



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina - DIMED

Corso di Laurea in

Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente: Chiarissimo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA

DETERMINAZIONE DI ETILGLUCURONIDE NEL CAPELLO:

VALIDAZIONE DI UN METODO IN HPLC-MS/MS

Relatore: Prof. Padoan Andrea

Correlatori: Dr. Artusi Carlo

Dr.ssa Marinova Mariela

Laureando: Zanella Sofia

Matricola: 1229892

Anno Accademico 2021 – 2022

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Alcool	1
1.1.1 Metabolismo alcool.....	3
1.1.2 Abuso di alcool	4
1.1.3 Monitoraggio dell'abuso alcolico	5
1.2 Etilglucuronide.....	7
1.2.1 Tecniche analitiche per la determinazione di EtG.....	11
1.3 Cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa	12
1.4 Validazione dei metodi analitici.....	15
1.4.1 Accreditoamento ISO 15189.....	15
1.4.2 Linee guida per la validazione analitica	16
1.4.3 Processo di validazione	17
2. SCOPO	23
3. MATERIALI E METODI	25
3.1 Campioni	25
3.2 Reagenti e dispositivi.....	25
3.3 Standard interno	26
3.4 Procedura di preparazione	26
3.4.1 Preparazione dei campioni	26
3.4.2 Preparazione controlli	27
3.4.3 Preparazione dei calibratori	28
3.5 Cromatografia liquida	28
3.6 Spettrometria di massa.....	28
3.7 Analisi statistica	30
3.8 Procedura di validazione del metodo	30
3.8.1 Limite di quantificazione.....	30
3.8.2 Curva di calibrazione e linearità	31
3.8.3 Precisione	31
3.8.4 Esattezza	31
3.8.5 Stabilità dei campioni processati	32
4 RISULTATI E DISCUSSIONE	33
4.1 Analisi cromatografica	33
4.2 Validazione del metodo	34
4.2.1 Limite di quantificazione	34

4.2.2 Curva di calibrazione e linearità	34
4.2.3 Precisione	36
4.2.4 Esattezza.....	36
4.2.5 Stabilità dei campioni processati	37
4.3 Studio sulla popolazione.....	38
5. CONCLUSIONI.....	43
6. BIBLIOGRAFIA	45

ABSTRACT

INTRODUZIONE: l'etilglucuronide (EtG) è un prodotto metabolico dell'alcool etilico, derivato dalla coniugazione dell'etanolo con acido glucuronato. Attualmente l'EtG viene misurato nelle urine per il monitoraggio dell'abuso alcolico cronico, ma presenta la limitazione di una ristretta finestra di rilevabilità. Data la necessità di una valutazione a lungo termine dei soggetti si è deciso di utilizzare la matrice pilifera.

SCOPO DELLO STUDIO: l'obiettivo di questa tesi è la validazione di un metodo HPLC accoppiato a spettrometria di massa presso l'UOC Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedale-Università di Padova.

MATERIALE E METODI: sono stati analizzati 60 campioni di pazienti provenienti dalla Commissione Patenti, precedentemente estratti e addizionati dello standard interno deuterato. La colonna cromatografica utilizzata è una C-18, 15 cm x 2,1 cm x 1,8 µm con una precolonna Atlantis Premier BEH C18 AX 2,5 µm - 2,1 x 5 mm (Waters), e le fasi mobili fornite dalla ditta Comedical. Lo strumento utilizzato è Acquity UPLC associato ad uno spettrometro di massa Xevo TQ-S Micro, entrambi della ditta Waters. Il processo di validazione ha incluso la valutazione di: precisione (intra- e inter-serie), esattezza, LLOQ, linearità e stabilità del prodotto estratto.

RISULTATI: la linearità è stata valutata su 5 punti di calibrazione range tra 5 e 300 pg/ng). Il limite di quantificazione è pari a 5 pg/ng. L'imprecisione intra- e inter-serie risultano con un CV% rispettivamente di 4,5% e 5,9%. Dalla valutazione della linearità si ottiene un R^2 medio=0,9993 (n=10) con bias <15%. L'esattezza valutata su tre campioni a concentrazione nota risulta del -11%, 0% e -9%. Le prove di stabilità, eseguite su tre campioni a concentrazioni diverse, riportano un bias % rispettivamente pari allo 6,2%, 0,9% e 0,9% dimostrando che l'etilglucuronide è un analita che rimane stabile per un mese se mantenuto a -20°C e fino a 5 giorni alla temperatura dell'autocampionatore (10°C).

CONCLUSIONI: è stato validato un metodo rapido, sensibile e accurato di HPLC-MS/MS per la determinazione dell'etilglucuronide nel capello. Questo permette la sua implementazione nelle analisi di conferma delle sostanze d'abuso eseguite dall'UOC Medicina di Laboratorio dell'Azienda-Ospedale di Padova.

1. INTRODUZIONE

1.1 Alcool

L'alcool (o etanolo) è la più antica e diffusa sostanza psicotropa d'abuso. Con il nome di alcool si indica comunemente l'alcool etilico o etanolo. Chimicamente esso appartiene alla categoria degli alcoli ed ha la composizione indicata dalla formula $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH}$. Si tratta di un liquido incolore, volatile e infiammabile, derivato dapprima dalla distillazione del vino e molto più tardi anche dalla distillazione di altre sostanze [1].

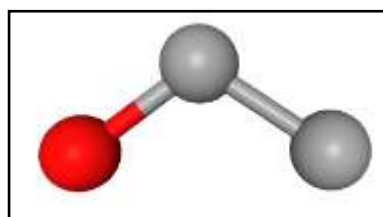


Figura 1. Struttura chimica dell'etanolo [2].

Il rapporto tra uomo e alcool risale a tempi antichissimi. Si ritiene che la prima bevanda alcolica con cui l'uomo sia entrato in contatto sia l'idromele circa 20.000 anni fa nel corso del Paleolitico superiore. Tuttavia, l'ampia diffusione delle bevande alcoliche avvenne durante il periodo neolitico (ca. 8000 a.C.). Infatti, insieme ad altre sostanze psicoattive veniva utilizzato nei riti propiziatori che precedevano le battute di caccia o le battaglie che gli uomini primitivi dovevano combattere.

Circa 3000 anni fa in Egitto c'era un ampio consumo a tutti i livelli sociali di vino e di birra, ottenuta facilmente a partire da pane d'orzo poco cotto, spesso come offerte sacrificali agli dei o medicinali per gli uomini. I primi problemi inerenti al consumo di alcol emergono già in questo periodo e, come si può leggere nella traduzione in inglese arcaico di un frammento di papiro, l'alcolismo rappresentava un problema sociale che coinvolgeva non solo l'alcolista, ma anche le persone che gli erano vicine [3].



Figura 2. Frammento di un papiro che invita a spronare i compagni a non bere, così da evitare sproloqui, incidenti e il forzato allontanamento dalle “birrerie”.

Contestualmente, testi babilonesi risalenti al III millennio a. C. denotano la presenza non solo di vino, ma anche di bevande inebrianti fabbricate mediante la fermentazione del miele, del grano, del succo della palma da datteri, ecc. Tuttavia, l'alcool come tale non veniva isolato, poiché non si conosceva la distillazione. I primi apparecchi per distillare furono scoperti dagli alchimisti greci alessandrini non prima del sec. I d. C., anche se si sa che essi non distillarono mai il vino [1].

Solo a partire dal XVII sec. d.C., i distillati, le bevande che oggi meglio conosciamo con il termine di superalcolici, vennero introdotti dall'uomo [4]. La patria di queste nuove tecniche di produzione fu l'Inghilterra proprio nel periodo della prima rivoluzione industriale, periodo durante il quale il consumo di alcolici cominciò ad essere considerato anche da altre prospettive, sia per il rapido incremento della sua diffusione (con un grosso significato economico), sia per i sempre più frequenti casi di morte alcol-correlata [3].

Nel 1788 il medico inglese Thomas Trotter in un suo libro espresse chiaramente il concetto che l'alcolismo era una malattia con effetti sulla psiche e sul fisico, concetto già descritto dall'americano Benjamin Rush che nel 1784 aveva pubblicato uno studio sugli effetti degli ardent spirits sul corpo umano, in cui affermava che l'abitudine al bere smodato era una malattia. Non si parlava però ancora espressamente di “alcolismo”. Per questa definizione bisognerà attendere degli anni, termine coniato nel 1849 e che divenne patrimonio comune di coloro che si occupano di problemi legati al consumo eccessivo di alcol [3].

1.1.1 Metabolismo alcool

L'alcol etilico, di solito assunto per via orale, viene assorbito rapidamente dallo stomaco e dal primo tratto dell'intestino per diffusione semplice.

Il tempo necessario per completare il processo di assorbimento varia da 2 a 6 ore, in funzione di fattori quali la presenza di cibo e di altri liquidi, il tempo impiegato per l'ingestione della bevanda, la variabilità biologica tra individui. L'alcol, vista la solubilità in acqua ed il basso peso molecolare, appena assorbito si distribuisce rapidamente in tutti i tessuti (nei quali non può tuttavia essere immagazzinato) e fluidi del corpo, superando anche la barriera encefalica e quella placentare. La massima concentrazione plasmatica viene raggiunta dopo circa 20 minuti dall'assunzione e la saliva e l'esperto seguono da vicino le variazioni dell'alcolemia, mentre le urine raggiungono un massimo con circa due ore di ritardo. Urine ed aria espirata rappresentano anche le principali vie di eliminazione dell'alcol e dei suoi prodotti di ossidazione [5].

Dopo l'assorbimento, nel fegato, l'etanolo va incontro a diverse vie metaboliche, ossidative e non. Viene prevalentemente metabolizzato (90-98 %) per via ossidativa, ad una velocità direttamente proporzionale al peso corporeo e costante nel tempo.

La reazione di ossidazione più importante avviene per azione dell'enzima alcol deidrogenasi con NAD come coenzima ed accettore di idrogeno e produzione di acetaldeide, trasformata poi in acetato. Un'altra via alternativa che ottiene il medesimo risultato è la via del MEOS, che consiste di alcune ossidasi, a funzione mista, associate al reticolo endoplasmatico liscio dell'epatocita, e che fa parte essenzialmente del sistema del citocromo P-450 [6].

In alternativa, quantità molto piccole di etanolo vengono coniugate con acido glucuronico, per opera di una delle glucuronil-transferasi microsomiali, che richiedono l'utilizzo di acido glucuronico in forma di UDPGA, o con acido solforico, per azione di solfotransferasi citoplasmatiche (reazioni di fase 2 della biotrasformazione dei farmaci). L'escrezione di questi prodotti è urinaria o biliare.

L'escrezione di alcol non modificato, di solito, interessa non più del 2% della quantità assunta ed avviene prevalentemente attraverso reni e polmoni, anche se piccole quantità si ritrovano anche nella saliva ed in altri liquidi organici [7].

Infine, recentemente alcuni autori hanno messo in evidenza l'importanza di una via metabolica non ossidativa. Questa prevede, con meccanismo non del tutto chiarito,

l'idrolisi dei trigliceridi con produzione di acidi grassi e successiva esterificazione con etanolo con produzione di esteri etilici degli acidi grassi (FAEE).

1.1.2 Abuso di alcool

Il consumo abituale di alcool è un fattore che impatta non solo sulla vita del singolo, ma anche notevolmente sulla comunità, sia da un punto di vista economico-sociale che del benessere.

Ad oggi l'etanolo è il terzo più importante fattore di rischio per malattia e morte prematura dopo il fumo e l'ipertensione, essendo ancor più rilevante dell'ipercolesterolemia e del sovrappeso. È responsabile di innumerevoli condizioni di malattia e infortunio e di diffusi danni sociali, mentali ed emotivi che causano enormi costi sociali, compresi criminalità e violenza in ambito familiare [8].

Se è vero che la percentuali dei consumatori giornalieri di bevande alcoliche è in diminuzione (dal 21,4% della popolazione di 11 anni e più nel 2016 al 20,2% nel 2019, secondo dati ISTAT), è in aumento la quota di quanti consumano alcol occasionalmente (dal 43,3% del 2016 raggiungendo il 46,6% del 2019) e quella di coloro che bevono alcolici fuori dai pasti (dal 26,1% del 2016 al 30,6% del 2019). Si stima che la percentuale di coloro che hanno consumato almeno una bevanda alcolica nell'anno 2019 sia pari al 66.8% della popolazione di 11 anni e più. [9]

Secondo quanto riportato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) relativamente al 2007, l'alcol è direttamente o indirettamente responsabile ogni anno di 1.8 milioni di morti. Di questi, il 32% corrisponde a traumi accidentali, il 13.7% ad altri traumi di varia origine mentre il 4.0% delle patologie sviluppate ogni anno globalmente è fatto risalire all'uso di alcol (in particolare il cancro esofageo ed epatico e la cirrosi epatica) [10].

Essendo in grado di indurre dipendenza, è considerato a tutti gli effetti una droga. Ciò nonostante, a differenza delle sostanze stupefacenti e psicotrope, normate dal DPR 309/90, integrato con la legge 49/2006, fino a circa 20 anni fa in Italia non si disponeva né di un'adeguata legislazione a riguardo, né di idonei provvedimenti istituzionali ed assistenziali. Questo aspetto è stato parzialmente superato dalla Legge Quadro 125/2001 (in materia di alcool e di problemi alcol-correlati), che disciplina tanto aspetti di ambito socio-sanitario, quali la prevenzione, la cura e il reinserimento sociale degli alcolodipendenti, quanto aspetti di ambito sociale, culturale ed economico,

quali la sicurezza del traffico stradale, la sicurezza sui luoghi di lavoro, la pubblicità, le modalità di vendita, etc. Inoltre, la legge quadro è stata integrata dalla Legge n. 120 del 29 Luglio 2010, che porta a modifiche agli articoli 186 e 187 e all'introduzione dell'articolo 186-bis del decreto legislativo n. 285 del 1992, in materia di guida sotto l'influenza dell'alcool e in stato di alterazione psicofisica per uso di sostanze stupefacenti, nonché di guida sotto l'influenza dell'alcool per conducenti di età inferiore a ventuno anni per i neopatentati e per chi esercita professionalmente l'attività di trasporto di persone o di cose [11].

Con la Legge 125/2001 si dispone l'abbassamento del tasso alcolemico legale dallo 0,8 allo 0,5 g/l, allineando l'Italia ai valori adottati nella maggior parte degli altri Paesi europei; per tassi alcolemici superiori a questo limite il soggetto viene considerato in stato di ebbrezza. Il test di accertamento del tasso alcolemico viene effettuato analizzando l'aria alveolare espirata tramite l'etilometro (impropriamente si parla di "test del palloncino"), strumento che valuta indirettamente la concentrazione di alcol nel sangue (alcolemia) [12]. Se il valore supera 0,5 g/L, ma rimane inferiore a 0,8 g/L, secondo l'articolo 186 del Codice della Strada (DL 30.4.1992 n.285 e successive modificazioni), la pena prevede una sanzione amministrativa del pagamento di una somma da euro 500 a euro 2.000 e la sospensione della patente di guida da tre a sei mesi [13]. Se il tasso alcolemico oscilla tra 0,8 e 1,5 g/L, il conducente viene punito con un'ammenda fino a 3200 €, l'arresto fino a sei mesi e la sospensione della patente per almeno sei mesi [14].

Se il tasso alcolemico supera 1.5 g/L la patente rimane sospesa a tempo indeterminato, fino a che il trasgressore non presenti il certificato della Commissione Medica Provinciale che lo dichiara idoneo alla guida ed esclude, attraverso un esame medico specialistico, che il conducente sia un alcolista cronico o abituale (in questo caso viene revocata la patente).

1.1.3 Monitoraggio dell'abuso alcolico

Nel mondo occidentale si sta osservando un forte aumento delle problematiche sanitarie legate all'eccessivo consumo di alcol. Statistiche correnti indicano che il 20-30% dei costi relativi alle cure sanitarie ed all'ospedalizzazione sono da attribuire all'abuso alcolico; anche il consumo pro capite è aumentato, tanto che potrebbe ipotizzarsi una diminuzione dell'aspettativa di vita nei paesi con più elevato consumo

di alcol [9]. I test di laboratorio proposti per il riconoscimento dell'abuso alcolico sono innumerevoli.

Gli esami più tradizionali, quali γ GT, AST, ALT ed MCV, alcolemia su siero, etanolo su urine, EtG urinario e CDT sono stati affiancati negli ultimi anni dalla determinazione sia in matrici convenzionali (sangue, urina), sia alternative (capelli, meconio), di prodotti minori del metabolismo non ossidativo dell'alcol, quali l'etilglucuronide (EtG), l'etilsolfato (EtS) e gli esteri etilici degli acidi grassi (FAEE) [15]. Poiché la positività a questi test è legata al tempo intercorso tra assunzione e prelievo, si possono distinguere marcatori di consumo acuto e di consumo cronico di alcol [10]. Ogni biomarcatore presenta dei vantaggi e degli svantaggi, legati soprattutto alla finestra di rilevabilità.

	Parametri	Materiale	Rilevabilità	Sensibilità (%)	Specificità	
Consumo cronico	CDT	Siero	2-3 settimane	60-80	Insieme: 80-90%	~ 95
	γ -GT	Siero	4-6 settimane	30-50		~ 75
	MCV	EDTA	3-4mesi	20-40	Elevata	80-90
	ALT AST	Siero	~ 1 mese	15-25		~ 50
	EtG	Capelli	Secondo la lunghezza dei capelli			~ 100
Consumo acuto	EtG	Urine	Fino a ca. 3 giorni, secondo la quantità di alcol consumata			
	Etanolo	Sangue, espirato, saliva, urine	Dipende dalla quantità di alcol consumata		~ 100	

Tabella 1. Principali marcatori di abuso alcolico [16].

Come si nota dalla tabella 1., ogni matrice presenta una propria finestra di rilevabilità a in seguito all'assunzione. Dopo l'ingestione, una sostanza è rilevabile nel sangue per alcune ore, poi nell'urina per alcuni giorni e infine nei capelli (se l'assunzione è sufficiente a permetterne l'incorporazione) fino a mesi di distanza. Anche l'analisi di metaboliti dell'alcool, come EtG ed EtS, sarà effettuata nel sangue o nel siero, se si vuole verificare l'esposizione nel momento immediatamente precedente il prelievo (o la morte, nel caso di indagine necroscopica), nell'urina e nei capelli, rispettivamente, se sono d'interesse i 2-3 giorni oppure i mesi precedenti il prelievo. [10]



Figura 3. Schema generico di rilevabilità di una sostanza in seguito all'assunzione.

1.2 Etilglucuronide

L'etilglucuronide (ethyl- β -D-glucuronide) è una molecola non volatile (PM 222 g/mol), polare, relativamente stabile, solubile in acqua, formata dalla coniugazione dell'etanolo con l'acido glucuronico tramite la mediazione delle UDP-glucuronil transferasi (UGT), una superfamiglia di enzimi altamente polimorfici. Sembrano esserci diverse isoforme delle UGT in grado di sintetizzare EtG, perciò differenze funzionali tra individui diversi non risultano in una distorsione del dato analitico. Di conseguenza, la mancanza in un individuo di una isoforma dell'enzima non fa supporre variazioni significative nella formazione di EtG. Dunque, individui appartenenti a etnie differenti sintetizzano molto probabilmente la stessa percentuale del composto in seguito all'assunzione di alcol. In generale, si stima che solo lo 0.02-0.06% dell'etanolo assunto sia trasformato in EtG [17].

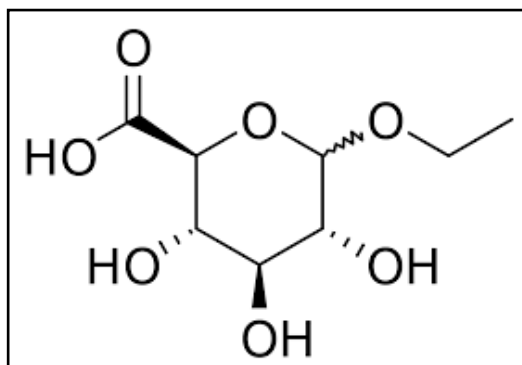


Figura 4. Struttura chimica dell'etilglucuronide.

Il metabolismo è principalmente epatico e la sua velocità è costante, indipendente dalla concentrazione ematica e direttamente proporzionale al peso, maggiore nel bevitore abituale rispetto all'occasionale, a causa dell'induzione enzimatica.

Per quanto riguarda l'eliminazione, essa avviene per via renale e per diffusione dal circolo sanguigno al bulbo pilifero, anche se in questo caso i meccanismi coinvolti rimangono poco chiari [18], consentendo l'incorporazione dell'etilglucuronide nel capello. Una volta incorporato rimane stabile nella matrice cheratinica per diverso tempo, da giorni fino a parecchi mesi. Pertanto un suo riscontro al di sopra di una stabilita concentrazione limite, consente di verificare una eventuale assunzione cronica.

Rispetto ad altri marcatori di abuso cronico di alcol utilizzati, quale CDT nel siero, l'EtG nei capelli si caratterizza per l'elevata specificità accompagnata da una elevatissima sensibilità analitica, come la probabilità di falsi negativi notevolmente più ridotta rispetto alla CDT. In quanto metaboliti diretti dell'alcol, tali molecole sono virtualmente dotate di specificità assoluta e si sono dimostrate particolarmente promettenti anche in termini di sensibilità.

Generalmente l'etilglucuronide è un prodotto metabolico che viene ricercato nelle urine dei soggetti in cura per alcolismo o a cui è stata ritirata la patente per guida in stato di ebbrezza. Questa metodologia comporta dei vantaggi, come il prelievo non invasivo e la possibilità di analizzare sostanze e metaboliti a diversi giorni dall'assunzione, tuttavia porta con sé anche diversi svantaggi, come la facile adulterazione, un'indicazione solo approssimativa sul momento di assunzione dell'alcol (finestra di sorveglianza massimo di 72 ore), la difficoltà nel monitoraggio cronico sia per motivi economici che organizzativi (i prelievi devono essere ripetuti ogni due settimane) e la probabile diminuzione dei livelli di EtG in campioni di urina in presenza di batteri con enzimi, quali β -glucuronidasi e solfatasi, in grado di scindere

l'etilglucuronide, se conservati a 22°C . Inoltre, la concentrazione di analita varia con lo stato fisiologico del soggetto (in caso di problemi renali viene escreto in minori quantità) e con la diuresi. Alcuni studi svedesi hanno dimostrato che in pazienti diabetici può verificarsi la fermentazione di glucosio a etanolo con conseguente neoformazione di EtG che porta inevitabilmente a risultati falsamente positivi [19].

Per questo motivo, negli ultimi anni si è rivolta l'attenzione verso una matrice innovativa. La matrice cheratinica presenta molti vantaggi di tipo pratico rispetto ad altri campioni biologici, e tra questi si enumerano la maggiore facilità di prelievo attuabile anche da personale non medico, la non invasività del campionamento, la facile conservazione del suddetto materiale, la stabilità intra-matrice degli analiti, di molto superiore rispetto agli altri campioni biologici, e la possibilità di ripetere il prelievo in caso di controversia. Inoltre consente di ampliare la finestra di sorveglianza, permettendo teoricamente di individuare non soltanto un abuso continuo recente, ma anche un abuso in tempi pregressi.

Al contrario dei parametri ematici ordinariamente utilizzati per questo tipo di diagnosi (quali le sopraccitate AST, ALT, GGT, CDT, MCV), l'etilglucuronide è, come già sottolineato, un marker diretto, quindi presente nel capello solo in seguito a un consumo di alcol.

I valori di etilglucuronide presente nel capello rispecchiano la quantità di alcool consumato, attraverso il quale è possibile suddividere la popolazione in diverse fasce. Grazie ai documenti di consensus del 2019 della SoTH, sono stati stabiliti dei specifici cut off per classificare un soggetto [20].

Una persona viene definita astemia se la quantità di alcool ingerita è nulla e l'EtG nel capello sarà assente o inferiore a 5 pg/mg in un segmento prossimale di capelli tra i 3 e i 6 cm. I bevitori occasionali assumono una quantità di alcol che permette loro di non incorrere in problemi di salute e la quantità di EtG presente sarà superiore ai 5 pg/ng, ma inferiore a 30pg/mg (consumo abituale, ma non cronico). Infine esistono i "forti" bevitori, ossia coloro che introducono una grande quantità di alcol occasionalmente o di quantità più limitate frequentemente caratterizzati dalla presenza di EtG nei capelli al di sopra del cut-off di 30 pg/mg (corrispondente o superiore a 4 unità standard/giorno, ≥ 60 grammi di alcol/die).

I cut off di 5 e 30 pg/mg sono stati proposti principalmente per distinguere i bevitori "sociali" [7], caratterizzati dal consumo di un numero di bevande alcoliche a settimana inferiore a 7 e non oltre 3 per occasione [11] , che non superano in media i 20 grammi

di etanolo/die, dai bevitori cronici, il cui introito di etanolo è superiore a 60 grammi al giorno [21]. È importante ricordare che una unità alcolica corrisponde a 12 grammi di alcol puro ed equivale a un bicchiere di vino (125 ml a 12°), una lattina di birra (330 ml a 4,5°) o un bicchierino di superalcolico (40 ml a 40°).

Nel 2004 Yegles et al. osservarono, analizzando capelli di 10 pazienti all'inizio di una terapia di riabilitazione alcolica, che non esiste una correlazione quantitativa tra i livelli di EtG nel capello con quelli degli esteri etilici degli acidi grassi (FAEE) che rappresentano un'altra famiglia di metaboliti diretti dell'etanolo [22].

In uno studio presentato al 44° Meeting del TIAFT "The International Association of Forensic Toxicologists" la ricerca dell'EtG nel capello venne messo a confronto con la valutazione della CDT nel siero, il test più usato fino ad oggi nella diagnosi da abuso cronico di alcol. I risultati ottenuti sui primi 37 soggetti analizzati, mostrarono che l'EtG ha una specificità adeguata e perfettamente sovrapponibile a quella della CDT, ma una sensibilità doppia [23].

Il gruppo del professor Wennig nel 2007 pubblicò due diversi articoli concernenti l'EtG nel capello. Nel primo studio si evidenziò come la concentrazione dell'EtG nel capello non è direttamente proporzionale ai livelli di melanina della matrice. Questo risultato è di notevole importanza perché sottolinea che l'EtG non è soggetto a bias di tipo etnico, come invece lo sono le più comuni droghe d'abuso ricercate nel capello [24].

Il secondo studio invece, dove si analizzò l'EtG nei capelli di 15 soggetti all'inizio di un trattamento di riabilitazione alcolica, confermò l'esistenza di una buona correlazione tra i livelli di etilglucuronide nei capelli con il consumo dichiarato di alcol, confermando così i risultati ottenuti in precedenza dal gruppo del professor Poletini nell'anno precedente [25].

È evidente che, sebbene tali studi siano da considerarsi ancora preliminari, la concordanza tra i risultati ottenuti in merito alla correlazione quantitativa tra EtG nei capelli e quantità di alcol assunta è senz'altro promettente nella prospettiva di definire valori di soglia di cut-off adatti a discriminare l'astemio dal bevitore moderato e il bevitore moderato da quello non moderato.

Per quanto riguarda le limitazioni dell'etilglucuronide, la più importante risultava essere l'interferenza data dall'utilizzo di cosmetici a base alcolica. Tuttavia, un recente studio ha dimostrato che nonostante 7 soggetti siano stati trattati per un mese con un prodotto con il 44.0% (vol%) di etanolo all'interno, i loro valori di EtG non hanno

risentito di variazioni [26]. Ad ogni modo, è ancora dibattuta l'influenza di trattamenti chimici e fisici quali decolorazioni, tinte e permanenti sulla concentrazione di EtG [20]. Alla luce di questi studi, è ragionevole affermare che l'etilglucuronide, essendo un prodotto metabolico diretto dell'etanolo, è un valido marker dotato di elevata specificità diagnostica per la rilevazione di uso o abuso alcolico nel breve (sangue/siero), medio (urina) e lungo (capelli) periodo. Le applicazioni più comuni nell'ambito medico-legale sono il monitoraggio di pazienti in trattamento per la dismissione, il monitoraggio di altri pazienti in astinenza da alcol (esempio: soggetto in lista d'attesa per trapianto epatico) e la verifica dell'idoneità alla guida [10].

In questo studio si è deciso di soffermarsi in particolare su quest'ultimo punto. Da dati ISTAT-ACI emerge che su un totale di 40310 incidenti con lesioni rilevati da Carabinieri e Polizia stradale nel 2020, 3692 presentavano uno dei conducenti dei veicoli coinvolti in stato di ebbrezza e in 1.391 si è rilevato l'effetto di stupefacenti. Perciò, nel complesso di tutti i casi rilevati il 9,2% e il 3,5% è correlato quindi, rispettivamente, ad alcol e droga, proporzioni in aumento rispetto al 2019, soprattutto per lo stato di ebbrezza alla guida (8,7% e 3,4%), seppure il periodo sia stato caratterizzato da una forte diminuzione degli incidenti e delle vittime.

Inoltre, è risultato in aumento l'esito positivo ai controlli eseguiti dalle Polizia Locali con etilometri o analoga strumentazione per rilevare uso di sostanze: rispettivamente l'8,3% dei controlli per alcool (era il 7,4%) e il 17,3% di quelli per droghe (era il 6,9%). L'incidentalità stradale correlata ad alcol e droga è dunque in aumento nel 2020 [27]. A fronte di questi dati è facile comprendere come sia necessario possedere un metodo analitico sensibile e specifico per monitorare nel lungo periodo coloro a cui è stata ritirata o sospesa la patente per guida in stato di ebbrezza, analogamente a quanto già è in uso per le sostanze d'abuso.

1.2.1 Tecniche analitiche per la determinazione di EtG

Per l'analisi dell'EtG sono stati riportati diversi metodi analitici, tra cui l'elettroforesi capillare (CZE), la gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS), la cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS) e l'immunometria (IA). [28] Ciascun metodo presenta punti di forza e di debolezza intrinseci in aree quali la specificità, la sensibilità, la complessità del saggio, il tempo di ciclo e il costo e/o la disponibilità della strumentazione [29].

1.3 Cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica utilizzata per identificare prodotti incogniti, per chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole e per determinazioni quantitative di composti noti. Permette di rilevare le molecole in base al loro rapporto massa/carica (m/z) e può essere utilizzata in vari campi che vanno dall'analisi farmaceutica alle applicazioni in campo forense. Con tale tecnica è possibile effettuare sia analisi qualitative che quantitative e, almeno dal punto di vista teorico, ogni molecola, poiché possiede una massa, può essere analizzata con uno spettrometro di massa, purché si ottengano i requisiti fondamentali per tale analisi, ossia che la molecola possa essere portata in fase gassosa, che possa essere ionizzata e che venga analizzata sotto vuoto spinto. Ogni spettrometro di massa è composto da sei parti fondamentali:

1. Sistema di introduzione del campione;
2. Sorgente (nella quale le molecole vengono ionizzate);
3. Analizzatore (in cui gli ioni formati dalla sorgente vengono separati in base al rapporto m/z);
4. Rivelatore (in cui il segnale di ogni m/z viene rivelato e amplificato);
5. Elaboratore (che permette la ricostruzione dello spettro finale);
6. Pompe da vuoto.

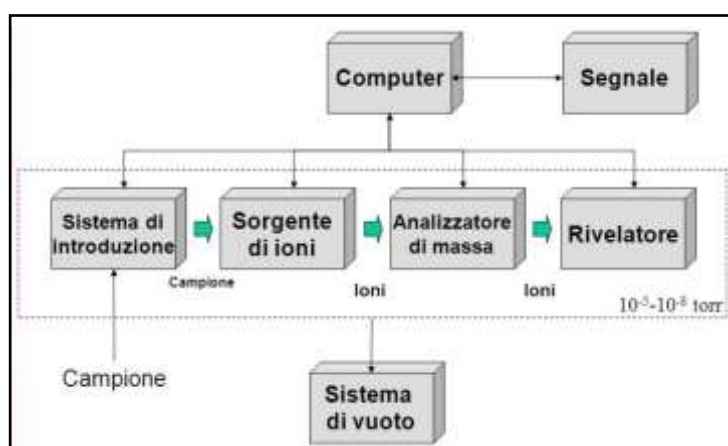


Figura 5. Schema a blocchi di uno spettrometro di massa.

Gli spettrometri di massa differiscono tra loro in potenzialità di analisi e costi, a seconda del tipo di sistema di introduzione del campione, di sorgente e di analizzatore con cui lo strumento è costruito. Ogni parte infatti influenza fortemente le potenzialità dello spettrometro di massa selezionando il tipo di molecole che possono essere

analizzate e le modalità con le quali il campione deve essere trattato prima di poter essere introdotto all'interno dello spettrometro. Parametri decisivi per la scelta dello spettrometro di massa da utilizzare sono le caratteristiche chimico-fisiche del campione da analizzare come ad esempio la termolabilità, la polarità, la capacità di ionizzazione e la volatilità [30].

Gli analizzatori utilizzati generalmente possono essere a settore, a trappola ionica o più frequentemente a quadrupolo. I rivelatori sono costituiti da fotomoltiplicatori in grado di amplificare il segnale degli ioni che impattano sulla loro superficie con un meccanismo a cascata. I più utilizzati sono quelli che utilizzano una sorgente Matrix Assisted Laser Ionization (MALDI) e quelli che utilizzano una sorgente Electron Spray Ionization (ESI), entrambi in grado, utilizzando tecniche di desorbimento, di analizzare molecole termolabili, polari ed in un vasto intervallo di massa. Gli strumenti con sorgente ESI vengono comunemente chiamati LC/MS poiché con tali strumenti è possibile introdurre il campione in sorgente direttamente in fase liquida. In questo modo è possibile utilizzare come sistema di introduzione del campione un sistema a cromatografia liquida HPLC in linea con lo spettrometro di massa.

In tale sorgente il campione viene portato in fase gassosa e ionizzato direttamente in sorgente facendolo passare attraverso un ago tenuto ad elevato potenziale elettrico; in questo modo si formerà una nebbia di goccioline cariche che man mano che il solvente evaporerà avranno una densità di carica superficiale maggiore, fino a quando tale densità sarà talmente elevata che la goccia esploderà emettendo analiti ionizzati in fase gassosa. Una cortina di gas, generalmente azoto posta perpendicolarmente al flusso di ioni, impedirà alle particelle neutre di entrare all'interno del sistema di rivelazione.

Tale tecnica è in grado di ionizzare le molecole a pressione atmosferica ed utilizza un sistema di vuoto a stadi che parte dall'analizzatore. La caratteristica di tale sorgente è quella di produrre ioni multicarica per cui se la molecola ha un alto peso molecolare, e diversi siti di protonazione, si presenterà nello spettro a vari rapporti m/z ognuno corrispondente ad un diverso grado di protonazione.

I meccanismi di desolvatazione, che avviene in una sorgente ESI, prevedono che le molecole vengano contemporaneamente ionizzate, desolvatate e portate in fase gassosa.

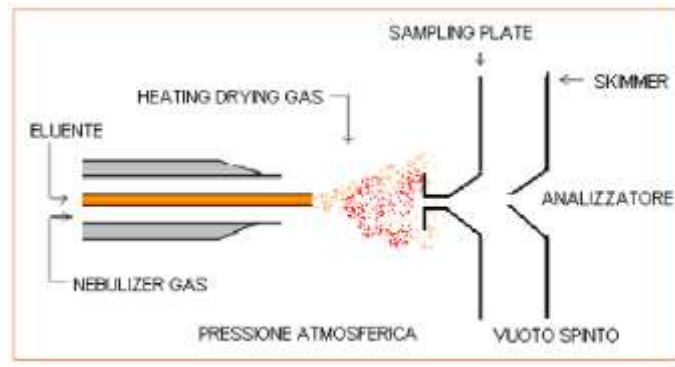


Figura 6. Meccanismo Electron Spray Ionization (ESI).

Un esempio di spettrometro di massa con sorgente ESI in grado di fornire un'energia di frammentazione ad un dato ione è il cosiddetto LC-MS/MS, dove l'analizzatore è costituito da una serie di quadrupoli, tale strumento prende il nome di strumento a triplo quadrupolo. Quando non si desidera frammentare la molecola che si sta analizzando i quadrupoli che costituiscono nel loro insieme l'analizzatore agiscono in maniera sincrona mandando direttamente gli ioni in uscita dalla sorgente al rivelatore in base al loro rapporto massa/carica; se invece si desidera frammentare lo ione che si sta analizzando, lo ione selezionato dal primo quadrupolo, entra all'interno della cella di collisione rappresentata dal secondo quadrupolo ed all'interno della quale viene immesso un gas, e, per collisione con il gas stesso, viene frammentato. I frammenti "figli" dello ione analizzato in uscita dalla cella di collisione, vengono rivelati dal terzo quadrupolo e inviati al detector. In questo modo si avrà uno spettro che rappresenta i prodotti di frammentazione dello ione selezionato [30].

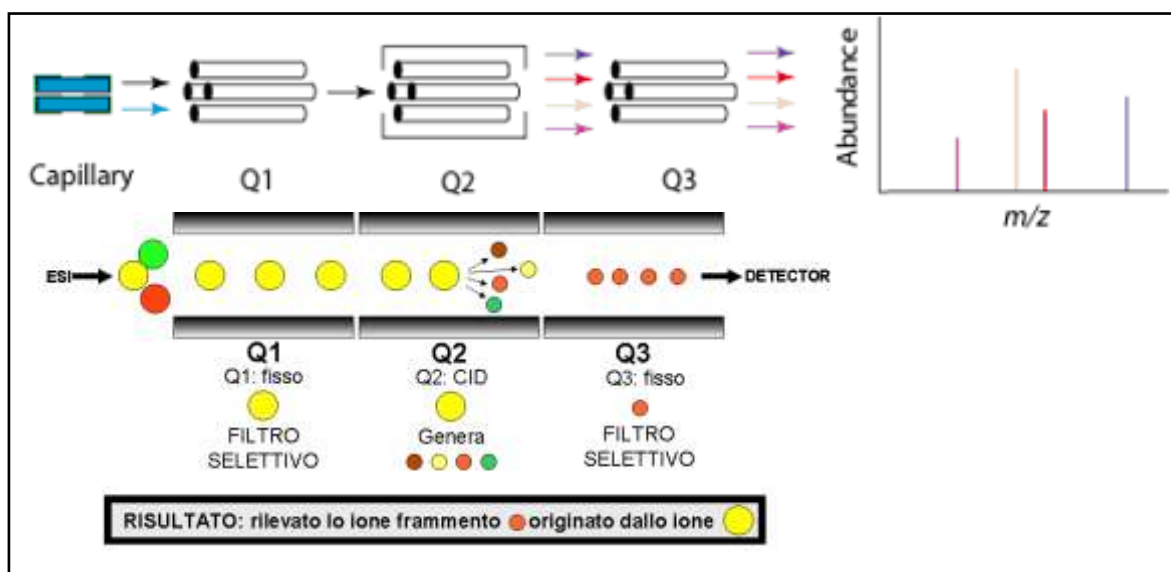


Figura 7. Schema di uno strumento a triplo quadrupolo.

1.4 Validazione dei metodi analitici

Ogni metodo analitico, sia esso nuovo o basato sulla letteratura scientifica deve essere validato completamente, in particolar modo per metodi usati nella pratica clinica. Lo scopo della validazione di un metodo è quello di dimostrare l'affidabilità di un metodo nella determinazione della concentrazione di un analita in una matrice biologica specifica.

Tutti i passaggi necessari per una completa validazione del metodo analitico devono fare riferimento alle attuali linee guida internazionali [31, 32, 33]

1.4.1 Accreditemento ISO 15189

Un passaggio fondamentale per una struttura sanitaria che vuole fare parte dell'Albo dei fornitori del Servizio Sanitario Regionale (e di conseguenza Nazionale) è l'accreditamento, ossia deve possedere requisiti che dimostrino l'elevato livello qualitativo della sua organizzazione e delle sue metodologie di lavoro e pertanto l'idoneità a erogare prestazioni sanitarie in nome e per conto del SSN.

La norma ISO 15189 è il documento di accreditamento di tutti i laboratori clinici (chimica clinica, istopatologia, microbiologia clinica, medicina trasfusionale), che include sia i requisiti dei sistemi di gestione per la qualità che gli specifici requisiti tecnici propri del settore considerato. Inoltre è lo strumento per armonizzare a livello internazionale i programmi di accreditamento dei laboratori clinici.

Ciò facilita lo scambio di esperienze ed il mutuo riconoscimento dell'accreditamento ottenuto in Paesi diversi. In questa norma sono presenti dei requisiti che il laboratorio deve soddisfare, essi sono divisi in 2 categorie: requisiti gestionali e requisiti tecnici.

Fanno parte dei requisiti gestionali tutti gli aspetti di management come controllo dei documenti, azioni preventive e correttive.

Nei requisiti tecnici, invece, sono inclusi i requisiti del personale, l'attrezzatura del laboratorio, i processi d'esame. Importanti per questo studio sono proprio questi ultimi nei quali rientrano selezione, verifica e validazione delle procedure d'esame.

La procedura di validazione deve essere applicata a:

- Tutte le procedure di analisi non validate dal produttore per l'uso previsto (metodi non CE-IVD);
- Metodi CE-IVD ma utilizzati al di fuori dell'uso previsto;

- Metodi CE-IVD ma modificati rispetto alla procedura validata dal produttore (per esempio uso di matrice diversa, differente trattamento pre-analitico del campione, ecc.);
- Metodi sviluppati/progettati internamente (home made);
- Metodi rilasciati solo per uso di ricerca (metodi Research Use Only, RUO)

1.4.2 Linee guida per la validazione analitica

Le attuali linee guida più adeguate per la validazione di un metodo analitico LC-MS/MS sono CLSI C62-A [31], FDA [32] ed EMA [33]. Inoltre, a livello nazionale la società di biochimica italiana (SIBIOC) ha di recente pubblicato delle raccomandazioni, a cui è possibile riferirsi. [34]. Per la determinazione della precisione, accuratezza e LLOQ per la procedura di la validazione è stata presa ispirazione da questi documenti.

	CLSI (C62-A)	FDA	EMA
Livelli di concentrazione	110% dell'LLMI 90% dell'LLMI (LLMI+ULMI)/2	LLOQ, Low, Medium, High.	LLOQ, Low, Medium, High.
Metodo	Eseguire 20 repliche e calcolare SD e % CV per ogni livello di concentrazione.	Eseguire almeno tre sedute analitiche indipendenti, quattro livelli QC per seduta e almeno cinque repliche per livello QC.	<u>Nella stessa serie:</u> analizzare almeno 5 repliche a ciascun livello del QC in ogni corsa analitica. <u>Tra serie:</u> analizzare ciascun livello di concentrazione QC in almeno 3 sedute analitiche in almeno due giorni diversi.
Criteri di accettabilità	CV \pm 15% tranne CV \pm 20% a LLOQ	CV \pm 15% tranne CV \pm 20% a LLOQ	CV \pm 15% tranne CV \pm 20% a LLOQ

Tabella 1. Confronto tra le diverse linee guida sulla precisione [31, 32, 33].

	CLSI (C62-A)	FDA	EMA
Metodo	Valutare almeno 40 campioni / analizzare materiali di riferimento in tre o cinque sedute diverse, con ciascun campione misurato in duplicato/ determinare la concentrazione di analita aggiunto con almeno 5 repliche.	Eseguire almeno tre sedute analitiche indipendenti, quattro livelli QC per seduta e almeno cinque repliche per livello QC	<u>Nella stessa serie:</u> analizzare almeno 5 repliche a ciascun livello del QC in ogni corsa analitica. <u>Tra serie:</u> analizzare ciascun livello di concentrazione QC in almeno 3 sedute analitiche in almeno due giorni diversi.
Criteri di accettabilità	Sono definiti in base alle variazioni biologiche, alle linee guida cliniche stabilite da gruppi di esperti e ai requisiti normativi locali o regionali.	Bias $\pm 15\%$ delle concentrazioni nominali, ad eccezione di Bias $\pm 20\%$ al LLOQ	L'accuratezza complessiva a ciascun livello di concentrazione deve essere compresa entro il $\pm 15\%$ delle concentrazioni teoriche, ad eccezione del LLOQ in cui il valore deve essere $\pm 20\%$.

Tabella 2. Confronto tra le diverse linee guida sull'accuratezza [31, 32, 33].

Lo scopo di queste guide è la globale armonizzazione, ossia appianare le differenze inter-laboratorio seguendo un processo di riconoscimento, comprensione e spiegazione delle differenze durante il percorso verso l'uniformità.

1.4.3 Processo di validazione

La validazione di una procedura analitica è la conferma, mediante l'apporto di evidenze oggettive, che i requisiti specifici per l'utilizzazione prevista siano soddisfatti. La validazione implica la valutazione delle caratteristiche di performance della procedura d'esame ritenute adeguate per lo scopo d'uso del test diagnostico.

Precisione

La precisione viene definita come il grado di concordanza fra misurazioni indipendenti di concentrazione di un analita in specifiche condizioni e viene espressa in termini di CV%. La precisione deve essere valutata sia nella stessa seduta analitica (precisione nella serie o ripetibilità) che tra sedute analitiche diverse (precisione tra le serie o riproducibilità). La ripetibilità di un metodo indica l'imprecisione di misurazioni indipendenti dello stesso analita nella stessa seduta, svolta dallo stesso operatore in

condizioni (quali temperature, reagenti, ecc.) uguali. La riproducibilità è una valutazione della precisione nel tempo, ed è consigliato utilizzare operatori, calibratori, reagenti differenti entro un arco temporale che non deve eccedere i 30 giorni per minimizzare gli effetti dovuti ad altre variabili nelle condizioni sperimentali [34].

I test sull'imprecisione devono considerare l'intero processo di analisi, dalla raccolta del campione e sua conservazione, alla preparazione (estrazione e purificazione) fino all'analisi strumentale. È possibile utilizzare materiali di controllo a più livelli di concentrazione, se disponibili in commercio, l'importante è che coprano l'intero intervallo di misurazione e, se previsto, dovrebbero includere un valore soglia o di decisione clinica. Nel caso in cui non sia possibile reperire concentrazioni elevate, si possono ottenere tramite l'aggiunta di standard puro, con una procedura definita "spiking" e il campione così trattato viene definito "spiked".

Le linee guida CLSI C62A indicano che la precisione deve essere valutata a tre diverse concentrazioni, inoltre per ogni concentrazione, si devono eseguire 20 repliche e calcolare SD e %CV. L'imprecisione viene espressa sotto forma di coefficiente di variazione percentuale (CV%), così determinato:

$$\%CV = (DS \text{ dalla media}/\text{media}) * 100$$

Tutte le linee guida concordano sui criteri di accettabilità, secondo i quali l'imprecisione di ciascuna concentrazione non deve superare il 15% di CV, tranne che per il LLMI (limite inferiore dell'intervallo di misurazione), per il quale è accettabile $\leq 20\%$. Valori superiori di imprecisione possono essere accettati o valori di imprecisione inferiore devono essere rispettati, qualora esistano documenti riconosciuti validi come linee guida locali o regionali o specifiche oppure da criteri universalmente riconosciuti basati sulla variabilità biologica [32, 33, 34, 35].

Esattezza

L'esattezza rappresenta il grado di concordanza tra il valore medio ottenuto a partire da diverse determinazioni dello stesso misurando e un valore di riferimento accettato (detto valore vero del misurando). Viene espressa come bias, ossia lo scostamento sistematico rispetto al valore vero. Differisce dall'accuratezza nel numero di misurazioni eseguite essendo essa valutata su una singola determinazione, e dal fatto che effettuando una media di misure si elimina il contributo nel bias dovuto all'imprecisione. Entrambe dipendono da quanto accurata è la scelta dei materiali di

calibrazione, la loro concentrazione e soprattutto dalla scelta della matrice che deve essere il più possibile commutabile con quella dei campioni reali. L'esattezza può essere valutata come bias utilizzando un materiale di riferimento certificato [come ad esempio i materiali certificati del National Institute of Standards & Technology (NIST)] oppure, se non disponibile, con materiali provenienti da valutazioni esterne di qualità che hanno un valore target assegnato con un metodo di riferimento standard. Nel caso in cui questi materiali non fossero a disposizione, è opportuno valutare il recupero percentuale mediante aggiunta degli analiti di interesse su campioni di bianco (matrice senza la presenza dell'analita). Il recupero è un parametro che indica la quantità di analita determinata da un metodo rispetto alla quantità totale e viene espresso come percentuale del rapporto tra la concentrazione aggiunta (nella fase di valutazione dello stesso) rispetto a quella misurata. La differenza tra il recupero ottimale (100%) e il valore misurato determina il valore di bias% da utilizzare per valutare l'esattezza del metodo. Il bias% per ogni misurazione deve essere inferiore al 15% per tutte le concentrazioni ad eccezione del LLOQ, in cui è accettabile un valore <20% [34].

Il bias viene così calcolato:

$$((\text{valore ottenuto} - \text{valore atteso}) / \text{valore atteso}) * 100$$

Linearità e curva di calibrazione

Ogni analita studiato necessita di una propria curva di calibrazione, che per essere tale deve coprire un intervallo di valori clinicamente utili. La curva dovrebbe essere preparata utilizzando un minimo di 6 livelli di concentrazione. Il primo punto della curva dovrebbe coincidere con il LLOQ, ma nel caso in cui la sensibilità del metodo permetta di avere un LLOQ basso, molto al di sotto del valore di interesse clinico, si può utilizzare un calibratore con valore più alto del LLOQ. È importante che nella curva sia presente un bianco (calibratore zero), solitamente non utilizzato per costruire la curva, che è costituito dalla matrice priva dell'analita, ma contenente lo standard interno.

Generalmente l'equazione che descrive meglio la curva di calibrazione è di tipo lineare, così definita: $Y = bX + a$. Per ogni curva di calibrazione con questa formula è raccomandato valutare il coefficiente di determinazione pendenza, intercetta e R^2 , indice che misura il legame tra la variabilità dei dati e la correttezza del modello statistico utilizzato. L'ideale è che R^2 sia superiore a 0.995.

Per valutare la linearità, si consiglia di misurare l'inaccuratezza dei calibratori confrontando i valori ottenuti per ogni punto con i valori teorici. La differenza tra i valori non dovrebbe superare il 15% tranne per il LOQ, in cui è accettabile il 20%.

Il materiale usato per preparare le curve dovrebbe essere del massimo grado di purezza disponibile. I calibratori possono essere acquistati dal commercio oppure preparati dal laboratorio. Se possibile, è raccomandato utilizzare materiali certificati (CRM o Certified Reference Materials), sciolti in matrice o in solvente, al fine di validare i calibratori utilizzati, in quanto il valore dei CRM è assegnato mediante metodi di riferimento. È possibile congelare le curve, a patto che sia dimostrata la stabilità dell'analita mediante appropriati studi di stabilità [34].

LLOQ

Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ o lower limit of quantification) viene definito come la più bassa concentrazione di analita che fornisce un picco identificabile con una precisione del 20% e inaccuratezza del 15% [34].

Stabilità dei campioni processati

Lo studio della stabilità è un passaggio essenziale al fine di garantire una corretta gestione di reagenti e campioni durante l'intero processo di analisi. Per questo, è necessario valutare ogni soluzione, reagente e campione durante tutte le fasi del processo, come raccolta (prelievo) dei campioni, stoccaggio dei campioni a breve e lungo termine, cicli di congelamento/scongelo e stoccaggio dopo processamento/estrazione. I parametri e le condizioni da valutare dovrebbero superare o al massimo coprire i normali tempi delle procedure di campionamento e analisi [34].

Per quanto riguarda la stabilità dopo processamento/estrazione (prima dell'analisi), lo studio viene solitamente condotto a 4-8 °C che è la classica temperatura di esercizio di un autocampionatore, per un minimo di 48 ore. Infatti, un campione può venire analizzato dopo un certo periodo di tempo, a causa del tempo di attesa dell'autocampionatore o per motivi che portino a posticipare l'analisi. Le temperature e il tempo possono essere variati secondo necessità del laboratorio stesso, ricordando che qualora sia prevista la conservazione previo congelamento, è necessario effettuare uno studio di stabilità sui cicli di congelamento/scongelo del campione processato/estratto.

La stabilità dovrebbe essere analizzata su 3 aliquote indipendenti di almeno 2 concentrazioni differenti dell'analita. Un campione viene considerato stabile in una specifica condizione valutata se la concentrazione media di ogni livello è entro $\pm 15\%$ della concentrazione determinata al tempo zero rispetto alla concentrazione media degli stessi livelli preparati con reattivi freschi [34].

2. SCOPO

L'obiettivo di questa tesi è la validazione di un nuovo metodo analitico basato sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC-MS/MS) caratterizzato da prestazioni analitiche tali da poter essere applicato ai fini tossicologici per il monitoraggio a lungo termine dei soggetti bevitori cronici tramite la determinazione di etilglucuronide nella matrice pilifera.

Le varie limitazioni legate alla matrice urinaria (finestra di rilevabilità, alterazione dei livelli di EtG, etc.) non consentono un monitoraggio nel lungo periodo (in termini di mesi) dei soggetti bevitori definiti cronici e sono facilmente eludibili (ad esempio smettendo di assumere alcool due/tre giorni prima del test). A seguito di queste considerazioni, è emersa la necessità di avere una matrice che consenta un controllo nel lungo periodo e che sia difficilmente adulterabile, come la matrice pilifera.

Inoltre, la metodica di riferimento nell'ambito medico-legale per l'analisi di conferma di sostanze d'abuso è la cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa. Per questi motivi, è stato validato un metodo in HPLC-MS/MS per la ricerca di etilglucuronide nel capello.

Il metodo analitico validato è stato applicato ad una popolazione di soggetti proveniente dalla Commissione Patenti, risultati negativi allo screening tossicologico per la maggior parte delle sostanze d'abuso (amfetamine, ecstasy, cocaina, THC, metadone e buprenorfina) al fine di verificare che effettivamente si astenessero dall'uso cronico di alcool grazie alla finestra temporale più ampia dell'etilglucuronide nella matrice pilifera.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campioni

I campioni selezionati provengono dalla Commissione Patenti, ricevuti nella finestra temporale compresa tra novembre 2020 e maggio 2022, per un totale di 60. I campioni provengono dalla zona nucale di soggetti di qualsiasi sesso ed età, purché maggiorenni, e la loro lunghezza è compresa tra i 3 e i 4 cm. Il prelievo dei campioni è stato effettuato da personale specializzato e conservati a temperatura ambiente ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) in fogli alluminio all'interno di idonei contenitori.

3.2 Reagenti e dispositivi

- Metanolo Hypergrade for LC-MS LiChrosolv (Merk, Germania);
- Diclorometano per HPLC stabilizzato con 30-50 ppm di 2-metil-2-butene (Carlo Erba, Italia);
- Acqua distillata milliQ (Millipore, USA);
- Reattivo M3 (M3 Reagent, reagente di estrazione, Comedical, Italia);
- Standard Interno (SI) (IDS2 EtG Hair, Comedical, Italia);
- Controllo positivo (CTRL EtG CONTROL, Comedical, Italia);
- Controllo Negativo, campione di capelli autentico negativo per morfina, monoacetilmorfina, codeina, benzoilecgonina, cocaina, cocaetilene, metadone, amfetamina, metamfetamina, MDMA, MDA, MDEA, $\Delta 9$ tetraidrocannabinolo, CBD, CBN, buprenorfina, norbuprenorfina, clobazam, ketamina, nor-ketamina ed etilglucuronide (CTRL NEG multiCONTROL, Comedical, Italia);
- Set di calibratori (CAL M3 EtG CALIBRATORS, Comedical, Italia);
- Fasi Mobili A1-B2 (Comedical, Italia);
- Provette per idrolisi a temperatura controllata in vetro borosilicato con tappo di chiusura a vite a tenuta ermetica, fondo arrotondato – capacità 10 ml (Comedical, Italia);
- Vials trasparenti (Agilent Technologies, USA);
- Forbice in acciaio inox, a punte acute per il prelievo e lo sminuzzamento del campione, lunghezza 170 mm (Comedical, Italia);
- Pipette da 100, 500, 1000 e 5000 μL (Eppendorf, Germania);
- Puntali relativi alle pipette (Eppendorf, Germania);
- Pipetta ripetitiva (Eppendorf, Germania);
- Pipetta Pasteur in vetro con tettarella;
- Pipette graduate in vetro da 10 ml;
- Propipetta (detta anche palla di Peleo o porcellino);
- Becher in vetro;
- Thermoblock per idrolisi a temperatura controllata (Comedical, Italia);
- Bilancia analitica di precisione (portata 110 g, 0,1 mg/divisione) (Mettler Toledo, USA);

- Precolonna Atlantis Premier BEH C18 AX 2,5 μm - 2,1 x 5 mm (Waters, USA);
- Colonna Atlantis Premier BEH C18 AX 2,5 μm - 2,1 x 5 mm (Waters, USA).

3.3 Standard interno

Lo standard interno utilizzato è l'etilglucuronato-D5, in cui 5 atomi di idrogeno sono stati sostituiti dal deuterio, isotopo stabile dell'idrogeno. In questo modo la molecola deuterata è strutturalmente identica alla molecola di etilglucuronide, da cui si discosta solo per il peso molecolare. Lo standard interno deve essere aggiunto ad ogni campione, controllo e calibratore e lo scopo è quello di eliminare l'inaccuratezza dovuta alla preparazione del campione e all'analisi strumentale assumendo che un errore compiuto sull'analita venga compiuto anche sullo standard interno. La quantità di SI da aggiungere è stata determinata dalla ditta ed è pari a 5 μl di SI puro per campione. Tuttavia, poiché non era possibile aggiungere con adeguata precisione lo standard interno con una pipetta ripetitiva, è stato deciso in accordo con la ditta Comedical di diluirlo in acqua distillata Millipore 1:4 (500 μl di SI e 1500 μl di acqua), aggiungendo poi 20 μl di questa soluzione per ogni campione.

3.4 Procedura di preparazione

Il metodo di preparazione dei campioni utilizzato è descritto dettagliatamente nella procedura operativa fornita dalla ditta produttrice. Il metodo di conferma "E direct" sviluppato dalla ditta Comedical può essere utilizzato sia per finalità cliniche che forensi ed è stato studiato per essere applicato principalmente alla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa in tandem (LC-MS/MS, UPLC-MS/MS). La preparazione dei campioni e dei controlli prevede l'idrolisi con il reattivo M3 e la successiva iniezione diretta del surnatante in UPLC-MS/MS. A differenza dei campioni, che dopo lo sminuzzamento subiscono un lavaggio, i controlli, sia positivo che negativo, sono già pronti all'uso (già sminuzzati e lavati).

3.4.1 Preparazione dei campioni

- Sminuzzare una ciocca di capelli, di lunghezza desiderabile compresa tra i 3 e i 3,5 cm, fino ad ottenere frammenti di 2-3 mm. In questa fase è importante non polverizzare i capelli poiché renderebbe difficile, se non impossibile, il passo successivo, la pesata;

- Utilizzando una bilancia analitica di precisione e provette in vetro con tappo a vite, pesare 65 mg di capelli per campione e numerarlo.
- Versare metanolo e diclorometano in due becher distinti, da cui verranno prelevati con una pipetta graduata in vetro. Distribuire prima 4 ml di metanolo per ogni provetta, lasciare agire un minuto agitando il fondo. Successivamente, prelevare il liquido poggiando la pipetta Pasteur sul fondo, precedentemente numerata. Aggiungere ai capelli 4 ml di diclorometano e lasciarlo agire per qualche secondo, per poi eliminarlo con la medesima pipetta Pasteur.
- Lasciare asciugare i capelli senza tappo a temperatura ambiente per una notte o in stufa a 50°C per alcune ore.
- Utilizzando delle nuove provette con tappo a vite, numerate nello stesso modo, pesare 25 mg ($\pm 0,02$) di capelli già lavati.
- Accendere il Thermoblock e impostare una temperatura di 100°, scongelare lo SI e rimuovere dal frigo il reagente M3.
- Utilizzando una pipetta ripetitiva prima aggiungere 500 μ l di reagente M3 con puntale da 5 ml (minimo erogabile: 100 μ l) per ciascun campione e poi 20 μ l di SI interno diluito 1:4 con puntale da 500 μ l (minimo erogabile: 10 μ l).
- Chiudere accuratamente il tappo a vite e riporre i campioni nel Thermoblock, quando questo ha raggiunto la temperatura impostata.
- Agitare il fondo della provetta e controllare che il tappo sia chiuso correttamente ogni 20 minuti.
- Dopo un'ora, spegnere il Thermoblock e lasciar raffreddare i campioni a temperatura ambiente.
- Centrifugare le provette a 3000 rpm per 5 minuti.
- Aspirare il surnatante con una micropipetta da 1000 μ l e trasferirlo in vials di vetro precedentemente numerate.
- Inserire le vials nel campionatore dell'analizzatore e iniettare direttamente in LC-MS/MS.

3.4.2 Preparazione controlli

Poiché i controlli sono costituiti da capelli già sminuzzati e lavati, è sufficiente pesare 25 mg di ogni controllo in una provetta di vetro tappo a vite. L'estrazione segue la medesima procedura dei campioni.

3.4.3 Preparazione dei calibratori

I calibratori si presentano sotto forma di flaconi, non di matrice cheratinica. Perciò, è necessario pesare 25 mg di controllo negativo per ogni punto di calibrazione (5 livelli), a cui poi aggiungere 500 µl di calibratore, 20 µl di standard interno e non i 500 µl di reattivo M3. L'estrazione avviene nello stesso modo di campioni e controlli (1 ora a 100°C).

3.5 Cromatografia liquida

La strumentazione HPLC utilizzata è Acquity UPLC della ditta Waters. La colonna è Atlantis Premier BEH C18 AX 2,5 µm - 2,1 x 5 mm (Waters, ISA), che presenta una precolonna Atlantis Premier BEH C18 AX 2,5 µm - 2,1 x 5 mm. (Waters,USA). Le fasi mobili utilizzate sono A1 e B1, fornite dalla ditta Comedical.

Il valore di pressione ottenuto alle condizioni iniziali oscilla tra 3800 e 4100 psi, corrispondenti a 263-283 bar a 0,4mL/min di flusso. Il tempo di una corsa analitica (per campione) è di 8 minuti. L'eluizione avviene secondo il seguente gradiente:

Pompa binaria			
Tempo min	Flusso ml/min	Fase A %	Fase B %
0.00	0.400	90.0%	10.0%
2.00	0.400	90.0%	10.0%
3.50	0.400	0.0%	100.0%
4.00	0.400	0.0%	100.0%
4.05	0.400	90.0%	10.0%
8.00	0.400	90.0%	10.0%

Tabella 3. Tabella relativa la gradiente.

Il tempo di acquisizione della massa è stato impostato tra il minuto 1,35 e il minuto 1,85.

3.6 Spettrometria di massa

Lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo accoppiato all'HPLC è Xevo TQ-S Micro (Waters, USA). Lo spettrometro di massa è interfacciato all'HPLC tramite sorgente Electron Spray Ionization (ESI).

Metodo di ionizzazione	ESI -
Temperatura colonna	50°C
Flusso	0,4 ml/minuto
Temperatura autocampionatore	10 °C
Volume di iniezione	4 µl
Temperatura di desolvatazione	650°C
Temperatura del cono	650°C
Flusso del gas di desolvatazione	1200 L/h

Tabella 4. Parametri strumentali dello spettrometro di massa.

L'analisi viene effettuata in modalità MRM (multiple reaction monitoring) in modo da monitorare le transizioni dell'analita e dello standard interno (carichi negativamente) rispetto allo ione figlio più intenso generato a seguito della frammentazione.

Il peso molecolare dell'etilglucuronide è 222.19 g/mol, mentre quello dello standard è 227 g/mol. Poiché si verifica una ionizzazione in negativo, al primo quadrupolo l'etilglucuronide e il suo standard interno perdono un protone, raggiungendo così una massa su carica pari rispettivamente a 221 e 226 [35]. Successivamente, la molecola viene frammentata nel secondo quadrupolo per essere poi nuovamente analizzata e rilevata. I frammenti importanti al fine di rilevare la presenza dell'EtG e quantificarlo sono 84 m/z, 85 m/z e 75 m/z.

- 85 m/z viene utilizzato come qualifier, serve cioè per rilevare la presenza di etilglucuronide;
- 75 m/z viene usato come quantifier, per determinare la quantità di EtG presente all'interno del campione. Si preferisce all'85, poiché è più abbondante.

Il motivo per cui non si utilizza un solo frammento sia per qualificare che per quantificare è la minore specificità di quest'ultimo metodo. Infatti, possiamo essere maggiormente sicuri che la sostanza rilevata sia proprio etilglucuronide solo e soltanto se presenta tutti e due i frammenti, che derivano dal precursore di m/Z pari a 221.

Nonostante lo standard interno abbia lo stesso frammento qualifier dell'EtG, lo strumento è in grado di distinguerli grazie al differente precursore (226-221).

Perciò, le transizioni selezionate per effettuare la determinazione dell'etilglucuronide sono: per l'etilglucuronide 221→85 m/z e per l'etilglucuronide deuterato, utilizzato come standard interno, 226→85 m/z.

3.7 Analisi statistica

Per la statistica descrittiva sono state calcolate sia media e deviazione standard che mediana e 25°, 75° e 97.5° percentile. Poiché alcuni valori di EtG risultavano inferiori al limite di quantificazione (LLOQ) del metodo analitico (5 pg/ng), tutti i valori al di sotto di questo cut-off sono stati trasformati nel valore $5/\sqrt{2}$, in accordo con quanto descritto in letteratura per la gestione di dati appartenenti a distribuzioni "left-censored" [36]. I dati ottenuti sono stati analizzati con Analye-it® for Windows, v 2.07, (Ltd, Leeds, UK).

3.8 Procedura di validazione del metodo

Per attuare la validazione del metodo sono state consultate e adattate le principali linee guida alle condizioni dello studio. Infatti, il materiale in possesso non è sempre stato sufficiente allo scopo, perciò si è dovuto cercare di ottenere il miglior risultato con le risorse a disposizione. Sono stati valutati i principali e più significativi parametri di validazioni per metodi LC-MS/MS come suggerito dalle principali linee guida (vedi paragrafo 1.4). Di seguito viene riportato come è stato valutato ogni singolo parametro di validazione.

3.8.1 Limite di quantificazione

Per la determinazione del LLOQ è stato diluito 1:6 un campione certificato che presentava una concentrazione iniziale di etilglucuronide pari a 30 pg/ng in modo tale da ottenere la concentrazione che rappresenta il limite più basso per determinare un'astinenza da alcool (5 pg/ng). Al fine di determinare i valori di bias e CV%, 10 aliquote indipendenti del campione sono state iniettate all'interno della stessa corsa.

3.8.2 Curva di calibrazione e linearità

La curva di calibrazione fornita dalla ditta produttrice copre un intervallo da 15 pg/ng a 300 pg/ng, con il primo calibratore che funge da bianco (blank; matrice priva di analita, ma contenente lo standard interno). Idealmente il calibratore più basso dovrebbe essere il valore del LLOQ. Il CAL 5 rappresenta il valore più elevato di quantificazione.

Per valutare la linearità del metodo analitico sviluppato sono stati estratti i dati dalle varie sedute analitiche eseguite. In particolare, sono state selezionate le prime 10 sedute analitiche eseguite in un intervallo di tempo di 20 giorni.

3.8.3 Precisione

Al fine di valutare la precisione, le linee guida indicherebbero l'utilizzo di almeno 3 livelli differenti di concentrazione in quantità tale necessaria ad effettuare tutte le replicate previste (almeno 55 prove). Tale quantità di materiale non è disponibile e nemmeno facilmente ottenibile. Non è infatti percorribile la strategia di creare un pool di campioni di capelli da soggetti differenti in quanto per semplice sminuzzamento e mescolamento non sarebbe possibile ottenere un campione omogeneo. Si è così stabilito di valutare il solo controllo positivo dello stesso lotto, in quanto il materiale è disponibile in quantità sufficiente ad eseguire tutte le prove necessarie. Per la valutazione della precisione sono state effettuate le seguenti prove:

- Imprecisione nella stessa serie (intra-analitica): il controllo positivo è stato analizzato 10 volte all'interno di una seduta analitica. Sono stati poi calcolati media, DS e CV%.
- Imprecisione tra le serie (inter-analitica): si è deciso di analizzare in triplicato per 15 sedute indipendenti il controllo positivo in una finestra di tempo di due mesi. Sono stati quindi calcolati media, DS e CV%.

3.8.4 Esattezza

L'esattezza è stata valutata su 3 campioni di un materiale fornito da un provider di programma di valutazione esterna di qualità (VEQ) a concentrazione nota. Sono state analizzate 5 aliquote di ogni campione nella stessa serie per 3 sedute diverse nell'arco di 3 giorni. Il bias % è stato poi calcolato sia intra-serie che inter-serie.

3.8.5 Stabilità dei campioni processati

Per lo studio sulla re-iniezione dei campioni già processati sono stati analizzati tre campioni, con concentrazioni differenti: il primo pari a 3 volte l'LLOQ, il secondo con concentrazione vicina al cut off di 30 pg/ng e l'ultimo un valore molto maggiore rispetto al cut off superiore. Questi campioni sono stati scongelati dopo un mese a -20°C e ri-iniettati in una prima corsa. Successivamente sono stati mantenuti a 10°C nell'autocampionatore per essere re-iniettati a distanza di 24, 48 ore e 96. Sono stati calcolati valori di bias% seguendo questa formula:

$$[(\text{valore misurato} - \text{valore atteso})/\text{valore atteso}] * 100$$

I valori di bias% sono stati calcolati sulla base dei valori misurati nella prima seduta prima del congelamento (valore atteso).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Analisi cromatografica

Dal tracciato cromatografico ottenuto mediante il gradiente di eluizione descritto nel paragrafo 3.5 si ottengono due picchi: l'etilglucuronide e l'etilglucuronide deuterato, rispettivamente al tempo 2.34/2.36 e 2.31/2.33. L'area del picco è in relazione alla concentrazione. Come esempi, sono stati presi due valori a concentrazioni di cut off.

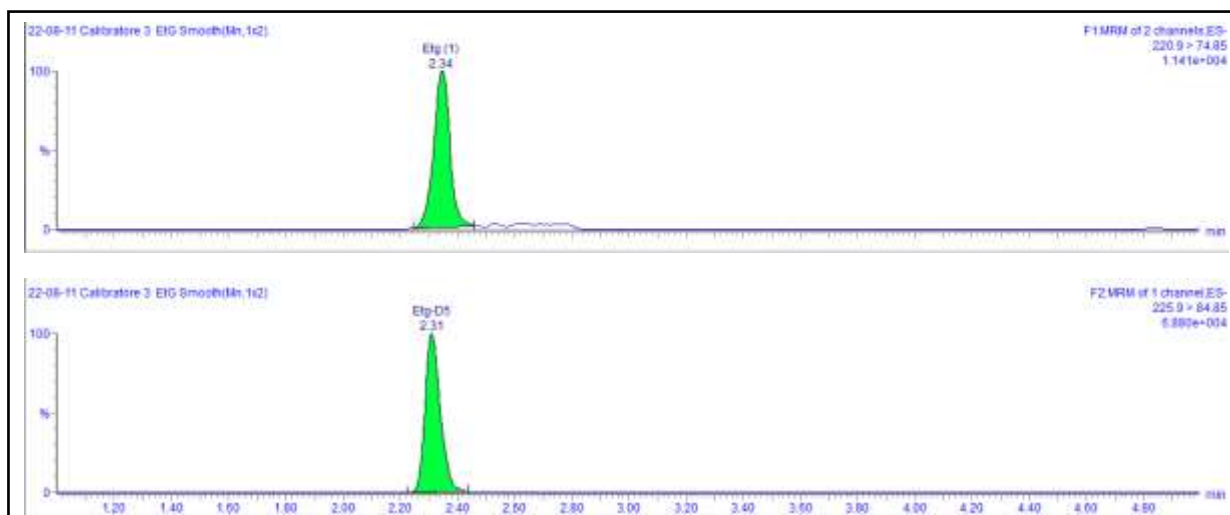


Figura 9. Cromatogramma di un calibratore a 30 pg/ng.

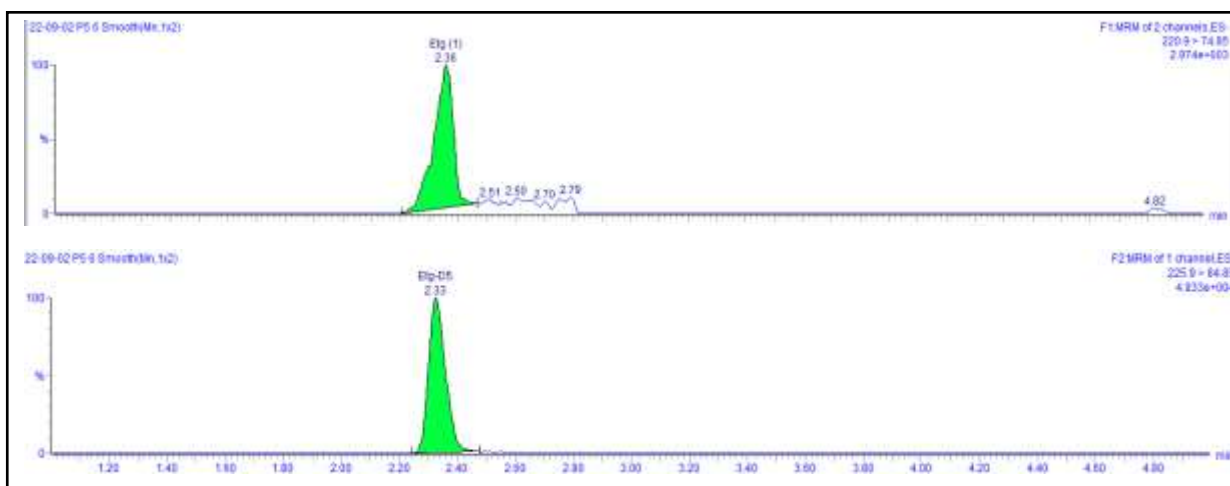


Figura 10. Cromatogramma del campione per LLOQ a 5 pg/ng.

I primi due grafici mostrano cromatogrammi di un calibratore a concentrazione di etilglucuronide di 30 pg/ng (in alto) e il relativo SI (in basso). Nella figura 10. è possibile vedere i cromatogrammi di una delle aliquote iniettate per calcolare l'LLOQ, a concentrazione 5 pg/ng, e del relativo SI. Il picco si ben distingue dal rumore di fondo.

4.2 Validazione del metodo

4.2.1 Limite di quantificazione

Il limite di quantificazione (LLOQ) risulta di 5 pg/ng. I parametri di precisione e accuratezza rientrano nei criteri di accettabilità, poiché i valori di bias e imprecisione sono inferiori al 20%, pari rispettivamente a -10% e 12%. Al di sotto di 5 pg/ng un soggetto viene considerato non bevitore, in quanto è il cut off indicato dalle linee guida [34].

Campione	Valore misurato	Campione	Valore misurato
1.1	5	1.6	5
1.2	4	1.7	4
1.3	5	1.8	4
1.4	4	1.9	5
1.5	5	1.10	4

Tabella 5. Prove eseguite per determinare LLOQ.

Campione 1	Media	DS	CV%	Valore atteso	Bias%
	4.5	0.527	11.712	5	-10

Tabella 6. Elaborazione dei risultati delle prove.

4.2.2 Curva di calibrazione e linearità

La linearità del metodo consente di poter quantificare concentrazioni di etilglucuronide tra 5 e 300 ng/pg. Mentre il calibratore 1 è pari al bianco, il calibratore 2 ha un concentrazione tre volte maggiore rispetto al LLOQ (15 pg/ng) e il calibratore 3 è pari al valore di cut off che distingue un bevitore cronico da uno occasionale. Il CAL5 ha concentrazione pari a 300 pg/ng, che rappresenta la maggior concentrazione misurabile in quanto non è stata valutata la linearità a valori superiori. La curva di calibrazione che ne deriva ha i seguenti punti:

- CAL 1: 0 pg/ng
- CAL 2: 15 pg/ng
- CAL 3: 30 pg/ng
- CAL 4: 90 pg/ng
- CAL 5: 300 pg/ng

La linearità è stata calcolata su dieci sedute analitiche e rispetta il criterio secondo il quale più del 75% dei punti deve rimanere sotto un bias del 15%. Inoltre, sempre queste 10 sedute possedevano un R² uguale o superiore a 0.995.

N° corsa	Bias CAL 2	Bias CAL 3	Bias CAL 4	Bias CAL 5	R ²
1	0%	0%	-11%	0%	0,9975
2	0%	0%	-4%	0%	0,9996
3	13%	7%	-6%	0%	0,9991
4	0%	-7%	2%	0%	0,9999
5	7%	10%	-6%	0%	0,9993
6	-13%	-3%	4%	0%	0,9995
7	13%	10%	-8%	1%	0,9988
8	0%	0%	0%	0%	0,9999
9	-7%	13%	-4%	0%	0,9994
10	-7%	-3%	-1%	0%	0,9998

Tabella 5. Bias % di ogni livello di calibrazione su 10 prove.

Di seguito un esempio di grafico della curva di calibrazione:

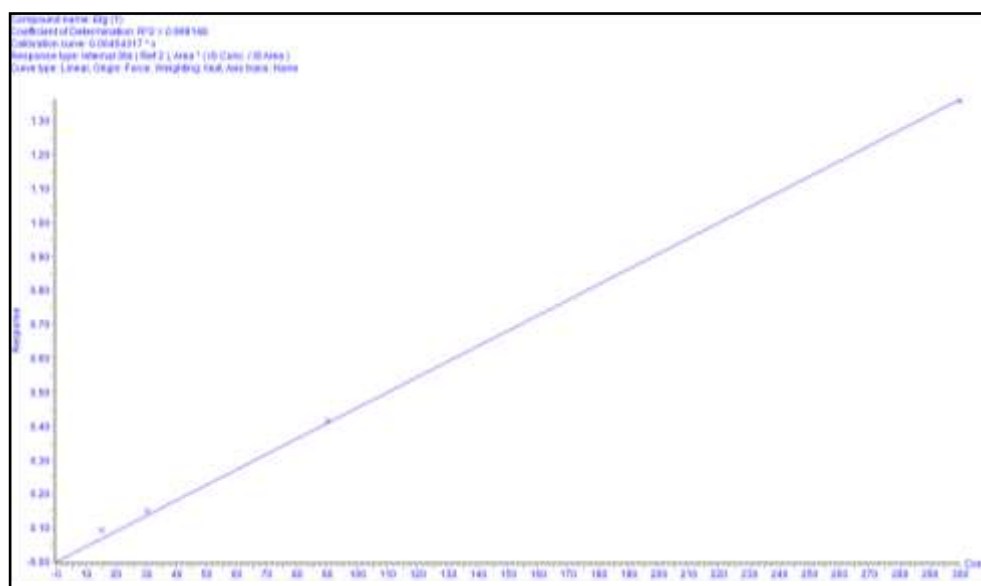


Figura 11. Curva di calibrazione.

4.2.3 Precisione

Le precisione nella serie e tra le serie forniscono valori di CV% pari a 4,5% (n=10) e 5,1% (n=45) rispettivamente, all'unica concentrazione valutata, con un valore atteso di 75 ng/pg.

	Mean	SD	CV%
CTRL POS	73.30	3.30	4.50%

Tabella 6. Valori di precisione intra-serie.

	Mean	SD	CV%
CTRL POS	71.02	4.21	5.93%

Tabella 7. Valori di precisione inter-serie.

4.2.4 Esattezza

L'esattezza è stata calcolata su tre campioni a concentrazione nota inviati dalla ditta Comedical, analizzati cinque volte nella stessa corsa, per tre sedute analitiche diverse nell'arco di una settimana.

	Campione 1	Campione 2	Campione 5
1.1	64	31	40
1.2	61	31	41
1.3	60	32	41
1.4	60	32	39
1.5	61	31	40
2.1	54	33	43
2.2	54	30	40
2.3	52	32	40
2.4	51	31	40
2.5	51	27	40

3.1	59	27	40
3.2	62	27	43
3.3	66	27	42
3.4	59	27	43
3.5	56	27	43

Tabella 8. Valori di esattezza ottenuti nelle tre sedute.

	Campione 1	Campione 2	Campione 3
Media	58	30	41
Valore atteso	65	30	45
Bias	-11%	0%	-9%

Tabella 9. Elaborazione dati sull'esattezza.

I tre valori di bias rientrano nei criteri di accettabilità indicati nelle linee guida (vedi paragrafo 3.8.4), poiché rimangono all'interno del 15% di variazione. Il campione 1 ha risentito di un calo di segnale durante la seconda seduta analitica (2.1-2.5) che ha aumentato la variabilità del risultato, ma nonostante ciò l'esattezza risulta comunque accettabile. Complessivamente il metodo ha soddisfatto i criteri di accettabilità per l'esattezza, arrivando ad ottenere un bias dello 0% nel secondo campione.

4.2.5 Stabilità dei campioni processati

La stabilità è stata valutata dopo un mese, conservando i campioni congelati a -20°C, e nei giorni successivi fino a massimo 96 ore (dal lunedì al venerdì) mantenendo le vials nell'autocampionatore. I risultati dimostrano che l'etilglucuronide è un metabolita stabile a diverse condizioni ambientali, sia a temperatura di conservazione che a temperatura ambiente, e per diverso tempo (un mese a -20°C e 5 giorni a 10°C). Infatti, il bias percentuale dei tre campioni risulta inferiore al 15% come previsto dalle linee guida (vedi paragrafo 3.8.5). Il bias del secondo e del terzo campione (P2-P3) sono prossimi allo zero, dimostrando che il metabolita non si degrada e che il valore vicino al cut-off rimane affidabile anche dopo diverso tempo.

Campione	Valore atteso	Ore 0	Ore 24	Ore 48	Ore 96
P1	16	17	17	16	18
P2	29	29	29	29	30
P3	85	86	86	86	85

Tabella 10. Valori di stabilità nelle diverse giornate valutate.

Campione	Bias%
P1	6,2%
P2	0.9%
P3	0.9%

Tabella 11. Bias % dei valori di stabilità.

4.3 Studio sulla popolazione

Sample	Conc. pg/ng	Sample	Conc. pg/ng	Sample	Conc. pg/ng	Sample	Conc. pg/ng
P1	<5	P16	20	P31	<5	P46	<5
P2	45	P17	<5	P32	122	P47	15
P3	<5	P18	<5	P33	9	P48	<5
P4	12	P19	41	P34	80	P49	13
P5	54	P20	10	P35	<5	P50	<5
P6	17	P21	36	P36	101	P51	15
P7	30	P22	45	P37	9	P52	<5
P8	40	P23	<5	P38	10	P53	10
P9	<5	P24	20	P39	425	P54	27
P10	27	P25	28	P40	<5	P55	<5
P11	315	P26	124	P41\	<5	P56	<5
P12	7	P27	226	P42	<5	P57	<5
P13	38	P28	33	P43	172	P58	29

P14	21	P29	15	P44	<5	P59	85
P15	<5	P30	18	P45	11	P60	<5

Tabella 12. Valori dei campioni ottenuti.

Dai dati ottenuti, è emerso che la mediana dei valori è pari a 14 pg/ng (range interquartile: 5-36.5), che denota un consumo occasionale di alcool. Ciò significa che, nonostante a questi pazienti sia stata ritirata la patente e sia stata imposta loro l'astensione da sostanze d'abuso e dal consumo di alcool, la maggior parte di essi consuma abitualmente un moderata quantità d'alcool e non rispetta l'astinenza.

Al fine di ricavare dei dati utilizzabili, si è deciso di sostituire tutti i valori inferiori a 5 (i quali si trovano al di sotto del limite di quantificazione e di cui non è possibile determinare il reale valore) con il valore $5/\sqrt{2}$. Inoltre, si è scelto di fare riferimento alla mediana anziché media e deviazione standard, poiché la media non è utilizzabile in quanto la distribuzione non è gaussiana e ci sono molti outliers (mean = 40.5 e SD = 75.7).

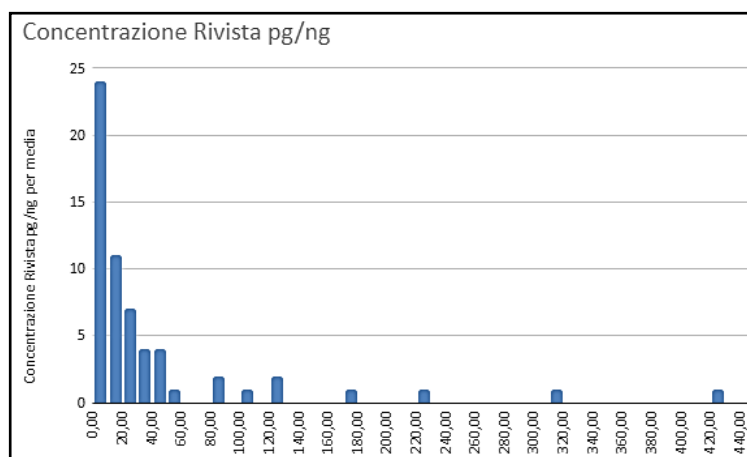


Figura 11. Grafico della distribuzione dei dati. I valori inferiori a 5 pg/ng (LLOQ) sono stati trasformati secondo quanto specificato nei materiali e metodi.

Come già evidenziato dai dati, dal grafico (Figura 11.) è possibile notare che la maggior parte dei soggetti presenta una concentrazione di etilglucuronide sotto il limite per l'abuso alcolico, in particolare anche sotto il cut off per l'astinenza (5 pg/ng). Poiché il 75° percentile della distribuzione dei risultati è superiore al limite per determinare l'abuso alcolico (30 pg/ng), si deduce che una cospicua parte dei soggetti beve abitualmente.

Inoltre, sono presenti degli outliers con valori molto elevati, tra cui un campione in particolare che risulta anche sopra il limite superiore di quantificazione (ULOQ). In questo caso il campione è stato diluito 1:2 con il controllo negativo per etilglucuronide per far rientrare il risultato nella linearità del metodo.

Mediana	14
25° percentile	5
75° percentile	36.5
97.5° percentile	272.72

Tabella 13. Valori di mediana e percentili dei dati.

Per integrare lo studio e confermare l'effettiva utilità dell'etilglucuronide su matrice pilifera, abbiamo deciso di verificare eventuali esiti della ricerca di etanolo ed etilglucuronide urinari contestuali e precedenti alla data di prelievo del capello.

Campione	Concentrazione etilglucuronide	Etanolo-EtG urinari e data	Data prelievo
P2	45 pg/ng	Negativi dal 29/06 al 08/7/21	15/07/2021
P5	54 pg/ng	Alcool negativo dal 05/07 al 14/07/22 EtG positivo (582 µg/L e 190 µg/L il 07 e 05/07/22)	05/08/2022
P7	30 pg/ng	Negativi al 02/09/2021	31/08/2021
P8	40 pg/ng	Negativi dal 02/03 al 02/09/2021	24/08/2021
P19	41 pg/ng	Negativi dal 19/10 al 28/10/2021	28/10/2021
P21	36 pg/ng	Negativi da 09/11/21 in poi	11/11/2021
P22	45 pg/ng	Negativi dal 23/11 al 02/12/2021	25/11/2021
P26	124 pg/ng	Negativi dal 01/03 al 10/03/2022	03/03/2022

P27	226 pg/ng	Negativi dal 15/02 al 24/02/2022	17/02/2022
P28	33 pg/ng	Negativi dal 15/02 al 24/02/2022	17/02/2022
P32	122 pg/ng	Negativi dal 15/02 al 23/03/2022	22/03/2022
P34	80 pg/ng	Negativi dal 22/03 al 31/03/2022	24/03/2022
P36	101 pg/ng	Negativi dal 26/10/21 al 19/05/2022	12/05/2022
P39	425 pg/ng	Negativi dal 13/04 al 26/10/21 Positivi il 28/10/21	18/05/2022
P43	172 pg/ng	Negativi dal 18/05 al 31/05/2021	18/05/2021
P59	85 pg/ng	Negativi dal 03/11 al 12/11/2020	12/11/2020

Tabella 14. Dati raccolti su pregressi risultati di EtG e/o etanolo in matrice urinaria.

Come è possibile vedere dalla tabella 14., il capello consente di ottenere una finestra di rilevabilità molto maggiore rispetto alle urine. Infatti, possiamo vedere che l'esito delle urine dei campioni risulta negativo, in contrasto con il risultato sul capello, in alcuni casi (P27, P39 e P43) fortemente positivo. Questo dimostra che la determinazione dell'etilglucuronide nella matrice pilifera è in grado di colmare le lacune lasciate dalla matrice urinaria e di integrare più informazioni.

5. CONCLUSIONI

Il metodo validato consente di determinare l'etilglucuronide su matrice pilifera fino a concentrazioni minime di 5 pg/ng (cut off che discrimina l'astinenza dal consumo sociale di alcool). Inoltre, consente di ottenere risultati in breve tempo, prevedendo una rapida e semplice estrazione degli analiti dalla matrice cheratinica, attraverso il reattivo fornito dall'azienda produttrice.

Il processo di estrazione in sé impiega un'ora e mezza, a cui è necessario aggiungere il tempo preliminare per pesare e lavare i campioni prima della processazione.

L'analisi prevede una separazione cromatografica selettiva e in tempi contenuti con una rilevazione specifica e accurata in spettrometria di massa a triplo quadrupolo (corsa analitica di 8 minuti che garantisce che il batch sia concluso in 3-4 ore, inclusi manutenzione quotidiana e tempo di attivazione del sistema).

Un vantaggio di questo metodo è sicuramente il fatto di non richiedere una più laboriosa purificazione del campione che consisteva in una precipitazione liquido-liquido, prevista invece nella procedura precedente.

Il metodo analitico è stato validato garantendo prestazioni analitiche quali sensibilità, specificità, selettività, precisione e accuratezza, rientrando nei criteri di accettabilità delle linee guida descritte nel processo di validazione (paragrafo 1.3.3). Grazie a queste prove il metodo potrà essere presto introdotto nella routine della UOC Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedale-Università di Padova al fine di poter fornire uno strumento analitico-diagnostico per il monitoraggio dell'abuso alcolico e potrà essere accreditato in quanto soddisfa pienamente i requisiti richiesti dalla norma ISO 15189.

È necessario specificare che i valori di etilglucuronide nella matrice pilifera devono essere accompagnati anche da valori di CDT, etilglucuronide e alcool nelle urine per ottenere un quadro completo del monitoraggio dell'abuso alcolico.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Sessa L., "ALCOOL", in *Enciclopedia Italiana Treccani*, 1929.
- [2] PubChem, "Ethanol", in "*National Center for Biotechnology Information (NCBI)*", 16 Settembre 2004.
- [3] Ceccanti M., Romeo M., Fiorentino D., "Alcol e donna: aspetti clinici", Istituto Superiore di Sanità, 2004.
- [4] Segnini D., "La singolare storia dell'alcol" in "La dispoli Cerveteri", 29 Aprile 2007.
- [5] Lodi F., "Alcol Etilico", in *Tossicologia Forense e Chimica Tossicologica*, Milano, Ed. Cortina, 1982, pp. p. 309-324..
- [6] Hathaway D.E., "Kinetic considerations", in *Molecular Aspects of Toxicology*, London, Royal Society of Chemistry, 1984, pp. p. 164-165.
- [7] Walsham N., Sherwood R., "Ethyl glucuronide", *Annals Clinical Biochem*, vol. 49, p. 110–117, 2012.
- [8] Anderson P., Gual A., Colom J., "Alcol e primary health care: linee guida", *Salute e Territorio*, vol. 155, pp. 77-84, 2006.
- [9] ISTAT, "*Il consumo di alcol in Italia*", 2020.
- [10] Morini L., Politi L., "Marcatori diagnostici dell'abuso alcolico", in *Convegno SIBIOC*, 2021.
- [11] *Legge 29 Luglio 2010 n. 120 - sulla sicurezza stradale*, Italia, 2010.
- [12] Ferrara SD, "Sunshine I: Liquidi Volatili Tossici" in "*II Laboratorio di Farmacologia e Tossicologia Clinica*", Torino, Ed Med Scient, 1989, pp. 79-84.
- [13] Articolo 186, Decreto Legislativo n. 285, 30 aprile 1992.
- [14] "Automobile Club Italia", ACI, 2012.
- [15] BIOS-LCR, "I biomarcatori di abuso alcolico", 27 Settembre 2013.
- [16] Mäder R., Ridinger M., "Rilevabilità dell'alcol / Biomarcatori dell'alcolismo", *Praxis Suchtmedizin Schweiz*, 07 Settembre 2020.
- [17] Crunelle CL., Yegles M., Van Nuijs A., Covaci A., De Doncker M., Maudens K., Sabbe B., Dom G., Lambert W., Michielsen P., Neels H., "Hair ethyl glucuronide levels as a marker for alcohol use and abuse: A review of the current state of the art", 1 Gennaio 2014.

- [18] Fritz P., Balikova M. A., "State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse", *Pubmed*, vol. 370, no. 1-2, pp. 17-49, Agosto 2006.
- [19] Bianchi V., Arfini C., "Identificazione precoce dell'abuso di alcol: utilizzo dei biomarcatori emergenti in differenti matrici biologiche", *Working Paper of Public Health*, no. 15, 2012.
- [20] "Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption.", in *SoHT*, 2019.
- [21] Landmark Recovery, "Social Drinking vs. Binge Drinking", 22 Maggio 2018. Available: <https://landmarkrecovery.com/social-drinking-vs-binge-drinking/>.
- [22] Yegles M., Labarthe A., Auwärter V., Hartwig S., Vater H., Wennig R., Pragst F., "Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers", *Forensic Science International*, vol. 145, no. 2-3, pp. 167-173, 29 Ottobre 2004.
- [23] Poletti A., Morini L., Stramesi C., Politi L., "Sensitivity and selectivity of ethyl glucuronide in hair as a marker of chronic alcohol use: Preliminary results", in *44th Meeting of the International Association of Forensic Toxicology (TIAFT)*, Ljubljana, Slovenia, 2006.
- [24] Appenzeller B. MR, Agirman R. Neuberg P., Yegles M. e. Wennig R., "Ethyl glucuronide concentration in hair is not influenced by pigmentation", *Alcohol and Alcoholism*, vol. 42, no. 4, pp. 326-327, 21 Maggio 2007.
- [25] Appenzeller B. MR, Agirman R. Neuberg P., Yegles M. e. Wennig R., "Segmental determination of ethyl glucuronide in hair: A pilot study", *Forensic Science International*, vol. 173, no. 2, pp. 87-92, 20 Dicembre 2007.
- [26] Martins Ferreira L., Binz T. Yegles M., "The influence of ethanol containing cosmetics on ethyl glucuronide concentration in hair", *Forensic Science International*, vol. 218, no. 1-3, pp. 123-125, 10 Maggio 2012.
- [27] ISTAT, "INCIDENTI STRADALI", 2020.
- [28] Palmer R. B., "A review of the use of ethyl glucuronide as a marker for ethanol consumption in forensic and clinical medicine", *Seminars in Diagnostic Pathology*, vol. 26, no. 1, pp. 18-27, 1 Febbraio 2009.
- [29] Biondi A., Freni F., Carelli C., Moretti M., Morini L., "Ethyl glucuronide hair testing: A review", *Forensic Science International*, vol. 300, pp. 106-119, 2019.
- [30] Casella M., Federici G., *Sviluppo di un metodo per il dosaggio plasmatico del busulfano mediante HPLC-ESIMS/ MS in studi di farmacocinetica su pazienti talassemici*, Roma: Università Degli Studi di Roma "Tor Vergata", facoltà di medicina, 2010.

- [31] Clinical and laboratory Standard Institute (CLSI), *Liquid chromatography-mass spectrometry methods; approved guidelines*, vol. 34, 2014.
- [32] Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), *Bioanalytical method validation; guidance for industry*, 2018.
- [33] European Medicines Agency (EMA), *ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and*, 2022, pp. 1-45.
- [34] D'Avolio A., Cantù M., Gervasoni J. "Validazione dei metodi quantitativi bioanalitici in spettrometria di massa: regole e protocolli sperimentali", in *Convegno SIBIOC*, 2018.
- [35] PubChem, "Ethyl glucuronide", National Library of Medicine - National Center for Biotechnology Information, 04 Dicembre 2004. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-glucuronide>.
- [36] Padoan A., Basso D., La Malfa M., Zambon C.F., Aiyetan P., Zhang H., Di Chiara A., Pavanello G., Bellocco R., Chan W. D., Plebani M. "Reproducibility in urine peptidome profiling using MALDI-TOF", *Proteomics*, vol. 15, no. 9, pp. 1476-1485, Maggio 2015.
- [37] "Consensus for the Use of Alcohol Markers in Hair for Assessment of both Abstinence and Chronic Excessive Alcohol Consumption", in *SOHT-GTFI*, 2013.
- [38] Kintz P., "Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption", in *Forensic Sci Int*, 2012.