

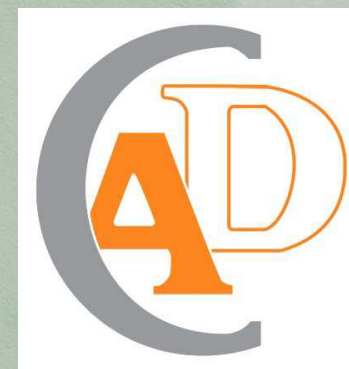
Reggio Calabria, 31 Maggio 2014

XVI Congresso Nazionale dei Chimici

**Chimica, Tossicologia
ed Antidoping –
La nuova sfida**

Marco Vincenti, Alberto Salomone,
Valentina Pirro

**Nuovi scenari per la valutazione
dell'abuso alcolico**



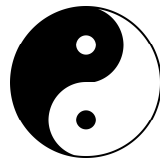


Workplace Drug Testing

Obiettivo:

verificare che i lavoratori addetti a mansioni che comportano rischi per soggetti terzi non siano consumatori abituali o cronici di sostanze stupefacenti e non svolgano la propria mansione sotto l'effetto dell'alcol o non abbiano forme di dipendenza da tali sostanze.

Minimizzare i costi



Massimizzare l'efficienza

Modifica del concetto di screening

“SCREENING” nel mondo del lavoro

Commisurare gli strumenti accertativi ai rischi che la mansione comporta per i terzi (insegnante vs. autista di scuolabus) in relazione al rapporto costo/beneficio e all'incidenza percentuale del rischio

Di quali soggetti stiamo parlando?

- Lavoratori a basso rischio?*
- Lavoratori ad alto rischio (autisti, piloti)?*
- Soggetti a cui è stata ritirata la patente di guida?*
- Pazienti in cura presso i SerD?*



- *Valutare attraverso i parametri di **sensibilità e specificità** la percentuale di falsi positivi e falsi negativi che lo screening comporta*
- *Accettare il rischio di non riuscire a riconoscere tutti i consumatori problematici di alcol e/o di sostanze stupefacenti*



“CONFERMA” nel mondo del lavoro

Allontanamento dalla mansione lavorativa

Sospensione della patente di guida

Concessione del porto d'armi



*Utilizzare **SEMPRE** gli strumenti accertativi più efficaci a riconoscere inequivocabilmente il consumo di sostanze stupefacenti e/o il consumo problematico di alcol*

***NON** accettare il rischio di non riconoscere tutti i consumatori problematici di alcol*

Quali violazioni della libertà individuale ?

Principi inderogabili

**Principi derogabili solo in circostanze eccezionali
(perquisizioni, intercettazioni, limitazioni)**

Principi derogabili per giusta causa
(autisti, carrellisti: vantaggi superano svantaggi)
→ efficienza come “necessità”
→ limitazioni di libertà e privacy “accettabili”

Principi derogabili su base routinaria
(automobilisti: etilometro, campioni di saliva)

Principi derogabili su base volontaria
(adesione ad un protocollo terapeutico)



Abuso cronico di alcol

Biomarcatori indiretti (AST, ALT, γ -GT, MCV, CDT)

Forte variabilità biologica

Danno epatico a seguito
del consumo di alcol



patologie epatiche, uso / abuso di
farmaci e droghe illecite



Indagine retrospettiva a breve termine

Determinazione semplice, veloce
economica, automatizzata



Protocolli standard e valori di cut-off condivisi: **NO / SI'**

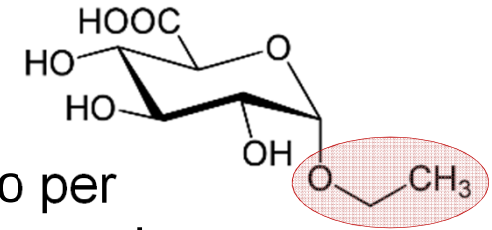
Sensibilità e specificità diverse, ma individualmente poco performanti

V. Pirro, V. Valente, P. Oliveri, A. De Bernardis, A. Salomone, M. Vincenti, Chemometric evaluation of nine alcohol biomarkers on a large population of clinically-classified subjects: prevalence of ethyl glucuronide concentration in hair for confirmatory classification, *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, **2011**, 401, 2153-2164.

Biomarcatori diretti (EtG, FAEES)

Ethyl glucuronide →

metabolita diretto dell'etanolo per
coniugazione con l'acido glucuronico



FAEEs →

metaboliti diretti dell'etanolo per reazione con
acidi grassi liberi

Correlazione diretta con la quantità di alcol assunta

sangue
urina
matrice cheratinica

Determinazione in matrice cheratinica per indagini retrospettive a lungo termine (per EtG: sensibilità 96% e specificità 99%)

Elevate sensibilità, specificità e
accuratezza diagnostica



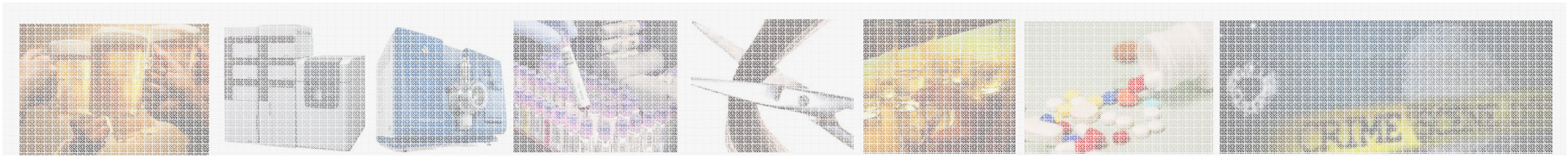
rispondono direttamente alla
quantità di alcol assunta

Procedure analitiche complesse in GC-MS(/MS) o (U)HPLC – MS/MS

Determinazione su matrici biologiche non-convenzionali.
Studio dei possibili fattori di bias:

Es. trattamenti cosmetici forti e ripetuti





Protocolli standard
e valori di cut-off
condivisi



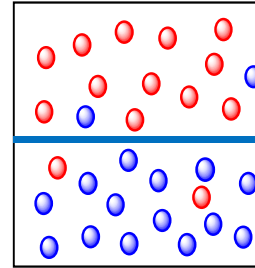
*“The cut-off for **EtG in hair** strongly suggesting chronic excessive alcohol consumption is proposed at **30 pg/mg** scalp hair, measured in 0-3 cm (up 0-6 cm) proximal segment”*

*“The cut-off for the sum of the four **fatty acid esters in hair** to strongly support chronic excessive alcohol consumption is proposed at **0.5 ng/mg** scalp hair, measured in 0-3 cm proximal segment. If the 0-6 cm proximal segment is used the proposed cut-off is 1.0 ng/mg scalp hair”*

*“**EtG** should be the first choice in abstinence assessment. A **concentration ≤ 7 pg/mg** EtG in the 0-3 up to 0-6 cm proximal scalp hair segment is not in contradiction to the self-reported abstinence of a person during the corresponding time period before sampling”*

Identificazione degli abusatori cronici

Approccio tradizionale univariato



Heavy
drinkers

Non-
abusers

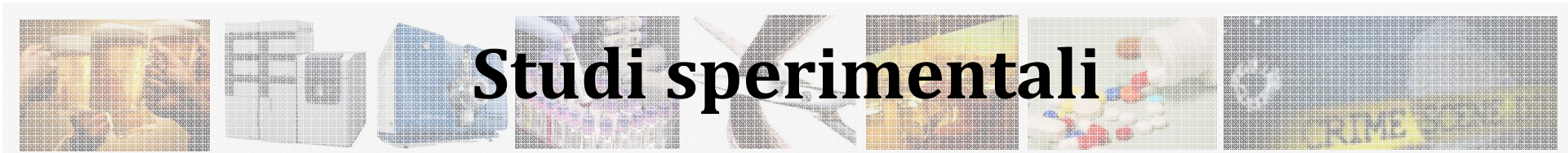
Sensibilità =
$$\frac{\text{esito: veri positivi (> cut-off)}}{\text{numero totale abusatori cronici}}$$

Specificità =
$$\frac{\text{esito: veri negativi (< cut-off)}}{\text{numero totale di non-abusatori}}$$

**variando il
valore del
cut-off**

**ROC curve
analysis**

Area under the curve (AUC) Misura sperimentale accuratezza del test
=



Studi sperimentali

Diagnosi di abuso alcolico cronico

“Chemometric evaluation of nine alcohol biomarkers in a large population of clinically-classified subjects: pre-eminence of ethyl glucuronide concentration in hair for confirmatory classification”

*Pirro V, Valente V, Oliveri P, De Bernardis A, Salomone A, Vincenti M.
Analytical Bioanalytical Chemistry 2011 October; 401(7): 2153-2164.*

“A study of distribution of ethyl glucuronide in different keratin matrices”

*Pirro V, Di Corcia D, Pellegrino S, Vincenti M, Sciutteri B, Salomone A.
Forensic Science International 2011 July; 210(1-3): 271-277.*

“Multivariate strategies for screening evaluation of harmful drinking”

*Pirro V, Oliveri P, Sciutteri B, Salvo R, Salomone A, Lanteri S, Vincenti M.
Bioanalysis 2013 March; 5(6): 687-699.*

Accertamento dell'astinenza dal consumo di alcolici

“Determination of basic ethyl glucuronide levels in hair for the assessment of alcohol abstinence”

*Pirro V, Di Corcia D, Seganti F, Salomone A, Vincenti M.
Forensic Science International; 2013 October; 232(1-3): 229-236 .*

1° studio

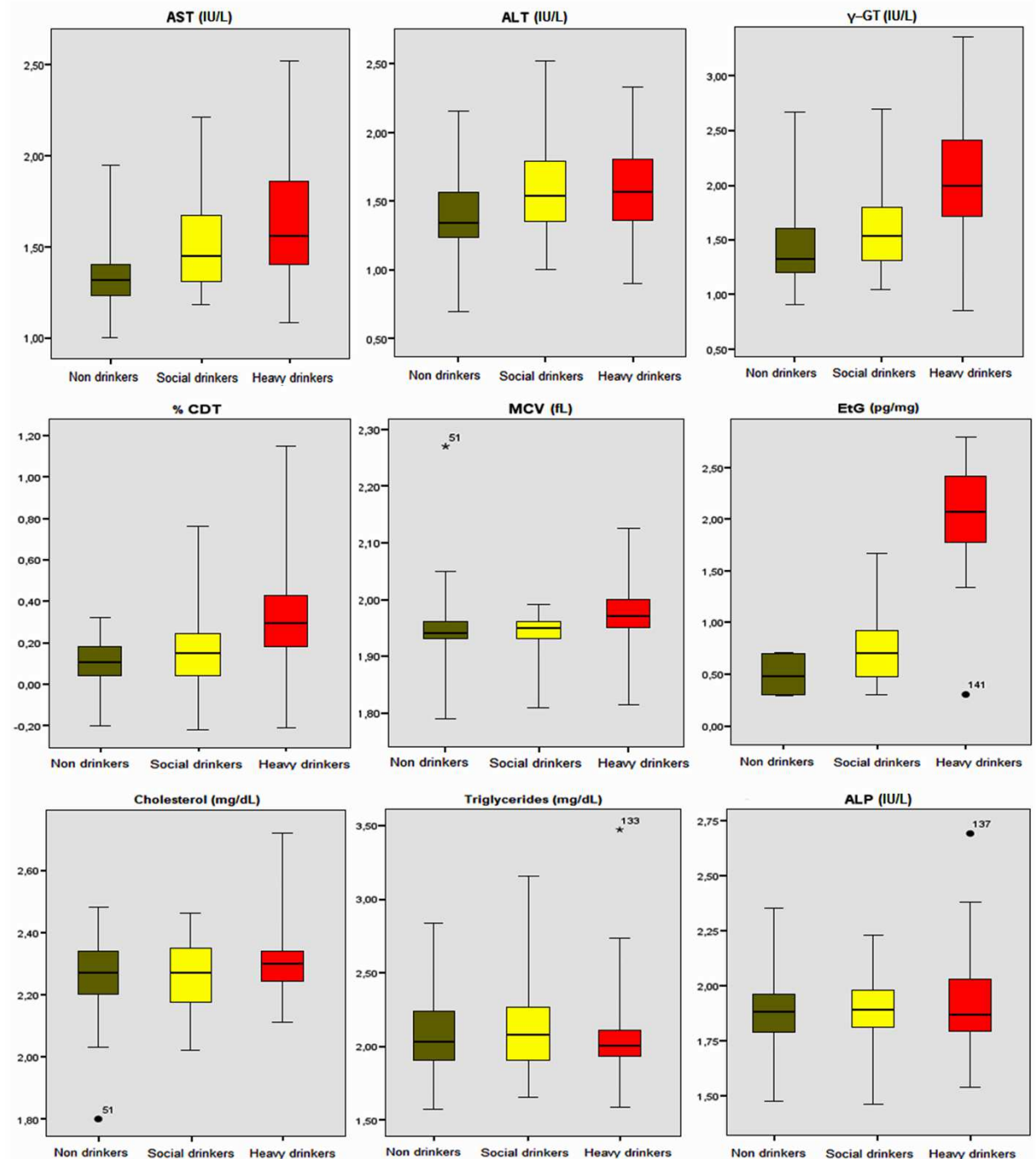
CAD + ASL TO4 +
ASL TO2

Studio sperimentale:

- **175** soggetti
- **9** biomarcatori

- Astinenti
- Bevitori occasionali
- Abusatori cronici

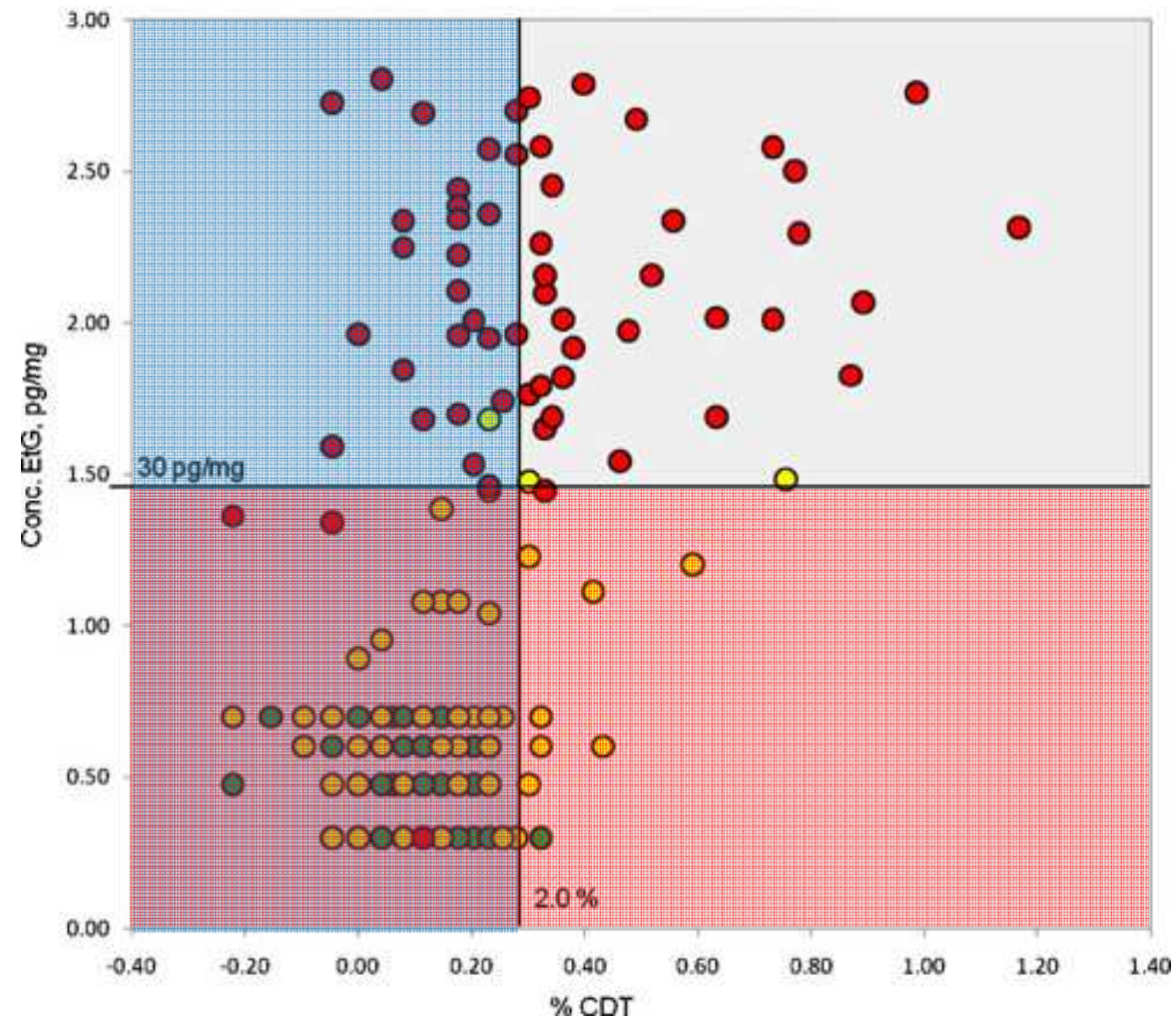
Pirro et al. (2011)
Analytical Bioanalytical
Chemistry 401:2153-2164



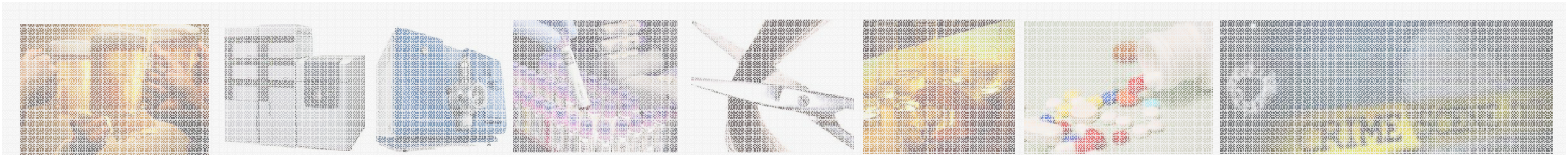
EtG vs.
CDT

CDT
FALSE
NEGATIVE
RESULTS

EtG
FALSE
NEGATIVE
RESULTS



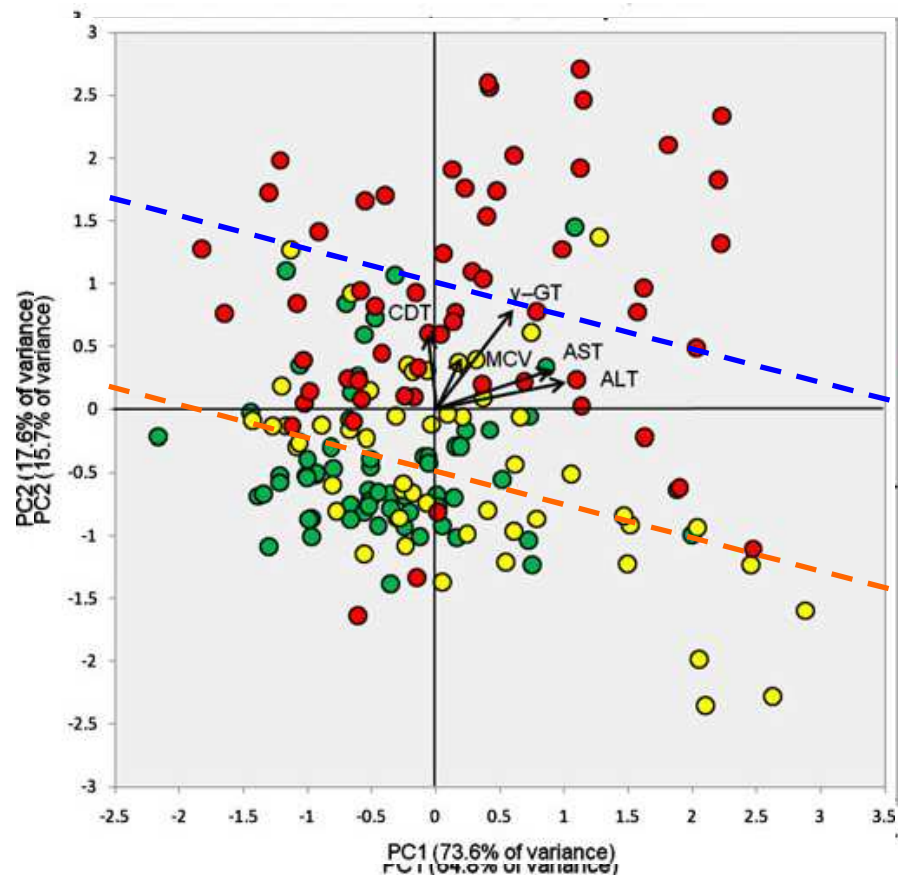
Pirro et al. (2011) Anal. Bioanal. Chem.
101 2152-2161



PCA: analisi esplorativa

175 soggetti × 5-9 marcatori

● Non-drinkers ● Social drinkers ● Heavy drinkers



- **EtG: marcatore molto sensibile e specifico**
Quando l'EtG è rimosso, la separazione tra consumatori cronici e non cronici
 - **CDT & MCV: marcatori specifici, ma non sensibili**
(CDT > MCV)
 - **γ-GT, AST & ALT: scarsa sensibilità e specificità**
(γ-GT > AST, ALT)
- Indagini di screening?

V. Pirro, P. Oliveri, B. Sciutteri, R. Salvo, A. Salomone, S. Lanteri, M. Vincenti,
Multivariate strategies for screening evaluation of harmful drinking,
Bioanalysis, **2013**, 5, 687-699.



2° Studio: 423 pazienti × 6 marcatori

Classificazione clinica dei pazienti secondo criteri ICD-10

	Patologie epatiche	Low-risk drinkers	Harmful drinkers
Pazienti	No	311	55
	Sì	39	18
Totale (N=423)		350	73



AST, ALT and γ -GT
(colorimetric assays)

MCV (optical measurement)

%CDT (HPLC-UV, $\lambda = 460$ nm)



Hair EtG (HPLC-MS/MS)

PCA: tecnica multivariata per l'analisi esplorativa dei dati

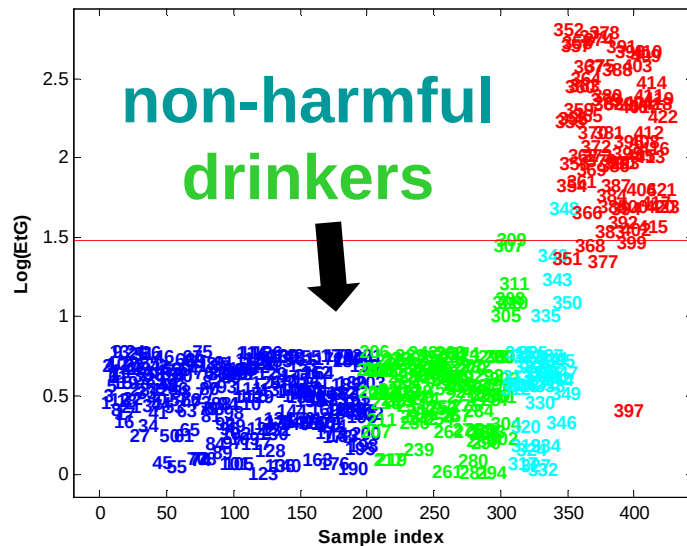
Capacità diagnostiche

Strategia univariata: **curve ROC**

Strategia multivariata: **UNEQ class modeling**

EtG nel capello **vs.** CDT come marcatore di conferma

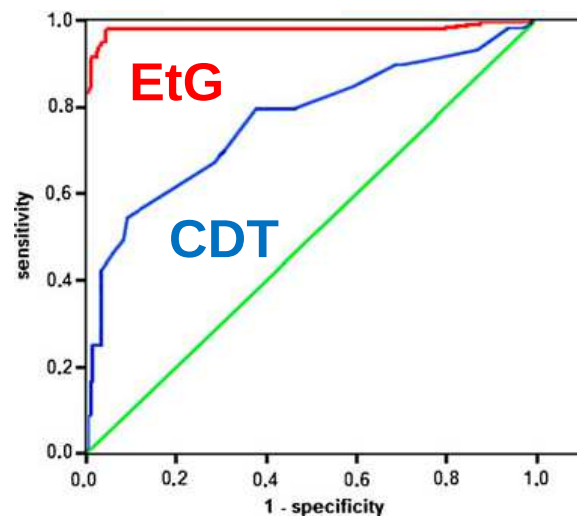
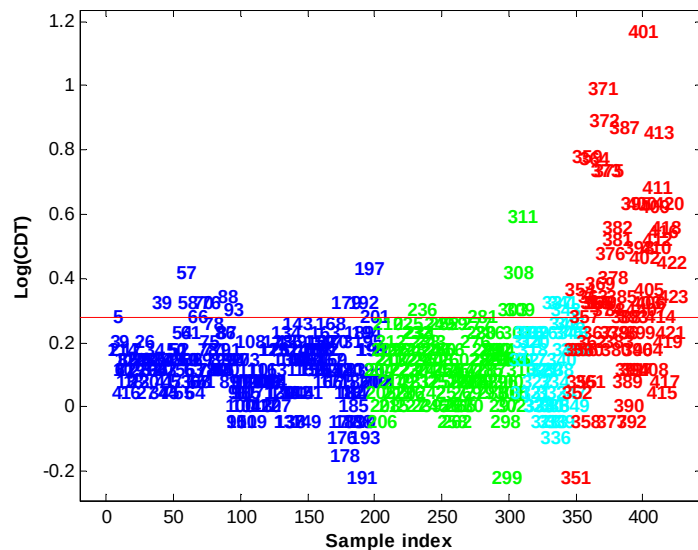
2° studio:
423 soggetti



Harmful drinkers

EtG alta sensibilità (92%) e
alta specificità (99%)

CDT bassa sensibilità (51%)
e alta specificità (90%)

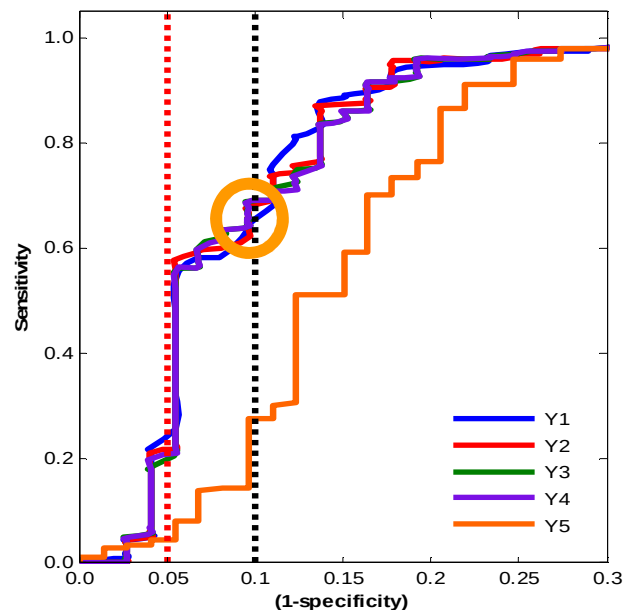
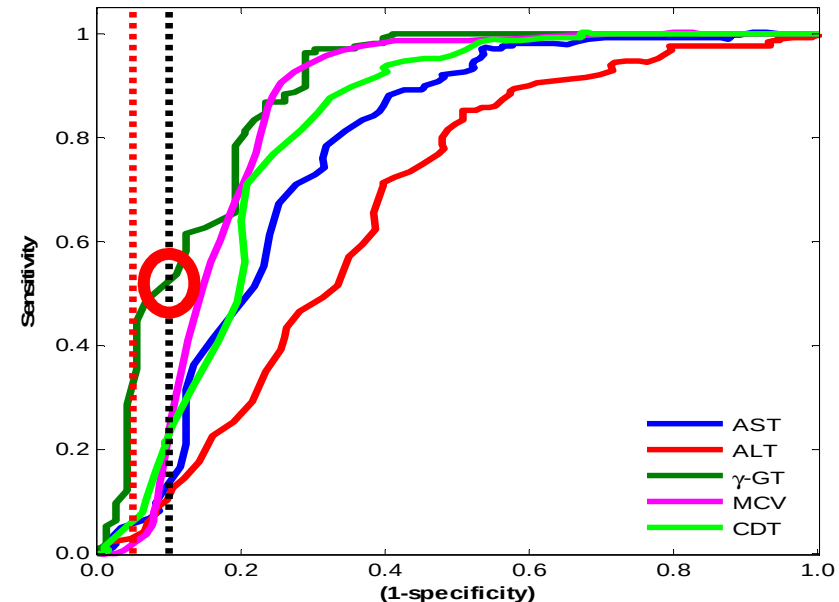


CURVE ROC

2° studio: marcatori indiretti 423 soggetti

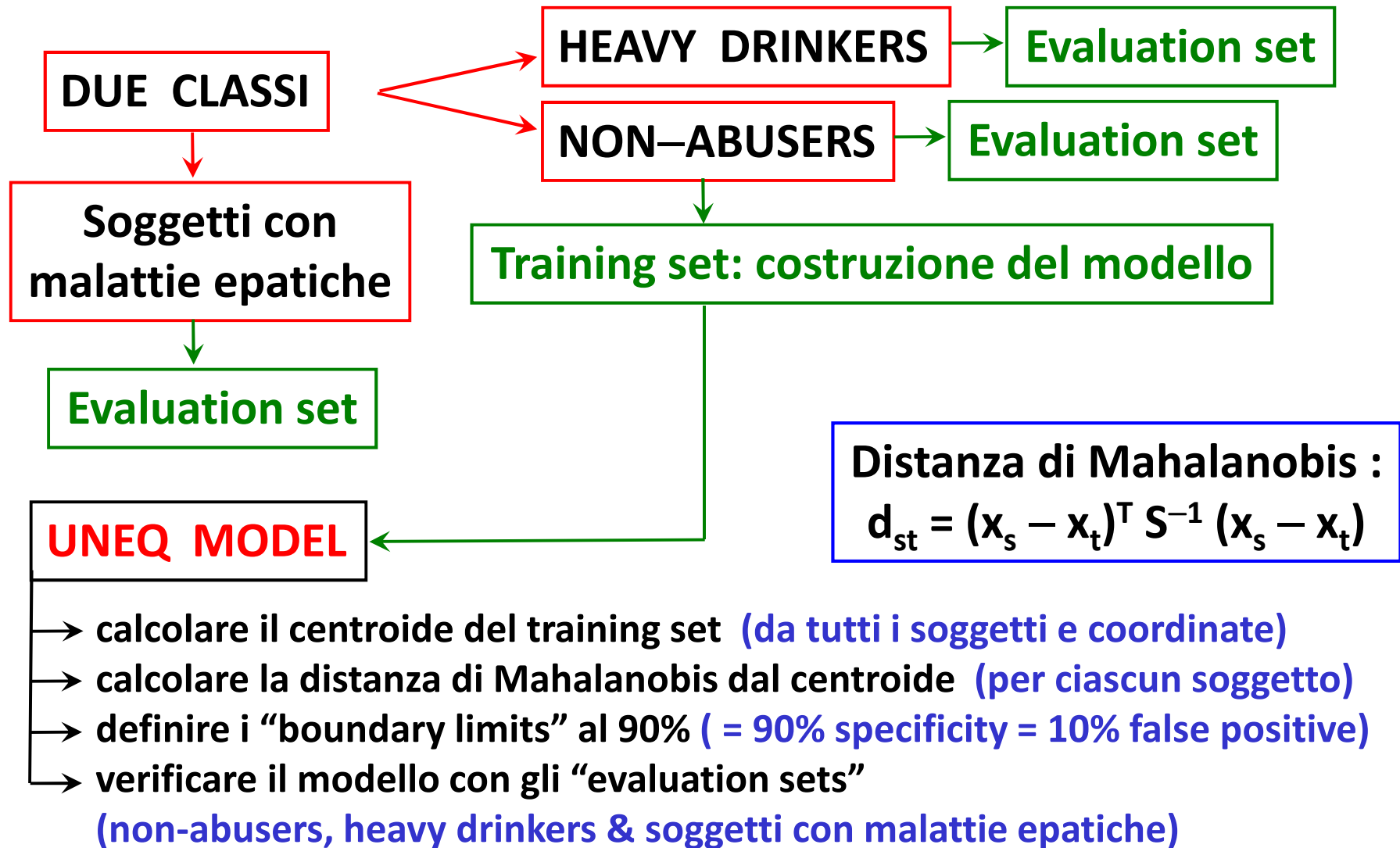
Confronto dei valori di sensibilità alla specificità prefissata del 90%
modellando il cut-off (variabile) sui non-bevitori

Biomarkers	Sensitivity	AUC
AST (U/L)	0.15	0.767
ALT (U/L)	0.13	0.664
γ -GT (U/L)	0.53	0.876
CDT (%)	0.22	0.802
MCV (fL)	0.31	0.833

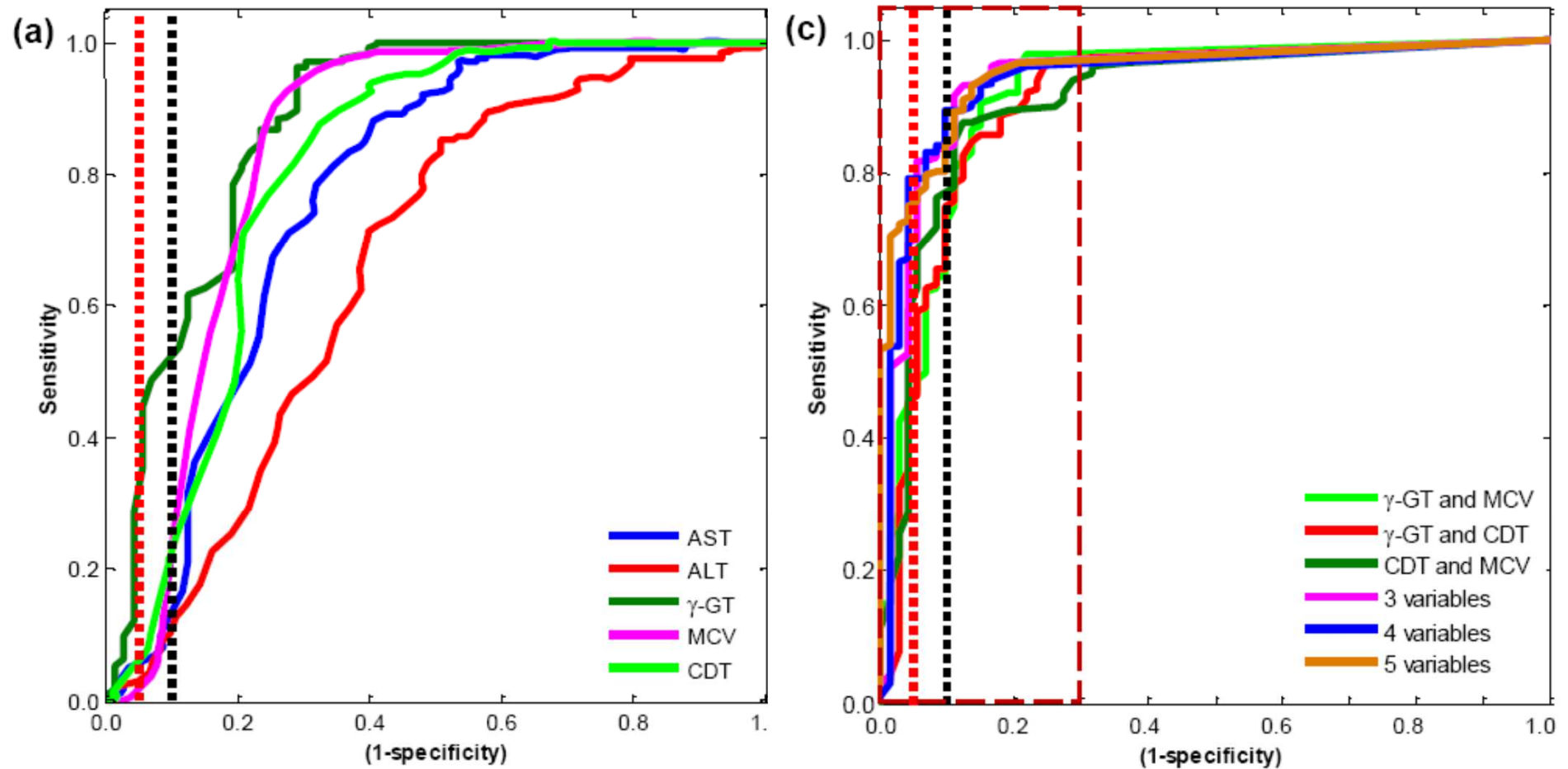


Functions	Sensitivity	AUC
$Y1 = 0.64\ln_{\gamma\text{-GT}} + 0.77\ln_{\text{CDT}}$	0.68	0.913
$Y2 = 0.81\ln_{\gamma\text{-GT}} + 1.30\ln_{\text{CDT}}$	0.68	0.912
$Y3 = 0.90\ln_{\gamma\text{-GT}} + 1.68\ln_{\text{CDT}}$	0.69	0.910
$Y4 = 1.04\ln_{\gamma\text{-GT}} + 1.96\ln_{\text{CDT}}$	0.69	0.910
$Y5 = \text{CDT} + \text{Log}_{\gamma\text{-GT}} + \text{MCV}$	0.28	0.851

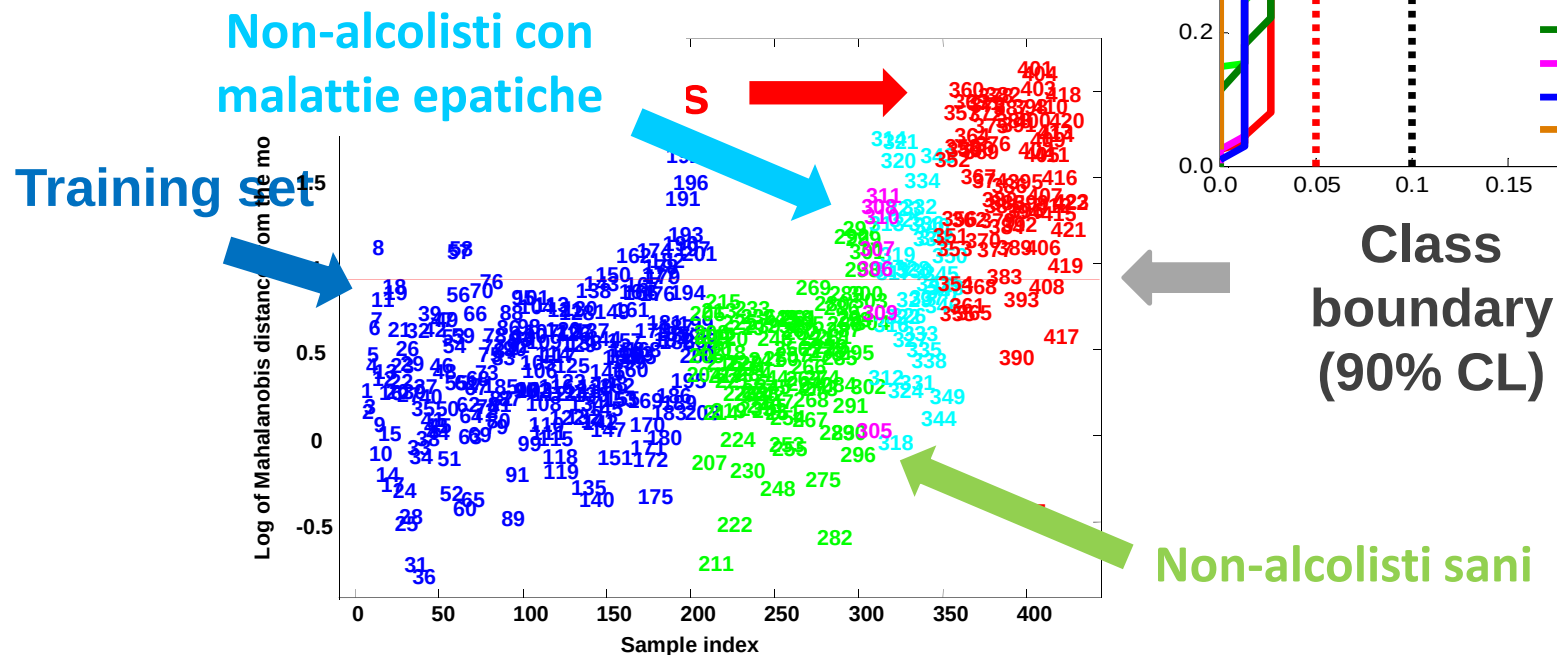
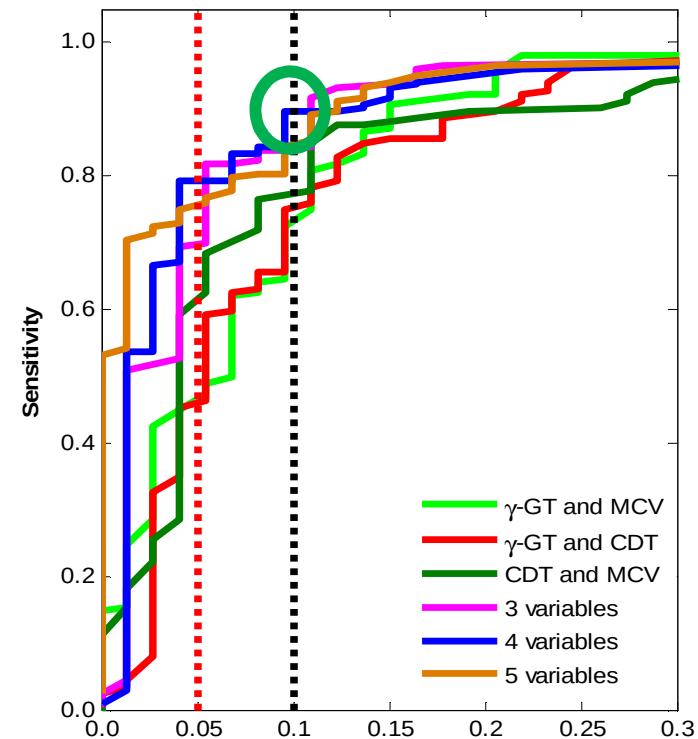
UN NUOVO APPROCCIO: IL MODELLAMENTO MULTIVARIATO



MULTIVARIATE MODELLING: training set shaped on non-abusers



UNEQ models	CL	Sensitivity	AUC
2 (γ -GT and CDT)	0.738	0.76	0.911
2 (γ -GT and MCV)	0.758	0.76	0.923
2 (MCV and CDT)	0.817	0.82	0.914
3	0.873	0.86	0.942
4	0.900	0.91	0.942
5	0.853	0.86	0.952



PROCEDIMENTO (per “screening” futuri)

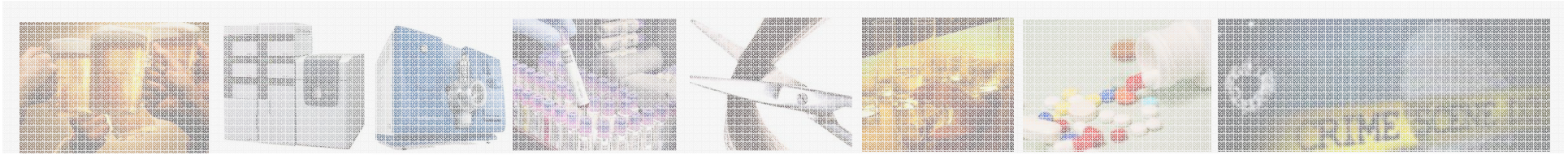
I risultati sui nuovi soggetti sottoposti a screening verranno classificati sulla base dei risultati del modello multivariato, fissando un valore di specificità del 90%

RISULTATI ATTESI

Con il 91% di sensibilità, soltanto il 9% degli abusatori cronici di alcol non verrà riconosciuto come tale (falsi negativi)

Con il 90% di specificità, i falsi positivi saranno soltanto il 10%, e l'errore di falsa positività verrà corretto mediante analisi dell'EtG nel capello, a costi contenuti

Non si può usare questo modello per i soggetti con storia pregressa di malattia epatica; occorre svolgere un'accurata indagine anamnestica



3° studio

Accertamento dell'astinenza dal consumo di alcolici mediante analisi dell'EtG nel capello

- concentrazioni HEtG < LOD (unita' di pg/mg)
- cut-off attuale proposto: 7 pg/mg



16-32 g alcol/giorno $\Rightarrow$ EtG capello < 7 pg/mg

[...] none of persons who ingested 16 g of ethanol daily for 3 months had concentrations over 7 pg/mg [...]

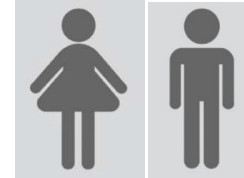
R. Kronstrand et al., Forensic Sci. Int. 215 (2012) 51-55.

[...] 46 subjects reported some alcohol use (range 0.1–68.5 g per day) but did not have hair EtG $\geq$ 8 pg/mg [...]

S.H. Stewart et al., Alcohol Alcohol. 48 (2013) 83-87.



44 astemi e astinenti

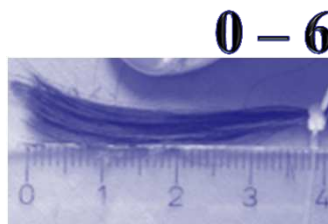


Protocollo analitico

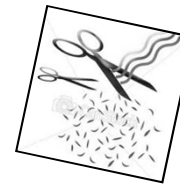


0-3 cm

Decontamination
of hair samples
methylene chloride & methanol
(3 mL, 3 min)



0 – 6 cm

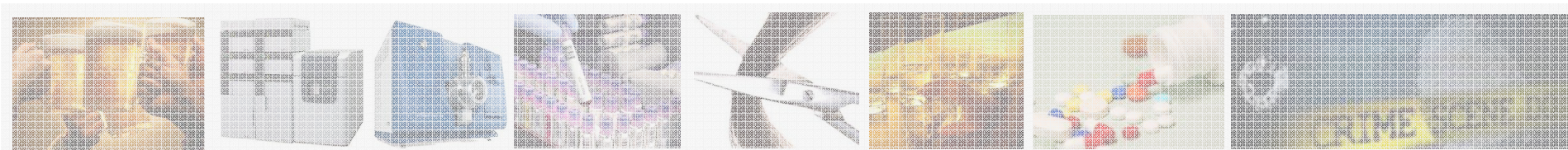


50 mg



Sonication

**Overnight incubation with
MeOH / water**



Method validation

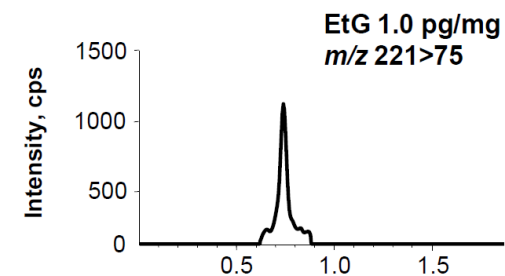
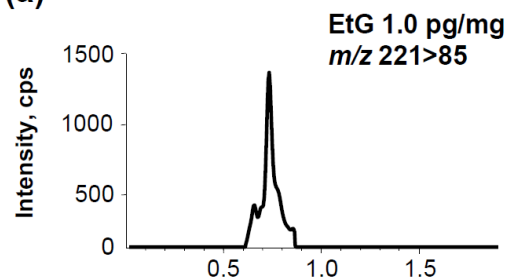


Selectivity;
specificity;
linearity range;
LOD & LOQ;
Matrix effect

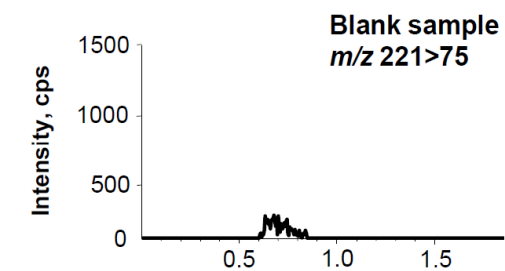
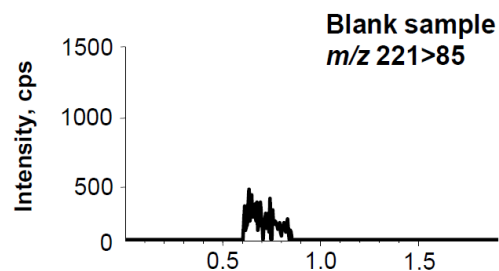


↓
LOD = 0.5 pg/mg
LOQ = 1 pg/mg

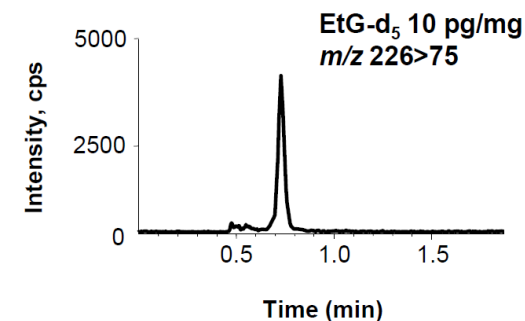
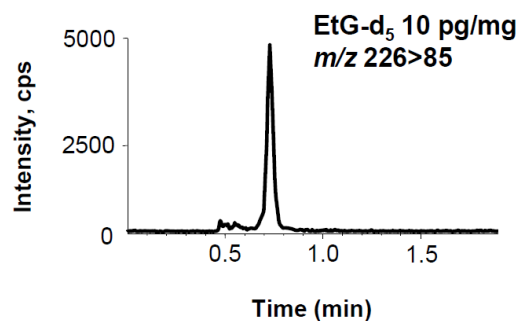
(a)



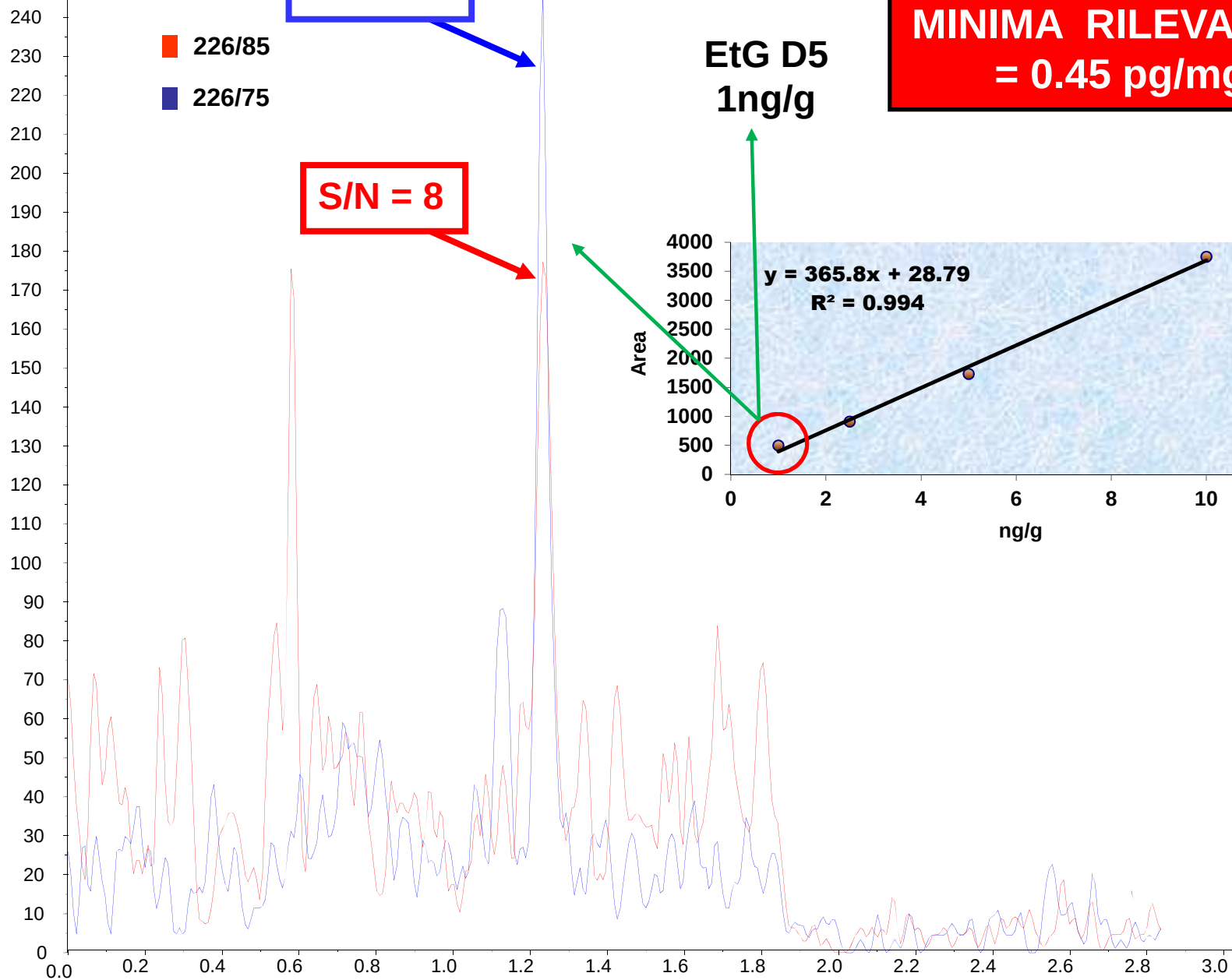
(b)



(c)

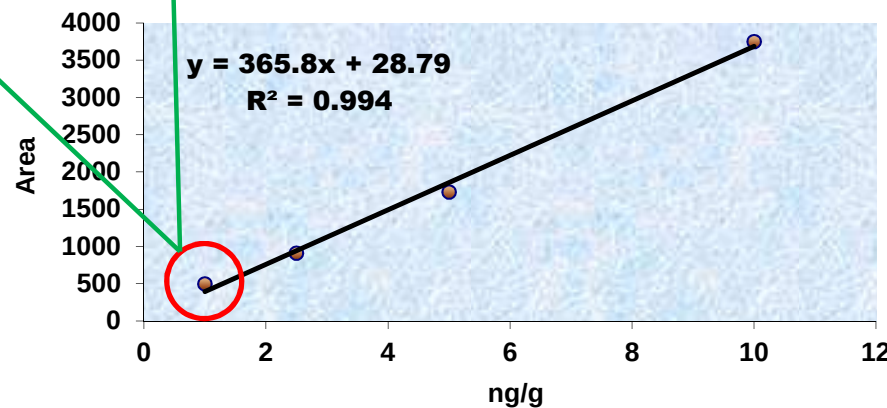


Intensity
cps



EtG D5
1ng/g

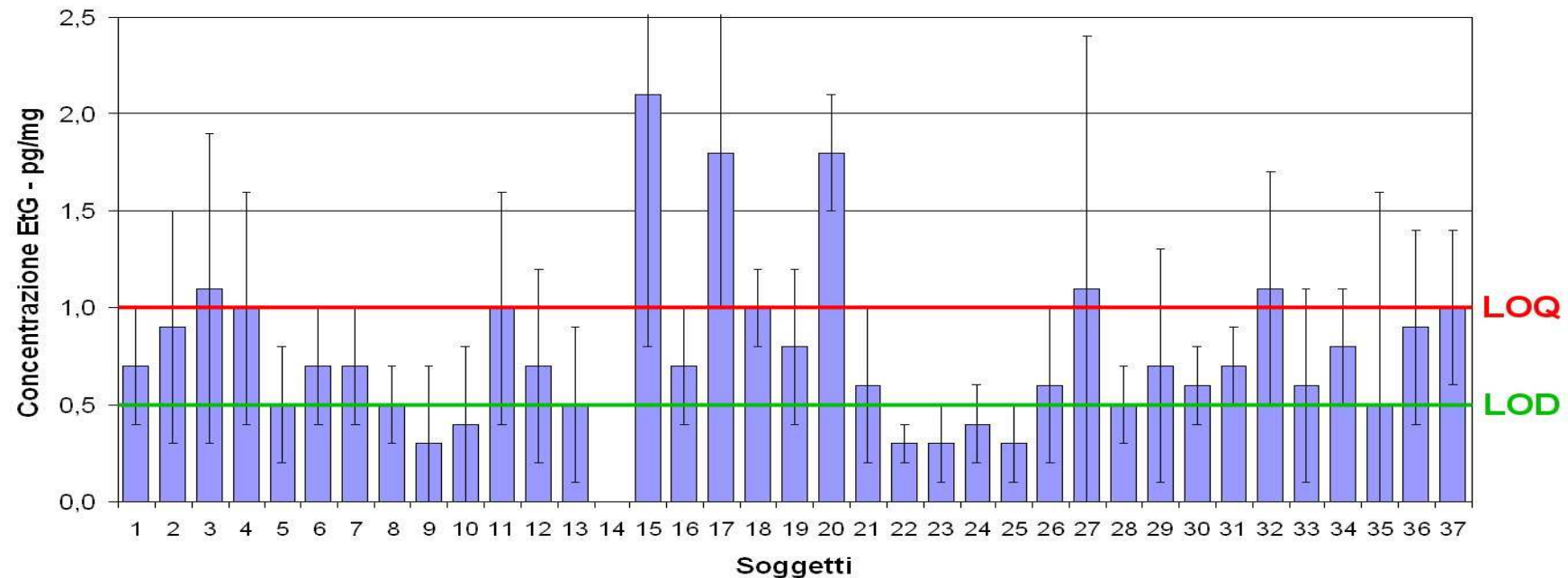
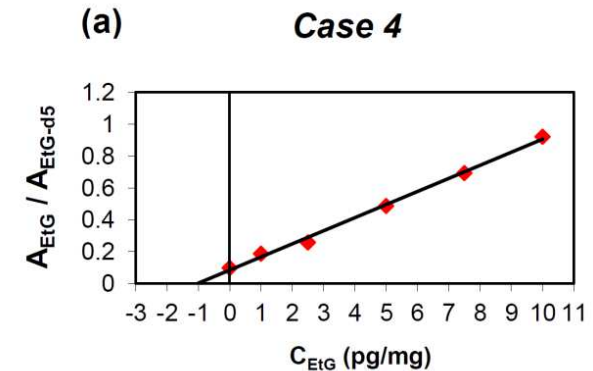
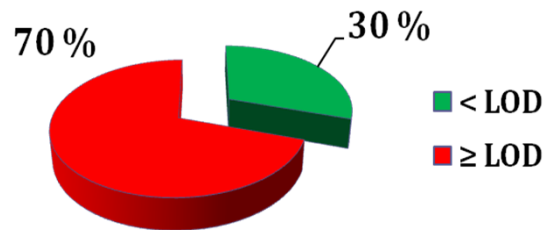
**CONCENTRAZIONE
MINIMA RILEVABILE
= 0.45 pg/mg**

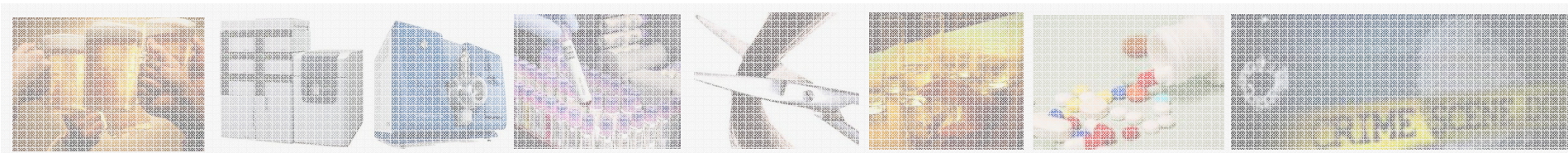


Metodo di quantificazione mediante addizioni standard

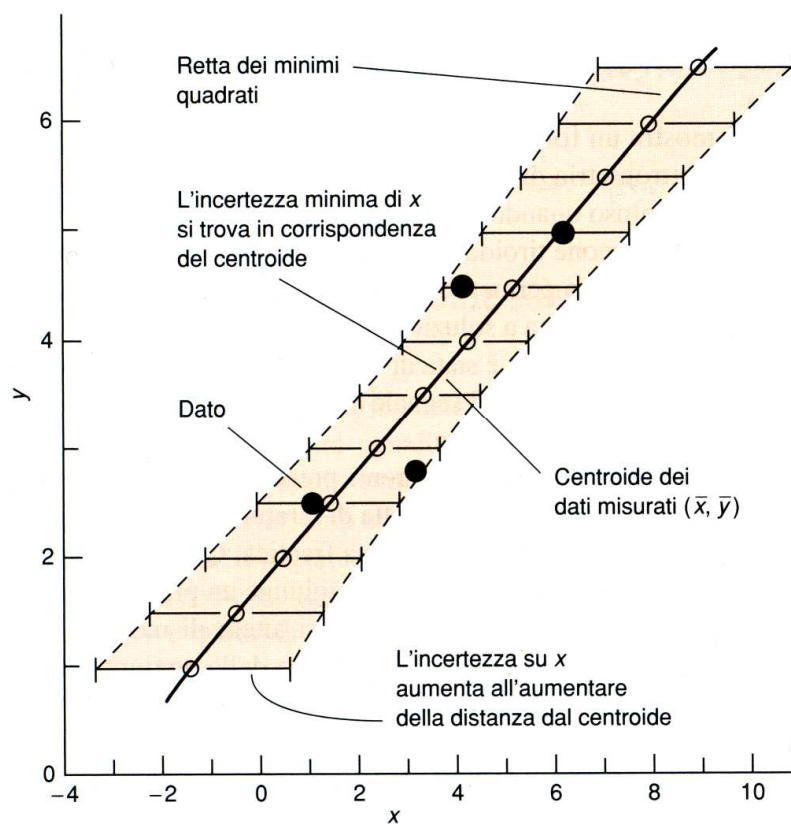
(36 casi su 44)

- 95% campioni ➤ HEtG < 1 pg/mg
- Concentrazione media = 0.8 ± 0.4 pg/mg

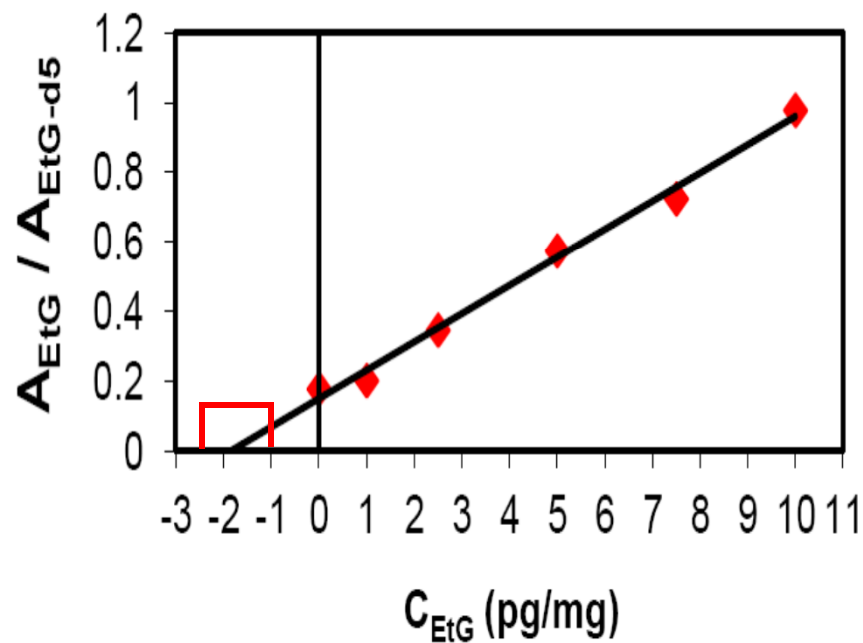


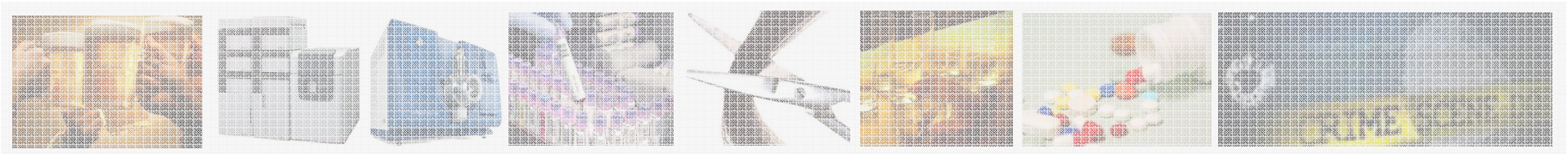


Misura dell'incertezza



Case 17





DUE casi presentavano concentrazioni di EtG > LOQ

Caso # 1

Età: 1 anno

Capelli biondi

17 pg/mg

EtOH 96°, 0.5 mL



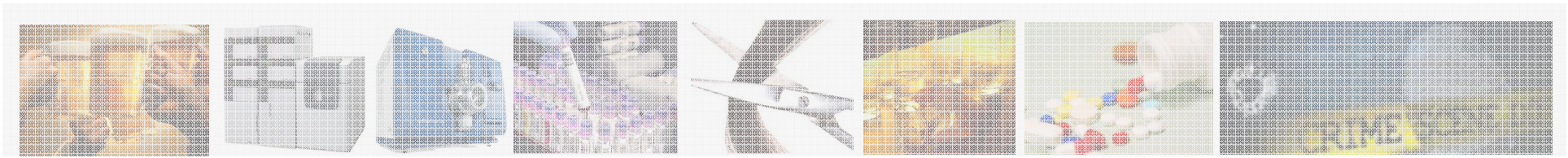
Caso # 2

Lavoratore di industria
di dispositivi elettronici

1.8 ± 0.3 pg/mg

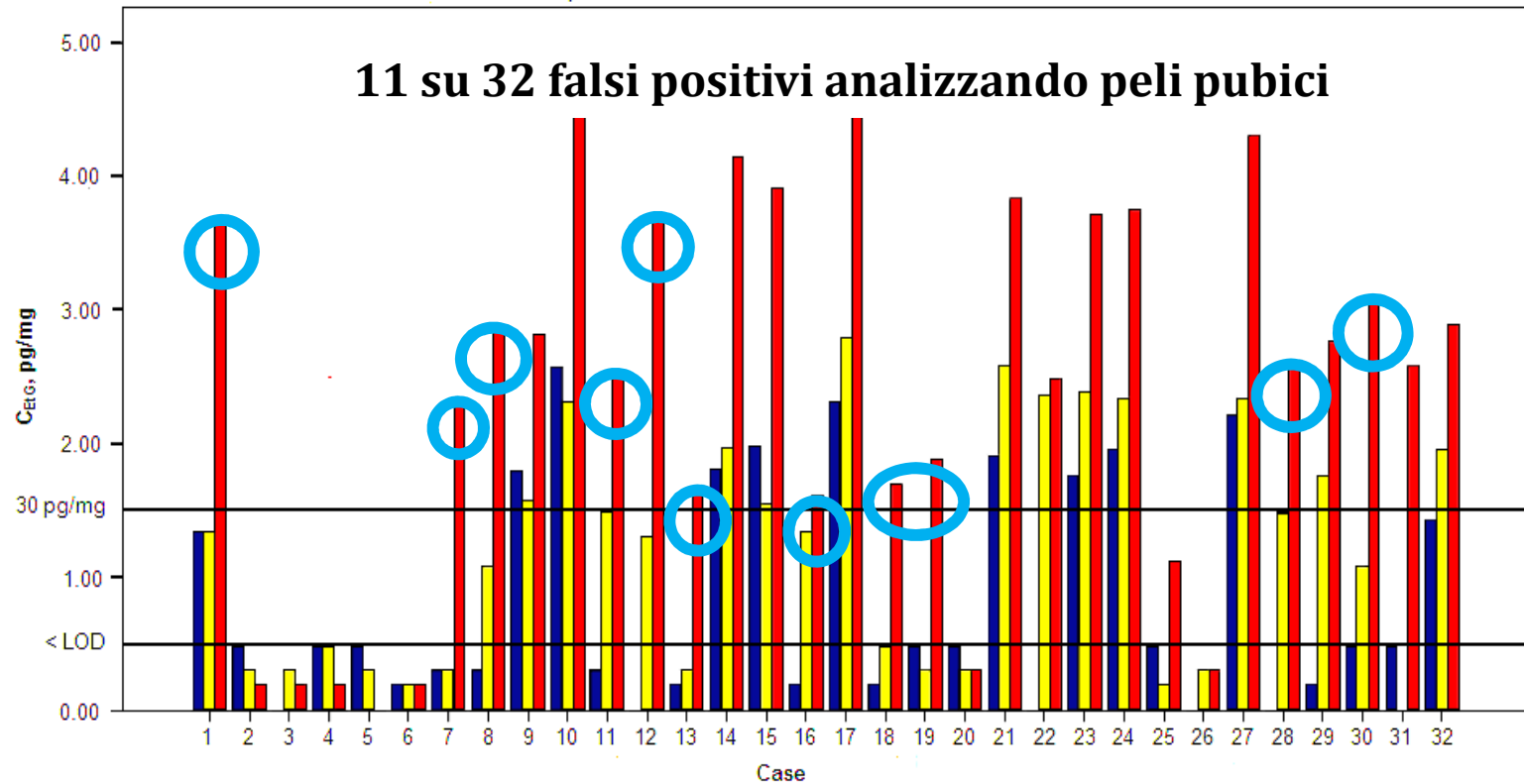
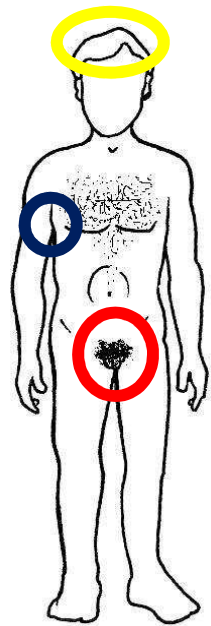


Valori di EtG = 1.0-2.0 pg/mg possono essere proposti
come cut-off per l'accertamento dell'astinenza da alcol



4° studio

Possibili fattori di bias: matrice cheratinica



EtG: peli pubici > capello > peli ascellari

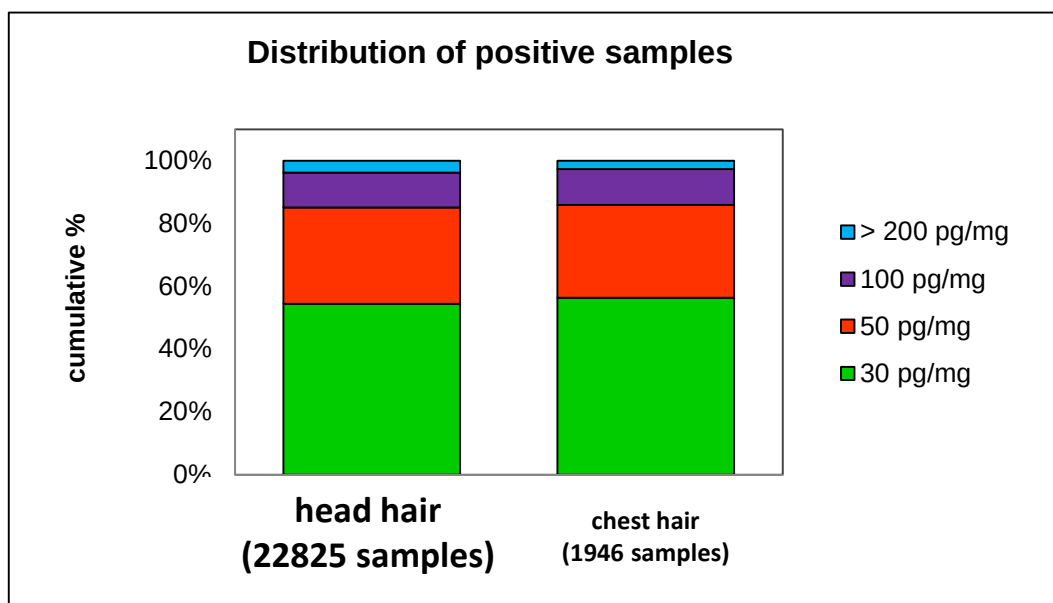
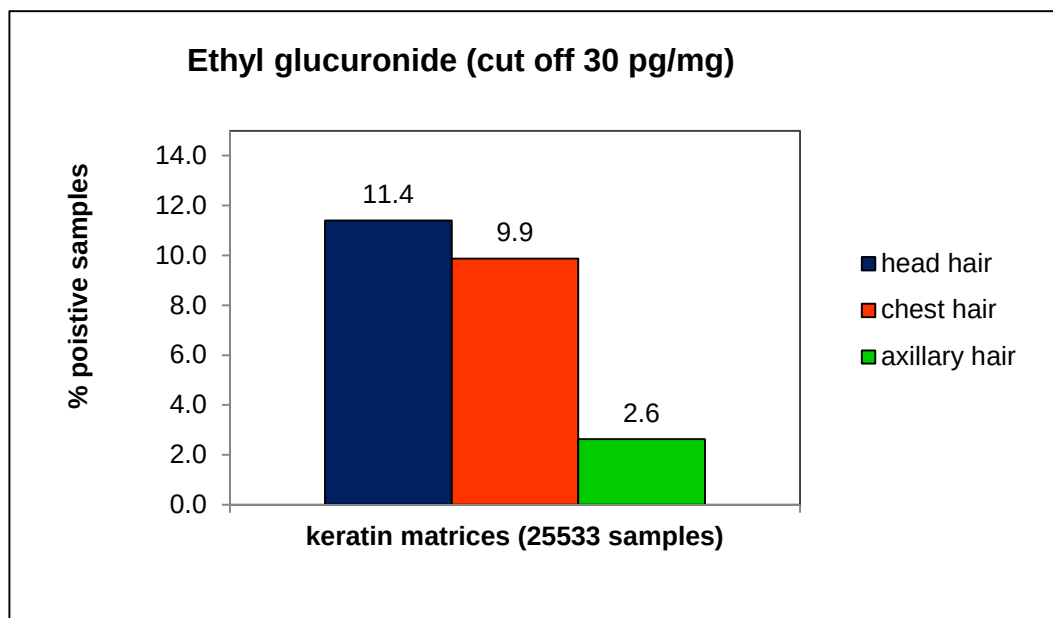
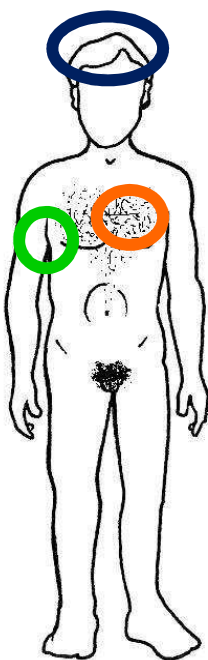
Sovrastima

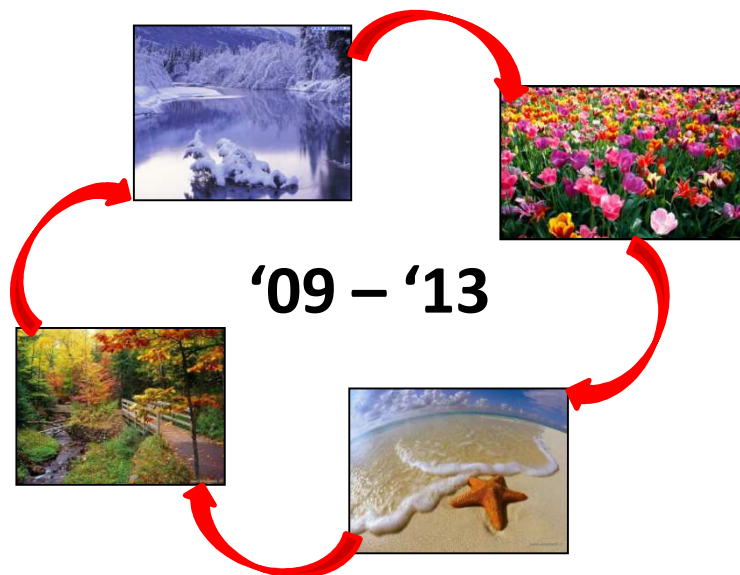


Sottostima

Pirro et al. 2011, Forensic Science International 210: 271-277

5° studio: risultati EtG nel capello su 25533 campioni





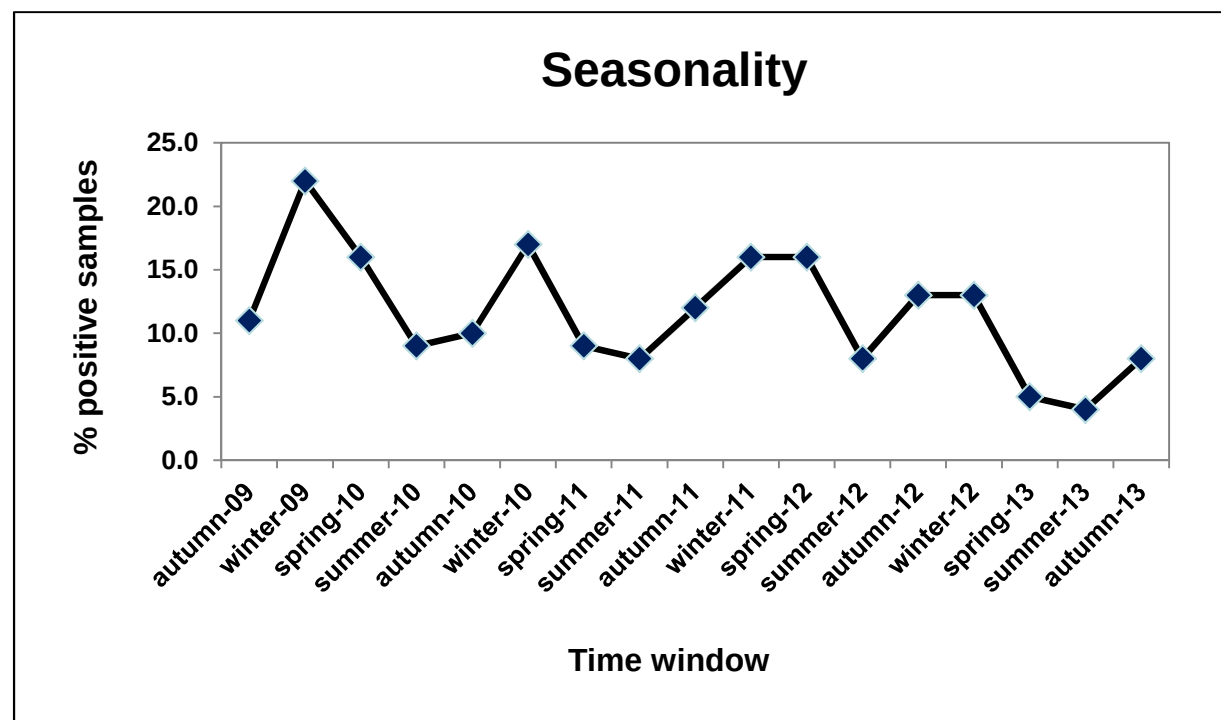
**Stagione di
crescita del
capello**

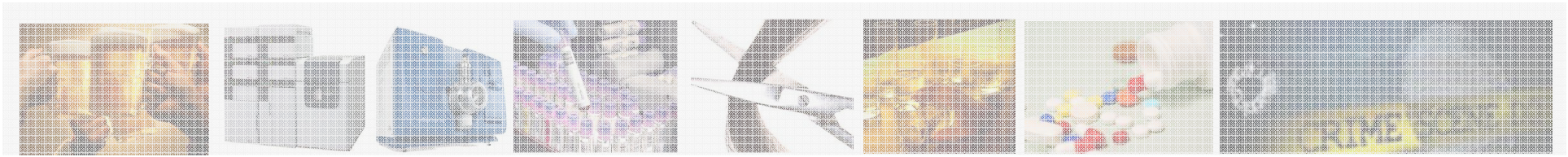
	media % positivi (EtG > 30 pg/mg)
Inverno	17%
Primavera	12%
Estate	7%
Autunno	11%

*Come per i peli ascellari,
l'abbondante
sudorazione estiva*

SFAVORISCE

*l'accumulo di EtG nella
matrice cheratinica*



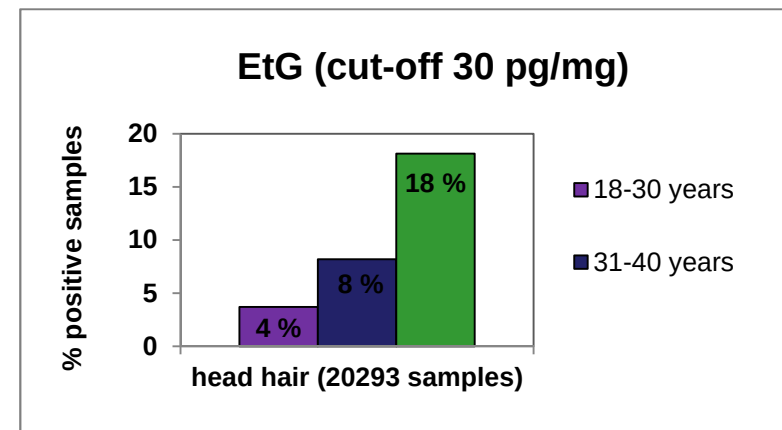


5° studio:
risultati EtG
nel capello su
18917 campioni

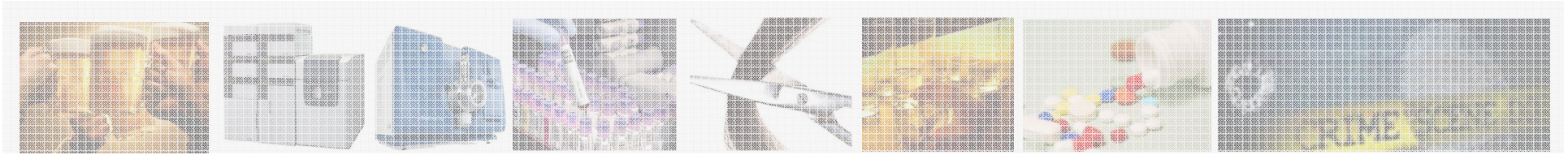
Studio di altri possibili fattori di bias:
fattori biologici e personali

- *Età*
- *Indice di massa corporea*
- *Sesso M/F*
- *Trattamenti cosmetici forti*

-Età
(intersezione con fattori sociologici)



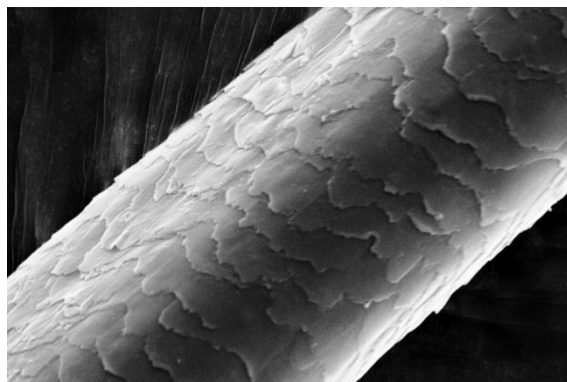
- ***Indice di massa corporea (non c'è dipendenza)***
- ***Sesso M/F (non c'è dipendenza)***
- ***Trattamenti cosmetici forti e/o ripetuti***



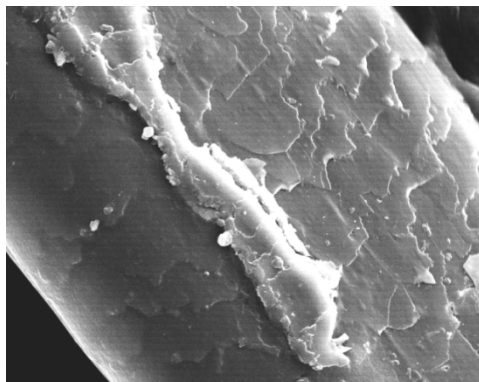
Possibili fattori di bias: trattamenti cosmetici chimici e fisici

- No contaminazione esterna da prodotti contenenti alcol. Un solo caso di contaminazione descritto in letteratura da prodotti contenenti EtG (*Sporkert et al. 2012*)
- Prodotti decoloranti (forti ossidanti) possono degradare e dilavare la matrice cheratinica e ridurre la concentrazione riscontrata di EtG

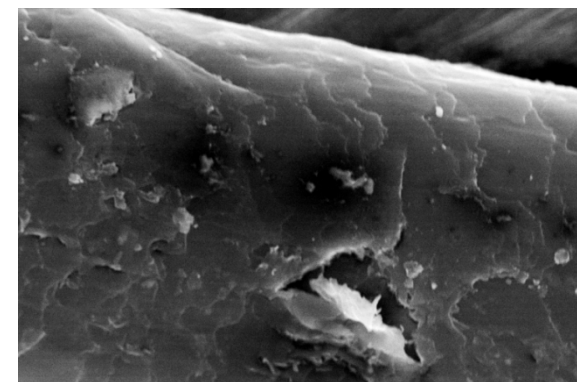
Non trattati



Piastrati



Decolorati



Analisi SEM (microscopio elettronico a scansione)

CONCLUSIONI:

- I marcatori indiretti possono essere utilmente impiegati in valutazioni di screening su popolazioni ampie di soggetti (es. lavoratori), considerando i dati dopo un'opportuna sintesi (es. trattamento statistico)
- EtG nel capello rappresenta un insostituibile marcatore di abuso alcolico cronico, da utilizzare senza eccezione in tutti i casi sospetti (es. ritiro della patente di guida), nonché nelle mansioni di particolare rischio (es. disponibilità di armi, autisti di autobus, piloti, ecc.)
- Il campionamento di pelo toracico può sostituire quello del capello per la determinazione dell'EtG, benchè l'intervallo cronologico non sia ben definito
- La determinazione dell'EtG in capelli che mostrino un'evidente degradazione e/o colorazione deve essere considerata con senso critico, e abbinata ad altri accertamenti, su matrici alternative o con marcatori indiretti (CDT, γ -GT, MCV)

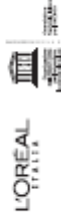


L'ORÉAL-UNESCO
FOR WOMEN
IN SCIENCE

*Cambiare il volto
della scienza*



PER LE DONNE E LA SCIENZA
IN COLLABORAZIONE CON



LE BORSISTE
2013

11^a Edizione

Valentina PIRRO

PROGETTO

La spettrometria di massa: dalla scena del crimine alla lotta al cancro

ISTITUTO OSPITANTE

*Dipartimento di Chimica Università degli Studi di Torino e Centro Regionale
antidoping e di tossicologia "A. Bertinaria"*

GRAZIE !

