



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MACERATA

DIPARTIMENTO DI GIURISPRUDENZA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN DIRITTO E INNOVAZIONE

Curriculum Diritto e Innovazione Sociale

CICLO XXV°

“STRATEGIE INNOVATIVE PER LA VALUTAZIONE DI ABUSO ALCOLICO A SCOPO FORENSE”

SUPERVISORE DI TESI

Chiar.mo Prof. Mariano Cingolani

DOTTORANDA

Dott.ssa Cerioni Alice

COORDINATORE

Chiar.mo Prof. Massimo Meccarelli

ANNO 2023

INDICE

CAPITOLO I	4
INTRODUZIONE	4
1.1 Alcolismo – epidemiologia	4
1.2 Etanolo	8
1.3 Meccanismo d’azione	12
1.4 Legislazione	15
1.5 Biomarcatori di abuso alcolico	19
CAPITOLO II	29
SCOPO DELLA TESI	29
CAPITOLO III	31
MATERIALE E METODI	31
3.1 Campioni	31
3.2 Standard e reagenti	32
3.3 Preparazione del campione	32
3.4 Curva di calibrazione	34
CAPITOLO IV	36
RISULTATI E DISCUSSIONE	36
BIBLIOGRAFIA	45

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

1.1 Alcolismo – epidemiologia

L'alcol etilico è la sostanza psicoattiva d'impiego più frequente e più antico. Il consumo di alcol è un importante problema di salute pubblica, classificato in Europa come terzo fattore di rischio di malattia e morte prematura dopo il fumo e l'ipertensione arteriosa. Come riportato dall'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) nel rapporto "Global status report on alcohol and health", il documento che presenta un quadro completo del consumo di bevande alcoliche e del carico di malattia attribuibile all'alcol in tutto in mondo, in media sono circa 2,3 miliardi le persone che consumano bevande alcoliche nel mondo (circa il 43% della popolazione mondiale). L'alcol viene consumato da più della metà della popolazione solamente in tre regioni: l'Europa, con il 59,9% di consumatori d'alcol), le Americhe (54,1%) e la regione del Pacifico Occidentale (53,8%)¹. Come mostrato dai più recenti dati pubblicati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, il consumo totale pro-capite di alcol nella popolazione mondiale con un'età superiore ai 15 anni è di 6,4 litri l'anno, che corrispondono a 13,9 grammi di alcol al giorno. Se si considera che il 57% della popolazione globale con età superiore ai 15 anni dichiara di essersi astenuta dal bere alcolici nei precedenti 12 mesi, i bevitori di sostanze alcoliche consumano una media di 15,1 litri di alcol all'anno, che corrisponde ad un consumo giornaliero di 32,8 grammi di alcol. In tutto il mondo più di un quarto (26,5%) dei ragazzi di età compresa dai 15 ai 19 anni consuma alcolici, con un tasso di consumo per questa

¹ Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). (2018). Global status report on alcohol and health 2018.

fascia di età che risulta più elevata in Europa (43.8%), seguita dalle Americhe (38.2%) e dalla regione del Pacifico Occidentale (37.9%), ricalcando l'andamento nella popolazione globale. Le differenze nei livelli di consumo di alcol tra le varie regioni del mondo sono dovute all'interazione di un ampio numero di fattori, tra cui fattori sociodemografici, il livello di sviluppo economico, fattori religiosi, cultura e tipi di bevande preferite.

Nel 2016, nel mondo, il consumo dannoso di alcol è stato responsabile di più di 3 milioni di decessi ogni anno, pari al 5,3% di tutti i decessi. Di tutti i decessi attribuibili all'alcol nel mondo, il 28% è causato da incidenti stradali e atti di autolesionismo e violenza interpersonale; 21% a causa di disturbi digestivi; 19% a causa di malattie cardiovascolari e il resto a causa di malattie infettive, tumori, disturbi mentali e altre condizioni di salute. I danni alcol-correlati infine non coinvolgono i soli consumatori. Le conseguenze del consumo di alcol si ripercuotono sulle famiglie e sulla comunità in generale a causa del deterioramento delle relazioni personali e di lavoro, dei comportamenti criminali (es. vandalismo e violenza), della perdita di produttività e dei costi a carico dell'assistenza sanitaria.

In Italia i consumatori di almeno una bevanda alcolica sono in aumento negli ultimi anni, pari al 66,8% degli italiani con più di 11 anni nel 2018. I consumatori di vino nel 2018 sono stati il 54,1%, più di 28 milioni e 500 mila persone, ovvero sono aumentati del 3% rispetto al 2017 (52,6%), soprattutto tra le femmine che sono passate dal 40,3% al 42,6% (+5,7%). Per quanto riguarda la birra più di 27 milioni di persone con età superiore agli 11 anni hanno ammesso di averla consumata nel 2018, mentre per gli aperitivi alcolici i numeri si attestano sui 20 milioni di persone.

Nell'anno 2016 il numero di decessi di persone di età superiore a 15 anni per patologie totalmente alcol-attribuibili è stato pari a 1.290, di cui 1.032 (80,0%) uomini e 258 donne

(20,0%)². Sempre nello stesso anno il 51,3% dei ragazzi e il 43,7% delle ragazze di età compresa tra 11 e 25 anni ha consumato almeno una bevanda alcolica nel corso dell'anno. Un fenomeno che desta molta preoccupazione, soprattutto tra i più giovani, è il cosiddetto binge drinking, termine con il quale si indica una modalità di consumo eccessivo episodico in un breve arco di tempo, e che è stato riferito dal 30,1 % degli studenti, ovvero da 776mila ragazzi tra i 15 e i 19 anni nel 2021³.

1.1.1 Cenni storici

L'alcool, fin dall'antichità, rappresenta la più antica e la più diffusa sostanza psicotropa; infatti, si ritiene che le prime bevande alcoliche siano comparse sulla terra più di 20.000 anni fa e che già i cacciatori e i coltivatori della preistoria conoscessero l'effetto stupefacente della fermentazione di riso, miele e frutta. Per quanto riguarda invece viticoltura e vinificazione, le aree geografiche in cui si ritiene che queste abbiano preso avvio sono quelle dell'antica Persia, corrispondenti all'attuale Iran, all'incirca nel 5400 a.C.⁴. Alcuni documenti, tra cui geroglifici e papiri, dimostrano la pratica corrente di utilizzo del vino e della birra ai tempi dell'antico Egitto. Il codice di Hammurabi (1700 a.C.), prima raccolta scritta di leggi emanate dagli uomini, conteneva norme che regolamentavano il commercio del vino e puniva severamente i reati commessi in stato

² Scafato, E., Ghirmi, S., Gandin, C., Vichi, M., Matone, A., Scipione, R., Gruppo di Lavoro CSDA (Centro Servizi Documentazione Alcol). (2020). Epidemiologia e monitoraggio alcol-correlato in Italia e nelle Regioni. Valutazione dell'Osservatorio Nazionale Alcol sull'impatto del consumo di alcol ai fini dell'implementazione delle attività del Piano Nazionale Alcol e Salute. Rapporto 2020.

³ Presidenza del Consiglio dei Ministri Dipartimento per le Politiche Antidroga. (2022). Relazione annuale al Parlamento sul fenomeno delle tossicodipendenze in Italia. relazione-al-parlamento-2022.pdf (politicheantidroga.gov.it)

⁴ Khaderi, S. A. (2019). Introduction: Alcohol and Alcoholism. Clinics in liver disease, 23(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2018.09.009>.

di ubriachezza. Dalla Mesopotamia la conoscenza del vino raggiunse la civiltà greca, dove rappresentò uno degli elementi essenziali del Simposio e a cui fu dedicata una divinità: Dionisio.

Gli antichi romani appresero le tecniche di coltivazione della vite dagli Etruschi. I Romani erano a conoscenza delle proprietà battericida del vino, per cui era consuetudine portarlo nelle loro campagne come bevanda per i legionari; con esso venivano create pomate e tinture dalle proprietà terapeutiche per curare ferite e infezioni. Durante il Medioevo, dopo la caduta dell'Impero Romano, la produzione di vino diminuì e la viticoltura subì una fase di stallo, mentre in Germania si affinò e perfezionò l'arte della birra. Bisognerà attendere il Rinascimento con il diffondersi dei processi di urbanizzazione e crescita economica per restituire al vino il ruolo di protagonista della cultura occidentale.

Nella società occidentale, birra e vino furono un alimento essenziale durante la vita quotidiana fino al XIX secolo in quanto, anche se diluite, erano preferite all'acqua, che veniva invece associata a malattie acute e croniche. Una volta che furono introdotti sistemi di purificazione dell'acqua, il consumo di bevande alcoliche virò verso l'attuale ruolo di forma di ricreazione socialmente accettabile⁵.

⁵ Katzung, B. G., Masters, S. B., Trevor, A. J. (2011). Farmacologia generale e clinica. VIII Edizione italiana condotta sulla XI Edizione americana. Piccin Nuova Libreria, Padova.

1.2 Etanolo

L'alcol è classificabile fra le sostanze voluttuarie ovvero quelle sostanze che vengono assunte perché ritenute gradevoli e procurano sensazioni diverse dal solito e apparentemente positive⁶. Le bevande alcoliche sono composte principalmente da etanolo (CH₃CH₂OH) e acqua in proporzioni variabili dal 2% v/v fino al 55% v/v di etanolo. L'etanolo, o alcool etilico, è una piccola molecola idrosolubile che viene rapidamente e completamente assorbita dal tratto gastrointestinale. Il picco alcolemico si raggiunge in circa 30 minuti se l'ingestione di alcol avviene a digiuno; la presenza di cibo nel tubo gastroenterico ne ritarda l'assorbimento. Le molecole di etanolo dopo l'assorbimento entrano nella circolazione sanguigna e vengono trasportate a tutti gli organi e i tessuti corporei e si distribuisce nell'acqua corporea totale (il volume di distribuzione è di 0,5-0,7 L/kg).

Solo una piccola percentuale di etanolo viene escreta dall'organismo in forma intatta attraverso i polmoni e con le urine. Una piccolissima percentuale di etanolo (<0,1%) viene rimossa dal corpo attraverso un metabolismo non ossidativo ad opera di reazioni di coniugazione a livello epatico che portano alla formazione di Etilglucuronide ed Etilsolfato⁷. Oltre il 90% dell'alcool assunto viene metabolizzato attraverso ossidazione epatica sequenziale, prima ad acetaldeide da parte dell'alcool deidrogenasi (ADH), enzima citoplasmatico contenente zinco, e poi ad acido acetico da parte dell'aldeide deidrogenasi (ALDH), localizzato nei mitocondri⁸.

⁶ Frolidi, R. (2011). *Lezioni di tossicologia forense*. Quinta Edizione. G. Giappichelli Editore, Torino.

⁷ Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., Watt, J. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Quarta Edizione. Pharmaceutical Press, Londra.

⁸ Crabb, D. W., Bosron, W. F., & Li, T. K. (1987). Ethanol metabolism. *Pharmacology & therapeutics*, 34(1), 59–73. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(87\)90092-1](https://doi.org/10.1016/0163-7258(87)90092-1)

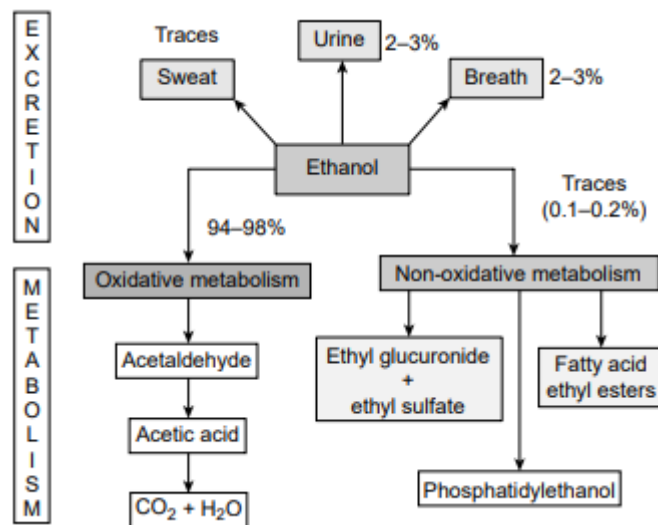


Figura 1: Schema del destino dell'etanolo nel corpo, comprensivo della quantità smaltita tramite escrezione in forma tal quale attraverso le urine, il respiro e il sudore e la quantità eliminata tramite metabolismo nel fegato mediante meccanismi ossidativi e non-ossidativi.

Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., Watt, J. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Quarta Edizione. Pharmaceutical Press, Londra.

Per la conversione dell'etanolo in acetaldeide è richiesto l'apporto del cofattore nicotinamide-adenina dinucleotide (NAD⁺) su cui viene trasferito lo ione idrogeno dall'alcol con formazione di NADH. Allo stesso modo la seconda deidrogenasi, l'ALDH, catalizza la trasformazione dell'acetaldeide in acetato con consumo di NAD⁺ e liberazione di H⁺. L'ossidazione dell'etanolo genera dunque, nel fegato, un eccesso di equivalenti riducenti, in particolare di NADH, che è causa di alcuni disturbi metabolici legati all'alcolismo, nonché dell'acidosi lattica e dell'ipoglicemia che si verificano a seguito dell'ingestione di ingenti quantità di alcool. L'incremento del rapporto NADH/NAD⁺ comporta, infatti, l'inibizione degli enzimi che richiedono NAD⁺, con conseguente riduzione dell'attività del ciclo degli acidi tricarbossilici e accumulo del

lattato ed acetil coenzima A. L'aumento del NADH e dell'acetil CoA favoriscono la sintesi degli acidi grassi e l'immagazzinamento dei trigliceridi⁹.

Anche il sistema microsomiale di ossidazione dell'etanolo (MEOS) può essere implicato nel metabolismo dell'alcol. Il MEOS, o sistema ossidasico a funzione mista, richiede l'attività dell'enzima CYP2E1, localizzato a livello del reticolo endoplasmatico liscio degli epatociti, e utilizza NADP⁺ come cofattore per la conversione dell'etanolo in acetaldeide¹⁰. Il MEOS è un sistema inducibile, ovvero presenta la proprietà di metabolizzare il substrato più efficacemente a seguito di una continua esposizione, come accade nei binge drinkers. In aggiunta, avendo il MEOS una Km elevata per l'ossidazione dell'etanolo, a basse concentrazioni di alcool contribuisce poco al metabolismo dell'etanolo; quando invece vengono consumate maggiori quantità di alcool il sistema dell'alcool deidrogenasi si satura e si verifica un aumento del contributo da parte del sistema MEOS.

Infine, anche la catalasi può convertire l'etanolo in acetaldeide, ma la disponibilità epatica di H₂O₂ è generalmente troppo bassa per favorire l'ingresso dell'etanolo in questa via metabolica¹¹.

Le cinetiche di eliminazione dell'alcool mostrano il raggiungimento di un valore di picco dopo circa 30-60 minuti dall'ultima somministrazione. La velocità di assorbimento può variare in funzione di numerosi fattori, tra cui l'assunzione di cibo, il tempo impiegato per il consumo della bevanda alcolica, età, sesso e polimorfismi enzimatici. Dopodiché si assiste ad una fase di equilibrio nella quale assorbimento ed eliminazione si equivalgono.

⁹ Brunton, L. L., Lazo, J. S., Parjter, K. L. (2006). Goodman & Gilman. Le basi farmacologiche della terapia. 1^a Edizione italiana dell'11^a Edizione originale. McGraw-Hill, Milano.

¹⁰ Ingall G. B. (2012). Alcohol biomarkers. Clinics in laboratory medicine, 32(3), 391–406.
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2012.06.003>

¹¹ Cederbaum A. I. (2012). Alcohol metabolism. Clinics in liver disease, 16(4), 667–685.
<https://doi.org/10.1016/j.cld.2012.08.002>

Infine, si ha una fase di eliminazione che non è influenzata dai livelli ematici ma è funzione lineare del tempo, in cui la concentrazione di etanolo diminuisce in maniera costante con un tasso di circa 0,15-0,20 g/L/h (Figura 2).

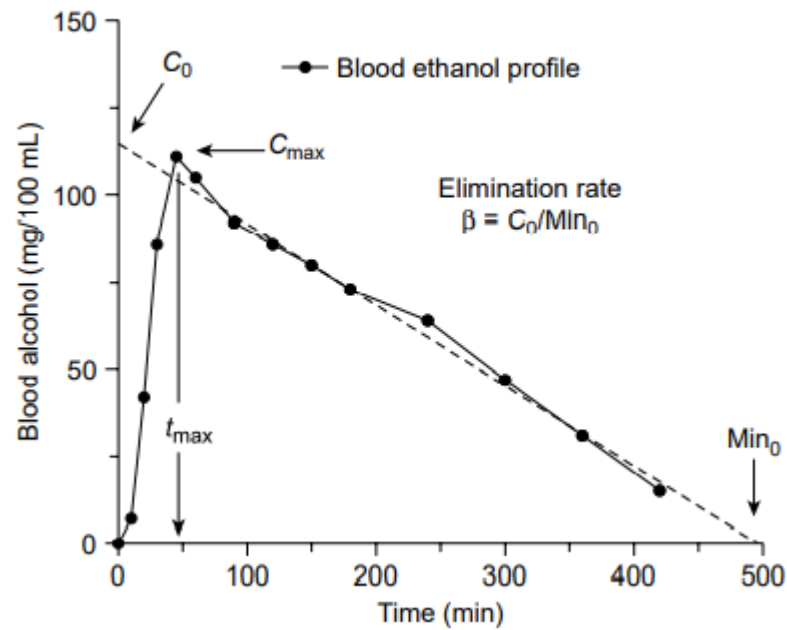


Figura 2: Curva alcolemica relativa ad un soggetto di sesso maschile che ha consumato una dose di etanolo di 0.80 g/Kg a stomaco vuoto.

Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., Watt, J. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Quarta Edizione. Pharmaceutical Press, Londra.

1.3 Meccanismo d'azione

L'influenza dell'alcool etilico sul comportamento dell'uomo dipende principalmente dall'azione che esso svolge sul sistema nervoso centrale con effetti di tipo depressivo. L'azione dell'etanolo si svolge sia stimolando la neurotrasmissione inibitoria sia antagonizzando la neurotrasmissione eccitatoria, con conseguenti effetti ansiolitici e sedativi e, a concentrazioni più alte, atassia, dislessia e comportamenti disinibiti con alterazione della capacità di giudizio. L'etanolo agisce mediante interferenza con specifici recettori sul complesso macromolecolare del GABA e con i recettori del glutammato. L'alcol aumenta l'attività inibitoria dei recettori del GABA stabilizzando il recettore GABA nello stato aperto e permeabilizzando il neurone all'ingresso di ioni cloro; di conseguenza, per iperpolarizzazione, si riduce l'eccitabilità neuronale. Dall'altro lato agisce legandosi ai recettori NMDA e bloccandone l'attività, determinando una riduzione dell'attività eccitatoria del glutammato. La depressione operata dall'alcol assume, in termini comportamentali e clinici, un andamento bifasico caratterizzato da una azione disinibitoria a basse dosi e da una depressione del SNC in toto, a dosi elevate.

A seguito dell'ingestione di grandi quantità di alcol si possono avere una serie di sintomi che vanno dalla semplice ebbrezza al coma. La Figura 3 elenca i principali sintomi ed effetti clinici dell'alcool in funzione della concentrazione ematica di etanolo (BAC). Ad una concentrazione ematica di etanolo di 20-30mg/100mL il soggetto generalmente assume un comportamento meno inibito e diventa più loquace e rilassato. Quando si raggiungono concentrazioni ematiche maggiori gli effetti dell'alcol diventano più evidenti, con perdita dell'autocontrollo e della capacità di giudizio, per cui il soggetto è più propenso al rischio. A concentrazioni di alcol nel sangue superiori a 100mg/100mL si rendono evidenti i classici segni di ubriachezza, come andatura instabile e diminuzione

del tempo di reazione, fino a raggiungere depressione respiratoria e coma in corrispondenza di una BAC di 300mg/100mL¹².

BAC (mg/100 mL)^(a)	Signs and symptoms of alcohol influence^(b)
<20	Sobriety, lack of outward signs, possible smell of alcohol on breath
20-50	Loss of inhibitions, more talkative, impairment of certain cognitive skills, especially those requiring divided attention
50-100	Lack of judgement and control, more rowdy and daring, slowed reaction time, especially in choice situations
100-150	Lack of coordination, unsteady gait, slurred speech, prolonged reaction to sights and sounds
150-200	Obvious drunkenness, aggression, ataxia, slowed reaction time even when relatively simple tasks are performed, nausea and vomiting especially after rapid absorption
200-300	Confusion, inability to stand upright or walk without help, slurred speech, motor areas of the brain are now markedly impaired, distorted perception of time and judgement risk lapsing into a comatose state
300-400	Stupor or comatose state with shallow breathing, risk of respiratory arrest, loss of gag reflex and danger of inhalation of vomit leading to asphyxia and death
400-500	Profound risk of death from respiratory paralysis and cardiopulmonary arrest

Figura 3: Segni clinici e sintomi dell'effetto dell'alcool in funzione dell'aumento della concentrazione ematica di etanolo.

Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., Watt, J. (2011). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Quarta Edizione. Pharmaceutical Press, Londra.

¹² Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., Watt, J. (2011). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 4th Edition Pharmaceutical Press, Londra.

Il consumo di alcool ad alte dosi e per un periodo protratto provoca tolleranza e dipendenza fisica e psicologica. Con il termine di tolleranza farmacologica si definisce il fenomeno caratterizzato dalla necessità di aumentare la dose di una sostanza per mantenere costante l'intensità dell'azione da esso prodotta.

La dipendenza fisica si evince dal fatto che insorge una sindrome di astinenza quando il consumo di alcol viene interrotto e si sviluppa conseguentemente all'adattamento a seguito di un riequilibrio dei meccanismi omeostatici in risposta all'uso ripetuto di una sostanza. I sintomi della crisi di astinenza includono insonnia, tremori e, nei casi più gravi, convulsioni e delirium tremens¹³. Un altro aspetto della dipendenza è un comportamento di desiderio compulsivo dell'alcol e di provare gli effetti gratificanti dell'alcol, fenomeno denominato dipendenza psicologica.

¹³ Witkiewitz, K., Litten, R. Z., & Leggio, L. (2019). Advances in the science and treatment of alcohol use disorder. *Science advances*, 5(9), eaax4043. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax4043>

1.4 Legislazione

1.4.1 Alcool e idoneità alla guida

Il consumo di alcool costituisce un pericolo importante per la sicurezza stradale. In Italia sono stati promossi diversi interventi normativi nell'ambito dell'abuso alcolico in relazione alla guida. Il D. Lgs. n. 59/2011 stabilisce che la patente non deve essere rilasciata o rinnovata a coloro che si trovano in stato di dipendenza dall'alcool o che non possano dissociare la guida dal consumo di alcool. La Legge n. 41/2016 ha introdotto nel Codice penale le nuove fattispecie delittuose dell'omicidio stradale e delle lesioni personali stradali. Il D. Lgs. N. 285/1992, con cui viene approvato il nuovo Codice della Strada, agli articoli 186 e 186 bis vieta la guida sotto l'influenza di alcool, fattispecie che conferma che il campione biologico di elezione per valutare lo stato di ebrezza è il sangue. La concentrazione ematica di alcool risulta infatti strettamente correlata alla disabilità alla guida, per l'azione di depressione che esso provoca al livello del sistema nervoso centrale. Le sanzioni per la guida sotto l'effetto di sostanze alcoliche, aggiornate dalla Legge n. 120 del 29 Luglio 2010, sono diversificate in base alla gravità della violazione commessa e collegate progressivamente a tre fasce alcolemiche (0,5-0,8; 0,8-1,5; >1,5 g/l). La legge introduce anche un nuovo articolo, il 186 bis, secondo cui è obbligatorio un tasso alcolemico pari a zero per i conducenti neopatentati (soggetti con età inferiore a 21 anni e chi ha ottenuto la patente da meno di tre anni) e per chi si occupa come professione del trasporto di persone o cose.

1.4.2 Alcool e sicurezza sul lavoro

Gli effetti che l'abuso di sostanze alcoliche provoca sulla salute delle persone e della collettività, come pure sulla sicurezza per sé e per altri nello svolgimento di numerose attività lavorative, sono sempre più al centro dell'attenzione e degli interventi delle Istituzioni pubbliche che, a questo riguardo, hanno promosso negli ultimi anni un numero crescente di interventi preventivi e informativi ed hanno emanato specifiche disposizioni di legge¹⁴. Il primo riferimento normativo riguarda la legge n. 125 del 30 Marzo del 2001 *“Legge quadro in materia di alcol e problemi alcol correlati”* che all'art. 15 riporta:

“1. Nelle attività lavorative che comportano un elevato rischio di infortuni sul lavoro ovvero per la sicurezza, l'incolumità o la salute dei terzi, individuate con decreto del Ministro del lavoro e della previdenza sociale, di concerto con il Ministro della sanità, da emanare entro novanta giorni dalla data di entrata in vigore della presente legge, è fatto divieto di assunzione e di somministrazione di bevande alcoliche e superalcoliche.

2. Per le finalità previste dal presente articolo i controlli alcolimetrici nei luoghi di lavoro possono essere effettuati esclusivamente dal medico competente ai sensi dell'articolo 2, comma 1, lettera d), del decreto legislativo 19 settembre 1994, n. 626, e successive modificazioni, ovvero dai medici del lavoro dei servizi per la prevenzione e la sicurezza negli ambienti di lavoro con funzioni di vigilanza competenti per territorio delle aziende unità sanitarie locali.

3. Ai lavoratori affetti da patologie alcol-correlate che intendano accedere ai programmi terapeutici e di riabilitazione presso i servizi di cui all'articolo 9, comma 1, o presso altre strutture riabilitative, si applica l'articolo 124 del testo unico delle leggi in materia di

¹⁴ Riboldi, L., & Bordini, L. (2008). Abuso acuto e cronico di alcol e lavoro [Acute and chronic alcohol abuse and work]. *Giornale italiano di medicina del lavoro ed ergonomia*, 30(3 Suppl), 56–66.

disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza, ...”.

La suddetta legge prevede il divieto di assunzione e di somministrazione di bevande alcoliche e superalcoliche durante le attività lavorative che comportano un elevato rischio di infortuni. Successivamente, con provvedimento del 16 marzo 2006 – n. 75 GU 30 marzo 2006 all'allegato 1, è stato emanato un decreto attuativo che individua dettagliatamente quali siano le categorie di lavoratori a cui la norma precedente fa riferimento. Si prevede che l'attività di controllo alcolimetrico sia esercitata dal medico competente o dal medico del lavoro senza tuttavia indicare il campione da prelevare, le procedure analitiche da applicare e il metodo da utilizzare per l'interpretazione del risultato¹⁵. In aggiunta, queste disposizioni presentano delle limitazioni di natura pratica sia per la rapida scomparsa dell'etanolo dal sangue rendendo improbabile l'identificazione di un abuso alcolico sul luogo di lavoro tramite alcolemia, sia per la difficoltà organizzativa di eseguire controlli alcolimetrici a sorpresa. Tale impianto normativo è stato recentemente integrato dal D.Lgs. 81/08 che amplia l'ambito applicativo preesistente laddove stabilisce (art. 41, comma 4) che "...Nei casi ed alle condizioni previste dall'ordinamento, le visite di cui al comma 2, lettere a), b) e d) (visite mediche preventive, periodiche e di cambio mansione) sono altresì finalizzate alla verifica di assenza di condizioni di alcol dipendenza...". In considerazione di quanto espresso l'intervento del medico competente appare così rivolto non solo alla prevenzione delle condotte di abuso acuto (controlli alcolimetrici) ma anche a quelle di abuso cronico, ritenendo che il Legislatore con il termine di "alcol dipendenza" abbia voluto far riferimento ai criteri classificativi dell'OMS (ICD 10)¹⁶.

¹⁵ Frolidi, R. (2011). *Lezioni di tossicologia forense*. Quinta Edizione. G. Giappichelli Editore, Torino.

¹⁶ Riboldi, L., & Bordini, L. (2008). Abuso acuto e cronico di alcol e lavoro [Acute and chronic alcohol abuse and work]. *Giornale italiano di medicina del lavoro ed ergonomia*, 30(3 Suppl), 56–66.

Il consumo di alcool nei luoghi di lavoro costituisce un fattore di rischio aggiuntivo che può incidere sulla salute, sicurezza e incolumità del lavoratore stesso e di terze persone. L'Organizzazione Internazionale per il Lavoro attesta che il 10-12% di tutti i lavoratori di età superiore ai 16 anni ha problemi legati all'abuso o alla dipendenza da alcol. Gli infortuni sul lavoro denunciati dall'Inail nel 2021 sono stati 564.089, di cui secondo l'Istituto Superiore di Sanità il 4-20% è alcool correlato, mentre l'OMS stima tra il 10 e il 30% la quota di infortuni attribuibili all'alcool.

1.5 Biomarcatori di abuso alcolico

L'aumento del consumo di alcol nella società ha provocato una serie di problematiche non solo mediche, come la diffusione di patologie come la cirrosi e i tumori, ma è diventato anche un problema di notevole rilevanza giuridica, sia in relazione al codice della strada (articolo 186 del Codice della Strada), sia in ambito di sicurezza sul lavoro (articolo 15 della legge 125 del 30/03/2001). La riduzione del fenomeno può verificarsi solo se si svilupperanno strategie efficaci per prevenire, diagnosticare e curare l'abuso alcolico. Nonostante un consumo acuto di alcol può essere facilmente identificato attraverso la misurazione dei livelli dell'etanolo stesso nel sangue o nell'aria espirata, ciò non fornisce indicazioni circa l'assunzione cronica di etanolo, direttamente correlata all'abuso e dipendenza alcolica¹⁷. Da anni sono disponibili dei questionari (CAGE, MUST o AUDIT) che vengono autocompilati e risultano dunque poco affidabili e poco corrispondenti alla realtà. Da qui nasce l'interesse scientifico nell'individuare strumenti oggettivi, i biomarcatori, che permettano una diagnosi precoce di abuso alcolico.

Un marcatore biochimico è una sostanza presente nei fluidi biologici che funge da indicatore di un normale processo biologico, di un processo patologico o della risposta farmacologica ad un intervento terapeutico. Quindi, nel contesto dell'abuso alcolico, un biomarcatore deve essere un indicatore accurato del consumo individuale di alcol durante un determinato periodo di tempo. Il marcatore ideale di abuso alcolico dovrebbe possedere una serie di caratteristiche, tra cui dare risultati riproducibili e attendibili, riuscire a identificare la quantità di alcool assunto anche nell'unità di tempo, essere economico e facilmente utilizzabile. L'affidabilità e il potere diagnostico di un marcatore

¹⁷ Torrente, M. P., Freeman, W. M., & Vrana, K. E. (2012). Protein biomarkers of alcohol abuse. Expert review of proteomics, 9(4), 425–436. <https://doi.org/10.1586/epr.12.38>

biochimico vengono valutati in termini di sensibilità e specificità. In questo contesto la sensibilità misura la frazione di abusatori di alcool effettivamente identificati come tali, mentre la specificità misura la frazione di non abusatori correttamente identificati.

I marcatori di abuso alcolico possono essere suddivisi in “biomarcatori di trait”, che evidenziano la predisposizione genetica a sviluppare dipendenza da alcool, e gli “state markers”, che indicano un consumo acuto o cronico di alcool e una condizione di abuso alcolico in atto¹⁸.

Il metodo più tradizionale per valutare il consumo di alcool è la ricerca diretta dell’etanolo nei fluidi biologici o nell’aria espirata, permettendo, però, solamente la rilevazione di un’assunzione molto recente a causa del rapido metabolismo dell’etanolo. Inoltre, riscontrare una positività all’etanolo non è indice dell’abitudine al bere o di problematiche di abuso alcolico di un soggetto. Per questo motivo la letteratura scientifica ha indagato numerosi marcatori biochimici in grado di valutare più specificamente l’abuso alcolico anche dopo un lungo periodo dall’assunzione di bevande alcoliche. Tra i marcatori di abuso alcolico ritroviamo marcatori non specifici e indiretti che non forniscono un dato diretto e quantitativo del consumo di alcol, ma valutano unicamente la presenza di patologie organiche alcool correlate, come enzimi epatici (GGT, AST, ALT), volume corpuscolare medio eritrocitario (MCV) ed elettroforesi siero proteica¹⁹. La gamma-glutamyl transferasi è una glicoproteina sierica e un enzima prevalentemente di origine epatica. È un marcatore di abuso alcolico poco specifico e poco sensibile; tra i fattori interferenti ritroviamo il diabete, pancreatiti, obesità e l’uso di farmaci quali barbiturici, antiepilettici e anticoagulanti. In relazione all’abuso alcolico è utile per seguire

¹⁸ Helander A. (2003). Biological markers in alcoholism. *Journal of neural transmission. Supplementum*, (66), 15–32. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0541-2_2

¹⁹ Società scientifica COMLAS, Ministero della Salute, SIBIOC, SIML, PUBLIEDIT. (Stesura definitiva al 30/06/2022). Linee di indirizzo per la valutazione dell’idoneità alla guida in soggetti con uso/abuso di bevande alcoliche.

l'astinenza di un alcolista e nel follow up di soggetti inseriti nei programmi di disassuefazione, in quanto la sua attività sierica torna alla normalità dopo 20-30 giorni di completa astensione.

Il volume cellulare medio degli eritrociti (MCV) rappresenta un altro indicatore di comune utilizzo e aumenta, nei soggetti assuntori di alcool, sia per l'azione tossica diretta dell'alcool sulla microviscosità della membrana eritrocitaria, sia per l'azione dell'acetaldeide sulla replicazione dei precursori degli eritrociti a livello midollare, sia per l'interferenza operata dall'etanolo sull'assorbimento intestinale e sul metabolismo dell'acido folico e della vitamina B12²⁰. A causa della sua bassa sensibilità non viene mai utilizzato singolarmente, mentre associato alla determinazione della GGT i valori di sensibilità e specificità aumentano. L'emivita di questo parametro dipende dalla vita dei globuli rossi, per cui la normalizzazione dei livelli sierici avviene dopo circa due mesi.

Altri indicatori tradizionalmente utilizzati sono l'aspartato aminotransferasi (AST) e l'alanina aminotransferasi (ALT), due enzimi sierici marcatori di danno epatico, poco sensibili e poco specifici. Falsi positivi si possono riscontrare in caso di epatopatia non alcolica, disordini muscolari e infarto miocardico.

Sono stati tutti quanti marcatori ampiamente utilizzati in passato, ma ad oggi il loro uso è stato abbandonato a favore dell'impiego di marcatori specifici indiretti, come la CDT, e diretti, come l'Etilglucuronide, che forniscono invece un dato quantitativo correlato alla quantità di alcool metabolizzata. Dunque, ai markers tradizionali per lo più di natura proteica, si è affiancata la determinazione, sia in matrici convenzionali (sangue, urina), sia alternative (capelli, meconio), di prodotti minori del metabolismo non ossidativo

²⁰ Società scientifica COMLAS, Ministero della Salute, SIBIOC, SIML, PUBLIEDIT. (Stesura definitiva al 30/06/2022). Linee di indirizzo per la valutazione dell'idoneità alla guida in soggetti con uso/abuso di bevande alcoliche.

dell'alcol, quali l'Etilglucuronide (EtG), il Fosfatidiletanolo e gli esteri etilici degli acidi grassi (FAEE).

1.5.1 Transferrina carboidrato-carente (CDT)

La transferrina è una glicoproteina (β 1-globulina) sierica sintetizzata nel fegato ed in piccole quantità dal sistema del reticolo endoteliale e dalle ghiandole endocrine con un'emivita di circa 7-10 giorni. La transferrina è deputata al trasporto del ferro ed ha un peso molecolare che varia tra 75.37 a 79.61 kDa. È costituita da una catena polipeptidica di 679 amminoacidi separata in due domini globulari, N-terminale (aa 1-336) e C-terminale (aa 337-679), ciascuno dei quali può legare uno ione Fe^{3+} . A livello del dominio C-terminale sono legate due catene glucidiche all'azoto delle asparagine 413 e 611²¹. In base al carico di ferro si possono identificare quattro isoforme di transferrina: l'apotransferrina, le transferrine monoferriche in cui il ferro è legato ai domini N- o C-terminali e la transferrina diferrica. L'eterogeneità della transferrina è data inoltre dalle catene glicaniche, costituite da N-acetilglucosammina, mannosio e galattosio; ogni catena può avere due, tre o quattro antenne, ciascuna delle quali termina con una molecola di acido sialico. Si possono avere, quindi, transferrine con residui di acido sialico da 0 a 8²². Un altro livello di eterogeneità della transferrina è situato a livello della struttura primaria della proteina. Si conoscono almeno 38 varianti genetiche che differiscono per uno o più amminoacidi nella catena polipeptidica. La Tf-C è la più comune nella popolazione

²¹ Bortolotti, F., De Paoli, G., & Tagliaro, F. (2006). Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 841(1-2), 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.05.005>

²² Arndt T. (2001). Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clinical chemistry*, 47(1), 13–27.

caucasica: di questa si conoscono almeno 16 varianti (C1-C16). La variante Tf-C1 è la più diffusa (95%) ed il suo gene codificante, polimorfico, possiede due varianti alleliche che generano la Tf-C2 (la prolina in posizione 570 è sostituita da una serina) e la Tf-C3. Vi sono poi la Tf-B con migrazione più anodica e la Tf-D con migrazione più catodica, delle quali a loro volta si conoscono numerose varianti. La Tf-D è maggiormente diffusa nell'Africa occidentale. A queste si aggiungono le associazioni eterozigoti tra le varie C, B e D²³.

La glicofoma della transferrina predominante, con oltre l'80% sia nella popolazione sana che negli alcolisti, è la tetrasialotransferrina, contenente due N-glicani bi-antennari. Le glicoforme di transferrina carboidrato carenti o desialate (ovvero l'asialo-Tf, monosialo-Tf e disialo-Tf) vengono collettivamente indicate come CDT e rappresentano generalmente nei soggetti non abusatori di alcool meno del 2% della transferrina totale. A seguito dell'assunzione di elevate quantità di alcool si assiste ad una riduzione della glicosilazione della transferrina, producendo un incremento della CDT. La desialazione della transferrina richiede il consumo di almeno 50-80g di alcool etilico al giorno per una settimana. Il meccanismo patognomonico dell'aumento della CDT in presenza di abuso alcolico non è ancora ben chiaro e definito; tuttavia, è noto che una quantità elevata di etanolo diminuisce l'attività enzimatica dell'N-acetilglucosaminiltransferasi, enzima della glicosilazione. L'astensione dall'alcool determina una normalizzazione dei livelli di questo marcatore in 2-4 settimane, in quanto le forme desialate della transferrina presentano un'emivita di circa 15 giorni. I metodi strumentali impiegati per la

²³ Gruppo di lavoro SIBioC: Bianchi, V., Pacifici, R., Palmi, I., Pichini, S., Vernocchi, A., Merlini, G., Ceriotti, F., Plebani, M. Gruppo di lavoro GFTI-SIMLA: Tagliaro, F., Bernini, M., Bortolotti, F., Caligara, M., Cassandro, P., De Giovanni, N., Snenghi, R. (2010). Transferrina carboidrato-carente (CDT): strategie analitiche ed interpretative. Documento di consenso delle Società Scientifiche SIBioC e Gruppo Tossicologi Forensi Italiani afferente alla Società Italiana di Medicina Legale e delle Assicurazioni (GTFI-SIMLA).

determinazione della CDT sono rappresentati principalmente dalla focalizzazione isoelettrica, dalla cromatografia liquida a scambio ionico e dall'elettroforesi capillare. Data l'ampia diversità dei test di laboratorio disponibili la determinazione della CDT presenta una grande disomogeneità negli intervalli di riferimento e nei risultati. Per questo motivo la Federazione Internazionale di Chimica Clinica (IFCC) ha evidenziato la necessità di un processo di standardizzazione della misurazione della CDT in qualità di biomarcatore di abuso alcolico²⁴. L'IFCC ha identificato la disialotransferrina come molecola a cui far riferimento, in quanto anche se meno specifica presenta una più elevata sensibilità diagnostica rispetto all'asialotransferrina e può essere rilevata anche quando i livelli di quest'ultima non sono ancora aumentati. Inoltre, l'IFCC ha definito che il risultato debba essere espresso come rapporto tra la somma dell'asialotransferrina e disialotransferrina rispetto alla transferrina totale, in modo tale da eliminare tutte le cause di aumento e diminuzione della transferrina che potrebbero inficiare nel risultato.

L'alterazione dei livelli della CDT non è un indice completamente specifico di abuso alcolico. Ci sono alcuni soggetti che presentano, ad esempio, rari disordini congeniti di glicosilazione e che hanno basalmente elevati livelli di CDT. Un altro fattore genetico associato a risultati falsamente positivi di CDT è la presenza di varianti genetiche di transferrina con sostituzioni di aminoacidi nella catena polipeptidica²⁵. Inoltre, pazienti con malattie croniche al fegato in stato avanzato possono avere alti valori di CDT anche senza aver consumato alcool.

²⁴ Helander, A., Wielders, J., Anton, R., Arndt, T., Bianchi, V., Deenmamode, J., Jeppsson, J. O., Whitfield, J. B., Weykamp, C., Schellenberg, F., & International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Standardisation of Carbohydrate-Deficient Transferrin (IFCC WG-CDT) (2016). Standardisation and use of the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 459, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.05.016>

²⁵ Fleming, M. F., Anton, R. F., & Spies, C. D. (2004). A review of genetic, biological, pharmacological, and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 28(9), 1347–1355. <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000139815.89794.be>

1.5.2 Etilglucuronide (EtG)

L'Etilglucuronide (EtG) è una molecola non volatile, polare, relativamente stabile, formata dalla coniugazione dell'etanolo con l'acido glucuronico con la mediazione delle UDP-glucuronil transferasi (UGT) e rappresenta per questo un marcatore diretto non ossidativo dell'etanolo e come tale viene considerato altamente specifico per la valutazione dell'assunzione di alcool. Può essere rilevato nel sangue fino a 8 ore e nelle urine fino a 80 ore dall'assunzione alcolica. 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. Dopo la somministrazione di eguali quantità di alcool, persone diverse mostrano differenti livelli di EtG nelle urine. A causa di questa variabilità biologica non è possibile risalire, dalla sola determinazione dell'EtG sulle urine, alla quantità di alcol assunta, né è possibile distinguere tra un'assunzione di una bevanda a basso contenuto alcolico poco prima della raccolta del campione e una consumazione di più ingenti quantità di alcool alcuni giorni prima della raccolta delle urine²⁶. Il dosaggio di questo marcatore nelle urine ha, pertanto, come principale applicazione, quella di valutare l'astensione in quei soggetti che seguono un programma di riabilitazione.

È stato inoltre puntualizzato che la concentrazione di EtG nell'urina varia in funzione della diuresi. Pertanto, sia nel monitoraggio dei pazienti in trattamento per alcolismo, sia nel corso di accertamenti di natura amministrativa o medico legale, è consigliabile riportare la concentrazione urinaria del metabolita a quella della creatinina.

²⁶ Andresen-Streichert, H., Müller, A., Glahn, A., Skopp, G., & Sterneck, M. (2018). Alcohol Biomarkers in Clinical and Forensic Contexts. *Deutsches Arzteblatt international*, 115(18), 309–315. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0309>

L'EtG può essere rilevato anche in matrici biologiche alternative, principalmente capelli, per la determinazione dell'abuso alcolico pregresso, specialmente nel contesto forense-amministrativo. L'EtG è una sostanza acida con un $pK_a=3.21$, per cui a pH fisiologico risulta carico negativamente. Essendo il pH dei cheratinociti e melanociti più acido rispetto a quello del plasma, l'equilibrio di distribuzione è spostato a svantaggio nell'incorporazione dell'EtG nella matrice pilifera. Questo sembrerebbe essere uno dei motivi per cui si ritrovano basse concentrazioni di EtG nei capelli (pg/mg). L'esatto meccanismo tramite cui l'EtG si accumula nella matrice pilifera non è ancora completamente noto; tuttavia, alcuni dati sperimentali suggeriscono che la principale via tramite cui si incorpora nei capelli è dal sangue, molto meno dal sudore e sebo²⁷. In particolare, l'accumulo dell'EtG nel capello avviene per diffusione passiva dai capillari sanguigni ai cheratinociti, determinando una deposizione più centrale dell'EtG, e dal sebo e sudore, risultando in un'incorporazione più periferica, e dunque più instabile, dell'EtG. La stabilità delle sostanze accumulate nella matrice pilifera dipende principalmente dalle proprietà chimiche della molecola, dalla qualità del capello e dalle pratiche di cura dei capelli eseguite dall'individuo. Il contenuto di melanina è noto che influenzi la deposizione su capello di molte sostanze, in particolare quelle basiche; tuttavia, la pigmentazione ha dimostrato di non influire sulla concentrazione di EtG nel capello. La concentrazione di EtG non sembra essere influenzata dall'uso di spray per capelli, gel o in generale prodotti per la cura dei capelli contenenti etanolo²⁸. Al contrario, invece, la concentrazione di EtG su capello può risultare diminuita da trattamenti chimici quali la

²⁷ Fosen, J. T., Høiseith, G., Sempio, C., Giarratana, N., Enger, A., Mørland, J., & Morini, L. (2019). Hair EtG: Alterations in segment levels accompanying hair growth. *Drug testing and analysis*, 11(1), 112–118. <https://doi.org/10.1002/dta.2474>

²⁸ Martins Ferreira, L., Binz, T., & Yegles, M. (2012). The influence of ethanol containing cosmetics on ethyl glucuronide concentration in hair. *Forensic science international*, 218(1-3), 123–125. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.015>

decolorazione, la permanente o la tintura, causando dei risultati falsi negativi. Anche le colorazioni temporanee o l'hennè possono incidere sulla stabilità dell'EtG nella matrice pilifera. Ciò va tenuto in considerazione per la corretta interpretazione dei dati ottenuti dalla misurazione dell'EtG²⁹. È quindi fondamentale documentare la presenza e il tipo di trattamento chimico eseguito sul campione di capelli e, in caso di presenza di un sospetto risultato falso negativo, si può ricorrere all'analisi dei FAEE (esteri etilici degli acidi grassi, in particolare l'Etilpamitato) per confermare il risultato negativo o meno.

L'esposizione occupazionale a prodotti contenenti etanolo, come gli igienizzanti per le mani, possono falsamente incrementare i livelli di EtG urinari, ma sembra che non influiscano sulla concentrazione di EtG su capello³⁰.

La matrice cheratinica presenta numerosi vantaggi di tipo pratico rispetto ad altri campioni biologici, tra cui la maggiore facilità di prelievo attuabile anche da personale non medico, la non invasività del campionamento, la facile conservazione del materiale, la stabilità intra-matrice degli analiti e dell'Etilglucuronide in particolare, di molto superiore rispetto agli altri campioni biologici, e la possibilità di ripetere il prelievo in caso di controversia. Inoltre, la matrice pilifera consente di ampliare la finestra di sorveglianza, permettendo, teoricamente, di individuare non soltanto un abuso continuo recente, ma anche un abuso in tempi pregressi.

La Society of Hair Testing (SoHT) ha emanato nel 2019 un documento di consenso per l'utilizzo di marcatori di abuso alcolico proponendo, per campioni di capello di lunghezza compresa tra 3 e 6 cm nel segmento prossimale, il cut-off di 5 pg/mg di Etilglucuronide

²⁹ Crunelle, C. L., Yegles, M., De Doncker, M., Dom, G., Cappelle, D., Maudens, K. E., van Nuijs, A. L., Covaci, A., & Neels, H. (2015). Influence of repeated permanent coloring and bleaching on ethyl glucuronide concentrations in hair from alcohol-dependent patients. *Forensic science international*, 247, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.11.023>

³⁰ Biondi, A., Freni, F., Carelli, C., Moretti, M., & Morini, L. (2019). Ethyl glucuronide hair testing: A review. *Forensic science international*, 300, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.05.004>

per discriminare un consumo di alcol ripetuto rispetto all'astinenza o al consumo occasionale, e un cut-off di 30 pg/mg di Etilglucuronide per identificare un consumo cronico eccessivo di alcool³¹. L'analisi del segmento prossimale della matrice pilifera, ovvero quella più vicina alla cute, permette di riscontrare un'esposizione temporalmente vicina all'assunzione.

Rispetto ai marker tradizionali, l'EtG su capello presenta una più elevata sensibilità e specificità diagnostica (rispettivamente 0,85 e 0,97 quando viene utilizzato un cut-off di 30 pg/mg nei 3 cm prossimali per rilevare un consumo >60 grammi al giorno di alcool) con una probabilità di falsi negativi notevolmente più ridotta rispetto alla CDT, una più lunga finestra di rilevabilità e una migliore correlazione con la quantità di alcool assunta.

³¹ Society of Hair Testing (SoTH). Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption, 2011.

CAPITOLO II

SCOPO DELLA TESI

Gli state markers biochimici di abuso alcolico vengono utilizzati in maniera efficace non solo nella diagnosi di condizioni abuso alcolico cronico a scopo clinico, ma anche per identificare il rischio di agire sotto l'effetto di alcool nel corso di attività rischiose per la salute di terzi, come la conduzione di veicoli. L'uso di questi marcatori nella valutazione dell'idoneità alla patente di guida è volto a identificare i soggetti a rischio di essere coinvolti in incidenti stradali alcool-correlati.

La CDT è stata ampiamente utilizzata finora come marcatore per rilevare un consumo cronico di alcool, soprattutto nei soggetti che devono presentarsi presso la Commissione medica Patenti per riottenere o rinnovare la patente di guida. La CDT è un marcatore abbastanza specifico se la sua analisi viene eseguita seguendo le linee guida fornite dall'IFCC. Tuttavia, si riscontrano ancora delle interferenze che conducono a risultati falsamente positivi, tra cui rari disordini congeniti di glicosilazione, l'uso di contraccettivi orali e in caso di pazienti con epatopatie, e falsi negativi, tra cui varianti genetiche della transferrina, alto BMI ed elevata trigliceridemia. Più recentemente, ai tradizionali marcatori di abuso alcolico si è affiancata la determinazione, sia in matrici convenzionali (sangue, urina) che alternative (capelli, meconio), di prodotti minori del metabolismo non ossidativo dell'alcol, tra cui l'Etilglucuronide (EtG). Poiché metabolita diretto dell'alcol, tale molecola è virtualmente dotata di specificità assoluta e si è dimostrata particolarmente promettente anche in termini di sensibilità.

Lo scopo di questo progetto è quello di studiare questi marcatori, in particolar modo la CDT e l'Etilglucuronide, e comparare vecchi e nuovi marcatori di abuso alcolico nel

sangue e nei capelli. Questo potrebbe essere d'aiuto alle Commissioni Mediche Locali Patenti come supporto nel loro giudizio di idoneità alla guida per i soggetti sospettati di consumare alcol in modo eccessivo, o anche ai Servizi per le tossicodipendenze che si occupano di gestire e curare i soggetti con problemi di alcolismo.

CAPITOLO III

MATERIALE E METODI

3.1 Campioni

I partecipanti di questo studio sono soggetti che hanno fatto richiesta per riottenere la patente di guida a seguito della sospensione della stessa secondo gli articoli 186 e 187 del Codice della Strada. I campioni di capelli sono stati reperiti e successivamente analizzati presso il Laboratorio For.Med.Lab, spin-off dell'Università di Macerata, il quale si interfaccia con le Commissioni Mediche Patenti delle Marche e i Sert per l'accertamento dell'uso di sostanze stupefacenti e di abuso alcolico. In particolare, per questo studio, i campioni piliferi sono stati inviati al laboratorio dalla Commissione Patenti di Ascoli Piceno, con la quale è stata instaurata una collaborazione per le finalità del progetto. La raccolta dei capelli è stata eseguita attraverso un taglio il più vicino possibile al cuoio capelluto a livello della nuca. I partecipanti allo studio sono stati 133 soggetti che hanno fatto richiesta presso la Commissione Patenti di Ascoli Piceno per il rinnovo, il rilascio o la revisione della patente da Ottobre 2018 a Luglio 2020.

I campioni di sangue per l'analisi della CDT sono stati invece sottoposti ad analisi presso l'Ospedale di Ascoli Piceno. Tutti i soggetti partecipanti allo studio hanno espresso consenso informato e il progetto è stato eseguito secondo le linee guida della commissione etica locale. A tutti i campioni è stato attribuito un codice per garantire l'anonimato.

3.2 Standard e reagenti

Lo standard di Etilglucuronide (EtG) e il relativo standard interno deuterato (D₅-EtG) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich. Il metanolo per l'analisi, l'acqua per l'analisi, il metanolo per HPLC, l'acqua ultrapura per HPLC e l'acido formico sono stati presi dalla Carlo Erba. Tutti i reagenti sono stati conservati secondo le indicazioni fornite dal produttore.

3.3 Preparazione del campione

L'analisi dell'Etilglucuronide su matrice pilifera è stata eseguita secondo la metodica riportata di seguito, che è stata validata internamente dal laboratorio Centro Diagnostico Italiano di Milano (CDI). I capelli sono stati dapprima tagliati in piccoli frammenti di circa 1-2 mm fino ad ottenere 100 mg di campione pilifero e poi lavati una prima volta con acqua e successivamente con metanolo. Dopo aver rimosso tutto il metanolo e asciugato i capelli in stufa a 45°C per qualche minuto, i campioni sono stati estratti mediante l'aggiunta di 600 µL di acqua ultrapura per LC-MS, 80 µL di metanolo ultrapuro per LC-MS e 20 µL di standard interno (D₅-EtG) in soluzione acquosa (1 ng/ µL). I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente overnight, sonicati per due ore e poi centrifugati a 13.000rpm per 10 minuti. Dopo centrifugazione, 500 µL del sovrantante sono stati prelevati, messi in un vial spinato da 1,5 mL e portati a secco sotto flusso di azoto mediante l'utilizzo dell'evaporatore Savant SPD121P della Thermo Scientific. Infine, i campioni sono stati risospesi con 50 µL di acqua con 0,1% (v/v) di acido formico per l'iniezione in UHPLC-HRMS.

Per l'analisi dei campioni è stato utilizzato il sistema cromatografico Dionex Ultimate 300 (UHPLC) della Thermo Scientific accoppiato con l'analizzatore Thermo Exactive Plus Orbitrap (HR-MS) mediante l'utilizzo della colonna cromatografica Luna Omega 3 μ m Polar C18 (50 x 2.1 mm). La fase A utilizzata è costituita da H₂O + 0,1 % (v/v) di acido formico, mentre la fase B è composta da acetonitrile + 0,1 % (v/v) di acido formico. La temperatura della colonna è stata impostata a 25°C e il flusso a 0,4 mL/min. Il gradiente di eluizione è mostrato in Tabella 1.

Tabella 1: Gradiente di eluizione dell'UHPLC.

TIME	FASE A (%)	FASE B (%)
0-1	99	1
1-4	5	95
4-6	5	95
6-7	99	1
7-10	99	1

Per l'identificazione dell'EtG e del relativo standard interno (EtG-d5) è stata utilizzata la massa esatta (EM) e le masse degli ioni prodotti dalla frammentazione per impatto elettronico (PI), ottenute dalla libreria m/z Cloud, con un range di accettabilità di ± 5 ppm. I valori presi in considerazione per gli analiti sono i seguenti: 221.06668 (EM), 75.00877, 85.02950, 113.02442 (PI) per l'Etilglucuronide e 226.09805 (EM) per l'Etilglucuronide deuterato.

Il cut-off per la positività all'Etilglucuronide è stato fissato a 30 pg/mg, come indicato dalla Society of Hair Testing (SoHT)³².

3.4 Curva di calibrazione

Ogni sostanza ricercata necessita di una curva di calibrazione per essere quantificata.

La curva di calibrazione utilizzata in questo studio copre un intervallo da 10 pg/mg a 100 pg/mg, con il primo calibratore che funge da bianco (matrice priva di analita ma contenente lo standard interno). La curva di calibrazione che ne deriva ha i seguenti punti:

- CAL 1: 0 pg/mg
- CAL 2: 10 pg/mg
- CAL 3: 25 pg/mg
- CAL 4: 50 pg/mg
- CAL 5: 100 pg/mg

Tali valori sono stati ottenuti aggiungendo diversi volumi di calibratore a 100 mg di capelli blank. È stato poi costruito il grafico inserendo i rapporti delle aree (Area analita/ Area standard interno) sull'asse delle y e le relative concentrazioni note sull'asse delle x, per calcolare l'equazione della retta di regressione con il metodo dei minimi quadrati (Figura 4). Il coefficiente di determinazione ottenuto R^2 è superiore al 99%, permettendo in questo modo una quantificazione affidabile.

³² Society of Hair Testing (SoTH). Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption, 2011.

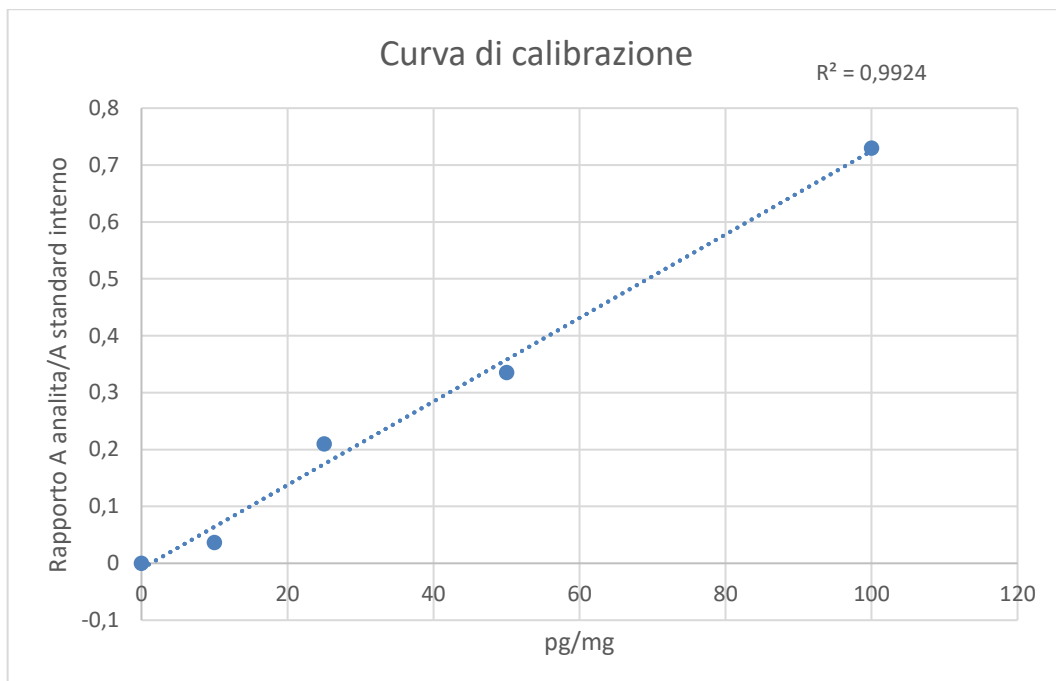


Figura 4: Curva di calibrazione

CAPITOLO IV

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel mondo occidentale si sta assistendo ad un forte aumento del fenomeno dell'uso e dell'abuso di alcool. L'etanolo è la sostanza psicoattiva più frequentemente utilizzata e rappresenta un serio motivo di allarme sociale. L'aumento del consumo di alcool nella società ha provocato una serie di problematiche non solo mediche, come la diffusione di patologie come la cirrosi e i tumori, ma è diventato anche un problema di notevole rilevanza giuridica, sia in relazione al codice della strada (articolo 186 del Codice della Strada), sia in ambito di sicurezza sul lavoro (articolo 15 della legge 125 del 30/03/2001). Secondo l'articolo 186 del codice della strada è vietato guidare in stato di ebbrezza a seguito all'assunzione di bevande alcoliche. La concentrazione ematica del sangue è infatti correlata alla disabilità alla guida per la sua azione di depressione sul SNC, con un rischio di incidente alcool correlato significativamente maggiore già con livelli alcolemici di 0,5 g/l. Per quanto riguarda la sicurezza sul lavoro, l'articolo 15 della legge 125 del 30/03/2001 tutela la salute del lavoratore vietando l'assunzione e la somministrazione di bevande alcoliche negli ambienti lavorativi, in quanto la compromissione dell'efficienza psicologica e fisica dell'etanolo comporta un aumento del rischio di infortuni.

In questo studio, in particolare, è stato affrontato il problema della comparazione tra vecchi e nuovi marcatori di abuso alcolico, nello specifico CDT ed Etilglucuronide, in uno scenario reale costituito da 133 soggetti che hanno fatto richiesta per il rinnovo o revisione della patente. Di questi 118 sono individui di sesso maschile, mentre 15 sono donne. L'età media è di 42 anni, con un minimo di 22 anni e un massimo di 75 anni. Sono stati riscontrati rispettivamente 1/133 (0,75%) e 29/133 (21,80%) soggetti positivi alla

CDT (>2,0%) e all'EtG (>30 pg/mg). In particolare, un solo campione è risultato positivo ad entrambi i test (0,75%), nessun campione solo alla CDT (0%) e 28 solo all'EtG (21,05%) (Tabella 2). I due marcatori erano in accordo nel 79% circa dei casi, con 104 risultati negativi e uno positivo.

Tabella 2: Comparazione tra i risultati positivi e negativi dell'EtG e della CDT.

		EtG		
CDT	-	+		Total
-	104	28		132
+	0	1		1
TOTAL	104	29		133

La prima osservazione che risulta da questo studio è la poca correlazione riscontrata tra nuovi e tradizionali marcatori di abuso alcolico.

A prima vista risalta sicuramente come non ci sia alcun campione che sia risultato positivo alla CDT e negativo all'Etilglucuronide. Questo dato dimostra quanto emerso in numerosi altri studi presenti in letteratura, secondo cui l'EtG presenta un'ottima performance diagnostica nell'ambito dell'abuso alcolico, superando di gran lunga le performance

diagnostiche dei marcatori tradizionali. Al contrario di questi ultimi, infatti, l'Etilglucuronide non risulta influenzato da età, sesso, BMI e numerosi altri fattori³³.

Il dato interessante su cui ci si è focalizzati maggiormente è, però, il cospicuo numero di campioni positivi solamente all'Etilglucuronide. Di questi campioni è stata calcolata la media del valore dell'EtG, pari a 351,96 pg/mg, e la mediana, pari a 215 pg/mg. Il valore minimo ritrovato è di 90 pg/mg, mentre quello massimo è di 1500 pg/mg; si evidenzia come siano stati riscontrati, dunque, valori elevati di EtG, molto più alti rispetto al cut-off di 30 pg/mg per la discriminazione di soggetti abusatori di alcool. Ventotto campioni positivi all'EtG non sono stati identificati come abusatori di alcool attraverso l'analisi della CDT; di questi 23 soggetti presentavano bassi livelli di CDT (< 1,1%).

Pochi dati sono disponibili riguardo a fattori associati a risultati falsi negativi di CDT. Recentemente è stato ipotizzato che alcune terapie farmacologiche potrebbero ridurre i valori della CDT³⁴. Sembrerebbe poi che un alto BMI, un'elevata trigliceridemia e bassi livelli di colesterolo-HDL si associano ad una ridotta sensibilità della risposta della CDT all'assunzione di alcool. Infine, sono state identificate alcune varianti genetiche che interferiscono sul valore dell'isoforma disialo, causandone un decremento dei valori; in particolare la più diffusa è la variante C, con una prevalenza >1%, seguita dalle varianti D e B.

Un'altra possibile motivazione che spiega il disaccordo tra i risultati ottenuti dall'analisi della CDT e dell'EtG si può ritrovare nella loro differente cinetica. Mentre l'EtG,

³³ Kharbouche, H., Faouzi, M., Sanchez, N., Daepfen, J. B., Augsburger, M., Mangin, P., Staub, C., & Sporkert, F. (2012). Diagnostic performance of ethyl glucuronide in hair for the investigation of alcohol drinking behavior: a comparison with traditional biomarkers. *International journal of legal medicine*, 126(2), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0619-9>

³⁴ Vidali, M., Bianchi, V., Bagnati, M., Atzeni, N., Bianchi, A. M., & Bellomo, G. (2014). False negativity to carbohydrate-deficient transferrin and drugs: a clinical case. *Biochemia medica*, 24(1), 175–179. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.020>

misurato in campioni di capello della lunghezza di 3 cm, fa riferimento al consumo di alcool degli ultimi 3 mesi (essendo la crescita del capello, in media, pari a un centimetro al mese), i livelli della CDT si innalzano a seguito di un consumo maggiore di 60 grammi di alcool al giorno per almeno due settimane, con un tempo di dimezzamento di circa 10 giorni. In aggiunta, un soggetto, se è a conoscenza del giorno della raccolta del campione di sangue, può limitare o interrompere il consumo di alcool per alcune settimane per normalizzare i valori della CDT e la sua classificazione come abusatore cronico di alcool potrebbe sollevare qualche dubbio. Nel caso, quindi, la valutazione di abuso alcolico da parte della Commissione Medica Patenti venisse eseguita mediante l'impiego esclusivo della CDT come marcatore, si otterrebbero dei risultati fuorvianti e si giungerebbe a rilasciare la patente di guida a dei soggetti che in realtà potrebbero avere una storia di consumo eccessivo di alcool.

L'Etilglucuronide non presenta praticamente risultati falsi positivi, per cui risulta molto affidabile in campo forense-amministrativo, grazie alle sue elevate performance nel monitoraggio dell'astinenza, nell'identificare una ricaduta nel bere o nella diagnosi di abuso cronico di alcool³⁵. Numerosi studi hanno infatti dimostrato che i livelli di EtG non sono influenzati dall'utilizzo di prodotti per la cura di capelli contenenti etanolo. Al contrario si potrebbero riscontrare invece dei falsi negativi nel caso in cui il soggetto abbia eseguito trattamenti quali la decolorazione³⁶, tintura o permanente.

Un altro vantaggio da tenere sicuramente in considerazione, riguardo all'impiego dell'EtG su matrice pilifera come marcatore di abuso alcolico, è la possibilità di avere a

³⁵ Kharbouche, H., Faouzi, M., Sanchez, N., Daepfen, J. B., Augsburger, M., Mangin, P., Staub, C., & Sporkert, F. (2012). Diagnostic performance of ethyl glucuronide in hair for the investigation of alcohol drinking behavior: a comparison with traditional biomarkers. *International journal of legal medicine*, 126(2), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0619-9>

³⁶ Morini, L., Zucchella, A., Poletti, A., Politi, L., & Groppi, A. (2010). Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair: an in vitro experiment. *Forensic science international*, 198(1-3), 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.11.005>

disposizione un valido strumento per l'accertamento dell'uso non recente di questa sostanza psicotropa. I capelli, grazie alla loro capacità di accumulo, permettono un significativo ampliamento della finestra temporale di rilievo dell'alcool. Inoltre, grazie all'analisi di segmenti differenti di capelli, è possibile ricavare informazioni sulla storia del consumo; l'EtG risulta infatti stabile fino a 18 mesi nei soggetti che non hanno eseguito trattamenti ai capelli³⁷. In aggiunta a questo, l'analisi dell'EtG su matrice pilifera comporta sicuramente dei vantaggi di ordine metodologico e pratico, in quanto il prelievo del campione è non invasivo e facile, così come la sua conservazione.

Alla luce di ciò entra in gioco il momento più importante e forse più interessante per il tossicologo forense: l'interpretazione del dato ottenuto. Come già detto i dati raccolti vanno attentamente valutati e giustificati alla luce di tutte le informazioni disponibili, sia di tipo anamnestico, sia di tipo analitico. Come si evince dai dati ottenuti da questo studio, è sicuramente opportuno affiancare all'analisi dei tradizionali marcatori di abuso alcolico (come la CDT) anche la ricerca di nuovi indicatori diretti di un consumo eccessivo di alcool (come l'EtG), sicuramente più affidabili e con una sensibilità maggiore. Tra i soggetti che hanno partecipato a questo studio, infatti, ben 28 hanno mostrato una negatività alla CDT e una positività all'EtG. Se le Commissioni Patenti avessero utilizzato solamente la CDT come marcatore per l'accertamento di abuso alcolico avrebbero erroneamente confermato, restituito o rilasciato la patente di guida ad una cospicua parte di soggetti.

La CDT è sicuramente uno dei marcatori più utilizzati e studiati ed è stato dimostrato avere un'elevata specificità, ma una sensibilità limitata. Una sensibilità e specificità

³⁷ Crunelle, C. L., Yegles, M., De Doncker, M., Dom, G., Cappelle, D., Maudens, K. E., van Nuijs, A. L., Covaci, A., & Neels, H. (2015). Influence of repeated permanent coloring and bleaching on ethyl glucuronide concentrations in hair from alcohol-dependent patients. *Forensic science international*, 247, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.11.023>

accettabile si raggiunge solo quando questo viene combinato con i risultati ottenuti da altri marcatori³⁸. Negli ultimi anni ai biomarcatori tradizionali si è affiancata la determinazione, sia in matrici convenzionali (sangue, urine), sia alternative (meconio, capelli), di prodotti minori del metabolismo non ossidativo dell'alcol, quali l'Etilglucuronide (EtG), l'Etilsolfato (EtS) e gli esteri etilici degli acidi grassi (FAEE). Tali molecole, in quanto metaboliti diretti dell'alcol, sono virtualmente dotate di specificità assoluta e si sono dimostrate promettenti anche in termini di sensibilità. Pertanto, un'interpretazione combinata di due o più parametri consente di aumentare l'accuratezza e l'attendibilità del dato. Data, infatti, l'ampia variabilità in termini di sensibilità e specificità che questi marcatori hanno dimostrato, sicuramente il loro uso combinato consente una diagnosi di abuso alcolico più corretta rispetto al loro uso singolo. Anche secondo le Linee di Indirizzo sulla Valutazione dell'Idoneità alla Guida in Soggetti con uso/abuso di bevande alcoliche viene raccomandata la prescrizione degli esami dei marcatori EtG su capello e CDT su sangue, in quanto i due marcatori associati aumentano la possibilità di diagnosi di consumo di alcool, indagando due diversi metaboliti su due matrici diverse. In mancanza di capello le stesse linee guida raccomandano di prendere in considerazione il pelo toracico come matrice cheratinica. In mancanza, invece, di qualsiasi matrice cheratinica, la valutazione della CDT deve contemplare l'esecuzione di almeno 3 prelievi distanziati di minimo 15 giorni nell'arco di due mesi.

Risultati simili a quelli ottenuti in questo progetto di ricerca sono emersi anche in uno studio di Poletini e colleghi, in cui è stata messa a confronto la ricerca dell'EtG sul

³⁸ Morini, L., Politi, L., Acito, S., Groppi, A., & Poletini, A. (2009). Comparison of ethyl glucuronide in hair with carbohydrate-deficient transferrin in serum as markers of chronic high levels of alcohol consumption. *Forensic science international*, 188(1-3), 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.04.003>

capello con la valutazione della CDT nel siero ed è risultato che la CDT e l'EtG presentano una specificità perfettamente sovrapponibile, ma l'EtG ha una sensibilità doppia rispetto alla CDT³⁹.

In conclusione, il problema dell'assunzione di quantità eccessive di alcol sta avendo un'attenzione sempre maggiore sia in campo scientifico, che sociale e normativo. I dati danno ragione di questa affermazione: la prevalenza del fenomeno, la diffusione crescente di modalità di assunzione più a rischio, l'incremento di tale abitudine nelle fasce di età più giovani, il numero e la gravità degli effetti, sia acuti che cronici, ad essa conseguenti, giustificano la promozione di azioni tese a controllare e, soprattutto, a prevenire questa abitudine voluttuaria.

La diagnosi di patologie correlate all'alcol segue criteri diagnostici accettati a livello internazionale quali il DSM V e la Classificazione Internazionale delle Malattie (ICD-10) dell'OMS, e gli strumenti diagnostici usufruiscono sia di questionari volti a identificare problemi connessi all'uso di alcol, sia di esami biochimici. Tra questi sono di uso comune quelli che fanno riferimento ad alcuni enzimi epatici gamma glutamiltrasferasi (GGT), aspartato aminotrasferasi (AST), alanina aminotrasferasi (ALT) e, soprattutto, alla transferrina carboidrato carente (CDT). Questi marker, che subiscono un incremento in presenza di un consumo di alcol non moderato, difettano per sensibilità e specificità diagnostiche essendo influenzati da vari altri fattori, tra cui variabilità genetica, patologie epatiche di altra origine, assunzione di farmaci, fattori ormonali⁴⁰.

Per tale ragione risulta di primaria importanza poter formulare una diagnosi oggettiva di questa condizione attraverso l'impiego di indicatori diagnostici il più possibile affidabili.

³⁹ 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, August 27–September 1, 2006, CT-1-11 (Abstracts).

⁴⁰ Politi, L., Morini, L. (2008). Marcatori diagnostici dell'abuso alcolico e ruolo dell'etil glucuronide. Instrumentation Laboratory.

Sulla base dei grammi di etanolo assunti giornalmente, ottenuti dalle indicazioni fornite da autodichiarazioni, si può effettuare una classificazione dei consumatori di alcool di tipo epidemiologico in:

- Astemi o astinenti, individui che non consumano alcool;
- Moderati o social drinkers, individui che assumono una quantità di etanolo inferiore a 60 grammi al giorno;
- Consumatori eccessivi o a rischio, individui che consumano una quantità di etanolo superiore a 60 grammi al giorno.

Dal punto di vista analitico la ricerca nei laboratori di tossicologia forense si è incentrata nell'individuazione di una corrispondenza tra questi tre gruppi e la quantificazione dei metaboliti dell'alcool nelle varie matrici biologiche.

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 alcool (esempio: soggetto in lista d'attesa per trapianto epatico) e la verifica dell'idoneità alla guida. In questo studio si è deciso di soffermarsi in particolare su quest'ultimo punto, in quanto dai dati ISTAT-ACI emerge che su un totale di 52.459 incidenti con lesioni rilevati dal Comando Generale dell'Arma dei Carabinieri e il Servizio della Polizia Stradale del Ministero dell'Interno nel 2021 sono stati 5.085 quelli con almeno uno dei conducenti dei veicoli coinvolti in stato di ebbrezza, in aumento rispetto al 2020. Dai dati comunicati dalle Polizie Municipali o Locali, infine, risulta che il 36% delle sanzioni per guida in stato di ebbrezza sono state elevate in occasione di incidente stradale.

Per la guida in stato di ebbrezza, secondo i controlli effettuati dalle Polizie Municipali, la percentuale di conducenti positivi all'etilometro sono risultati il 7,3% (8,3% nel 2020 e 7,4% nel 2019). Si rilevano infine aumenti delle sanzioni pari al 12% rispetto al 2020. Va

però ricordato che fino al 20 giugno 2021 è stato in vigore il coprifuoco dalle 22 alle 5 del mattino.

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.

Per quanto riguarda la diagnosi e la prevenzione delle condotte di alcol-dipendenza disponiamo oggi di strumenti affidabili per la loro identificazione. Accanto agli indicatori di consolidata efficacia (GGT, MCV, AST, ALT, CDT) la recente introduzione nella pratica di laboratorio di nuovi marcatori (EtG, FAEE, etc.) rappresenta un prezioso strumento per la diagnosi e individuazione delle condizioni di abuso alcolico. Questi nuovi indicatori si stanno dimostrando molto utili per la diagnosi di alcolismo, essendo metaboliti diretti dell'etanolo e mostrando una maggiore affidabilità rispetto ai marker tradizionali, che invece possono essere influenzati anche da altri fattori. Perciò, considerando anche la grande variabilità dei risultati ottenuti dalla determinazione della CDT su sangue e dell'EtG su capello, si sconsiglia l'uso singolo della CDT, come attualmente in essere in alcune Commissioni Mediche Patenti, a favore dell'uso combinato dei due parametri per migliorare l'accuratezza della diagnosi, grazie alla conferma comune dei due indicatori e all'identificazione dei falsi positivi o falsi negativi causati da variazioni biologiche.

BIBLIOGRAFIA

- Andresen-Streichert, H., Müller, A., Glahn, A., Skopp, G., & Sterneck, M. (2018). Alcohol Biomarkers in Clinical and Forensic Contexts. *Deutsches Arzteblatt international*, 115(18), 309–315. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0309>.
- Arndt T. (2001). Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clinical chemistry*, 47(1), 13–27.
- Biondi, A., Freni, F., Carelli, C., Moretti, M., & Morini, L. (2019). Ethyl glucuronide hair testing: A review. *Forensic science international*, 300, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.05.004>.
- Bortolotti, F., De Paoli, G., & Tagliaro, F. (2006). Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 841(1-2), 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.05.005>.
- Brunton, L. L., Lazo, J. S., Parjter, K. L. (2006). *Goodman & Gilman. Le basi farmacologiche della terapia. 1a Edizione italiana dell'11a Edizione originale.* McGraw-Hill, Milano.
- Cederbaum A. I. (2012). Alcohol metabolism. *Clinics in liver disease*, 16(4), 667–685. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2012.08.002>.
- Crabb, D. W., Bosron, W. F., & Li, T. K. (1987). Ethanol metabolism. *Pharmacology & therapeutics*, 34(1), 59–73. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(87\)90092-1](https://doi.org/10.1016/0163-7258(87)90092-1).

- Crunelle, C. L., Yegles, M., De Doncker, M., Dom, G., Cappelle, D., Maudens, K. E., van Nuijs, A. L., Covaci, A., & Neels, H. (2015). Influence of repeated permanent coloring and bleaching on ethyl glucuronide concentrations in hair from alcohol-dependent patients. *Forensic science international*, 247, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.11.023>.
- Fleming, M. F., Anton, R. F., & Spies, C. D. (2004). A review of genetic, biological, pharmacological, and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 28(9), 1347–1355. <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000139815.89794.be>
- Fosen, J. T., Høiseth, G., Sempio, C., Giarratana, N., Enger, A., Mørland, J., & Morini, L. (2019). Hair EtG: Alterations in segment levels accompanying hair growth. *Drug testing and analysis*, 11(1), 112–118. <https://doi.org/10.1002/dta.2474>.
- Froldi, R. (2011). *Lezioni di tossicologia forense*. Quinta Edizione. G. Giappichelli Editore, Torino.
- Gruppo di lavoro SIBioC: Bianchi, V., Pacifici, R., Palmi, I., Pichini, S., Vernocchi, A., Merlini, G., Ceriotti, F., Plebani, M. Gruppo di lavoro GFTI-SIMLA: Tagliaro, F., Bernini, M., Bortolotti, F., Caligara, M., Cassandro, P., De Giovanni, N., Snenghi, R. (2010). Transferrina carboidrato-carente (CDT): strategie analitiche ed interpretative. Documento di consenso delle Società Scientifiche SIBioC e Gruppo Tossicologi Forensi Italiani afferente alla Società Italiana di Medicina Legale e delle Assicurazioni (GTFI-SIMLA).
- Helander A. (2003). Biological markers in alcoholism. *Journal of neural transmission*. Supplementum, (66), 15–32. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0541-2_2.

- Helander, A., Wielders, J., Anton, R., Arndt, T., Bianchi, V., Deenmamode, J., Jeppsson, J. O., Whitfield, J. B., Weykamp, C., Schellenberg, F., & International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Standardisation of Carbohydrate-Deficient Transferrin (IFCC WG-CDT) (2016). Standardisation and use of the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 459, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.05.016>.
- Ingall G. B. (2012). Alcohol biomarkers. *Clinics in laboratory medicine*, 32(3), 391–406. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2012.06.003>.
- Katzung, B. G., Masters, S. B., Trevor, A. J. (2011). *Farmacologia generale e clinica. VIII Edizione italiana condotta sulla XI Edizione americana*. Piccin Nuova Libreria, Padova.
- Khaderi S. A. (2019). Introduction: Alcohol and Alcoholism. *Clinics in liver disease*, 23(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2018.09.009>.
- Kharbouche, H., Faouzi, M., Sanchez, N., Daepfen, J. B., Augsburger, M., Mangin, P., Staub, C., & Sporkert, F. (2012). Diagnostic performance of ethyl glucuronide in hair for the investigation of alcohol drinking behavior: a comparison with traditional biomarkers. *International journal of legal medicine*, 126(2), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0619-9>.
- Martins Ferreira, L., Binz, T., & Yegles, M. (2012). The influence of ethanol containing cosmetics on ethyl glucuronide concentration in hair. *Forensic science international*, 218(1-3), 123–125. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.015>.

- Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., Watt, J. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Quarta Edizione. Pharmaceutical Press, Londra.
- Morini, L., Politi, L., Acito, S., Groppi, A., & Poletini, A. (2009). Comparison of ethyl glucuronide in hair with carbohydrate-deficient transferrin in serum as markers of chronic high levels of alcohol consumption. *Forensic science international*, 188(1-3), 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.04.003>.
- Morini, L., Zucchella, A., Poletini, A., Politi, L., & Groppi, A. (2010). Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair: an in vitro experiment. *Forensic science international*, 198(1-3), 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.11.005>.
- Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). (2018). *Global status report on alcohol and health 2018*.
- Poletini, A., Morini, L., Stramesi, C., Politi, L. (2006). 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, August 27–September 1, 2006, CT-1-11 (Abstracts).
- Politi, L., Morini, L. (2008). *Marcatori diagnostici dell'abuso alcolico e ruolo dell'Etil Glucuronide*. Instrumentation Laboratory.
- Presidenza del Consiglio dei Ministri Dipartimento per le Politiche Antidroga. (2022). *Relazione annuale al Parlamento sul fenomeno delle tossicodipendenze in Italia*. [relazione-al-parlamento-2022.pdf \(politicheantidroga.gov.it\)](https://www.politicheantidroga.gov.it/relazione-al-parlamento-2022.pdf).
- Riboldi, L., & Bordini, L. (2008). Abuso acuto e cronico di alcol e lavoro [Acute and chronic alcohol abuse and work]. *Giornale italiano di medicina del lavoro ed*

ergonomia, 30(3 Suppl), 56–66.

Scafato, E., Ghirni, S., Gandin, C., Vichi, M., Matone, A., Scipione, R., Gruppo di Lavoro CSDA (Centro Servizi Documentazione Alcol). (2020). Epidemiologia e monitoraggio alcol-correlato in Italia e nelle Regioni. Valutazione dell'Osservatorio Nazionale Alcol sull'impatto del consumo di alcol ai fini dell'implementazione delle attività del Piano Nazionale Alcol e Salute. Rapporto 2020.

Società scientifica COMLAS, Ministero della Salute, SIBIOC, SIML, PUBLIEDIT. (Stesura definitiva al 30/06/2022). Linee di indirizzo per la valutazione dell'idoneità alla guida in soggetti con uso/abuso di bevande alcoliche.

Society of Hair Testing (SoTH). (2011). Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption.

Torrente, M. P., Freeman, W. M., & Vrana, K. E. (2012). Protein biomarkers of alcohol abuse. *Expert review of proteomics*, 9(4), 425–436. <https://doi.org/10.1586/epr.12.38>.

Vidali, M., Bianchi, V., Bagnati, M., Atzeni, N., Bianchi, A. M., & Bellomo, G. (2014). False negativity to carbohydrate-deficient transferrin and drugs: a clinical case. *Biochimica medica*, 24(1), 175–179. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.020>.

Witkiewitz, K., Litten, R. Z., & Leggio, L. (2019). Advances in the science and treatment of alcohol use disorder. *Science advances*, 5(9), eaax4043. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax4043>.