

**MARKERS BIOCHIMICI DI ABUSO ALCOLICO CRONICO.
ESPERIENZA DEL LABORATORIO DI TOSSICOLOGIA
DELL' U.O MEDICINA LEGALE DI CATANZARO**

Bonacci F.; Maurotti S.; Melina S.; Rivalta L.

L'abuso di bevande alcoliche è un problema di grande attualità, per le gravi conseguenze mediche e sociali; sono infatti da considerare non solo le patologie alcool-correlate, ma anche gli incidenti in ambito domestico, lavorativo e soprattutto della circolazione stradale attribuibili a questa sostanza.

In Italia vi sono circa 4 milioni di soggetti che sono consumatori eccessivi di alcool, di cui 1 milione è alcool-dipendente; i decessi circa 30.000 all'anno, dato significativo se paragonato ai 1000 decessi/anno per tossicodipendenza.

I numerosi studi a riguardo hanno valutato che il 30-50% degli incidenti stradali è causato da assunzione di alcool. Il rischio aumenta esponenzialmente con l'aumento dell'alcoolemia, ma l'alcool riduce le capacità e i tempi di reazione già a livelli ematici molto bassi.

L'Unità Operativa di Medicina Legale di Catanzaro è sede della Commissione Locale Patenti provinciale, dove afferiscono tutti i soggetti che sono stati fermati per guida in stato di ebbrezza, ovvero con un tasso alcoolemico superiore a 0,5 grammi/litro, ai sensi dell'art. 186 del Codice della Strada.

Il laboratorio di Tossicologia, sub-articolazione della Medicina Legale, esegue gli esami ematochimici su tali soggetti, che vengono altresì sottoposti a consulenza psichiatrica e tossicologica.

Numerosi sono gli indicatori biochimici utilizzati per la diagnosi di abuso alcolico cronico; tra questi la transferrina carboidrato carente (CDT) rappresenta il marcatore più utilizzato per la sua specificità.

La transferrina, glicoproteina sierica umana deputata al trasporto del ferro, è caratterizzata da microeterogeneità dovuta al carico di ferro, a variazioni della sequenza degli aminoacidi, alla struttura degli oligosaccaridi. La molecola è costituita da una singola catena polipeptidica con due catene polisaccaridiche N a loro volta legate ai residui terminali di acido sialico, in numero da 1 ad 8.

Nel 1976 Stibler e Kjiellin scoprirono nel liquido cefalorachidiano, mediante tecniche di immunoelettrofocusing, che le isoforme della transferrina di soggetti affetti da alcolismo erano in quantità differente rispetto a soggetti sani.

Tali glicoforme in concentrazione anomala presentavano $pI. \geq 5.7$ ed avevano contenuto di acido sialico più basso che in condizioni normali. Si è quindi evidenziato che le isoforme povere in acido sialico (disialo, monosialo e asialo transferrina), denominate nel loro complesso transferrina desialata o transferrina carboidrato carente (CDT), sono presenti nel siero di pazienti con un consumo regolare di alcol in quantità superiori a 50-80 g di etanolo il giorno per almeno 2 settimane; il meccanismo dell'incremento della frazione CDT in presenza di abuso alcolico non è del tutto chiaro, probabilmente è dovuto ad una modifica nel processo di glicosilazione della transferrina. Le concentrazioni di CDT ritornano a livelli normali dopo circa 2-4 settimane di astinenza dall'assunzione di alcol.

Per la determinazione della CDT vi sono diverse procedure analitiche: test immunochimici, cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e l'elettroforesi capillare (CE). Quest'ultima, utilizzata al fine di differenziare le varie isoforme della transferrina desializzata, è risultata più sensibile delle tecniche immunometriche nell'individuazione degli etilisti cronici ed ha evidenziato una significativa capacità di discriminazione tra consumatori eccessivi e moderati di bevande alcoliche.

La Transferrina Carboidrato Carente è un marker idoneo a rilevare l'abuso alcolico cronico, posto a confronto con gli altri esami di laboratorio più comunemente usati, quali *Gamma GT*, *MCV*, *GOT*, e *GPT*.

Sono stati analizzati i sieri di 150 soggetti di età compresa tra 18 ed i 70 anni ai quali era stata ritirata la patente per guida in stato di ebbrezza.

I campioni sono stati raccolti in un intervallo di tempo compreso tra gennaio 2006 e dicembre 2006.

Sono stati determinati i seguenti esami ematochimici: emocromo, γ GT, GOT, GPT e CDT.

Il prelievo è stato effettuato con provetta vacutainer senza alcun additivo, il campione è stato centrifugato ed il siero conservato a $+4^{\circ}\text{C}$, se analizzato il giorno successivo, altrimenti in freezer a -20°C . Prima del loro utilizzo i campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente ed agitati per qualche minuto.

Le determinazioni della CDT sono state eseguite con un elettroferografo capillare P/ACE MDQ (Beckman Coulter) dotato di un detector UV a lunghezza d'onda singola con un filtro di interferenza a 200 nm. Il capillare utilizzato era di silice fusa, uncoated della lunghezza totale di 57 cm, effettiva 50 cm e diametro interno $50\ \mu\text{m}$ (Beckman Coulter).

Ogni mattina il capillare è stato lavato ad una pressione di 25 psi con HCl 0.1M per 5 minuti, seguiti da un lavaggio con H₂O per 5 minuti, ed ancora con NaOH per 5 minuti.

Successivamente il sistema è stato condizionato, applicando una pressione di 20kV per 12 minuti, utilizzando i seguenti tamponi:

- *Rinse*: acqua bidistillata
- *Condizionatore*: NaOH 0.2 M
- *Iniziatore*: tampone TRIS/Phosphato pH 2.0
- *Buffer*: tampone TRISborato pH 8.5

Il voltaggio applicato è stato di 13.9 kV (corrente 14 mA), la temperatura di 25° C. La rilevazione è avvenuta a 200 nm.

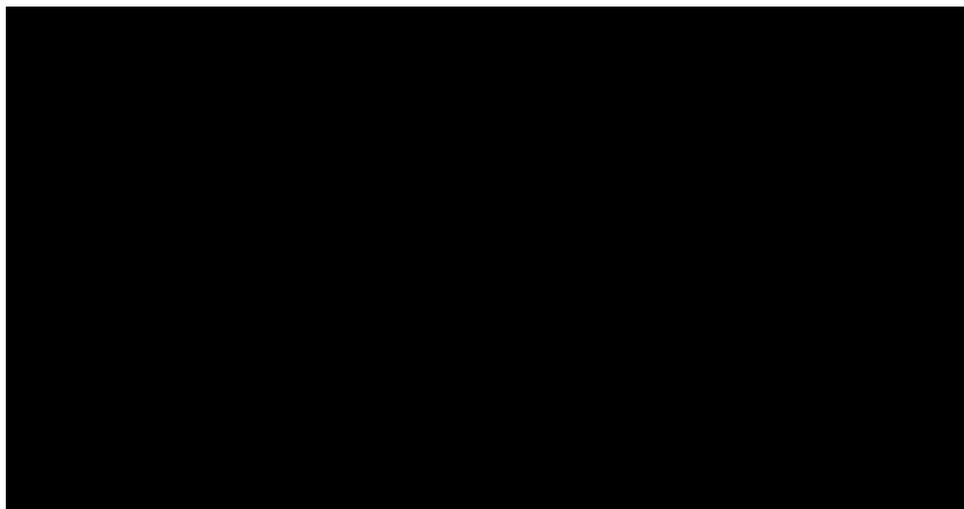
I campioni da analizzare sono stati introdotti in una micro piastra da 96 pozzetti.

Sono stati addizionati 50 microlitri di siero a 150 microlitri di soluzione di Cloruro Ferrico; sono stati incubati a temperatura ambiente ed è stata eseguita l'analisi.

Sono arrivati all'osservazione della Commissione Medica Locale Patenti di Catanzaro nell'anno 2006, numero 133 soggetti (131 uomini e 2 donne) sottoposti a sospensione della patente di guida, ai sensi dell'art. 186 del Codice della Strada - Guida in stato di ebbrezza.

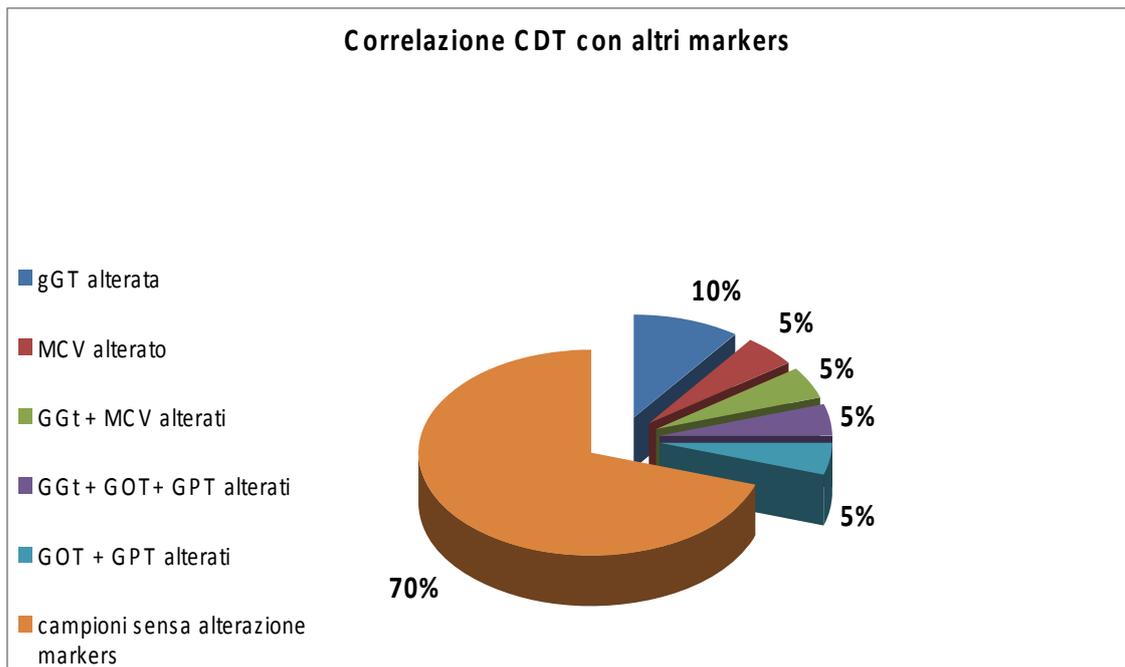
I valori di Transferrina Carboidrato Carente rilevati (media campione totale 1.39 %) sono risultati patologici, ovvero superiori ad 1.8 %, in 20 soggetti con una media di 2.42 % ed una deviazione standard di 1.60.

Il numero dei soggetti i cui valori di CDT sono ricaduti nella zona *border-line*, compresa tra 1.60 % e 1.79 %, è stato di 10, pari all'8 %.



Riguardo alla correlazione tra La Transferrina Desializzata Carente e gli altri markers di abuso alcolico cronico,(*Grafico n.2*) si è rilevato che sui 20 soggetti aventi valori patologici di CDT :

- ◆ la gGT è risultata alterata in 2 casi (10%)
- ◆ il MCV è risultato alterato in un caso (5 %)
- ◆ la gGT + MCV è risultato alterato in un caso (5 %)
- ◆ la gGT + GOT + GPT è risultato alterato in un caso (5 %)
- ◆ la GOT + GPT è risultato alterato in un caso (5 %)
- ◆ in 14 casi la Cdt era l'unico marker con valore patologico, risultando nella norma tutti gli altri valori.



I soggetti sottoposti a revisione della patente di guida, ai sensi dell'art. 186, dopo aver concluso il protocollo analitico, sono stati sottoposti a consulenza psichiatrica e tossicologica.

In tutti i soggetti con valori di CDT patologici sono emerse problematiche alcool-correlate; l'abbinamento del dato clinico al dato laboratoristico ha consentito di formulare diagnosi di abuso alcolico cronico, con la conseguente sanzione di sospensione della patente di guida per almeno sei mesi e affidamento degli stessi al servizio di Alcologia del Sert territorialmente competente, per un opportuno programma terapeutico.

I risultati ottenuti confermano la validità della transferrina carboidrato carente quale marker dell'abuso alcolico cronico.

La CDT si eleva al di sopra del valore di 1,8 % nei soggetti che assumono 60g /die di alcol per 2 settimane; la specificità risulta nettamente superiore agli altri marker bioumorali usati finora (*Gamma GT, MCV, GOT, e GPT*).

Il riscontro di falsi positivi, risultato inferiore all' 1 % nel campione esaminato, è non solo del tutto trascurabile in termini assoluti, ma anche nettamente inferiore, rispetto alla γ GT ed alle transaminasi sieriche.

Pertanto la determinazione della Transferrina Carboidrato Carente risulta attualmente il *gold standard* per individuare i soggetti con problematiche alcool-correlate.

Inoltre la cinetica di normalizzazione a seguito di sospensione dell'abuso alcolico, con un tempo di dimezzamento di circa 15 giorni, rende idonea la determinazione della CDT, non solo a scopo forense, ma anche per il monitoraggio del percorso clinico di riabilitazione.

E' infatti possibile, con una ripetizione dell'esame a distanza di tempo, verificare l'astinenza dalle bevande alcoliche e testare così l'adesione alla terapia nei soggetti sottoposti a programmi terapeutici presso i Sert o le Comunità.