

BIOMARCATORI MATERNO-FETALI DELL'ESPOSIZIONE PRENATALE ALL'ALCOL ETILICO

Simona Pichini, Renata Solimini, Enrica Pizzi, Adele Minutillo, Roberta Pacifici
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

L'alcol etilico è la sostanza d'abuso legale attualmente più popolare, e il suo consumo da parte delle donne in età riproduttiva rimane un problema significativo per la salute pubblica. Gli effetti negativi del bere in gravidanza sono ben documentati e conosciuti ormai da tempo. L'uso gestazionale di alcol può provocare un *continuum* di eventi avversi fetali noto come spettro dei disordini fetto-alcolici (*Fetal Alcohol Spectrum Disorders*, FASD) (1), che comprende dismorfismi cranio-facciali caratteristici, ritardo di crescita e deficit dello sviluppo neurologico e cognitivo (2). La prevalenza di FASD nelle diverse parti del mondo può raggiungere e anche superare il valore dell'1% di tutti i nati vivi e la persona colpita è a rischio di sviluppare una vasta gamma di disturbi mentali e sociali che la danneggiano per l'intero ciclo di vita (3). D'altra parte FASD è uno dei disturbi dello sviluppo psicocognitivo più ricorrenti e al tempo stesso più facilmente e totalmente prevenibili (4).

Un altro aspetto da considerare è il costo della cura e della gestione dei bambini e adulti con FASD. Negli Stati Uniti è stato calcolato che il costo medio annuo solo per l'assistenza sanitaria per un bambino affetto da FASD, dalla nascita fino all'età 21 anni, è di circa duemila dollari in più rispetto a un bambino senza tale disturbo (5). Nel complesso, il costo di gestione e cura per FASD comprende diversi aspetti quali: l'assistenza sanitaria, l'affidamento, il trattamento per disturbi dello sviluppo, i programmi di intervento precoce, l'educazione specifica, la salute mentale, il trattamento per l'abuso di sostanze associate spesso al disturbo, la cura delle persone colpite durante tutta la loro vita, e l'eventuale sistema di correzione, tra cui frequente è la giustizia minorile (6).

Attualmente, l'individuazione dell'esposizione prenatale all'alcol si basa sulla relazione materna del consumo, o su un sospetto basato su una serie di evidenze (la mancanza di cure prenatali, eventi di vita correlati all'uso eccessivo di alcol, alcoldipendenza o infrazioni delle norme del codice della strada alcol-correlate, ecc.) (7). Tuttavia, uno degli svantaggi principali del questionario autosomministrato è che le donne in gravidanza o partorienti tendono a non riportare la reale quantità e la frequenza della loro assunzione di alcol e sono riluttanti a rivelare l'uso gestazionale di alcol, per paura di un giudizio sociale o di problemi giudiziari (es. la sospensione della patria potestà sul minore) (8).

Pertanto, a causa della difficoltà nel valutare oggettivamente il reale consumo di alcol gestazionale, negli ultimi decenni sono stati proposti una serie di marcatori biologici considerati molto più affidabili per documentare l'uso di alcol etilico. Questi marcatori comprendono le misure dirette di alcol etilico nelle varie matrici biologiche, i biomarcatori indiretti di patologie alcol-indotte e i prodotti del metabolismo ossidativo e non ossidativo dell'alcol etilico.

Biomarcatori indiretti materni

I parametri clinici utilizzati di routine per la diagnosi di uso cronico eccessivo di alcol sono indicatori indiretti di patologie alcol-indotte, come ad esempio gli enzimi epatici quali: la gamma-glutamilttransferasi (GGT), l'aspartato aminottransferasi (AST) e l'alanina aminottransferasi (ALT); il volume corpuscolare medio degli eritrociti (*Mean Corpuscular Volume*, MCV), la transferrina carboidrato carente (*Carbohydrate Deficient Transferrine*, CDT). Inoltre, ci sono anche alcuni marcatori indiretti a basso peso molecolare, come ad esempio il rapporto plasmatico 5-idrossitriptofolo/acido 5-idrossiindolacetico (5-hydroxytryptophol/5-hydroxyindolylacetic acid, 5-HTOL/5-HIAA) che cambia in seguito all'uso eccessivo di alcol etilico. La maggior parte di questi biomarcatori sono misurati esclusivamente nella matrice sangue (siero o plasma) e sono indicativi soltanto di un uso cronico di alcol da parte della madre.

GGT

Breve descrizione e storia

La gammaglutamilttransferasi (GGT) è un enzima glicoproteico situato sulla membrana cellulare in diversi tessuti. Sebbene la GGT sia prodotta in molti tessuti, solo l'isoforma epatica è rilevabile nel siero. La misura della GGT è uno dei più antichi test biochimici per l'individuazione di uso eccessivo di alcol (9). Clinicamente è stata utilizzata per la valutazione del danno epatico. Tuttavia, i livelli sierici di GGT possono aumentare in risposta all'esposizione ad una serie di farmaci e alcol. Pertanto, l'uso della GGT come strumento di screening per l'uso eccessivo di alcol è limitato dalla sua aspecificità e anche dalla sua sensibilità relativamente bassa. Solo il 30-50% (10, 11) di bevitori eccessivi presenta livelli significativamente più elevati della media nella popolazione generale. Inoltre, i livelli di GGT normalmente si correlano solo moderatamente con la quantità consumata di alcol (10) e questo marcatore non si modifica in seguito ad una singola dose di alcol.

Determinazione

La reazione chimica in cui la GGT agisce come catalizzatore è il trasferimento di un residuo glutamile, legato mediante l'acido gamma carbossilico del glutammato ad un'ammina o di un altro amminoacido, che agisce come accettore. Una vasta gamma di composti possono agire come gamma-glutamilt donatore o accettore. Tra i gamma-glutamilt donatori il substrato naturale più significativo è rappresentato dal glutatione (gamma-glutamilt cisteinil glicina), ma una serie di substrati artificiali possono essere attivati dalla GGT. Gli accettori sono amminoacidi o peptide e la glicilglicina è la più comunemente usata. Sono stati descritti anche immunodosaggi e i metodi altamente sensibili basati sulla fluorescenza per usi specifici (9, 12).

Uso per la diagnosi di uso di alcol gestazionale

La bassa sensibilità della GGT nel rilevare il bere rischioso nelle donne non si presta all'applicazione di questo biomarcatore, ma alcuni gruppi di ricerca hanno pubblicato risultati in questo campo. Un primo studio di Larsson del 1983, ha coinvolto un gruppo di donne in gravidanza che si presentavano alla visita antenatale in quattro diversi ospedali scandinavi (13). Lo studio ha evidenziato un 4% di bevitrice eccessive, e due donne con neonati che presentavano disordini alcol-correlati. Diversamente, lo studio di Halmesmäki *et al.* del 1992 reclutava soltanto gestanti ad alto rischio (14). Venticinque donne che assumevano almeno 150

g di alcol a settimana sono state confrontate con venti donne astemie. Tredici delle venticinque bevitrici hanno dato alla luce neonati affetti da sindromi alcol-correlate. Il valore medio della GGT materna era significativamente superiore nelle donne bevitrici che davano alla luce bambini sani e ancora superiore nelle tredici bevitrici che avevano partorito neonati con problemi, rispetto al valore misurato nelle donne astemie.

Nonostante questi studi, l'utilizzo di GGT nello screening per l'abuso di alcol in gravidanza ha scarsa sensibilità, con molti risultati falsi positivi. Tuttavia, è interessante notare che il valore della GGT è più alto nelle donne che danno alla luce neonati con sindromi alcol-correlati. Non è chiaro se la GGT elevata nelle madri che bevono in modo eccessivo rifletta semplicemente un'assunzione maggiore di alcol, o una risposta diversa e più dannosa all'assunzione di alcol.

AST e ALT

Breve descrizione e storia

Le AST e le ALT sono enzimi epatici che presentano un valore significativamente più elevato nel siero di alcolisti poiché l'alcol è una epatotossina indiretta. Questi enzimi catalizzano la trasformazione reversibile degli alfa-chetoacidi in aminoacidi trasferendo gruppi amminici. La loro velocità di eliminazione è intorno alle 3 settimane. Similmente alla GGT, la concentrazione delle aminotrasferasi non aumenta dopo un singolo episodio di bere eccessivo (15). Le aminotrasferasi sono ancor meno sensibili della GGT nel rilevamento di un eccessivo consumo di alcol etilico (16).

Determinazione

Le AST e le ALT sono tipicamente misurate sulla base della loro attività catalitica (17); entrambi richiedono il piridossale 5'-fosfato (P5'-P) per l'attività massima, sebbene l'effetto della carenza della P5'-P sull'attività della ALT è maggiore che non su quella della AST (18).

Uso per la diagnosi dell'uso gestazionale di alcol

Nelle donne in gravidanza, è comune trovare una diminuzione nelle concentrazioni di AST e ALT. Pertanto, questi enzimi sono indicatori inadeguati del bere eccessivo a causa della bassa sensibilità (19). Come nel caso della GGT, le aminotrasferasi sono parte di una serie di test biochimici di routine (20). Nello studio previamente menzionato di Halmesmäki *et al.* (14), oltre alla GGT, venivano misurate le concentrazioni di transaminasi nel siero delle donne in gravidanza. Le concentrazioni di AST e di ALT risultavano aumentate nelle donne con consumo eccessivo di alcol, ma lo studio ha dimostrato che questi biomarcatori non erano ottimali per la valutazione di un uso cronico di alcol.

MCV

Breve descrizione e storia

È noto da molti anni, che il volume medio dei globuli rossi (*Mean Corpuscular Volume*, MCV) aumenta con un consumo eccessivo di alcol che porta alla macrocitosi (21,22). A causa della elevata emivita dei globuli rossi, che normalmente è di 120 giorni, qualsiasi cambiamento nell'abitudine al bere si rifletterà nei livelli di MCV solo dopo diversi mesi (23). Similmente, sembra sia necessario un bere eccessivo cronico per produrre elevati livelli di MCV. La misura

dell'MCV può essere applicata nello screening ma ha un valore limitato come un singolo marcatore (24).

Determinazione

Esiste un'ampia gamma di metodi analitici per la stima dell'MCV. Questo marcatore viene misurato di routine ogni volta che si esegue un esame completo del sangue. La conta delle cellule con metodi automatizzati è più accurata rispetto ai metodi manuali (25).

Uso per la diagnosi dell'uso gestazionale di alcol

Uno studio di Sarkola *et al.* nel 2000, ha misurato la MCV in 18 forti bevitrice in stato di gravidanza e ha concluso che in questo caso il biomarcatore risulta efficace nel rilevare il consumo eccessivo di alcol (26).

CDT

Breve descrizione e storia

La transferrina viene sintetizzata e secreta nel fegato. Con una emivita di 7-10 giorni agisce da trasportatore di ferro nel sangue. La CDT è un gruppo di isoforme minori di transferrina umana, con un minor grado di glicosilazione rispetto alle isoforme principali di questa glicoproteina. La CDT è un marker relativamente nuovo, che è, però, sempre più utilizzato per la rilevazione di abuso di alcol grazie alla sua elevata specificità (27,28).

Determinazione

Sono attualmente disponibili diversi metodi per la misurazione della CDT. In passato, i metodi più utilizzati esprimevano la concentrazione di CDT come unità semplici (U/L); mentre con i metodi più recenti, i risultati sono espressi come percentuale di transferrina carboidrato carente rispetto alla transferrina totale (% CDT). Il principale vantaggio di quest'ultimo approccio è che tiene conto della variabilità naturale della transferrina serica (29). Ad oggi, la tecnica più comune isola la CDT con una microcolonna cromatografica a scambio anionico, basandosi sulle diverse cariche delle isoforme desialate della transferrina, seguita da immunosaggio per la quantificazione. Grazie allo sviluppo di anticorpi monoclonali umani per la CDT e all'automazione, il biomarcatore può essere analizzato più rapidamente con un'unica procedura. Per un migliore isolamento, e una più accurata quantificazione, sono disponibili la cromatografia liquida, l'elettroforesi capillare e la focalizzazione isoelettrica (30,31). La cromatografia liquida è attualmente considerata il metodo candidato ad essere di riferimento (31).

Uso per la diagnosi dell'uso gestazionale di alcol

L'accuratezza diagnostica della CDT per rilevare l'abuso di alcol, può essere limitata nelle donne in gravidanza e deve essere attentamente valutato in relazione al consumo di alcol (32). Recentemente, lo studio di Kenan *et al.* ha messo in luce un aumento fisiologico della CDT durante la gestazione che suggerisce l'eventuale rischio di risultati falsi positivi, quando la CDT viene utilizzata per rilevare l'abuso cronico di alcol nelle donne in gravidanza (33). Nel 2011 anche il gruppo di studio di Bianchi *et al.* (34), ha dimostrato che i livelli di CDT sono direttamente correlati alla lunghezza della gestazione e, in un contesto legale, il suo uso come biomarcatore per l'uso gestazionale di alcol può essere limitato.

HTOL / 5-HIAA

Breve descrizione e storia

Un biomarcatore alternativo più incentrato sul bere moderato ed elevato recente è il 5-idrossitriptofolo (5-hydroxytryptophol, 5-HTOL), che viene escreto nelle urine principalmente come 5-idrossitriptofol-glucuronide (35). Un uso frequente del 5-HTOL come marcatore è stato ostacolato principalmente da problemi metodologici, a causa della elevata sensibilità richiesta per la sua misurazione, visto che la sostanza è presente a basse concentrazioni (35). Nell'uso clinico di routine, viene misurato il rapporto con l'acido 5-idrossi-indolacetico (5-HTOL/5-HIAA) per compensare le interferenze dovute a variazioni di diluizione delle urine, nonché al turnover della serotonina, di cui queste due sostanze sono metaboliti urinari (36).

Determinazione

L'approccio analitico comune per la misurazione urinaria del 5-HTOL e del 5-HIAA è l'impiego di metodi individuali per ciascun composto: tipicamente la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa per 5-HTOL e la cromatografia liquida per il 5-HIAA (35). Recentemente è stato commercializzato un test immunoenzimatico per la misura diretta del 5-idrossitriptofol-glucuronide, che risulta essere una valida alternativa alla metodologia gascromatografica che, determinando il solo 5-HTOL, necessita di una previa idrolisi del glucuronide urinario (37). I ricercatori del gruppo svedese di Helander e Beck, hanno messo a punto una metodologia in cromatografia liquida-spettrometria di massa per la misurazione simultanea del 5-idrossitriptofol-glucuronide e del 5-HIAA nelle urine, in associazione alla sola misura del glucuronide con un metodo immunologico (38, 39).

Uso per la diagnosi di uso di alcol gestazionale

Non sono stati condotti fino ad ora studi su donne in gravidanza.

Biomarcatori diretti

I biomarcatori diretti derivano direttamente dalla molecola di alcol etilico e contengono tutti i due gli atomi di carbonio della molecola parente. Si tratta in primo luogo dell'alcol etilico stesso o dei suoi prodotti del metabolismo ossidativo e non ossidativo, come gli esteri etilici degli acidi grassi (*Fatty Acid Ethyl Esters*, FAEE), l'etil glucuronide (EtG) e l'etisulfato (EtS) o il fosfatidiletanolo (*Phosphatidylethanol*, PEth). L'alcol etilico viene normalmente misurato nell'espriato e nel sangue per rilevare l'eventuale assunzione nelle ore immediatamente precedenti. Tale misura è quindi inutile per valutare l'uso gestazionale di alcol e la conseguente esposizione prenatale a questo teratogeno (40).

FAEE

Breve descrizione e storia

I FAEE si formano per esterificazione di alcol etilico con gli acidi grassi liberi e acidi grassi legati all'acilcoenzima A endogeni. Il processo di esterificazione è facilitato da due enzimi: la FAEE sintasi e l'acil-Coenzima A/etanol O-acil-transferasi (41,42). Negli esseri umani, le FAEE sintasi si trovano principalmente nel fegato e nel pancreas (41). Il gruppo dei FAEE è

costituito da più di 20 diversi esteri di acidi grassi a diversi numeri di atomi di carbonio. I FAEE più rappresentativi sono l'etil laurato (E12:0), l'etil miristato (E14:0), l'etil palmitato (E16:0), l'etil palmitoleato (E16: 1), l'etil stearato (E18:0), l'etil oleato (E18:1), l'etil linoleato (E18:2), L'etil linoleato (E18:3), l'etil arachidonato (E20: 4) e l'etil docosaesanoato (E22:6). L'eliminazione plasmatica dei FAEE ha un profilo cinetico bifasico con un'emivita primaria di circa 3 ore e un'emivita terminale di circa 11 ore, seguita dalla distribuzione tissutale o dall'idrolisi ad opera delle FAEE idrolasi (43). A causa della fase di eliminazione secondaria più lunga, i FAEE persistono nel sangue almeno 24 ore dopo l'ultima assunzione di alcol etilico (44).

Determinazione in matrici biologiche materne

I FAEE possono essere misurati in diverse matrici biologiche materne. Tra queste, le più significative per misurare il consumo di alcol etilico gestazionale sono il sangue e i capelli (45).

I metodi utilizzati per dell'analisi dei FAEE nel sangue (siero o plasma) si basano generalmente su una estrazione degli analiti dalla matrice con solventi apolari (es. acetone/n-esano), seguita da un'ulteriore purificazione su colonna di estrazione in fase solida (es. colonne amminopropiliche) (46-49). Dopo l'estrazione e la purificazione, gli analiti vengono identificati e quantificati mediante gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa, utilizzando i FAEE deuterati come standard interni o il meno costoso etil eptadecanoato (E17:0), di natura non endogena. L'analisi dei FAEE nel sangue, come biomarcatori di assunzione di alcol, fornisce un'informazione solo sul consumo recente (47). Secondo gli studi di Borucki *et al.* (50), i FAEE non sono più rilevabili nel siero dopo 29 ore dall'ultima assunzione di alcol etilico.

La metodologia di determinazione dei FAEE nei capelli è completamente diversa da quella riportata per il plasma e/o il siero. I metodi riportati per queste ultime due matrici non sono adatti per i capelli, a causa della sensibilità insufficiente per la poca quantità di campione disponibile (10-30 mg di capelli) e un elevato rumore di fondo cromatografico, causato da altri lipidi presenti nell'estratto di capelli. L'analisi dei FAEE nei capelli utilizza una microestrazione in fase solida a spazio di testa, dopo una procedura di lavaggio dei capelli con n-eptano e una purificazione con dimetilsolfossido-n-eptano, seguita dall'analisi in gas cromatografia-spettrometria di massa.

La somma della concentrazione di quattro FAEE (etil miristato E14:0, etil palmitato E16:0, etilsteato E18:0 ed etiloleato E18:1) nel segmento prossimale alla cute di 3 cm campioni dà una sensibilità del 90% e una specificità del 90%, con un valore soglia (cut-off) per la positività al consumo gestazionale di alcol di 0,5 ng/mg di capelli (51).

Uso per la diagnosi del consumo gestazionale di alcol

Non ci sono dati relativi alla concentrazione media dei FAEE nel sangue e/o plasma delle donne in gravidanza. Esistono soltanto dati sulla concentrazione plasmatica media dei FAEE E16:0, E18:0, E18:1 e E18:2, nel plasma di individui con una storia di abuso cronico di alcol (valore medio = 15,09 mg/L), rispetto ad un gruppo di individui con una storia di abuso acuto di alcol (valore medio = 4,25 mg/L), che mostrano una differenza significativa tra i due gruppi (52). Ad oggi, l'opzione migliore per la valutazione di uso cronico di alcol in gravidanza è la determinazione di FAEE nei capelli materni. Il gruppo tedesco di Pragst *et al.* è stato il primo a suggerire questa possibilità (53). Il loro studio ha individuato una correlazione tra le concentrazioni di FAEE in campioni di capelli materni e la quantità di alcol etilico, consumato anche dopo 2 mesi di astinenza continuativa. Analogamente, Kulaga *et al.* hanno utilizzato la determinazione dei FAEE nei genitori a rischio di avere bambini con spettro dei disordini feti

alcolici, e hanno quantificato la prevalenza del consumo di alcol in questa popolazione. Su un totale di 26 madri in gravidanza i cui capelli sono stati analizzati per la presenza dei FAEE, il 19% è risultato positivo (sopra il valore di cut-off di 0,5 ng FAEE/mg nei capelli) per la modalità di bere eccessivo (54). Anni dopo, Kulaga *et al.* hanno dimostrato che le madri risultate positive per un uso cronico eccessivo di alcol, avevano un rischio tre volte maggiore di essere positive anche alla cocaina, utilizzando l'analisi dei capelli per questa sostanza (55). Tuttavia, una recente ricerca di Morini *et al.* ha dimostrato che la determinazione dei FAEE nei capelli di donne in gravidanza, non è utile per rilevare l'assunzione di alcol etilico inferiore a 30 g/giorno (56). Inoltre, sorprendentemente, una bassa concentrazione di FAEE: 0,06-0,37 ng/mg (media 0,17 ng/mg, n = 17), è stato rilevato nei capelli di astemie (57,58). In generale, i livelli di FAEE misurati nei campioni di capelli devono essere interpretati con cautela, in quanto l'incorporazione dei FAEE nei capelli può essere influenzata da differenze inter-individuali nel metabolismo dell'alcol, nella fisiologia della crescita dei capelli, nell'attività delle ghiandole sebacee, nell'igiene e nella cosmesi dei capelli (57, 58).

Determinazione in matrici biologiche neonatali

La misura dei FAEE E16:0, E18:0, E18:2, E18:3 e E20:4 nel meconio neonatale è stata indicata per valutare oggettivamente l'esposizione prenatale all'alcol gestazionale. (59-61). La somma delle concentrazioni di questi cinque FAEE al disopra del valore soglia di 2 nmol/g o 50 ng/g meconio è stato raccomandato come prova di uso di alcol materno (53). Tradizionalmente, tutti i metodi analitici per la determinazione dei FAEE si basano sulla metodologia descritta per la prima volta nel 1996 da Bernhardt *et al.* (62). Questo metodo comporta una doppia estrazione dei FAEE dal meconio con solventi apolari e una estrazione successiva in fase solida. Una volta estratti dalla matrice biologica, i FAEE vengono determinati in cromatografia gassosa accoppiata ad un rivelatore a ionizzazione di fiamma o, nel caso di metodologie messe a punto successivamente, ad un rivelatore in spettrometria di massa (*Mass Spectrometry*, MS) (61, 63, 64).

Il primo metodo che ha utilizzato come rivelatore la spettrometria di massa tandem in accoppiamento alla gas cromatografia, è stato pubblicato da Bearer *et al.* nel 2003 (65). L'impiego di questo rivelatore ha permesso di incrementare notevolmente la sensibilità delle analisi. Nel 2009, Hutson *et al.* hanno introdotto una nuova tecnica di estrazione e purificazione dei FAEE, impiegando la microestrazione in fase solida con microfibra in silice, seguita da un'analisi in gas cromatografia-spettrometria di massa (66). Secondo gli autori, questo è un metodo ideale per la routine di campioni clinici poiché riduce al minimo il lavoro manuale. C'è però da obiettare che la microfibra è un dispositivo molto delicato, che presenta problemi di riproducibilità nell'estrazione di campioni successivi e di un certo costo. Pertanto, successivamente vari gruppi di studio hanno cercato di implementare e migliorare il metodo della microestrazione, cercando di renderlo meno costoso, più riproducibile e più sensibile (67, 68).

I metodi in cromatografia liquida, accoppiati alla spettrometria di massa tandem, hanno il vantaggio di essere più specifici in quantificare contemporaneamente svariati analiti di differente natura lipofila o idrofila, in matrici biologiche complesse. Il primo metodo utilizzato per quantificare i FAEE nel meconio con questa metodologia, è stato sviluppato da Pichini *et al.* (69). Tale metodo quantifica ben sette differenti FAEE – etil palmitato (E16:0), etil palmitoleato (E16:1), etil stearato (E18:0), etil oleato (E18:1), etil linoleato (E18:2), etil linolenato (E18:3), etil arachidonato (E20:4) – due in più dei cinque inizialmente considerati per dimostrare l'esposizione prenatale all'alcol. Il valore soglia per dimostrare la positività neonatale all'esposizione rimane comunque di 2 nmol per grammo di meconio, come suggerito dal gruppo canadese di Chan e Koren (63). Nel 2011, Kwak *et al.* hanno migliorato il metodo

precedentemente pubblicato, utilizzando una quantità inferiore di meconio come matrice biologica, un tempo di analisi più breve e un più piccolo volume di iniezione (70).

Uso per la diagnosi dell'esposizione prenatale all'alcol etilico

La determinazione dei FAEE nel meconio è stata utilizzata in diversi studi epidemiologici per evidenziare esposizione fetale all'alcol etilico, durante il secondo e il terzo trimestre di gravidanza (71). In questo senso, è importante ricordare che i FAEE materni non attraversano la placenta per raggiungere la circolazione fetale, come dimostrato da Chan *et al.* (72), ma sono prodotti direttamente dal feto per reazione tra gli acidi grassi fetali e l'alcol etilico che attraversa la placenta. Poiché il meconio si accumula nell'intestino fetale a partire dalla ventesima settimana di gestazione fino alla nascita, esso fornisce un'ampia finestra di rilevamento dell'esposizione cronica fetale all'alcol. Tuttavia, il peso totale di meconio aumenta esponenzialmente da circa 1 g nelle settimane 23-26 di gestazione, a 5 g nelle settimane 27-32 e infine a 20-80 g alla nascita. Almeno il 75% del campione di materiale proviene dalle ultime 8 settimane di gravidanza (73).

I primi a utilizzare la misura dei FAEE nel meconio per la valutazione dell'esposizione in utero all'alcol etilico furono gli americani nel 1999 (59), seguiti dai canadesi che, nello stesso anno, misurando i FAEE nel meconio neonatale, misero in luce una esposizione fetale all'uso di alcol in gravidanza da parte di una madre che lo negava all'intervista antenatale (60).

Come già riportato precedentemente, al fine di discriminare tra neonati con e senza esposizione prenatale, poiché una certa quantità di FAEE può provenire dall'alcol etilico endogeno, o da tracce di alcol etilico contenute in alimenti comuni, i canadesi hanno condotto uno studio di popolazione, stabilendo un cut-off di 2 nmol per grammo di meconio quale valore soglia per evidenziare una esposizione prenatale all'alcol (63). Invece, gli americani del gruppo di Moore *et al.* (74) hanno suggerito che una concentrazione totale dei cinque FAEE, maggiormente presenti nel meconio superiore a 10.000 ng/g, può indicare che il neonato è stato esposto a notevoli quantità di alcol durante la gestazione. Sebbene questi siano i valori soglia al momento utilizzati per discriminare l'esposizione prenatale all'alcol, è bene ribadire che, al momento, non è mai stata dimostrata una correlazione lineare tra l'uso materno di alcol etilico auto-riferito e la concentrazione dei FAEE nel meconio (75). Al contrario, sia Bearer *et al.* nel 2005 (65) che Ostrea *et al.* nel 2006 (61) e Peterson *et al.* nel 2008 (76), hanno dimostrato che il solo etil linoleato (E18:2) presenta elevata specificità per l'esposizione prenatale ad alcol e correla con l'alcol materno auto-riferito.

Una serie di studi ha indagato la prevalenza dell'esposizione prenatale all'alcol in diverse popolazioni. Nel 2008, Gareri *et al.* hanno misurato la concentrazione dei FAEE in 682 campioni di meconio anonimi di un ospedale della regione di Grey Bruce, Ontario in Canada (77). Diciassette campioni su 682 di meconio (pari al 2,5%) sono risultati positivi per l'esposizione prenatale all'alcol etilico. Nello stesso anno, Garcia-Algar *et al.* hanno evidenziato a Barcellona, in Spagna, una esposizione intrauterina nel 45% di 353 neonati, provenienti da una coorte madre-neonato di basso status socio-economico (71). Una percentuale simile, un 44% di neonati esposti all'alcol materno su 905 studiati, è stata individuata da Hutson *et al.* a Montevideo, Uruguay (78). Lo studio più recente è quello di Pichini *et al.*, che ha coinvolto le Unità di Neonatologia di sette ospedali distribuiti sul territorio italiano, da nord al sud della penisola, per un totale di 607 neonati. L'analisi nel meconio dei FAEE e dell'etilglucuronide ha evidenziato un'esposizione prenatale all'alcol nel 7,9% di neonati a livello nazionale, con range variabili dallo 0% nella città di Verona, al 4,0% nella città di San Daniele del Friuli, 4,9% a Napoli, 5,0% a Firenze, 6,2% a Crotone, fino al 10,6% a Reggio Emilia e infine il 29,4% nella città di Roma (79).

EtG ed EtS

Breve descrizione e storia

L'EtG e l'EtS sono entrambi metaboliti diretti non ossidativi minori dell'alcol etilico. L'EtG si forma dalla coniugazione dell'alcol etilico con acido glucuronico mediata dalla UDP-glucuronil transferasi, l'etil sulfato dal trasferimento di un gruppo solforico 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosolfato sull'alcol etilico ad opera della sulfotransferasi mitocondriale (80,81).

Determinazione in matrici biologiche materne

I primi metodi per la determinazione dell'EtG nel sangue e nelle urine risalgono alla metà degli anni 90 del secolo precedente, e si basavano su tecniche analitiche in gas cromatografia-spettrometria di massa (50, 82). Nel 2001 Janda *et al.* proposero un miglioramento delle precedenti metodologie, prevedendo un'estrazione in fase solida dell'analita dalla matrice biologica con cartucce amino propiliche. Con questa estrazione specifica era possibile raggiungere un limite di quantificazione nel siero di 0,17 mg/L e 0,56 mg/L nelle urine (83).

Ad oggi, la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem è considerata la tecnica di scelta e la più sensibile per la determinazione di questi due biomarcatori. Metodi analitici che prevedono altri tipi di strumentazione risultano meno sensibili. Tra questi, l'EtG è stato determinato nelle urine con cromatografia liquida e rivelatore elettrochimico ad impulsi (84), oppure mediante una procedura di screening immunochimico (85) e con una metodologia immunologica a sandwich con anticorpi policlonali (86). Similmente, per quanto riguarda la determinazione dell'EtG nel siero, è stata proposta l'elettroforesi capillare con rivelatore ad assorbanza di luce ultravioletta, senza necessità di estrazione dell'analita, ottenendo un limite di sensibilità più che adeguato di 0,047 mg/L (87). Tale metodo è stato proposto anche per la determinazione dell'EtS nelle urine (88).

Come già visto nel caso dei FAEE, per ampliare la finestra di rilevazione dell'EtG e poter individuare un consumo ripetuto di alcol, è necessario determinarlo nei capelli. I metodi tradizionali per l'analisi dell'EtG nei capelli si basano sulla cromatografia gassosa e liquida, entrambi accoppiate alla spettrometria di massa (89-92). In entrambi i casi, il limite di quantificazione è nell'intervallo dei pg per mg di capelli, poiché le concentrazioni di questo analita nella matrice cheratinica variano da pochi pg/mg di capelli nel caso degli astemi, a valori superiori di 30-50 pg/mg di capelli nel caso di bevitrice e bevitori cronici. Il passaggio critico dell'analisi dell'EtG nel capello è l'estrazione dell'analita dalla matrice solida prima della sua quantificazione. L'EtG può essere facilmente estratto dalla matrice cheratinica utilizzando una soluzione acquosa alcalina. Tuttavia, probabilmente a causa della instabilità dei glucuronidi a pH non neutro, è meglio incubare i campioni di capelli soltanto in acqua distillata con l'aiuto di un bagno ad ultrasuoni per facilitare l'estrazione dell'analita, e in un paio di casi è stata utilizzata una miscela di acqua e solvente organico. I più recenti metodi per l'analisi dell'EtG nel capello prevedono un'estrazione in fase acquosa seguita da un'analisi in cromatografia liquida, accoppiata alla spettrometria di massa tandem. L'estrema sensibilità che si può raggiungere con questa strumentazione ha consentito di poter estrarre invece dei 50 o 100 mg di capelli solitamente utilizzati per l'analisi dell'EtG, soltanto 25 mg di matrice (93). Tali metodiche presentano un limite di quantificazione nell'ordine dei 20 pg/mg di capello, in accordo con il valore soglia di 30 pg/mg stabilito dal consenso della Società internazionale dei test sui capelli (*Society of Hair Testing*, SoHT), sui test dei capelli per l'uso cronico di alcol (89, 94-96).

Uso per la diagnosi del consumo gestazionale di alcol

Negli ultimi dieci anni, per l'importanza dei tempi di esposizione all'alcol materno durante la gravidanza e i conseguenti esiti neonatali, è stata proposta la misura dell'EtG e dell'EtS nelle diverse matrici biologiche materne (sangue, urine e capelli materni) come supporto alla diagnosi del consumo materno.

Le concentrazioni massime di EtG e EtS nel sangue sono raggiunte 2-3,5 ore dopo il picco dell'alcol etilico e sono rilevabili fino a 4-8 ore dopo l'eliminazione dell'alcol etilico (97, 98).

Nelle urine, l'EtG è rilevabile nell'intervallo da 1 ora fino a 5 giorni dopo l'assunzione di alcol etilico (99), mentre l'ETS ha un periodo più breve di rilevamento: fino a 30 ore dopo l'assunzione di alcol (100). Pertanto sia l'EtG che l'EtS sono considerati biomarcatori urinari sensibili, che possono essere escreti nelle urine per periodi di tempo più prolungati rispetto a quelli dell'alcol etilico (101). In questo contesto, è importante ricordare la possibilità di risultati falsi negativi nelle donne in gravidanza a causa dell'eventuale idrolisi dell'EtG da parte dell'*Escherichia coli* qualora ci siano infezioni del tratto urinario, particolarmente comuni tra le donne in gravidanza (102). Attualmente, esiste un solo studio di Bianchi *et al.* che ha misurato le concentrazioni di EtG nel siero e nelle urine delle 64 gestanti mediante tecniche immunochimiche, rilevando sempre valori inferiori a 500 ng/mL di siero o di urina, valore soglia stabilito per lo studio riportato (34).

Con la determinazione dell'EtG nei capelli può essere possibile discriminare tra astemi, bevitori sociali e forti bevitori. Yegles e Pragst sono stati i primi a proporre dei valori soglia nei capelli, discriminativi delle differenti condizioni: EtG <8 pg/mg nel caso di astemi, tra 8 e 25 pg/mg nel caso di bevitori sociali e EtG >25 pg/mg per i bevitori pesanti (90). Tale valore soglia si è poi innalzato a 30 pg/mg, secondo il consenso della SoHT, come prima riportato (96).

L'analisi dell'EtG in campioni di capelli di donne in gravidanza è stata eseguita per la prima volta nel 2008, in uno studio pilota in Svezia, indicando che la misura sia dell'EtG che dei FAEE era in grado di identificare le potenziali consumatrici di alcol tra le donne in gravidanza più che il solo questionario AUDIT autosomministrato, senza indicare però la sensibilità del test (103). Ultimamente, Morini *et al.* (71) hanno misurato le concentrazioni di EtG in una coorte di donne in gravidanza mediante una metodologia in cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem, concludendo che l'EtG nei capelli materni non è un buon predittore di consumo di alcol gestazionale a causa della sua impossibilità di diagnosticare un apporto di alcol etilico inferiore 30g al giorno.

Determinazione in matrici biologiche neonatali

La determinazione dell'EtG e dell'EtS nel meconio è stata proposta come alternativa alla determinazione dei FAEE, allo scopo di discriminare tra uso eccessivo di alcol etilico gestazionale, uso occasionale o astinenza. Nel 2008, per la prima volta, il gruppo di studio italiano di Morini *et al.* ha messo a punto e validato un metodo analitico in cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem con aggiunta post-colonna di acetonitrile, per la misurazione di EtG e ETS nel meconio (104). Questo metodo è stato successivamente migliorato nelle sue prestazioni, utilizzando la cromatografia liquida ad interazione idrofilica dal gruppo di Tarcomnicu *et al.* (93); mentre Bakdash *et al.* (82) hanno proposto, come nel caso dei FAEE nel meconio, una microestrazione in fase solida in combinazione con il metodo in gas cromatografia-spettrometria di massa (67).

Uso per la diagnosi dell'esposizione prenatale all'alcol etilico

Utilizzando la misura dell'EtG e dell'EtS nel meconio, Pichini *et al.* hanno condotto diversi studi per valutare l'esposizione prenatale all'alcol etilico gestazionale in coorti madre-neonato

di due città del Mediterraneo: Reggio Emilia e Barcellona (105). Se da un lato, non è stato possibile stabilire una correlazione diretta tra le concentrazioni di EtG e EtS e quelle dei sette FAEE nel meconio, è stata evidenziata una buona correlazione tra EtG e EtS e singoli esteri etilici quali l'etil stearato (E18:0), o etil palmitoleato (E16:1) (56). Anche in mancanza di una correlazione diretta, gli studi sulle due coorti mediterranee hanno mostrato valori medi di EtG statisticamente più elevati nei campioni di meconio con FAEE > 2 nmol/g, rispetto ai valori medi dell'EtG in campioni di meconio con FAEE < 2 nmol/g, e una buona correlazione qualitativa tra EtG e EtS. Quest'ultimo biomarcatore era presente soltanto in campioni con EtG elevato, fungendo quindi da ulteriore conferma di una esposizione prenatale all'alcol materno (105, 106). Uno studio di popolazione su donne astemie in gravidanza e bevitrici croniche, ha permesso di stabilire anche nel caso dell'EtG un valore soglia per poter discriminare fra neonati esposti e non esposti in utero all'alcol materno. Questo valore soglia, calcolato con il metodo della curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), è risultato essere di 2 nmol EtG per grammo di meconio (106). Proprio utilizzando questo valore soglia, è stato possibile effettuare lo studio multicentrico in sette neonatologie italiane, menzionato in precedenza che per la prima volta ha indagato sulla esposizione prenatale all'alcol gestazionale in diverse città italiane (79).

L'EtG e l'EtS sono biomarcatori del consumo materno di alcol anche all'inizio della gravidanza, come ha dimostrato uno studio di Morini *et al.* (107), che ha potuto identificare questi due biomarcatori nei tessuti placentari e fetali ottenuti da donne sottoposte a interruzione volontaria della gravidanza a 12 settimane di gestazione. Lo studio ha indicato che, già all'inizio della gravidanza, questi due metaboliti diretti del consumo di alcol passano dalla circolazione sistemica materna alla placenta e ai tessuti fetali di neoformazione.

PEth

Breve descrizione e storia

I fosfatidiletanoli sono un gruppo di fosfolipidi derivati dell'alcol etilico che hanno in comune una di molecola di fosfoetanolo su cui si agganciano due molecole di acido grasso. Il PEth si forma dalla fosfatidilcolina delle membrane cellulari mediante una reazione di transfosfatidilazione catalizzata dalla fosfolipasi D (108, 109). La fosfolipasi D normalmente idrolizza la fosfatidilcolina in acido fosfatidico e colina, ma poiché l'affinità per l'alcol etilico è di più di mille volte superiore a quella dell'acqua, il PEth si forma a spese della fosfatidilcolina quando è presente l'alcol etilico (110-112). Poiché il PEth si forma specificamente in presenza di alcol etilico, e ha una lunga emivita grazie alla sua velocità di degradazione lenta (113, 114), è stato suggerito che il PEth potrebbe potenzialmente essere usato come marcatore di consumo di alcol etilico. Infatti, il PEth ha una emivita media di circa quattro giorni nel sangue di alcolisti, ed era ancora misurabile dopo un massimo di due settimane di sobrietà (113).

Determinazione nelle matrici biologiche materne

Diversi approcci analitici sono stati utilizzati per quantificare il PEth nel sangue e di altre matrici biologiche e tissutali: la cromatografia su strato sottile (112), la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa a elettronebulizzazione (115, 116) o alla spettrometria a tempo di volo (117), la cromatografia liquida accoppiata ad rivelatore evaporativo a diffusione di luce laser (114, 116, 118), l'elettroforesi capillare in mezzo non acquoso con rivelazione ad assorbanza di luce ultravioletta (119) o accoppiato alla spettrometria di massa a elettronebulizzazione (120). L'ultimo metodo menzionato ha dimostrato di essere il più sensibile e preciso, ed è quindi attualmente il più utilizzato.

Uso per la diagnosi del consumo gestazionale di alcol

Il fatto che il PEth può essere misurato fino a 15-20 giorni dopo l'ultima assunzione di alcol, suggerisce che esso potrebbe essere un utile biomarcatore per la rilevazione retrospettiva dell'uso di alcol durante le prime settimane di gravidanza, quando la donna non è neanche consapevole della sua gravidanza. Tuttavia, ad oggi non ci sono studi pubblicati su questo argomento, ad esclusione dello studio di Stewart e colleghi che dimostra che il PEth è un indicatore molto sensibile di uso moderato ed eccessivo di alcol nelle donne in età riproduttiva (121). Al momento non sono stati condotti studi su matrici neonatali.

Conclusioni e prospettive

Le matrici biologiche materne, fetali e neonatali sono, in misura diversa, depositi di sostanze, tra le quali l'alcol etilico e suoi biomarcatori, a cui è esposto il feto durante la vita uterina.

Pertanto, la valutazione accurata della esposizione del feto all'alcol etilico attraverso l'uso di questi biomarcatori oggettivi, potrebbe essere di grande importanza in quanto fornisce la base per un trattamento appropriato e adeguato follow-up dei neonati esposti. Laddove i biomarcatori materni indiretti sono indicativi di uso cronico di alcol, e possono essere aspecifici e influenzati da molte variabili fisiologiche e patologiche diverse dal consumo di alcol etilico, i biomarcatori diretti sono altamente specifici soprattutto se misurati in matrici biologiche fetali/neonatali. Solo in questo ultimo caso può essere dimostrata l'esposizione reale all'alcol etilico durante la vita intrauterina.

A questo proposito, il meconio neonatale è facilmente ottenibile e fornisce informazioni circa l'esposizione sia nel secondo che nel terzo trimestre di gravidanza. Al contrario, i capelli neonatali, formati soltanto durante l'ultimo trimestre, sono una matrice biologica per misurare l'esposizione all'alcol nell'ultima fase della gravidanza. Differentemente dal meconio, che si raccoglie solo nelle prime 24-48 ore dalla nascita, i capelli neonatali sono disponibili solo in piccola quantità, ma per un periodo postnatale (mesi) più esteso di quello del meconio. Per quanto riguarda i biomarcatori da misurare, la quantificazione dei FAEE nel meconio e nei capelli è attualmente il metodo più utilizzato per stimare l'incidenza dell'esposizione prenatale all'alcol etilico, grazie alla elevata sensibilità e specificità della misura. Al contrario, il metabolita alternativo ai FAEE, l'EtG, è di quindici anni più giovane, e ci sono ancora pochi studi di popolazione che confermino la validità della sua misura a fini diagnostici. Tuttavia, a differenza dei FAEE, che sono sette differenti composti misurabili soltanto con metodi cromatografici accoppiati alla spettrometria di massa, l'EtG è una sola molecola che al momento è anche essa misurata mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa, ma che potrebbe essere potenzialmente misurata dopo l'estrazione dal meconio con una metodica immunochimica a basso costo, attualmente disponibile per campioni di urina e di sangue. Questa prospettiva di un test immunochimico, in sperimentazione nell'ultimo anno potrebbe aprire le porte ad un test applicato di routine nei reparti di neonatologia per la diagnosi precoce di esposizione prenatale all'alcol etilico (79).

L'utilizzo di biomarcatori oggettivi in una vasta gamma di matrici biologiche, già nel periodo prenatale, è stato un enorme passo avanti nella valutazione degli effetti deleteri di esposizione prenatale a xenobiotici.

Idealmente, dovrebbero essere raccolte e analizzate il maggior numero possibile di matrici biologiche per ottenere un quadro preciso di esposizione nel periodo prenatale. Sono necessari studi prospettici su larga scala, che coinvolgano coppie madre-neonato, per i quali si abbia a disposizione una storia dettagliata dell'uso gestazionale dell'alcol etilico, per stabilire un

biomarcatore e un valore soglia definitivo da utilizzare nel test di screening e poter correlare le diverse abitudini al bere delle donne in gravidanza con i risultati ottenuti.

Bibliografia

1. Barr HM, Streissguth AP. Identifying maternal self-reported alcohol use associated with fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:283-7.
2. Olson HC, Morse BA, Huffine C. Development and psychopathology: fetal alcohol syndrome and related conditions. *Semin. Clin. Neuropsychiatry* 2001;3:262-84.
3. Streissguth AP, Bookstein FL, Barr HM Sampson PD, O'Malley K, Young JK. Risk factors for adverse life outcomes in fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects. *J Dev Behav Pediatr* 2004;25:228-38.
4. Abel EL. Prevention of alcohol abuse-related birth effects--I. Public education efforts, *Alcohol Alcohol* 1998;33:411-16.
5. Klug MG, Burd L. Fetal alcohol syndrome prevention: annual and cumulative cost saving, *Neurotoxicol Teratol* 2003;25:763-65.
6. Lupton C, Burd L, Harwood R. Cost of fetal alcohol spectrum disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004;127C:42-50.
7. Chang G. Alcohol-screening instruments for pregnant women. *Alcohol Res Health* 2001;25:204-9.
8. Russell M, Martier SS, Sokol RJ, Mudar P, Jacobson S, Jacobson J. Detecting risk drinking during pregnancy: a comparison of four screening questionnaires. *Am. J Public Health* 1996;86:1435-9.
9. Rosalki SB, Rau D, Lehmann D, Prentine M. Gamma-glutamyl transpeptidase in chronic alcoholism. *Lancet* 1970;21139
10. Sillanaukee P, Massot N, Jousilahti P, Vartiainen E, Sundvall J, Olsson U, Poikolainen K, Ponnio M, Allen JP, Alho H. Dose response of laboratory markers to alcohol consumption in a general population. *Am. J Epidemiol* 2000;152:747-51.
11. Poikolainen K, Vartiainen E. Determinants of gamma-glutamyltransferase: positive interaction with alcohol and body mass index, negative association with coffee. *Am J Epidemiol* 1997;146:1019-24.
12. Masuiki M, Ogawa M, Kitahara T, Murata A, Matsuda K, Kosaki G. Development of radioimmunoassay for gamma-glutamyl transferase using pancreatic enzyme. *Ann Clin Biochem* 1983;20:247-50.
13. Larsson G. Prevention of fetal alcohol effects. An antenatal program for early detection of pregnancies at risk. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1983;62:171-8.
14. Halmesmaki E, Roine R, Salaspuro M. Gamma-glutamyltransferase, aspartate and alanine aminotransferases and their ratio, mean cell volume and urinary dolichol in pregnant alcohol abusers. *B. J Obstet Gynaecol* 1992;99:287-91.
15. Devgun MS, Dunbar JA, Hagart J, Martin BT. Alcohol intake and liver function tests. *Ann Clin Biochem* 1985;22:104-5.
16. Helander A, Beck O, Jones AW. Laboratory testing for recent alcohol consumption: comparison of ethanol, methanol, and 5-hydroxytryptophol. *Clin Chem* 1996;42:618-24.
17. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem* 1978;24:58-73.
18. Vanderlinde RE. Review of pyridoxal phosphate and the transaminases in liver disease. *Ann Clin Lab Sci* 1986;16:79-93.

19. Littner Y, Bearer CF. Detection of alcohol consumption during pregnancy--current and future biomarkers. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31:261-9.
20. Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med* 2000;342:1266-71.
21. Wu A, Chanarin I, Levi AJ. Macrocytosis of chronic alcoholism. *Lancet* 1974;1:829-83.
22. Conigrave KM, Davies P, Haber P, Whitfield JB. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction* 2003;98:31-43.
23. Hasselblatt M, Martin F, Maul O, Ehrenreich H, Kernbach-Wighton G. Persistent macrocytosis following abstinence from chronic alcohol use. *JAMA* 2001;286:2946.
24. Meerkerk GJ, Njoo KH, Bongers IM, Trienekens P, van Oers JA. Comparing the diagnostic accuracy of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase, and mean cell volume in a general practice population. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1052-59.
25. Davidson RJ, Hamilton PJ. High mean red cell volume: its incidence and significance in routine haematology. *J Clin Pathol* 1978;31:493-8.
26. Sarkola T, Eriksson CJ, Niemela O, Sillanaukee P, Halmesmaki E. Mean cell volume and gamma-glutamyl transferase are superior to carbohydrate-deficient transferrin and hemoglobin-acetaldehyde adducts in the follow-up of pregnant women with alcohol abuse. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79:359-66.
27. Conigrave KM, Degenhardt LJ, Whitfield JB, Saunders JB, Helander A, Tabakoff B. CDT, GGT, and AST as markers of alcohol use: the WHO/ISBRA collaborative project. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:332-9.
28. Allen JP, Litten RZ. Recommendations on use of biomarkers in alcoholism treatment trials. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27:1667-70.
29. Helander A, Vabo E, Levin K, Borg S. Intra- and interindividual variability of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase, and mean corpuscular volume in teetotalers. *Clin Chem* 1998;44:2120-5
30. Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Trevisan MT, Floreani M, Tagliaro F. Analysis of carbohydrate-deficient transferrin: comparative evaluation of turbidimetric immunoassay, capillary zone electrophoresis, and HPLC. *Clin Chem* 2005;51:2368-71.
31. Helander A, Wielders JP, Te Stroet R, Bergstrom JP. Comparison of HPLC and capillary electrophoresis for confirmatory testing of the alcohol misuse marker carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem* 2005;51:1528-31.
32. Stauber RE, Jauk B, Fickert P, Hausler M. Increased carbohydrate-deficient transferrin during pregnancy: relation to sex hormones. *Alcohol Alcohol* 1996;31:389-92.
33. Kenan N, Larsson A, Axelsson O, Helander A. Changes in transferrin glycosylation during pregnancy may lead to false-positive carbohydrate-deficient transferrin CDT; results in testing for riskful alcohol consumption. *Clin Chim Acta* 2011;412:129-33
34. Bianchi V, Ivaldi A, Raspagni A, Arfini C, Vidali M. Pregnancy and variations of carbohydrate-deficient transferrin levels measured by the candidate reference HPLC method. *Alcohol Alcohol* 2011;46:123-7
35. Beck O, Helander A. 5-hydroxytryptophol as a marker for recent alcohol intake. *Addiction* 2003;98:63-72
36. Helander A, Beck O, Jones AW. Urinary 5HTOL/5HIAA as biochemical marker of postmortem ethanol synthesis. *Lancet* 1992;340:1159

37. Dierkes J, Wolfersdorf M, Borucki K, Weinmann W, Weisbeck G, Beck O, Borg S, Wurst FM. Determination of glucuronidated 5-hydroxytryptophol GTOL; a marker of recent alcohol intake, by ELISA technique. *Clin Biochem* 2007;40:128-31
38. Stephanson N, Helander A, Beck O. Alcohol biomarker analysis: simultaneous determination of 5-hydroxytryptophol glucuronide and 5-hydroxyindoleacetic acid by direct injection of urine using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2007;42:940-9
39. Beck O, Stephanson N, Bottcher M, Dahmen N, Fehr C, Helander A. Biomarkers to disclose recent intake of alcohol: potential of 5-hydroxytryptophol glucuronide testing using new direct UPLC-tandem MS and ELISA methods. *Alcohol Alcohol* 2007;42:321-5
40. Helander A. Biological markers in alcoholism. *J Neural Transm Suppl* 2003;15-32
41. Laposata EA, Lange LG. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science* 1986;281:497-9
42. Kaphalia BS, Ansari GA. Fatty acid ethyl esters and ethanol-induced pancreatitis. *Cell Mol Biol* 2001;47:173-9
43. Doyle KM, Bird DA, al-Salihi S, Hallaq Y, Cluette-Brown JE, Goss KA, Laposata M. Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion. *J Lipid Res* 1994;35:428-37
44. Doyle KM, Cluette-Brown JE, Dube DM, Bernhardt TG, Morse CR, Laposata M. Fatty acid ethyl esters in the blood as markers for ethanol intake. *JAMA* 1996;276:1152-6
45. Bearer CF, Gould S, Emerson R, Kinnunen P, Cook CS. Fetal alcohol syndrome and fatty acid ethyl esters. *Pediatr Res* 1992;31:492-5
46. Refaai MA, Nguyen PN, Steffensen TS, Evans RJ, Cluette-Brown JE, Laposata M. Liver and adipose tissue fatty acid ethyl esters obtained at autopsy are postmortem markers for premortem ethanol intake. *Clin Chem* 2002;48:77-83
47. Borucki K, Kunstmann S, Dierkes J, Westphal S, Diekmann S, Bogerts B, Luley C. In heavy drinkers fatty acid ethyl esters in the serum are increased for 44 hr after ethanol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1102-6
48. Kaluzny MA, Duncan LA, Merritt MV, Epps DE. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J Lipid Res* 1985;26:135-40
49. Dan L, Cluette-Brown JE, Kabakibi A, Laposata M. Quantitation of the mass of fatty acid ethyl esters synthesized by Hep G2 cells incubated with ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:1125-31
50. Borucki K, Schreiner R, Dierkes J, Jachau K, Krause D, Westphal S, Wurst FM, Luley C, Schmidt-Gayk H. Detection of recent ethanol intake with new markers: comparison of fatty acid ethyl esters in serum and of ethyl glucuronide and the ratio of 5-hydroxytryptophol to 5-hydroxyindole acetic acid in urine. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:781-7
51. Kintz P. Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2011. *Forensic Sci Int* 2012 May 10;218(1-3):2
52. Kaphalia BS, Cai P, Khan MF, Okorodudu AO, Ansari GA. Fatty acid ethyl esters: markers of alcohol abuse and alcoholism. *Alcohol* 2004;34:151-8
53. Pragst F, Yegles M. Determination of fatty acid ethyl esters FAEE; and ethyl glucuronide EtG; in hair: a promising way for retrospective detection of alcohol abuse during pregnancy? *Ther Drug Monit* 2008;30:255-63
54. Kulaga V, Koren G. Hair analysis of fatty acid ethyl esters in the detection of excessive drinking in the context of fetal alcohol spectrum disorders. *Ther Drug Monit* 2009;31:261-66
55. Kulaga V, Shor S, Koren G. Correlation between drugs of abuse and alcohol by hair analysis: parents at risk for having children with fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol* 2011;44:615-21

56. Morini L, Marchei E, Vagnarelli F, Garcia-Algar O, Groppi A, Mastrobattista L, Pichini S. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair-potential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol. *Forensic Sci Int* 2011;196:74-77
57. Auwarter V, Sporkert F, Hartwig S, Pragst F, Vater H, Diefenbacher A. Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotalers. *Clin Chem* 2001;47:2114-23
58. Auwarter V, Kiessling B, Pragst F. Squalene in hair--a natural reference substance for the improved interpretation of fatty acid ethyl ester concentrations with respect to alcohol misuse. *Forensic Sci Int* 2004;145:149-59
59. Bearer CF, Lee S, Salvator AE, Minnes S, Swick A, Yamashita T, Singer LT. Ethyl linoleate in meconium: a biomarker for prenatal ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:487-93
60. Klein J, Karaskov T, Koren G. Fatty acid ethyl esters: a novel biologic marker for heavy in utero ethanol exposure: a case report. *Ther Drug Monit* 1999;21:644-6
61. Ostrea EM, Hernandez JD, Bielawski DM, Kan JM, Leonardo GM, Abela MB, Church MW, Hanningan JH, Janisse JJ, Ager JW, Sokol RJ. Fatty acid ethyl esters in meconium: are they biomarkers of fetal alcohol exposure and effect? *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:1152-9
62. Bernhardt TG, Cannistraro PA, Bird DA, Doyle KM, Laposata M. Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 675:189-96.
63. Chan D, Bar-Oz B, Pellerin B, Paciorek C, Klein J, Kapur B, Farine D, Koren G. Population baseline of meconium fatty acid ethyl esters among infants of nondrinking women in Jerusalem and Toronto. *Ther Drug Monit* 2003;25:271-8
64. Moore CM, Lewis D. Fatty acid ethyl esters in meconium: biomarkers for the detection of alcohol exposure in neonates. *Clin Chim Acta* 2001;31:2235-7
65. Bearer CF, Jacobson JL, Jacobson SW, Barr D, Croxford J, Moltano CD, Viljoen DL, Marais AS, Chiodo LM, Cwik AS. Validation of a new biomarker of fetal exposure to alcohol. *J Pediatr* 2003;143:463-9.
66. Hutson JR, Aleksa K, Pragst F, Koren G. Detection and quantification of fatty acid ethyl esters in meconium by headspace-solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:8-12.
67. Bakdash A, Burger P, Goecke TW, Fasching PA, Reulbach U, Bleich S, Hastedt M, Rothe M, Beckmann MW, Pragst F, Kornhuber J. Quantification of fatty acid ethyl esters FAEE; and ethyl glucuronide EtG; in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study. *Anal Bioanal Chem* 2011;396:2469-77.
68. Hutson JR, Rao C, Fulga N, Aleksa K, Koren G. An improved method for rapidly quantifying fatty acid ethyl esters in meconium suitable for prenatal alcohol screening. *Alcohol* 2011;45:193-99.
69. Pichini S, Pellegrini M, Gareri J, Garcia-Algar O, Vall O, Vagnarelli F, Zuccaro P, Marchei E. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for fatty acid ethyl esters in meconium: assessment of prenatal exposure to alcohol in two European cohorts. *J Pharm Biomed Anal* 2008;48:927-33.
70. Kwak HS, Kang YS, Han KO, Moon JT, Chung YC, Choi JS, Han JY, Kim MY, Velanzquez-Armenta EY, Nava-Ocampo AA. Quantitation of fatty acid ethyl esters in human meconium by an improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011;878:1871-4
71. Garcia-Algar O, Kulaga V, Gareri J, Koren G, Vall O, Zuccaro P, Pacifici R, Pichini S, Alarming prevalence of fetal alcohol exposure in a Mediterranean city. *Ther Drug Monit* 2008;30:249-54.

72. Chan D, Knie B, Boskovic R, Koren G. Placental handling of fatty acid ethyl esters: perfusion and subcellular studies. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:75-82.
73. Burd L, Hofer R. Biomarkers for detection of prenatal alcohol exposure: a critical review of fatty acid ethyl esters in meconium. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008;82:487-93.
74. Moore C, Jones J, Lewis D, Buchi K. Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens. *Clin Chem* 2003;49:133-6.
75. Derauf C, Katz AR, Easa D. Agreement between maternal self-reported ethanol intake and tobacco use during pregnancy and meconium assays for fatty acid ethyl esters and cotinine. *Am. J.Epidemiol.* 2003;158:705-9.
76. Peterson J, Kirchner HL, Xue W, Minnes S, Singer LT, Bearer CF. Fatty acid ethyl esters in meconium are associated with poorer neurodevelopmental outcomes to two years of age. *J Pediatr* 2008;152:788-92.
77. Gareri J, Lynn H, Handley M, Rao C, Koren G. Prevalence of fetal ethanol exposure in a regional population-based sample by meconium analysis of fatty acid ethyl esters. *Ther Drug Monit* 2008;30:239-45.
78. Hutson JR, Magri R, Gareri JN, Koren G. The Incidence of Prenatal Alcohol Exposure in Montevideo Uruguay As Determined by Meconium Analysis. *Ther Drug Monit* 2010;32:311-17.
79. Pichini S, Marchei E, Vagnarelli F, Tarani L, Raimondi F, Maffucci R, Sacher B, Bisceglia M, Rapisardi G, Elicio MR, Biban P, Zuccaro P, Pacifici R, Pierantozzi A, Morini L. Assessment of prenatal exposure to ethanol by meconium analysis: results of an Italian multicenter study. *Alcohol Clin Exp Res* 2012;36:417-24.
80. Wurst FM, Skipper GE, Weinmann W. Ethyl glucuronide--the direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. *Addiction* 2003;98:51-61.
81. Pragst F, Balikova MA. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin. Chim. Acta* 2006;370:17-49.
82. Schloegl H, Dresen S, Spaczynski K, Stoertzel M, Wurst FM, Weinmann W. Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples. *Int J Legal Med* 2006;120:83-8.
83. Janda I, Alt A. Improvement of ethyl glucuronide determination in human urine and serum samples by solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;758:229-34
84. Shar R, Lacourse WR. An improved method to detect ethyl glucuronide in urine using reversed-phase liquid chromatography and pulsed electrochemical detection. *Anal Chim Acta* 2006;576:239-45.
85. Latvala J, Parkkila S, Melkko J, Niemela O. Acetaldehyde adducts in blood and bone marrow of patients with ethanol-induced erythrocyte abnormalities. *Mol Med* 2001;7:401-5.
86. Zimmer H, Schmitt G, Aderjan R. Preliminary immunochemical test for the determination of ethyl glucuronide in serum and urine: comparison of screening method results with gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2002;26:11-6.
87. Krivankova L, Caslavská J, Malásková H, Gebauer P, Thormann W. Analysis of ethyl glucuronide in human serum by capillary electrophoresis with sample self-stacking and indirect detection. *J Chromatogr A* 2005;1081:2-8.
88. Esteve-Turrillas FA, Bicker W, Lammerhofer M, Keller T, Lindner W. Determination of ethyl sulfate--a marker for recent ethanol consumption--in human urine by CE with indirect UV detection. *Electrophoresis* 2006;27:4763-71.
89. Jurado C, Soriano T, Gimenez MP, Menendez M. Diagnosis of chronic alcohol consumption. Hair analysis for ethyl-glucuronide. *Forensic Sci Int* 2004;145:161-6.

90. Yegles M, Labarthe A, Auwarter V, Hartwig S, Vater H, Wennig R, Pragst F. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotalers. *Forensic Sci Int* 2004;145:167-73.
91. Kharbouche H, Sporkert F, Troxler S, Augsburge M, Mangin P, Staub C. Development and validation of a gas chromatography-negative chemical ionization tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair and its application to forensic toxicology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:2337-43.
92. Janda I, Weinmann W, Kuehnle T, Lahode M, Alt A. Determination of ethyl glucuronide in hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic Sci Int* 2002;128:59-65.
93. Tarcomnicu I, van Nuijs AL, Aerts K, De Doncker M, Covaci A, Neels H. Ethyl glucuronide determination in meconium and hair by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 2011;196:121-7.
94. Morini L, Politi L, Groppi A, Stramesi C, Poletini A. Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry *J Mass Spectrom* 2006;41:34-42.
95. Lamoureux F, Gaulier JM, Sauvage FL, Mercerolle M, Vallejo C, Lachatre G. Determination of ethyl-glucuronide in hair for heavy drinking detection using liquid chromatography-tandem mass spectrometry following solid-phase extraction. *Anal Bioanal Chem* 2009;394:1895-901.
96. Kintz P. Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption. *Forensic Sci Int* 2010;196:2.
97. Schmitt G, Aderjan R, Keller T, Wu M. Ethyl glucuronide: an unusual ethanol metabolite in humans. Synthesis, analytical data, and determination in serum and urine. *J Anal Toxicol* 1995;19:91-4.
98. Halter CC, Dresen S, Auwaerter V, Wurst FM, Weinmann W. Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. *Int J Legal Med* 2008;122:123-8.
99. Wurst FM, Alling C, Aradottir S, Pragst F., Allen JP, Weinmann W, Marmillot P, Ghosh P, Lakshman R, Skipper GE, Neumann T, Spies C, Javors M, Johnson BA, Ait-Daoud N, Akhtar F, Roache JD, Litten R. Emerging biomarkers: new directions and clinical applications. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:465-73.
100. Kissack JC, Bishop J, Roper AL. Ethylglucuronide as a biomarker for ethanol detection. *Pharmacotherapy* 2008;28:769-81.
101. Junghanns K, Graf I, Pfluger J, Wetterling G, Ziemer C, Ehrental D, Zollner M, Dibbelt L, Backhaus J, Weinmann W, Wurst FM Urinary ethyl glucuronide EtG; and ethyl sulphate EtS; assessment: valuable tools to improve verification of abstinence in alcohol-dependent patients during in-patient treatment and at follow-ups. *Addiction* 2009;104:921-6.
102. Wurst FM, Wiesbeck GA, Metzger JW, Weinmann W. On sensitivity, specificity, and the influence of various parameters on ethyl glucuronide levels in urine--results from the WHO/ISBRA study. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1220-8
103. Wurst FM, Kelso E, Weinmann W, Pragst F, Yegles M, Sundstrom Poromaa I. Measurement of direct ethanol metabolites suggests higher rate of alcohol use among pregnant women than found with the AUDIT--a pilot study in a population-based sample of Swedish women. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:401-5.
104. Morini L, Marchei E, Pellegrini M, Groppi A, Stramesi C, Vagnarelli F, Garcia-Algar O, Pacifici R, Pichini S. Liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for the measurement of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium: new biomarkers of gestational ethanol exposure? *Ther Drug Monit* 2008;30:725-32.

105. Pichini S, Morini L, Marchei E, Palmi I, Rotolo MC, Vagnarelli F, Garcia-Algar O, Vall O, Zuccaro P. Ethylglucuronide and ethylsulfate in meconium to assess gestational ethanol exposure: preliminary results in two Mediterranean cohorts. *Can J Clin Pharmacol* 2009;16:370-5.
106. Morini L, Groppi A, Marchei E, Vagnarelli F, Garcia-Algar O, Zuccaro P, Pichini S. Population baseline of meconium ethyl glucuronide and ethyl sulfate concentrations in newborns of nondrinking women in 2 mediterranean cohorts. *Ther Drug Monit* 2010;32:359-62.
107. Morini L, Falcon M, Pichini S, Garcia-Algar O, Danesino P, Groppi A, Luna A. Ethyl-glucuronide and ethyl-sulfate in placental and fetal tissues by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2011;418:30-6.
108. Gustavsson L, Alling C. Formation of phosphatidylethanol in rat brain by phospholipase D *Biochem Biophys Res* 1987;142:958-63.
109. Kobayashi M, Kanfer JN. Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylation by rat brain synaptosomal phospholipase D *J Neurochem* 1987;48:1597-603.
110. Exton JH. Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function. *Physiol Rev* 1977;77:303-20.
111. Chalifa-Caspi V, Eli Y, Liscovitch M. Kinetic analysis in mixed micelles of partially purified rat brain phospholipase D activity and its activation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Neurochem Res* 1998;23:589-99.
112. Hansson P, Caron M, Johnson G, Gustavsson L, Alling C. Blood phosphatidylethanol as a marker of alcohol abuse: levels in alcoholic males during withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:108-10.
113. Varga A, Hansson P, Lundqvist C, Alling C. Phosphatidylethanol in blood as a marker of ethanol consumption in healthy volunteers: comparison with other markers. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:1832-7
114. Varga A, Hansson P, Johnson G, Alling C. Normalization rate and cellular localization of phosphatidylethanol in whole blood from chronic alcoholics. *Clin Chim Acta* 2000;299:141-50
115. Gunnarsson T, Karlsson A, Hansson P, Johnson G, Alling C, Odham G. Determination of phosphatidylethanol in blood from alcoholic males using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering or electrospray mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;705:243-9.
116. Gunnarsson T, Ekblad L, Karlsson A, Michelsen P, Odham G, Jergil B. Separation of polyphosphoinositides using normal-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection or electrospray mass spectrometry. *Anal Biochem* 1997;254:293-6.
117. Tolonen A, Lehto TM, Hannuksela ML, Savolainen MJ. A method for determination of phosphatidylethanol from high density lipoproteins by reversed-phase HPLC with TOF-MS detection. *Anal Biochem* 2005;341:83-8
118. Aradottir S, Olsson BL. Methodological modifications on quantification of phosphatidylethanol in blood from humans abusing alcohol, using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *BMC Biochem* 2005;6:18.
119. Varga A, Nilsson S. Nonaqueous capillary electrophoresis for analysis of the ethanol consumption biomarker phosphatidylethanol. *Electrophoresis* 2008;29:1667-71.
120. Nalesso A, Viel G, Cecchetto G, Frison G, Ferrara SD. Analysis of the alcohol biomarker phosphatidylethanol by NACE with on-line ESI-MS. *Electrophoresis* 2011;31:1227-33.
121. Stewart SH, Law TL, Randall PK, Newman R. Phosphatidylethanol and alcohol consumption in reproductive age women. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;34:488-92.