

ASSESSMENT AND DETECTION STANOVENÍ A DETEKCE

Detection Times for Urinary Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate in Heavy Drinkers during Alcohol Detoxification

Anders Helander^{1,*}, Michael Böttcher², Christoph Fehr³, Norbert Dahmen³ and Olof Beck⁴

DETEKČNÍ ČASY ETHYLGLUKURONIDU A ETHYLSULFÁTU V MOČI TĚŽKÝCH ALKOHOLIKŮ BĚHEM DETOXIKACE

1)Department of Clinical Neuroscience, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden,

2)Arztpraxis für Medizinische Mikrobiologie und Labordiagnostik, Dessau, Germany,

3)Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsklinikum Mainz, Mainz, Germany

4)Department of Medicine and Division of Clinical Pharmacology, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

Corresponding author: Alcohol Laboratory, L7:03, Karolinska University Hospital Solna, SE-171 76 Stockholm, Sweden. Tel: +46-8-51771530; E-mail: anders.helander@ki.se

(Received 30 June 2008; first review notified 21 August 2008; accepted 23 September 2008;)

ABSTRAKT- CÍL: Etylglukuronid (EtG) a ethylsulfát (EtS) jsou konjugované metabolity etanolu, vznikající v malém množství po konzumaci alkoholu. Ve srovnání s etanolem se EtG a EtS vylučují do moči po delší čas, což je předurčuje jako citlivé markery užívání alkoholu. Cílem této studie je určit časy detekce EtG a EtS u alkoholiků, podstupujících detoxikační léčbu.

METODY: Pacienti závislí na alkoholu (n = 32) s počáteční koncentrací alkoholu ≥ 1 g/l na základě dechové zkoušky, byli sledováni během detoxikační léčby. Vzorky moči pro stanovení EtG a EtS, etanolu a kreatininu byly odebrány při přijetí do nemocnice a poté jednou denně po dobu několika dnů. Stanovení EtG a EtS byla provedena metodou kapalinové chromatografie/hmotností spektrometrie (LC-MS) a paralelně byl EtG stanoven imunochemickým testem (DRI-EtG EIA, ThermoFisher/Microgenics).

VÝSLEDKY: Detekční časy EtG v moči byly týdně porovnávány ($r=0,434, P=0,013$) vzhledem k počáteční koncentraci alkoholu (rozmezí 1,0-3,4g/l). Pro EtG byl čas do poklesu koncentrace pod cut-off limit ($<0,5$ mg/l) bylo od 40-až130h (medián 78) (tj.cca.2-5dní)a podobné časové rozmezí vykazoval i EtS. Po korekci možného zředění moče byl vypočten poměr EtG/kreat. ($<0,5$ mg/g) bylo detekční okno ~40-90h (medián 65). Odhad doby detekce pro nulovou koncentraci etanolu byl ~30 až110 h (medián 66) pro EtG a ~30až70 h (medián 56) pro poměr EtG/kreat.

Výsledky EtG imunochemickou metodou a výsledky metodou LC/MS byly v dobré shodě.

ZÁVĚR: Během detoxikační léčby alkoholiků byly EtG a EtS detekovány v moči několik dní.

Detekční časy vykazovaly širokou individuální variabilitu, s ohledem na zředění moče a vztažení na odhad doby úplné eliminace alkoholu.

ÚVOD:

Po příjmu alkoholu, je většina ($> 95\%$) etanolu oxidována alkoholdehydrogenázou na acetaldehyd a dále na kyselinu octovou (aldehyd dehydrogenázou). Vzhledem k rychlému metabolismu etanolu a jeho vylučování, je časové rozmezí pro pozitivní záchyt ze slin, dechu nebo krve obvykle <12 hodin a o několik hodin déle v moči, vzhledem k zadržování moči v močovém měchýři (Helander a kol.,1996). Pokud chceme detekovat nadměrnou konzumaci alkoholu, zaměřil se výzkum na citlivější markery s delším detekčním oknem, než jaké je při testování ethanolu (Helander,2003)

Malé množství ($<0,1\%$) etanolu v organismu konjuguje s kyselinou glukuronovou a sírany za vzniku etylglukuronidu(EtG) (Schmitt et al, 1995; Dahl et al, 2002) a ethylsulfátu(EtS) (Helander a Beck, 2004). Reakce jsou katalyzované glukuronosyltransferázou (Foti,Fisher,2005) a sulfotransferázou (Schneider,Glatt, 2004).

Po požití alkoholu, EtG a EtS jsou vylučovány močí podstatně delší dobu než ethanol (Schmitt et al,1995; Dahl et al, 2002;Sarkola et al, 2003; Borucki et al., 2005; Helander a Beck, 2005) Testování těchto metabolitů etanolu získalo popularitu jako citlivá metoda tam, kde je uváděn poslední příjem alkoholu (Helander,2003; Politi et al,2007). Přítomnost EtG a EtS v moči indikuje nedávné pití i v případě, že etanol již není v moči detekovatelný (Helander,Beck, 2005). EtG byl doporučen jako marker příjmu alkoholu pro klinické a forenzní vyšetřování (Wurst et al,2003; Skipper et al.,2004; Ermet al.,2007;Hoiseth et al.,2007a;Kugelberg a Jones,2007), nebo pro dokumentování abstinence v léčebných programech, pro náhodné testování užívání alkoholu na pracovištích a školách a jako důkaz pití alkoholu pro soud.

Je třeba upozornit, že ve vyjímečných případech může být EtG, (ne EtS) vytvořen v již odebraném vzorku, pokud je moč infikována E.coli (primární patogen infekce močových cest) nebo obsahuje etanol, vzniklý např. fermentací ve vzorcích moči diabetiků) (Helander et al., 2007).

Vzhledem k potenciálně vážným důsledkům falešně pozitivního výsledku je nutná opatrnost při interpretaci výsledků testu EtG. V USA vydal SAMSHA (Substance Abuse and Mental Health Administration varování před použitím pozitivního výsledku EtG jako jediného důkazu pití alkoholu pro disciplinární a právní kroky (Centrum pro zneužívání návykových látek (Léčba,2006).

EtG je tedy (Helander, Dahl, 2005; Hoiseth et al.,2007b), ale ne EtS (Helander andDahl, 2005), je citlivý na bakteriální hydrolyzu, jsou-li uloženy infikované vzorky nesprávně, což znamená riziko získání falešně negativních výsledků.

Podrobná znalost o detekčních oknech pro EtG a EtS po pití je základním požadavkem, pokud jsou tyto metabolity

využívány pro klinické a medicínsko-právní účely.

Ve studii, prováděné na zdravých dobrovolnících byla provedena stanovení EtG a EtS po příjmu nízké až střední dávky etanolu za standardních podmínek. EtG a EtS byly detekovány v moči ≤ 24 hodin po příjmu 0,25 g/kg ethanolu, a ≤ 48 hodin po příjmu 0,50 g/kg ethanolu (Dahl et al, 2002, Helander a Beck, 2005, Wojcik a Hawthorne, 2007; Hoiseith et al, 2007a, 2008; Ohlávka a kol., 2008).

I při velmi malých dávkách etanolu (≤ 10 g) lze tedy detekovat močový EtG a EtS mnoho hodin po požití (Stephanson et al, 2002; Helander a Beck, 2005; Wurst a kol., 2006), a to i po neúmyslném - např. ústní vody (Costantino et al., 2006) nebo dezinfekčních prostředků (Röhrig et al., 2006) pokud má test nízký analytický limit detekce (cutoff). V krvi jsou detekční časy podstatně kratší (např. ≤ 14 h na 0,5 g/kg) (Schmidt a kol., 1997; Hoiseith et al, 2007a.; Ohlávka a kol., 2008).

Méně informací je k dispozici o detekčních oknech EtG a EtS po těžké intoxikaci (Wurst et al., 2002; Borucki et al., 2005).

Úvodní studie doporučila detekční čas pro močový EtG až 75 h (Alt a kol., 1997),

v poslední době jsou udávány doby detekce EtG v rozmezí od <24 h do > 90 h u těžkých alkoholiků po vysazení pití. (Beck et al., 2007). Tato práce má za účel stanovit detekční okna pro EtG a EtS v moči u pacientů – alkoholiků během detoxikace a zkoumat faktory, které je mohou ovlivnit.

MATERIÁLY A METODY

Pacienti a odběr vzorků

Náhodně vybraní pacienti závislí na alkoholu (podle DSM kritérií-IV věkový průměr 19,1) hospitalizovaní pro detoxikační léčbu alkoholismu na Univerzitní nemocnici v Mohuči, klinice psychiatrie a psychoterapie, se podíleli na této studii. Jejich konzumace alkoholu v posledním týdnu byla v rozmezí mezi 300 a 4380 g (průměr 1650, medián 1600) dle jejich vlastního sdělení. Během prvních 3 dnů hospitalizace byli pod dozorem a nemohli opustit oddělení. Od 4. dne jim bylo umožněno přijímat návštěvy a také opustit oddělení na čas. V případě, že se u nich projeví abstinenci příznaky, byli pacienti léčeni Clomethiazolem (Lange-Asschenfeldt et al., 2003).

Pacienti vykazovali koncentraci ethanolu ≥ 1 g/l (dechovou zkouškou) při přijetí a výrazně nižší nebo negativní výsledek při druhém testování, prováděném následující ráno (v průměru 18 hodin později) potvrzuje, že jsou v eliminační fázi a nepožili v této době alkohol. (Norberg et al., 2003). První vzorek moči byl odebrán při přijetí do nemocnice, druhý vzorek druhý den ráno a poté vždy jednou za 24 h (první ranní moč, pokud to bylo možné) v průběhu několika následujících dní (5-8 vzorků/pacient, průměr 7.3). Vzorky moči byly odebrány do plastových nádobek bez konzervačních látek (Monovettes Sarstedt AG, Německo) a skladovány při -20°C až do analýzy. Paralelně s odběrem každého vzorku moče bylo provedeno stanovení alkoholu v dechu. Dechové zkoušky a klinická pozorování byly používány v průběhu celé studie pro kontrolu abstinence. Studie v této podobě byla schválena etickou komisí na univerzitě Mainz.

Stanovení EtG, EtS, etanolu a kreatininu v moči

Měření EtG a EtS v moči bylo provedeno citlivou referenční metodou, kapalinovou chromatografií/hmotnostní spektrometrií (LC-MS) (Stephanson et al, 2002; Helander a Beck, 2004, 2005). Analýza byla provedena v negativním-ion módu, s použitím selektivního monitoringu deprotonovanými ionty na m/z 221 a m/z 226 pro EtG s penta-deuterovaným interním standardem (EtG-D5, Medichem Diagnostics, Německo) a na m/z 125 a m/z 130 pro EtS (TCI, Japonsko) a EtS-D5 (interní standard) (Helander a Beck, 2005). Detekční a kvantifikační limity této metody jsou: 0,05, resp. 0,1 mg. Pro klinické účely se rutinně používá cut-off 0,5 mg/l EtG (2,2 $\mu\text{mol/l}$) (Böttcher a kol., 2008), zatímco EtS je používán jako konfirmační test (limit 0,1 mg/l).

Všechny pozitivní výsledky EtG získané LC/MS byly potvrzeny LC-MS/MS (systém Perkin-Elmer 200 LC a Sciex API 2000 MS) se správnou relativní četností hlavního produktu EtG (m/z 75, 85 a 113). Nebyl zaznamenán vliv potlačení iontů na retenční časy analytů (Stephanson et al, 2002; Helander a Beck, 2005).

Stanovení koncentrace močového EtG bylo paralelně provedeno komerční enzym-immunochemickou metodou pro (DRI EtG EIA, ThermoFisher / Microgenics, Německo) (Böttcher et al., 2008).

Měření etanolu v dechu provedena pomocí přístroje Dräger Alcotest Model 7410 (Dräger Safety AG, Germany) a výsledky byly vyjádřeny jako odpovídající koncentrace v krvi s citlivostí 0,05 g/l).

Koncentrace etanolu v moči byla stanovena metodou s alkohol-dehydrogenázou na Olympusu AU640 s reagensii ThermoFisher / Microgenics (citlivost 0,1 g/l).

Kreatinin byl stanoven metodou Jaffe na Olympusu AU640 soupravou ThermoFisher/Microgenics

Statistické výpočty byly provedeny za použití F-testu pro porovnání variance a Pearsonova korelačního koeficientu (MedCalc software verze 9.3.9.0).

VÝSLEDKY Celkem **32** pacientů závislých na alkoholu (31m, 1ž) ve věku od 31 do 72let (průměr 46, medián 46), s tělesnou hmotností 41,5 - 124 kg (průměr 77,0, medián 75,8) splnili kritéria pro začlenění do této studie: Při přijetí do nemocnice měli koncentraci ethanolu ≥ 1 g/l a při druhém stanovení výrazně nižší nebo negativní výsledek (2. vzorek odebrán v průměru za 17,6 hodiny (medián 16,8, rozsah 5,5 - 41,5) Měření alkoholu v dechu prokázala počáteční koncentrace etanolu v rozmezí od 1,0 g/l do 3,4 g/l, s průměrnou hodnotou 2,0 g/l (medián 1,9).

Stanovení močového EtG a EtS bylo provedeno LC-MS a všechny pozitivní výsledky potvrzeny LC-MS/MS. Pro srovnání byl paralelně stanoven EtG enzymimunoassayí (DRI-ETG-EIA). Byla potvrzena celkově dobrá shoda mezi výsledky DRI-ETG a LC-MS/MS v celém rozmezí koncentrací (0-2440 mg/l), (obr. 1)

Ve výpočtech pak byla použita pouze data LC/MS/MS.

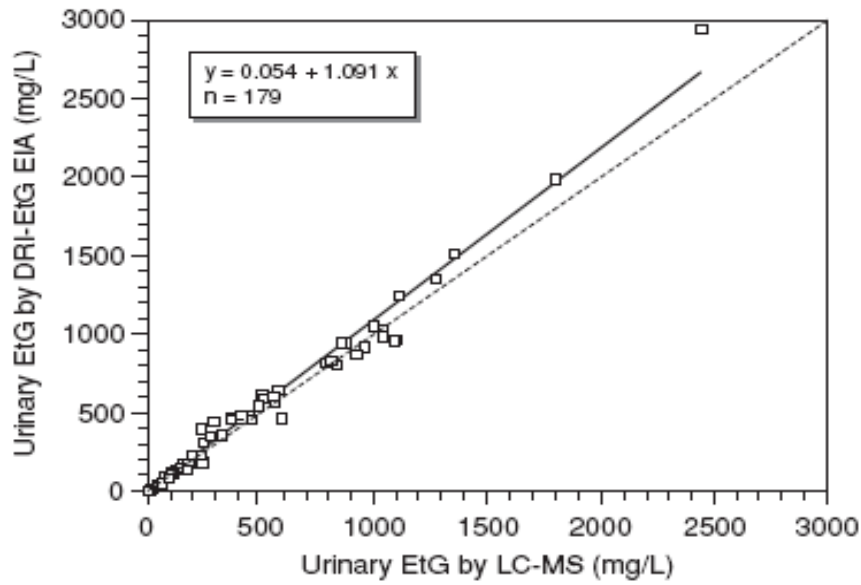
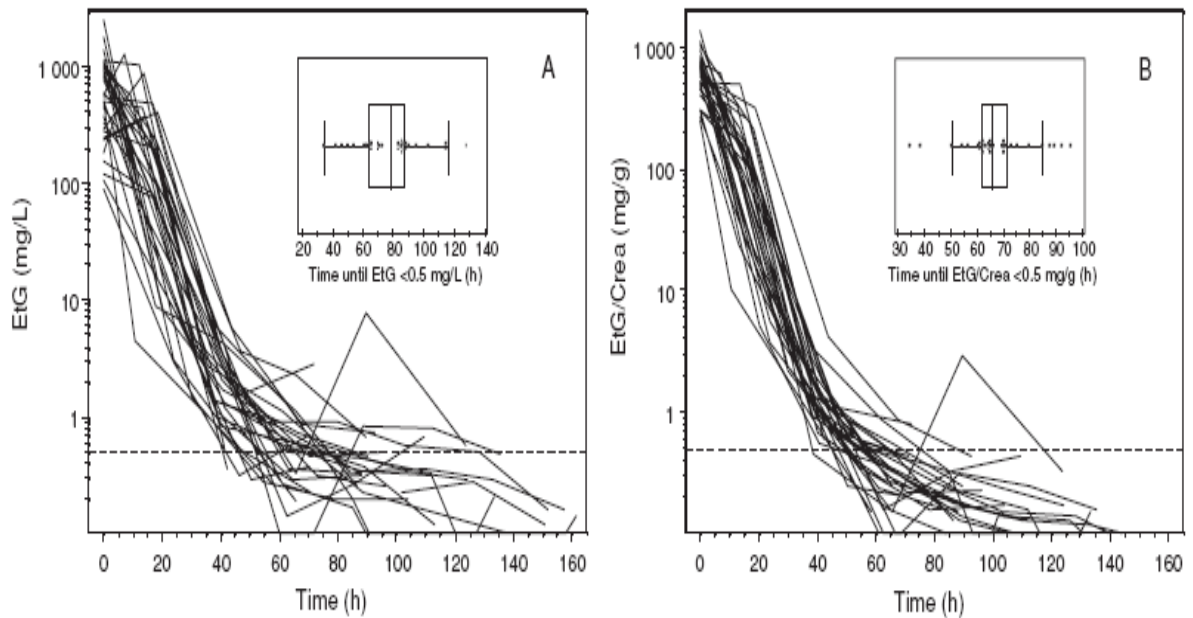
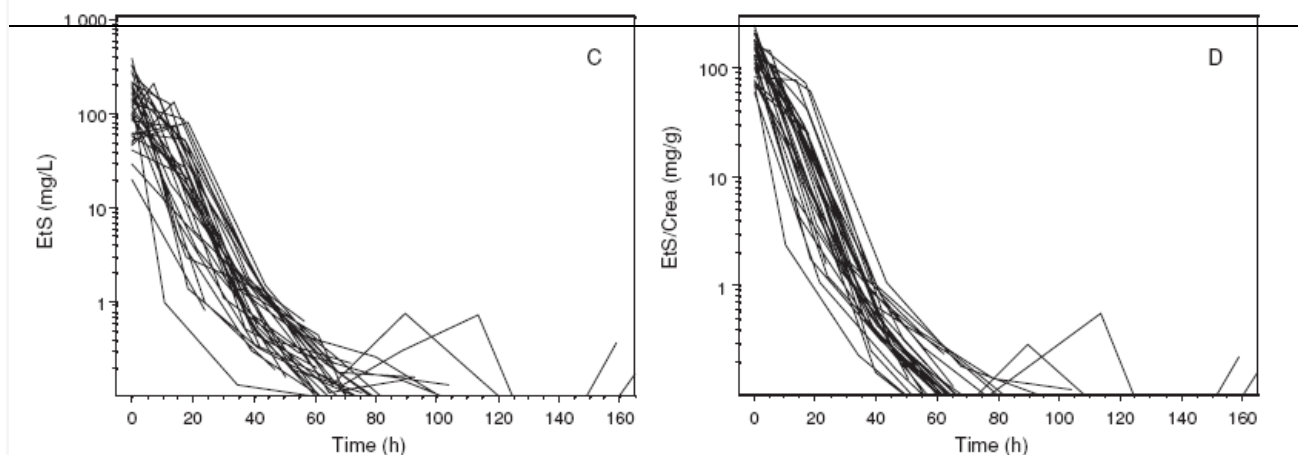


Fig. 1. Agreement of urinary ethyl glucuronide (EtG) levels determined by LC-MS and the EtG-DRI (Microgenics/ThermoFisher) immunoassay. Only data for EtG above the quantification limit of the LC-MS method (~ 0.1 mg/L) are shown.

Obr.1 – shoda koncentrací Etylgukoronidu moči, stanoveného LC/MS a paralelně imunochemicky (EtG DRI(microgenics/ThermoFisher))



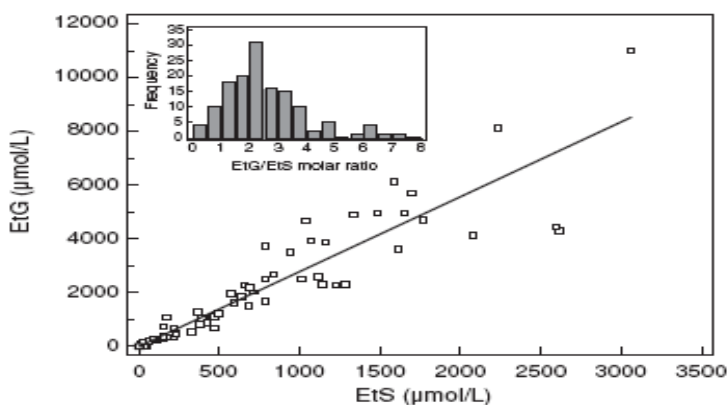


Individuální časové průběhy koncentrací EtG a EtS v moči znázorňují grafy na **obr. 2**. U všech 32 pacientů přetrvával pozitivní nález EtG a EtS podstatně delší dobu močového ethanolu (data nejsou uvedena). Všechny vzorky moči odebrané při příjmu do nemocnice měly pozitivní koncentraci etanolu (1,0 až 4,4 g/l, průměr 3,0, medián 3,1), ale pouze u 4 pacientů (12,5%) byl ethanol detekovatelný také v druhém vzorku, odebraném druhý den ráno. **EtG** při příjmu (tj. první testování, cut-off (<0,5 mg / l) v rozmezí od~40h do~130 h (**obr. 2A**) s průměrem 77h (medián 78, 25-75týpercentil (64-88). Podobný časový průběh lze pozorovat u koncentrací EtS s časy detekce ~55-110 h při (cutof limit 0,1 mg)- **Obr. 2C**. Hodnoty EtG a EtS vykazují dobrou korelaci s molárním poměrem EtG/EtS = 2,5 (**obr. 3**). U 2 pacientů byly pozorovány zvýšený EtG a EtS ještě po návratu na nízké nebo negativní hodnoty, což znamená nějaký druh expozice ethanolem (ať už záměrné pití nebo v důsledku neúmyslného požití z produktů obsahujících ethanol) (**Obr. 2**). Nicméně, nebyly zaznamenány žádné pozitivní dechové testy během sledovaného období. Vzhledem k tomu, že koncentrace EtG a EtS mohou být ovlivněny naředěním moči (Dahl et al, 2002;.. Bergstrom a kol,2003; Helander a Beck, 2005) byla ověřena normální hodnota močového kreatininu . Tím je zajištěna co nejnižší hladina inter-variability mezi oběma metabolity **Obr.2 B a D**..

Pro poměr EtG/kreatinin (**obr.2B**), jsou časy návratu do pod 0,5 mg/g v rozmezí od~40h do~90h s průměrem 67 hodin (medián 65, 25-75týpercentil, 62 až 72).

Slabě pozitivní korelace byla pozorována mezi počáteční koncentrací etanolu v dechu a dobou detekce EtG v moči ($r = 0,434$, $P < 0,013$), ale nedosáhl statistické významnosti pro EtS ($r = 0,189$). Pro kompenzaci proměnné počáteční koncentrace alkoholu a nefrekvenční časy odběrů vzorků, byla přibližná doba nulové koncentrace etanolu odhadnuta pro každého pacienta individuálně, na základě jeho koncentraci etanolu při přijetí a předpokládané rychlosti eliminace etanolu rychlostí 0,18 g/l/h (Jones et al., 1997). Při vyjádření tímto způsobem, vykazují eluční křivky pro EtG a EtS lepší inter-individuální shodu. (**Obr. 4 A a C**), časový pro EtG <0,5 mg/l je 30-110h, (průměr 66,medián 66, 25-75.percentil 54-80; $P = 0,013$ v porovnání s originální směrodatnou odchylkou) Po korekci ředění moči výpočtem poměru ku kreatininu (**obr.4B a D**), je detekční čas pro EtG/kreat. <0,5 mg/g od~30do-70h (průměr 56, medián 56, 25-75percentil 51-63; $P=0,004$, porovnáno se standardní směrodatnou odchylkou)

Obr.3



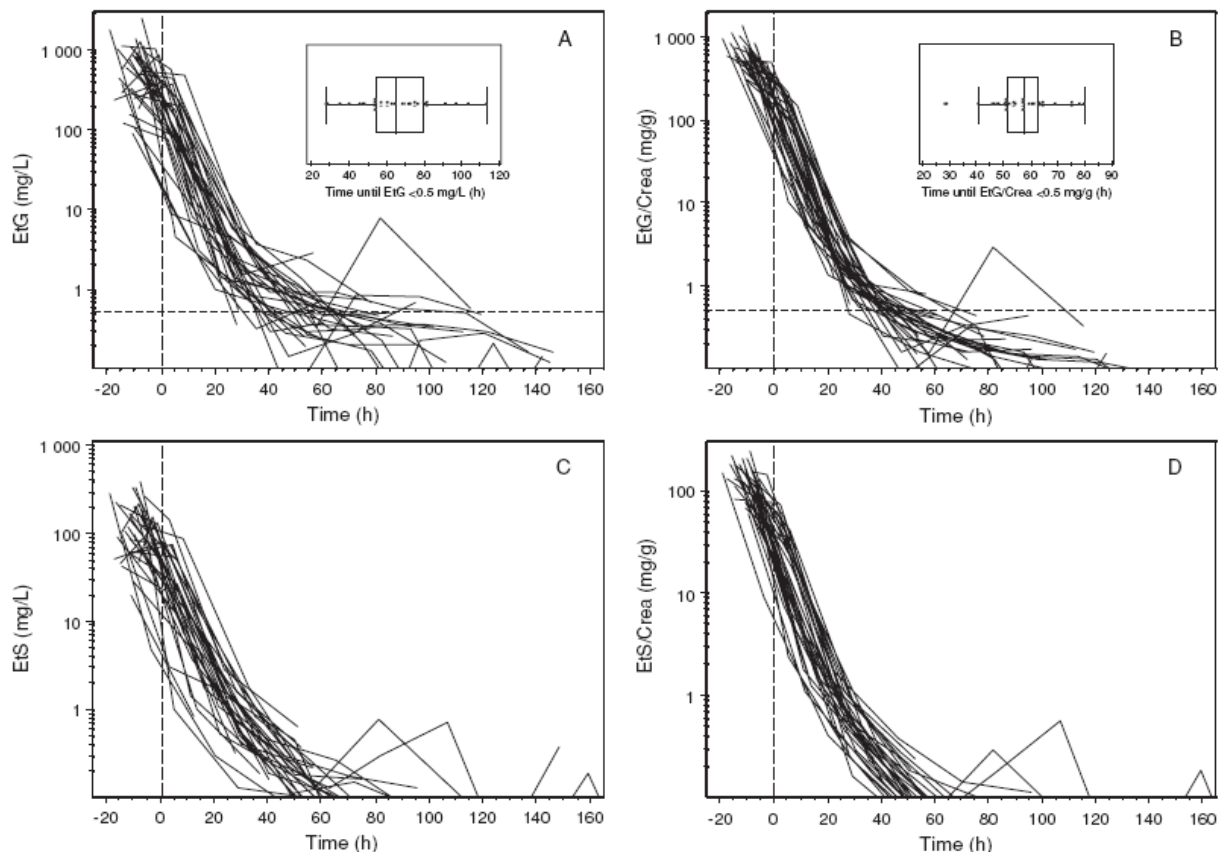
<- Korelace mezi koncentracemi močových EtG a EtC, stanovených LC/MS.

Regresní přímka: $Y=5,974+2,786x$, $n=297$ (obsahuje všechny hodnoty) $r=0,951$, $P=0,0001$

Molární poměr EtG/EtS odpovídá (průměr 2,5, median 2,25, rozmezí 0,21-7,22)

Fig. 3. Correlation between urinary EtG and EtS concentrations determined by LC-MS. Regression equation: $y = 5.974 + 2.786 x$, $n = 297$ (all values included), $r = 0.951$, $P < 0.0001$. Inset: the corresponding EtG/EtS molar ratio (mean 2.5, median 2.25, range 0.21–7.22).

Obr.4



Obr. 4. vylučování močí: časové profily koncentrací EtG a EtS ve vztahu k předpokládané době dosažení nulové koncentraci etanolu (A, C) a odpovídající hodnoty po vztážení na močový kreatinin (B a D), celkem 32 pacientů závislých na alkoholu v průběhu detoxikace (5-8 vzorků/pacienta, průměr 7,3)

Pozn: plochy pro předpokládaný čas nulové koncentrace etanolu vztáženého proti EtG a EtG/kreat v noci se blíží cut off limitu (<0,5 mg/l, resp.<0,5 mg/g).

TAB.1 :Detekční časy pro EtG a EtS v moči po různých dávkách alkoholu :

Table 1. Urinary detection times for EtG and EtS after different doses of alcohol

Population	N	Alcohol dose (g/kg)	Detection window (h) ^a		Cut-off limit (mg/L)		Reference
			EtG	EtS	EtG	EtS	
Healthy subjects	4	0.1	≤6	-	0.1	-	(Stephanson <i>et al.</i> , 2002)
	2	0.1	13–22	22–26	0.15	0.11	(Wurst <i>et al.</i> , 2006)
	9	0.15	-	≤12	0.1	-	(Helander and Beck, 2005)
	5	0.25	<24	-	0.1	-	(Wojcik and Hawthorne, 2007)
	6	0.2–0.3	3–25	5–30	0.15	0.11	(Wurst <i>et al.</i> , 2006)
	6	0.5	22–32	-	0.1	-	(Dahl <i>et al.</i> , 2002)
	10	0.5	25–35	-	0.2	-	(Hoiseth <i>et al.</i> , 2007a)
	9	0.5	-	≤24	0.1	-	(Helander and Beck, 2005)
	1	0.5	≤29	≤29	0.1	0.1	(Helander and Beck, 2004)
	10	0.5	25–48	25–39	0.1	0.1	(Hoiseth <i>et al.</i> , 2008)
	7	0.5	≤48	-	0.1	-	(Wojcik and Hawthorne, 2007)
	1	0.6	≤36	≤36	0.15	0.11	(Wurst <i>et al.</i> , 2006)
	13	0.50–0.78	27–44	23–47	0.1	0.1	(Halter <i>et al.</i> , 2008)
	7	0.75–0.85	≤48	-	0.1	-	(Wojcik and Hawthorne, 2007)
	Alcohol patients	17	>1	39–102	-	0.1	-
32		Alcohol intoxication	40–130	55–110	0.5	0.1	(Alt <i>et al.</i> , 1997) Present study

^aIn studies on healthy subjects, the detection times after the start of drinking are usually reported, while in studies of alcoholic patients, the times after admission to the hospital are usually given.

DISKUSE

V posledních letech, vzrostl zájem o EtG jako biomarker akutního příjmu alkoholu (Helander, 2003).

S nabídkou komerčních imunochemických testů pro rychlou a levnou detekci z moče se zájem ještě zvyšuje. (Böttcher et al., 2008). První vyzkoušená metoda enzymimunoassay test DRI-EtG prokázal dobrou shodu s hodnotami výsledků LC-MS (Böttcher et al., 2008).

Předložená studie potvrdila tuto shodu a podpořila klinickou užitečnost imunoanalýzy. V souladu s tím je nyní možno provádět EtG testy v souladu s koncepcí screeningu tak, jak je běžnou praxí při testování na drogy. Potvrzení výsledku rychlého testu EtG se doporučuje provést LC-MS (/ MS) (Weinmann a kol., 2004). V případě možného rizika rozkladu EtG a/nebo možného vzniku ve zkažených vzorcích moči je vhodnější EtS který je určen pro takové podmínky (Helander a Dahl, 2005; Helander et al., 2007) a doporučuje se jako doplňkový validační parametr (Helander a Beck, 2005).

V řadě studií jsou uváděny detekční časy EtG po příjmu alkoholu nebo, v klinické praxi, jako standardní test, prokazující nedávné pití, kdy etanol v dechu nebo krvi je již negativní. Tyto studie byly většinou provedeny se zdravými dobrovolníky a standardizovanou dávkou alkoholu, např. přepočtenou na tělesnou hmotnost). Byly to nízké nebo střední dávky alkoholu, ale jen málo byli zkoumáni pacienti během detoxikace po velmi vysokých dávkách.

V kontrolních studiích na zdravých dobrovolnících jsou už velmi dobře zdokumentovány vylučovací profily EtG a EtS v moči i krvi. (Schmitt et al, 1997; Dahl et al, 2002; Wurst et al, 2002, 2005; Borucki et al. 2005; Helander, Beck 2005)

Jsou vyčísleny vztahy: dávka-odpověď pro špičkové hodnoty, a jak je shrnuto v tabulce 1, doby detekce.

Například, ethanol v dávce mezi ~0.25 a 0,50 g/kg dává typický výsledek v době detekce močového EtG od ~24-48 hod. od začátku požití etanolu, nebo i o několik hodin dříve, pokud uplynula doba, kdy již není etanol detekovatelný v krvi. (Dahl et al., 2002). Ve skupině pacientů-alkoholiků, sledovaných v průběhu detoxikace, byla udána doba detekce do ~80 hodin (Wurst a kol., 1999) a byly zjištěny i delší doby (Beck et al., 2007).

Studie na 23 pacientech-alkoholicích během detoxikace se předpokládala typická doba detekce pouze ~48 h po eliminaci etanolu krve (Wurst a kol., 2002). Výsledky této prezentované studie prokázaly vysokou inter-individuální variabilitu mezi jednotlivými časy detekce pro EtG po přijetí do nemocnice, v rozmezí od ~40 h až po **130** hodin. Odpovídající doby detekce v moči pro EtS byly ve stejném rozsahu (~55-110 h). Je třeba zdůraznit, že odběr vzorků pro testování byl prováděn pouze jednou denně, takže je pravděpodobné rozšíření uváděného detekčního okna..

EtG a EtS jsou vylučovány močí, takže je třeba vzít v potaz ovlivnění vodou indukované diurézy (Dahl et al, 2002; Goll et al., 2002; Helander a Beck, 2005). Proto je vhodné zahrnout opravu koncentrace vztahením k e kreatininu v moči.

(Bergstrom a kol., 2003). Současné výsledky prokázaly že normalizace hodnot na zředění moči mělo z následků podstatně menší rozptyl hodnot při variabilních dávkách etanolu (tedy předpokládané době jeho nulové koncentrace). Následkem byl podstatně menší rozptyl jednotlivých eliminačních křivek (viz obr 2 a 4) a zaznamenány menší inter-individuální rozdíly v časech koncentračních profilů mezi křivkami obou metabolitů..

V klinické situaci, kdy obvykle nejsou známy časy příjmu alkoholu a počet a čas vymocení mezi pitím a odběrem vzorku, je nemožné dát do souvislosti zjištěný EtG a EtS, k určení přijaté dávky etanolu a určení času.

Zatím nebyl určen žádný limit pro koncentraci EtG a EtS v moči jako biomarkery užívání alkoholu.

V předložené studii byl použit rutinní limit = **0,5 mg / l** pro EtG (zhruba odpovídá 0,5 mg/ g kreatininu) protože umožňuje ponechat neúmyslnou expozici etanolem (malým množstvím) nedetekovanou. (Böttcher et al., 2008) zatímco EtS je běžně používán jako potvrzující test s nižším limitem 0,1 mg/l. Pro konfirmaci se používají metody LC/MS(/ MS), které využívají moderní přístroje a umožňují ještě nižší mezní limit EtG, což má za následek delší detekční okno, ale zvýšené riziko falešně pozitivních výsledků možným zachytem malých neplánovaných množství požitého alkoholu. Možnosti nejsou ještě plně prozkoumány, ale v běžné praxi se vžilo vztáhnout naměřenou hodnotu ke koncentraci kreatininu, čímž se kompenzuje úmyslné i neúmyslné ředění moči. V současnosti se předpokládá prahová hodnota ředění moči koncentrace kreatininu 20mg/dl), jakose používá při testování na drogy (Fraser a Zámečník, 2003).

Na závěr: tato studie prováděná na pacientech-alkoholicích v průběhu detoxikační léčby potvrzuje, že EtG a EtS přetrvává v moči několik dní u těžkých alkoholiků po značném pití, ale také ukazuje velké inter-individuální rozdíly i když hodnoty EtG byly vztaženy k počáteční dávce alkoholu a normalizovány na ředění moči vztahením ke kreatininu.

Měření EtG se používá pro klinické a lékařsko-právní účely podobně jako testování na drogy.

Doba detekce i po příjmu nízké až střední dávky etanolu je několik dní, je důležité vědět, že pozitivní výsledek nemusí znamenat vždy alkoholismus a nemusí kvalifikovat požití v zaměstnání při namátkovém testování.

Vlastnosti testu na EtG jej předurčují pro detekci nadměrného pití několik dní zpět a měl by být používán pro ověření selhání nebo relapsu pití v situaci, kdy je doporučena úplná abstinence.

Poděkování - Finanční podpora byla poskytnuta prostřednictvím regionální dohody o vzdělávání lékařů a klinický výzkum (ALF) mezi Stockholmu krajské rady a Karolinska Institute.

Autoři děkují Yufang Zheng a Helen Dahl za technickou pomoc s analýzou LC-MS moči EtG a EtS v moči.

REFERENCE – LITERÁRNÍ ODKAZY

1. Alt A, Wurst FM, Seidl S. (1997) Evaluation of the ethylglucuronide in urine samples with the internal standard d5 thylglucuronide. *Blutalkohol* **34**:360–5.
2. Beck O, Stephanson N, Böttcher M *et al.* (2007) Biomarkers to disclose recent intake of alcohol: potential of 5-hydroxytryptophol glucuronide testing using new direct UPLC-tandemMS and ELISA methods. *Alcohol Alcohol* **42**:321–5.
3. Bergström J, Helander A, Jones AW. (2003) Ethyl glucuronide concentrations in two successive urinary voids from drinking drivers: Relationship to creatinine content and blood and urine ethanol concentrations. *Forensic Sci Int* **133**:86–94.
4. Borucki K, Schreiner R, Dierkes J *et al.* (2005) Detection of recent ethanol intake with new markers: comparison of fatty acid ethyl esters and of ethyl glucuronide and the ratio of 5-hydroxytryptophol to 5-hydroxyindole acetic acid in urine. *Alcohol Clin Exp Res* **29**:781–7.
5. Böttcher M, Beck O, Helander A. (2008) Evaluation of a new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing. *Alcohol Alcohol* **43**:46–8.
6. Center for Substance Abuse Treatment (2006) The role of biomarkers in the treatment of alcohol use disorders. *Subst Abuse Treat. Advis* **5**:1–8.
7. Costantino A, Digregorio EJ, Korn W *et al.* (2006) The effect of the use of mouthwash on ethylglucuronide concentrations in urine. *J Anal Toxicol* **30**:659–62.
8. Dahl H, Stephanson N, Beck O *et al.* (2002) Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide. *J Anal Toxicol* **26**:262–6.
9. Erim Y, Böttcher M, Dahmen U *et al.* (2007) Urinary ethyl glucuronide testing detects alcohol consumption in alcoholic liver disease patients awaiting liver transplantation. *Liver Transpl* **13**:757–61.
10. Foti RS, Fisher MB. (2005) Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. *Forensic Sci Int* **153**:109–116.
11. Fraser AD, Zamecnik J. (2003) Impact of lowering the screening and confirmation cutoff values for urine drug testing based on dilution indicators. *Ther Drug Monit* **25**:723–7.
12. Goll M, Schmitt G, Ganssmann B *et al.* (2002) Excretion profiles of ethylglucuronide in human urine after dilution. *J Anal Toxicol* **26**:262–6.
13. Halter CC, Dresen S, Auwaerter V *et al.* (2008) Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. *Int J Legal Med* **122**:123–8.
14. Helander A. (2003) Biological markers in alcoholism. *J Neural Transm* **66**(Suppl):15–32.
15. Helander A, Beck O. (2004) Mass spectrometric identification of ethyl sulfate as an ethanol metabolite in humans. *Clin Chem* **50**:936–7.
16. Helander A, Beck O. (2005) Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake. *J Anal Toxicol* **29**:270–4.
17. Helander A, Beck O, Jones AW. (1996) Laboratory testing for recent alcohol consumption: comparison of ethanol, methanol, and 5-hydroxytryptophol. *Clin Chem* **42**:618–24.
18. Helander A, Dahl H. (2005) Urinary tract infection: a risk factor for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in the detection of recent alcohol consumption. *Clin Chem* **51**:1728–30.
19. Helander A, Olsson I, Dahl H. (2007) Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. *Clin Chem* **53**:1855–7.
20. Hoise G, Bernard JP, Karinen R *et al.* (2007a) A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology. *Forensic Sci Int* **172**:119–24.
21. Hoise G, Bernard JP, Stephanson N *et al.* (2008) Comparison between the urinary alcohol markers EtG, EtS, and GTOL/5-HIAA in a controlled drinking experiment. *Alcohol Alcohol* **43**:187–91.
22. Hoise G, Karinen R, Johnsen L *et al.* (2007b) Disappearance of ethyl glucuronide during heavy putrefaction. *Forensic Sci Int* **176**:147–51.
23. Jones AW, Norberg A, Hahn RG. (1997) Concentration-time profiles of ethanol in arterial and venous blood and end-expired breath during and after intravenous infusion. *J Forensic Sci* **42**:1088–94.
24. Kugelberg FC, Jones AW. (2007) Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature. *Forensic Sci Int* **165**:10–29.
25. Lange-Asschenfeldt C, Müller MJ, Szegedi A *et al.* (2003) Symptom-triggered versus standard chlormethiazole treatment of inpatient alcohol withdrawal: clinical implications from a chart analysis. *Eur Addict Res* **9**:1–7.
26. Norberg A, Jones AW, Hahn RG *et al.* (2003) Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. *Clin Pharmacokinet* **42**:1–31.
27. Politi L, Leone F, Morini L *et al.* (2007) Bioanalytical procedures for determination of conjugates or fatty acid esters of ethanol as markers of ethanol consumption: a review. *Anal Biochem* **368**:1–16.
28. Rohrig TP, Huber C, Goodson L *et al.* (2006) Detection of ethylglucuronide in urine following the application of erm-X. *J Anal Toxicol* **30**:703.
29. Sarkola T, Dahl H, Eriksson CJ *et al.* (2003) Urinary ethyl glucuronide and 5-hydroxytryptophol levels during repeated ethanol ingestion in healthy human subjects. *Alcohol Alcohol* **38**:347–51.
30. Schmitt G, Aderjan R, Keller T *et al.* (1995) Ethyl glucuronide: an unusual ethanol metabolite in humans. Synthesis, analytical data, and determination in serum and urine. *J Anal Toxicol* **19**:91–4.
31. Schmitt G, Droenner P, Skopp G *et al.* (1997) Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers, and suspected drinking drivers. *J Forensic Sci* **42**:1099–102.
32. Schneider H, Glatt H. (2004) Sulpho-conjugation of ethanol in humans *in vivo* and by individual sulphotransferase forms *in vitro*. *Biochem J* **383**:543–9.
33. Skipper GE, Weinmann W, Thierauf A *et al.* (2004) Ethyl glucuronide: a biomarker to identify alcohol use by health professionals recovering from substance use disorders. *Alcohol Alcohol* **39**:445–9.
34. Stephanson N, Dahl H, Helander A *et al.* (2002) Direct quantification of ethyl glucuronide in clinical urine samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit* **24**:645–51.
35. Weinmann W, Schaefer P, Thierauf A *et al.* (2004) Confirmatory analysis of ethylglucuronide in urine by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry according to forensic guidelines. *J Am Soc Mass Spectrom* **15**:188–93.
36. Wojcik MH, Hawthorne JS. (2007) Sensitivity of commercial ethyl glucuronide (ETG) testing in screening for alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol* **42**:317–20.
37. Wurst FM, Alling C, Aradottir S *et al.* (2005) Emerging biomarkers: new directions and clinical applications. *Alcohol Clin Exp Res* **29**:465–73.
38. Wurst FM, Dresen S, Allen JP *et al.* (2006) Ethyl sulphate: a direct ethanol metabolite reflecting recent alcohol consumption. *Addiction* **101**:204–11.
39. Wurst FM, Kempter C, Seidl S *et al.* (1999) Ethyl glucuronide—a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *Alcohol Alcohol* **34**:71–7.
40. Wurst FM, Seidl L, Ladewig D *et al.* (2002) Ethylglucuronide: the time course of excretion in urine during detoxification. *Addict Biol* **7**:427–34.
41. Wurst FM, Skipper GE, Weinmann W. (2003) Ethylglucuronide—the direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. *Addiction* **98**(Suppl 2):51–61.