

# **Ethylglucuronide et éthylsulfate, marqueurs biologiques de la consommation d'alcool**

Thomas Gicquel<sup>1,2,3</sup>, Sylvie Lepage<sup>1</sup>, Isabelle Morel<sup>1,2,3</sup>

1. CHU Rennes, Laboratoire de toxicologie biologique et médico-légale, F-35033 Rennes, France.

2. Université de Rennes 1, Faculté de pharmacie, F-35043 Rennes, France

3. INSERM, UMR991 « Foie, Métabolismes et Cancer » F-35043 Rennes, France

\* correspondance : Laboratoire de toxicologie biologique et médico-légale, CHU Pontchaillou, 35033 Rennes, France. [isabelle.morel@chu-rennes.fr](mailto:isabelle.morel@chu-rennes.fr)

## **RESUME :**

L'éthanol est la substance psychoactive la plus consommée en France et pose de réel problème de santé publique. La mise en évidence de sa consommation par des méthodes biologiques peut s'avérer importante aussi bien dans des contextes cliniques que dans des affaires médico-judiciaires. L'éthylglucuronide (EtG) et l'éthylsulfate (EtS) sont des marqueurs directs d'une consommation d'éthanol pouvant être identifiables dans différentes matrices biologiques comme le sang, l'urine ou les cheveux, ce qui représente un intérêt majeur à leur utilisation. De plus, leur détection peut se faire plusieurs heures voire même plusieurs jours, ce qui permet de mettre en évidence une consommation d'éthanol après que celui-ci ait disparu de l'organisme. Cet article

présente de manière synthétique les voies de production de l'EtG et l'EtS lors du métabolisme de l'éthanol, les méthodes actuellement employées pour leur mise en évidence, ainsi que les précautions d'interprétation des résultats et les applications du dosage de ces marqueurs dans différents contextes.

Mots-clés : toxicologie, alcool, éthanol, éthylglucuronide, éthylsulfate

## **SUMMARY**

Ethanol is the most frequently psychoactive substance used in France, leading to major public health problems. Alcohol intake detection might be important in a variety of clinical and forensic settings. Interestingly, ethylglucuronide (EtG) and ethylsulfate (EtS) have potential as direct markers of alcohol consumption and as being detected in various biological samples such as blood, urine or hair. Moreover, since their detection timeframe corresponds to few hours until several days, these two biomarkers can prove ethanol intake even after the complete elimination of alcohol from the body. We describe herein the metabolic pathway of ethanol leading to EtG and EtS production, the currently used methods for their determination, the precautions in data interpretation and clinical applications of the measurement of these two biomarkers of alcohol misuse.

Key words : toxicology, alcohol, ethanol, ethylglucuronide, ethylsulfate

## INTRODUCTION

Bien que la consommation « festive » d'alcool fasse partie intégrante de la culture française, celle-ci pose un problème majeur de santé publique, notamment lors d'une consommation chronique d'éthanol (l'éthylisme) qui entraîne des risques importants pour la santé. En effet, l'éthylisme chronique peut conduire au développement d'une fibrose et cirrhose du foie, à des cancers digestifs et des troubles neuropsychiatriques souvent irréversibles, induisant une mortalité prématurée. Malgré une consommation en baisse depuis plusieurs décennies, l'éthanol reste la substance psychoactive la plus consommée en France. Dans le monde, 2,25 million de décès (45 000 décès en France) sont attribuables à l'alcool chaque année [1], ce qui en fait la deuxième cause de mortalité de notre pays, après le tabac [2]. Il est reconnu que plus de 70 million d'individus dans le monde présentent un mésusage de l'alcool [1].

Les quantités d'alcool ingérées et les modes de consommation permettent de distinguer plusieurs populations d'individus. Ainsi, le test AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test) développé par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), qui tient compte à la fois de la fréquence de consommation au cours des douze derniers mois, du volume absorbé pendant une journée type de consommation et de la fréquence des épisodes d'alcoolisation ponctuelle importante, permet de définir quatre types de buveurs : 1) les abstinents et buveurs occasionnels sans risque, 2) les buveurs réguliers sans risque, 3) les buveurs festifs, à risque ponctuel et 4) les buveurs nocifs, à risque chronique. Les buveurs « à risque ponctuel » boivent habituellement moins que les recommandations maximales courantes (moins de 30 g ou de 3 doses d'éthanol / jour) mais peuvent parfois boire au cours d'une soirée six verres ou plus (> 60 g d'éthanol), il s'agit de « binge drinking » courant chez les jeunes où une grande quantité d'alcool est prise au cours d'une fenêtre de temps très courte. Les buveurs « à risque chronique », quant à eux, boivent régulièrement plus que les recommandations

courantes (> 30g d'éthanol / jour) ou au moins une fois par semaine, six verres ou plus sur l'ensemble de la journée [3].

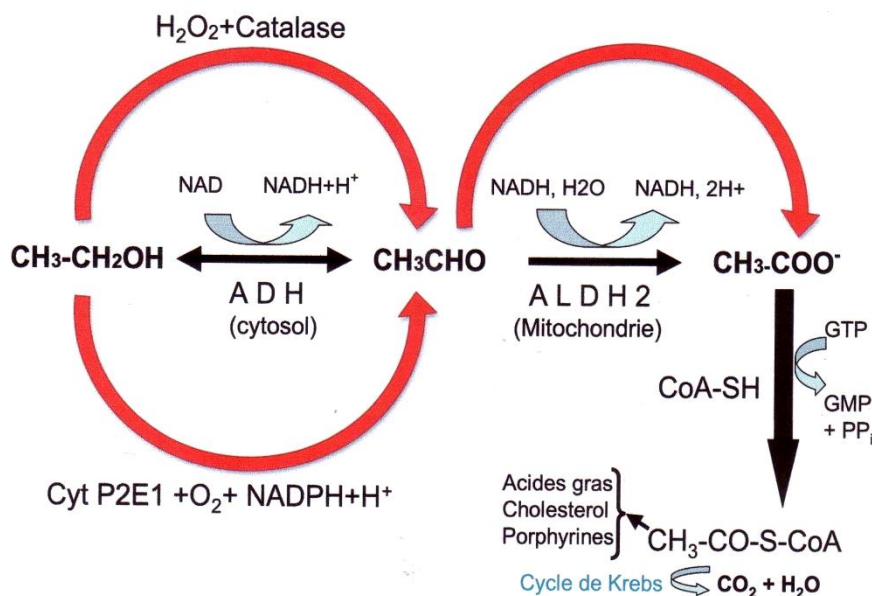
Sachant qu'un tiers des décès liés à la prise d'alcool correspond à des accidents, l'aspect médico-légal de la consommation d'éthanol est très important, notamment du point de vue de la conduite automobile. Les délits routiers sous l'influence de l'alcool sont une préoccupation majeure des forces de l'ordre et la récente modification de la réglementation avec la baisse la limite légale de l'alcoolémie chez les jeunes conducteurs à 0,20 g/L en est l'illustration. Bien que la mesure de la concentration sanguine d'alcool et celle dans l'air expiré soient les méthodes les plus couramment employées pour déterminer l'imprégnation alcoolique d'un individu, il n'en reste pas moins que l'utilisation d'autres marqueurs de la consommation d'alcool s'avère nécessaire dans d'autres situations, notamment lors du suivi de l'abstinence chez l'alcoolique chronique, comme nous le décrivons ultérieurement dans cet article.

Parmi ces marqueurs d'exposition à l'alcool, ceux issus directement du métabolisme de l'éthanol, l'éthylsulfate (EtS) et de l'éthylglucuronide (EtG), présentent des intérêts majeurs que nous allons présenter, en développant leurs avantages et applications ainsi que les limites d'utilisation et les précautions d'interprétation des résultats de leur dosage.

### **Production de l'éthylglucuronide et de l'éthylsulfate lors du métabolisme de l'éthanol**

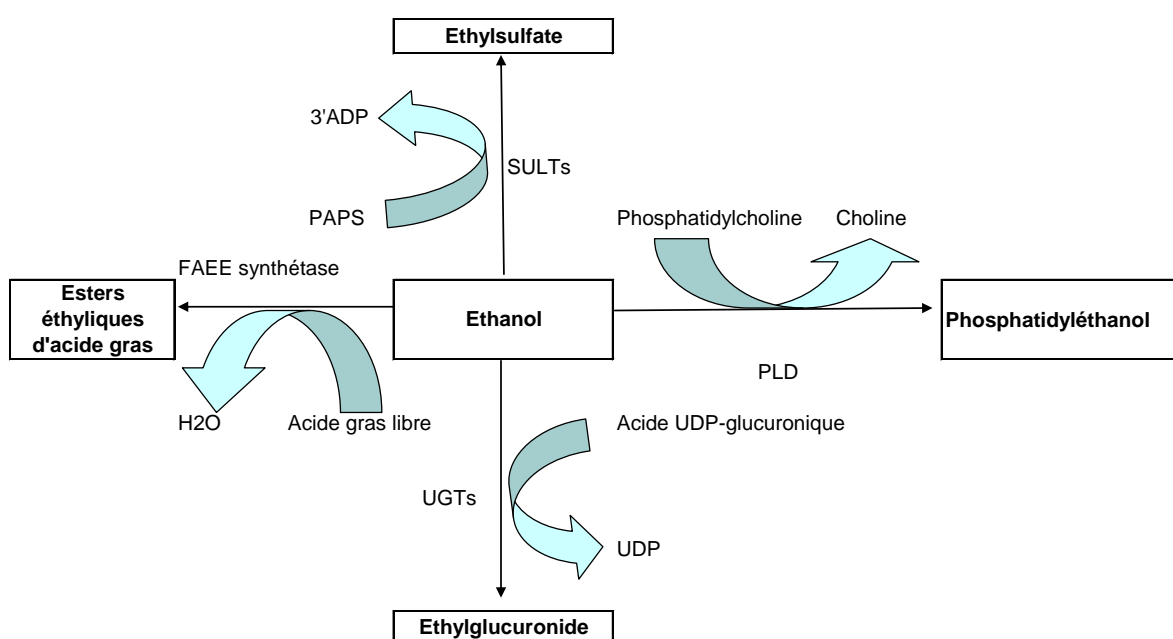
Après ingestion, l'éthanol est absorbé au niveau de l'estomac (environ 10%) et surtout au niveau du duodénum et du jéjunum proximal (70 à 80%), c'est-à-dire le début de l'intestin grêle. L'éthanol atteint ensuite le foie par la veine porte puis la circulation générale. Après la prise d'alcool, le pic de concentration sanguine est atteint en moyenne entre 45 à 60 minutes. L'éthanol se distribue rapidement dans tout l'organisme notamment dans les différents compartiments très vascularisés de

l'organisme comme le cerveau, les poumons et le foie, où il pénètre par simple diffusion du fait de sa forte liposolubilité au travers des membranes. Le volume de distribution est en moyenne de 0,5 L/kg chez la femme et de 0,6 L/kg chez l'homme. Une faible proportion d'éthanol est éliminée sous forme inchangée par la sueur, la respiration ou l'urine, mais la majorité de l'éthanol est métabolisée, principalement par oxydation au niveau du foie. Le métabolisme hépatique élimine plus de 80% de l'alcool ingéré grâce à trois grandes étapes. Dans un premier temps, l'éthanol est oxydé par l'alcool deshydrogénase (ADH) en acétaldéhyde ( $\text{CH}_3\text{CHO}$ ), qui est un métabolite hautement toxique dans le cytoplasme de l'hépatocyte. Dans un deuxième temps, l'acétaldéhyde est transformé en acétate ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) par l'aldéhyde deshydrogénase (ALDH2), essentiellement dans la mitochondrie, puis dans un troisième temps, l'acétate produit dans le foie, est libéré dans la circulation sanguine et enfin lui-même oxydé par les tissus périphériques en dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et en eau au cours du cycle Krebs (Figure 1).



**Figure 1** : Métabolisme oxydatif de l'éthanol (d'après [2])

Parallèlement, il existe une autre voie métabolique dite métabolisme non oxydatif de l'éthanol, voie minoritaire aboutissant à la formation d'esters éthyliques d'acides gras (FAEE), de phosphatidyléthanol (PHEt), de l'éthylsulfate (EtS) et de l'éthylglucuronide (EtG). Ces composés correspondent aux marqueurs dits « directs » de l'imprégnation éthylique. L'EtG (éthyl  $\beta$ -D-6-glucuronide) est un métabolite de phase II, qui est issu de la conjugaison de l'éthanol avec un acide glucuronique via les UDP-glucuronyl transférases (UGT) du réticulum endoplasmique de l'hépatocyte (Figure 2). Bien qu'elle soit souvent plus faible que la glucuroconjugaison, la sulfoconjugaison est une voie primordiale de détoxification des xénobiotiques par métabolisme de phase II. Ainsi, l'éthanol va être biotransformé par les sulfotransférases (SULTs) cytosoliques en un métabolite sulfoconjugué, l'éthylsulfate (EtS) [4] (Figure 2).



**Figure 2 :** Métabolisme non oxydatif de l'éthanol et marqueurs directs de l'éthanol (PAPS : 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate ; PLD : phospholipase D ; UGTs : UDP-glucuronosyl transférases ; SULTs : sulfotransférases ; ADP : adénosine 5'-diphosphate ; UDP : uridine 5'-diphosphate) (d'après [2])

Les autres marqueurs dit « indirects » dont les variations biologiques peuvent résulter d'une consommation d'alcool sont plus couramment utilisés et correspondent aux enzymes hépatiques ( $\gamma$ -GT et transaminases), à la transferrine désialylée ou transferrine déficiente en carbohydrates (CDT) et au volume globulaire moyen (VGM). Ceux-ci sont déterminés et exploités dans des conditions de recueil et de stockage d'échantillons standardisées au laboratoire. Ces derniers présentent cependant l'inconvénient de ne pas être exploitables et interprétables dans certaines situations. En effet, ces marqueurs indirects ne sont utilisables que dans le sang de l'individu vivant, ceux-ci n'étant pas interprétables en *post-mortem* [2].

### **Variabilité inter-individuelle de production de l'EtG et l'EtS**

L'UDP-glucuronosyl transférase (UGT) et la sulfotransférase (SULTs) sont sujettes à un polymorphisme génétique pouvant influencer le profil de production de l'EtG et de l'EtS selon les individus [4]. De plus, une étude récente a montré que la biotransformation de l'éthanol en EtG par les UGT était sous l'influence des composants nutritionnels [5]. Les différences ethniques, en particulier le déficit enzymatique bien connu chez les Asiatiques, et les différences Hommes/Femmes sont aussi des facteurs de variabilité du métabolisme de l'éthanol et par conséquent de la production des marqueurs en question. Malgré ces variations, il a été montré que la quantité d'EtS éliminée dans les urines était bien corrélée à celle d'EtG [4], même si le rapport EtG /EtS peut varier d'un individu à l'autre de 0,3 à 6,1 ce qui représente un intervalle de valeurs assez large. Ainsi, les résultats du dosage de ces marqueurs doivent être interprétés avec précaution.

### **Les marqueurs directs de la consommation d'alcool : EtG et EtS**

L'EtG et l'EtS représentent moins de 0,5% de l'alcool éliminé. Ces deux métabolites de phase II sont produits chaque fois qu'un individu ingère, absorbe ou inhale de l'éthanol.

Sachant que l'EtG et l'EtS s'accumulent à la suite d'une consommation chronique d'alcool, en cas de consommation importante ou répétée, leur délai de détection est plus long que celui de l'alcool, ce qui représente un intérêt à leur utilisation. En effet, en raison d'une élimination plus lente de ces métabolites que celle de l'éthanol, l'EtG et l'EtS sont retrouvés dans les fluides biologiques alors que l'alcool a lui-même disparu de l'organisme, ce qui en fait de bons marqueurs d'une consommation ancienne d'alcool.

Les fenêtres de temps permettant de mettre en évidence une consommation d'alcool sont relativement faibles lorsque l'analyse correspond au dosage de l'éthanol. Ainsi, l'alcool peut être détecté jusqu'à 4-6 h dans l'air expiré, 10-12h dans le sang et 18 à 24 h dans les urines. Ces faibles délais peuvent poser problème dans certaines situations, notamment dans un cadre médico-légal. L'orientation vers d'autres marqueurs d'exposition à l'alcool prend alors tout son intérêt. L'EtG et l'EtS peuvent être détectés dans les fluides biologiques quelques heures après consommation d'alcool et sont encore détectables jusqu'à 80 h après élimination complète de l'éthanol [6-8]. D'autres études ont montré que la fenêtre de détection de l'EtG dans le sang pouvait aller jusqu'à 36 h après l'élimination complète de l'alcool et jusqu'à 5 jours dans les urines [9-10] et cela de manière dose-dépendante [11]. Ainsi, l'identification simultanée d'EtG et d'EtS dans les urines indique que la personne a récemment consommé de l'alcool [12].

Bien que dépendants de la technique analytique employée, les seuils de positivité couramment retenus dans les urines sont de 0,1 mg/L pour l'EtG et de 0,05 mg/L pour l'EtS. Ceux-ci permettent de détecter la consommation d'un à deux verres (ou unités d'alcool) durant les 24 dernières heures [13]. Pour une application clinique, des cut-offs plus élevés de l'ordre de 0,5 mg/L peuvent être fixés afin de diminuer le risque de résultats faussement positifs [14].



### **Précautions de l'interprétation des résultats : Stabilité, production *in vitro*, faux positifs et faux négatifs**

L'EtG et l'EtS sont relativement stables *in vitro* lorsque les échantillons sont stockés réfrigérés [15]. Une fois glucuronoconjugués ou sulfoconjugués, ces composés ne sont plus volatils, contrairement à l'éthanol, ainsi il n'existe plus de risque d'évaporation. Cependant, il peut y avoir production d'EtG au cours de la conservation de l'échantillon ou en *post-mortem*, notamment par fermentation. Ainsi chez les diabétiques présentant une glucosurie, la fermentation du sucre du tractus urinaire en présence de *Candida albicans* produit de l'éthanol, conduisant à la possibilité de détecter ses marqueurs dans les urines [16]. Dans d'autres situations, à l'inverse, l'EtG et l'EtS sont sujets à l'hydrolyse bactérienne notamment dans les urines contaminées par *E. coli* ou *Clostridium sordellii* lors d'infections urinaires, ce qui conduit à une diminution de concentration [17-18].

D'une manière générale, la stabilité de l'EtG dépend de la matrice, de la température de conservation (transport et stockage des prélèvements) et de la présence de conservateurs (fluorures). Ainsi, il est recommandé un stockage des échantillons à +4°C dans des conditions évitant la prolifération bactérienne en présence de conservateurs tels que les fluorures [15], l'acide borique ou la chlorhexidine [19]. Il convient donc d'interpréter les résultats d'EtG et EtS en connaissant le risque de faux positifs ou faux négatifs dus à une contamination par des microorganismes, à la putréfaction ou à la mauvaise conservation de l'échantillon. Sachant au contraire que l'EtS n'est pas sujet aux variations de concentration liées à une production lors de mauvaises conditions de conservation, il convient d'effectuer sa mesure avec celle de l'EtG [17]. En effet, la mesure simultanée de ces 2 paramètres est donc

particulièrement importante pour pallier au risque de résultats faussement négatifs ou faussement positifs, issus de la conservation du prélèvement biologique.

Un autre facteur à prendre en considération lors de l'interprétation des résultats concerne les cas d'insuffisance rénale qui mènent à un défaut d'élimination urinaire de ces métabolites hydrophiles EtG et EtS et par conséquent qui conduisent à des concentrations élevées laissant suspecter une consommation récente d'alcool ou plus importante que la réalité [20].

Par ailleurs, il existe un risque de voir apparaître des échantillons positifs ne relevant pas d'une consommation d'alcool, notamment lors de l'utilisation de bain de bouche, de médicaments contenant de l'éthanol ou de solution hydro-alcoolique pour la désinfection des mains. Ceci peut conduire à la production d'une faible teneur d'EtG susceptible d'être retrouvée dans les urines.

### **Les autres matrices biologiques**

L'EtG et l'EtS sont principalement dosés dans les urines, le sang total ou le plasma. Certaines études présentent aussi des résultats de dosage dans les « spots » de sang séchés [21]. Le dosage de ces marqueurs directs de consommation d'alcool peut aussi s'effectuer dans d'autres matrices biologiques. En effet, après leur production, ces biomarqueurs peuvent atteindre et s'accumuler dans les phanères comme les cheveux, les poils et les ongles [22 – 23] et permettre ainsi la mise en évidence d'une consommation chronique d'éthanol. Cependant, l'interprétation des résultats s'avère très délicate [24]. Chez le nouveau-né, la détection d'EtG et d'EtS dans le méconium ou les cheveux permet de mettre en évidence une consommation d'éthanol de la mère pendant sa grossesse [25] et l'exposition du fœtus au cours des derniers mois de la grossesse.

Une autre matrice, la salive, peut, elle aussi, être exploitée, sachant qu'une étude a montré que le pic de concentration de l'EtG, dans les conditions expérimentales décrites dans l'article, se situait environ 3,5 h après consommation [26].

Dans un cadre médico-légal, en toxicologie *post-mortem*, d'autres matrices permettent également de mettre en évidence la présence d'EtG, comme par exemple l'humeur vitrée, le liquide céphalorachidien (LCR), la bile, le liquide synovial et les organes tels que le foie, le cœur et le muscle strié squelettique [27]. Le dosage de l'EtG et l'EtS dans la moelle osseuse en complément du dosage de l'éthanol semble prometteur dans le domaine médico-légal [28]. Il a même été reporté un dosage de l'EtG dans une dent afin de démontrer une consommation d'éthanol *anté-mortem* [29]. Bien que l'EtG et l'EtS soient retrouvés dans de nombreuses matrices, la quantification de ces marqueurs d'alcoolisation présente surtout un intérêt dans les urines (rapporté à la créatinine), dans le sang et dans les cheveux, où les concentrations peuvent être plus aisément interprétables sur la base des données de la littérature. Les méthodes de dosage de ces biomarqueurs doivent toutefois être validées dans chacune des matrices utilisées.

### **Méthodes de dosage dans les matrices biologiques**

L'EtG et l'EtS peuvent être dosés simultanément dans la plupart des matrices biologiques au moyen de techniques séparatives couplées à une détection par spectrométrie de masse. De nombreuses méthodes de dosages ont été développées au moyen de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) ou par mesure de la masse exacte (technologie Orbitrap ou Temps de vol/Tof) ou bien encore par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) après dérivation des molécules. Cependant,

l'hydrophilie importante de ces composés rend leur extraction complexe et conduit à des rendements d'extraction relativement faibles.

Parallèlement, des méthodes immunoenzymatiques (Thermofisher) sont commercialisées pour détecter et effectuer le dosage semi-quantitatif de l'EtG dans les urines [11]. Les concentrations en EtG estimées par immunoessais sont généralement plus faibles que celles obtenues par technique séparative, il existe cependant une très bonne corrélation entre ces deux méthodes [30 - 31]. Ces techniques immunoenzymatiques présentent l'avantage d'être automatisables, rapides et d'avoir une sensibilité suffisante pour réaliser les dosages en routine avec un seuil de positivité de 0,5 mg/L. Elles ne sont toutefois pas applicables au dosage de l'EtG dans les cheveux ou lorsque la sensibilité doit atteindre un faible seuil de 0,1 mg/L. De plus, cette méthodologie ne réalise pas le dosage simultané de l'EtS ce qui ne permet pas de faire la distinction entre une production réelle d'EtG par métabolisme de l'éthanol présent dans l'organisme, et une génération post-mortem ou *in vitro* d'EtG.

### **Les applications de la recherche et du dosage des marqueurs EtG et EtS**

La mise en évidence et quelquefois le dosage de l'EtG et l'EtS peuvent avoir de nombreuses applications aussi bien dans les domaines cliniques que médico-légaux.

Ainsi, grâce au dosage de l'EtG et de l'EtS, le suivi de l'abstinence des patients alcoolique peut être réalisé lors de programme de sevrage. Une absence d'EtG dans les urines permet d'exclure une consommation récente d'alcool [32]. Le dosage d'EtG dans la salive a également déjà été utilisé lors d'entretien d'embauche [33]. Avant transplantation hépatique, les receveurs doivent prouver leur abstinence. Cependant, chez ces patients, souvent insuffisants hépatiques, les résultats du dosage des paramètres indirects tels que les transaminases, les  $\gamma$ -GT ou la CDT sont parfois

inexploitables. Ainsi, le dosage des marqueurs directs comme l'EtG ou l'EtS peut présenter une grande utilité [12,34].

De même, la consommation d'alcool lors de la grossesse est contre-indiquée car elle peut entraîner des syndromes d'alcoolisation fœtale. Ainsi la mesure d'EtS et d'EtG dans le méconium [35], dans les urines ou les cheveux de la mère pendant la grossesse ou dans ceux du ou du nouveau-né permet de mettre en évidence une consommation d'alcool [36].

Ces dosages peuvent aussi trouver leurs intérêts lors de soumission chimique. Les victimes d'agression sexuelle mettent parfois un certain temps avant de porter plainte, l'éthanol n'est donc plus détectable dans les matrices biologiques. La mise en évidence d'EtG ou d'EtS dans les urines ou le sang permet de prouver une consommation d'éthanol malgré une alcoolémie négative [37], et ainsi d'orienter vers la possibilité d'une soumission chimique de la victime sous l'effet l'alcool.

Enfin dans certains pays, les conducteurs dont le permis a été retiré pour conduite en état d'ivresse doivent prouver une période d'abstinence afin que leur permis de conduire leur soit restitué. Le dosage de l'EtG et l'EtS dans l'urine et les cheveux trouve ici tout son intérêt [38-39].

Dans le domaine médico-légal, le dosage de ces marqueurs est de plus en plus préconisé. L'EtG est le plus souvent recherché dans l'urine et le sang mais il peut également être mis en évidence en *post-mortem* dans d'autres matrices biologiques que nous avons précédemment décrites.

## **Conclusion**

La recherche et le dosage de l'EtG et l'EtS dans les différentes matrices biologiques présentent des intérêts et des applications considérables dans la mesure où ces biomarqueurs permettent de mettre en évidence une consommation d'éthanol,

plusieurs heures voire même plusieurs jours après que celui-ci ait disparu de l'organisme, ceci avec une fenêtre de détection quelquefois très longue lorsque le dosage est réalisé dans les cheveux.

L'évolution des technologies analytiques vers la détection par spectrométrie de masse permet de nos jours la mise en évidence et la quantification de très faibles concentrations en EtG et en EtS, permettant encore d'élargir la fenêtre de détection de ces marqueurs. Toutefois des précautions quant à l'interprétation des résultats doivent être prises et des seuils de positivité dans les différentes matrices doivent pouvoir être déterminés afin de pouvoir discriminer les différents types de consommateurs d'alcool. Dans ce sens, un consensus de la Society of Hair Testing (SoHT) a établi que le seuil de positivité d'une exposition à l'alcool chez les consommateurs à risque se situait à partir de 30 pg d'EtG/mg de cheveux [40].

La commercialisation de kits de dosage de l'EtG dans les urines en fait un marqueur intéressant en routine au laboratoire. Toutefois, des résultats faussement positifs ou négatifs soulignent la difficulté d'interprétation des résultats et il est préférable de doser plusieurs marqueurs simultanément, comme l'EtG et l'EtS, ce qui n'est réalisé qu'au moyen des méthodes utilisant la spectrométrie de masse.

Ainsi, bien que des études récentes aient permis de faire évoluer les connaissances dans ce domaine, des travaux complémentaires devraient être menées afin de préciser l'influence sur les concentrations de ces marqueurs de facteurs biologiques comme le genre, l'âge et les anomalies du métabolisme. Il serait aussi intéressant de pouvoir étudier les possibilités de corréler les concentrations en EtG et EtS dans les différentes matrices biologiques avec l'importance et la durée d'exposition à l'alcool. D'une manière générale, ces travaux complémentaires pourraient permettre d'affiner les connaissances et d'apporter des éléments d'interprétation des résultats relatifs au dosage de ces biomarqueurs de l'alcool.

## REFERENCES

1. Walsham NE, Sherwood RA. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate. *Adv Clin Chem* 2014;67:47-7.
2. Morel I, Anger JP. L'alcool éthylique et éthylysme. Dans : Kintz P, *Toxicologie médico-légale*, Edition Elsevier, 2012 ; pp. 279-298.
3. Babor TF, Higgins-Biddle JC, Saunders JB, Monteiro MG. *AUDIT: The Alcohol Use Disorders Identification Test, Guidelines for Use in Primary Care*, 2nd ed. World Health Organization, Geneva, 2001.
4. Helander A, Beck O. Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake. *J Anal Toxicol* 2005;29:270-4.
5. Schwab N, Skopp G. Identification and preliminary characterization of UDP-glucuronosyltransferases catalyzing formation of ethyl glucuronide. *Anal Bioanal Chem* 2014;406:2325–2332.
6. 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;26:11–16.
7. 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.
8. Allen JP, Wurst FM, Thon N et al. Assessing the drinking status of liver transplant patients with alcoholic liver disease. *Liver Transpl* 2013;19:369–376.
9. Peterson K. Biomarkers for alcohol use and abuse - A summary. *Alcohol Res Health* 2004;28:30–37.
10. Maenhout TM, de Buyzere ML, Delanghe JR. Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. *Clin Chim Acta* 2013;415:322–329.
11. Böttcher M, Beck O, Helander A. Evaluation of a new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing. *Alcohol Alcohol* 2008;43:46-8.
12. Erim Y, Böttcher M, Dahmen U, et al. Urinary ethyl glucuronide testing detects alcohol consumption in alcoholic liver disease patients awaiting liver transplantation. *Liver Transpl* 2007;5:757-61.
13. Albermann ME, Musshoff F, Doberentz E, et al. Preliminary investigations on ethyl glucuronide and ethyl sulfate cutoffs for detecting alcohol consumption on the basis of an ingestion experiment and on data from withdrawal treatment. *Int J Legal Med* 2012;126:757–764.
14. Helander A, Böttcher M, Fehr C, et al. Detection times for urinary ethyl glucuronide and ethyl sulphate in heavy drinkers during alcohol detoxification, *Alcohol Alcohol* 2009;44:55–61.

15. Schoegl H, Dresen S, Spaczynski K, et al. Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples. *Int J Legal Med* 2006;120:83-8.
16. Helander A, Olsson I, Dahl H. Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. *Clin Chem* 2007;53:1855-7.
17. Helander A, Dahl H. Urinary tract infection; a risk for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in the detection of recent alcohol consumption. *Clin Chem* 2005;51:1728-30.
18. Baranowski A, Serr A, Thierauf W, et al. In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulfate. *Int J Leg Med* 2008;122:389–93.
19. Thierauf, A., Serr A, Halter CC, Al-Ahmad A, Rana S, Weinmann W. Influence of preservatives on the stability of ethyl glucuronide an ethyl sulphate in urine. *Forensic Sci Int* 2008;182:41-5.
20. Høiseth G, Nordal K, Pettersen E, et al. Prolonged urinary detection times of EtG and EtS in patients with decreased renal function. *Alcohol Clin Exp Res* 2012;36: 1148–51.
21. Redondo HA, Schroeck A, Kneubuehl B, et al. Determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate from dried blood spots. *Int J Leg Med* 2013;127:769–75.
22. Morini L, Colucci M, Ruberto MG, et al. Determination of ethyl glucuronide in nails by liquid chromatography tandem mass spectrometry as a potential new biomarker for chronic alcohol abuse and binge drinking behavior. *Anal Bioanal Chem* 2012; 402:1865–70.
23. Berger L, Fendrich M, Jones J, et al. Ethyl glucuronide in hair and fingernails as a long-term alcohol biomarker. *Addiction* 2014;109:425–431.
24. Kintz P, Villain M, Mandel A, et al. Les marqueurs de l'éthylisme chronique. Focus sur les approches immuno-chimiques. *Ann Toxicol Anal* 2009;21:21-5.
25. Cabarcos P, Álvarez I, Tabernero MJ, et al. Determination of direct alcohol markers: a review. *Anal Bioanal Chem* 2015;407:4907-25.
26. Høiseth G, Yttredal B, Karinen R, et al. Ethyl glucuronide concentrations in oral fluid, blood, and urine after volunteers drank 0.5 and 1.0 g/kg doses of ethanol. *J Anal Toxicol* 2010;34:319–24.
27. Kugelberg FC, Jones AW. Interpreting results of ethanol analysis in post-mortem specimens : a review of the literature. *Forensic Sci Int* 2007;165:10-29.
28. Cartiser N, Bévalot F, Fanton L, et al. State of the art of bone marrow analysis in forensic toxicology : a review. *Int J Legal Med* 2011;125:181-98.
29. Zeren C, Keten A, Çelik S, et al. Demonstration of ethyl glucuronide in dental tissue samples by liquid chromatography / electro-spray tandem mass spectrometry. *J Forensic Leg Med* 2013;20:706–10.



30. Turfus SC, Vo T, Niehaus N, et al. An evaluation of the DRI-ETG EIA method for the determination of ethyl glucuronide concentrations in clinical and post-mortem urine. *Drug Test Anal* 2013;5:439–45.
31. Leickly E, McDonnell MG, Vilardag R, et al. High levels of agreement between clinic-based ethyl glucuronide (EtG) immunoassays and laboratory-based mass spectrometry. *Am J Drug Alcohol Abuse* 2015;41:246-50.
32. Junghanns K, Graf I, Pflüger J, et al. 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.
33. Gjerde H, Christopherson AS, Moan IS, et al. Use of alcohol and drugs by Norwegian employees: a pilot study using questionnaires and analysis of oral fluid. *J Occup Med Toxicol* 2010;5:13–21.
34. Stauffer K, Andresen H, Vettorazzi E, et al. Urinary ethyl glucuronide as a novel screening tool in patients pre-liver and post-liver transplantation improves detection of alcohol consumption. *Hepatology* 2011;54:1640–9.
35. Pichini S, Morini L, Marchei E, et al. Ethylglucuronide and ethylsulfate in meconium to assess gestational ethanol exposure : preliminary results in two Mediterranean cohorts. *Can J Clin Pharmacol*. 2009;16:370–5.
36. Morini L, Marchei E, Vagnarelli F, O et al. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair - potential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol. *Forensic Sci Int* 2010;196:74–7.
37. Hegstadt S, Helland A, Hagelmann C, et al. EtG/EtS in urine from sexual assault victims determined by UPLC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 2013;37:227–32.
38. Liniger B, Nguyen A, Friedrich-Koch A, et al. Abstinence monitoring of suspected drinking drivers: ethylglucuronide in hair versus CDT. *Traffic Inj Prev* 2010;11:123–6.
39. Aguis R, Nadulski T, Kahl HG, et al. Ethyl glucuronide in hair - a highly effective test for the monitoring of alcohol consumption. *Forensic Sci Int* 2012;218:10–4.
40. 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.