

Giornate Frentane sulle Dipendenze
SITD
(Società Italiana Tossico Dipendenze d'Abruzzo e Molise)

“Alcool, Stupefacenti e Lavoro”

ESAMI DI LABORATORIO

Dott. Franco De Risio
Dott. Tommaso Pagliani

24 Giugno 2011

Laboratorio di base nell'ambito della biochimica tossicologica laboratorio di 1 livello che esegue solo test iniziali

Matrice Biologica	Urina
Metodiche	Immunochimiche
Tipo Di Analisi	Qualitativa/ Quantitativa
Cut - off	Quello Stabilito In Ambito Regionale
Strumentazioni	Analizzatori Automatici Di Chimica Clinica
Procedure	Quelle Stabilite Dai Manuali Della Qualità e Nelle Linee Guida
Controllo Qualità	Partecipazione A Ring Test
Catena Di Custodia	Si

Laboratorio specializzato nell'ambito della biochimica tossicologica laboratorio di 2 livello che esegue sia le analisi iniziali che di conferma

Matrice Biologica	Tutte
Metodiche	Immunochimiche E Cromatografiche
Tipo Di Analisi	Qualitativa/Quantitativa
Cut - Off	Quelli Stabiliti In Ambito Regionale
Strumentazioni	Gas Cromatografia Accoppiata Alla Spettrometria Di Massa
Procedure	Quelle Stabilite Nei Manuali Della Qualità e Nelle Linee Guida
Controllo Di Qualità	Partecipazione A Ring Test
Catena Di Custodia	Si

SANGUE

URINA

SALIVA

CAPELLI

PELI PUBICI

PELI ASCELLARI

UNGHIE

Matrici biologiche ad esclusione del sangue

Caratteristiche	Urine	Saliva	Sudore	Capelli
Tempo emivita	2-3 giorni	poche ore	1 settimana	mesi/anni
Tecniche analitiche	Imm. - GC/MS	Imm. - GC/MS	GC/MS	GC/MS
Durata analisi	++++	+++	+++	++++
Costo	++++	+++	+++	++++
Adulterazione	possibile	difficile	difficile	difficile
Conservazione	-20°C	-20°C	-20°C	T. Ambiente
Prelievo	invasivo	non/invasivo	non/invasivo	non/invasivo
Analisi principali	metaboliti	sostanza madre	sostanza madre	sostanza madre
Conc. nella matrice	Elevata	Bassa	Bassa	Bassa

Dopo somministrazione ed in funzione delle caratteristiche farmacocinetiche una droga e/o i suoi metaboliti possono essere rilevati:

Sangue

Ore

Saliva

Ore

Urina

Giorni

Capelli

Mesi

Quantità di campioni da prelevare

<i>Matrice Biologica</i>	<i>Campione</i>	<i>Controcampione</i>	<i>Quantità finale</i>
Urina	15 ml	15 ml	30 ml
Sangue per alcolemia	5 ml	5 ml	10 ml
Sangue per altre sostanze d'abuso	10 ml	10 ml	20 ml
Matrice pilifera	50 mg	50 mg	100 mg
Saliva	1 ml	1 ml	2 ml

Matrice: Sangue

Il sangue costituisce la matrice biologica di elezione per le indagini cliniche e forensi. La concentrazione ematica e/o plasmatica della sostanza ricercata, infatti, consente di stabilire o di escludere la recente assunzione ed è direttamente correlabile allo *status* psicofisico del soggetto al momento del prelievo.

Vantaggi:

Campione non adulterabile matrice biologica di prima scelta per la determinazione dell'alcolemia. Matrice biologica di prima scelta nelle indagini forensi.

Svantaggi:

Consente solo la dimostrazione di esposizione relativamente recenti prelievo invasivo con connesse problematiche sul consenso.

Prelievo:

Il prelievo di un campione di sangue per la determinazione delle sostanze d'abuso e/o dell'alcol è invasivo e deve essere effettuato con il consenso dell'interessato. È consigliabile eseguire tre prelievi in provette senza o con anticoagulante (K3 EDTA, fluoruro di sodio, eparinato di litio o ammonio o sodio). Un campione viene utilizzato per l'analisi di 1 livello, il secondo per l'analisi di 2 livello e il terzo congelato (in caso di positività) per gli eventuali successivi approfondimenti. È possibile utilizzare per le analisi delle sostanze d'abuso sangue intero, siero o plasma.

Matrice:Urina

L'esame delle urine può essere eseguito per motivi di semplicità, rapidità o di non invasività; la positività dell'analisi indica che la sostanza è stata assunta da alcune ore ad alcuni giorni prima del prelievo, ma non può correlare l'eventuale stato di alterazione psico-fisica ad una recente assunzione.

Vantaggi:

possibilità di analizzare sia le sostanze sia i loro metaboliti, di determinare le sostanze d'abuso dopo diversi giorni dall'assunzione, prelievo non invasivo, possibilità di rilevare l'eventuale adulterazione, possibilità di campionare elevati volumi.

Svantaggi:

campione adulterabile, concentrazioni degli analiti variabili con la dose, modalità di somministrazione, tempo dall'assunzione, metabolismo individuale.

Prelievo:

È necessario raccogliere almeno 60 ml di campione urinario. Al fine di favorire la minzione, l'interessato può bere acqua, in ragione di non più di 500 ml. Per motivi amministrativi e/o giudiziari, i campionamenti devono essere effettuati a vista da un operatore sanitario qualificato. I contenitori devono essere dotati di chiusura ermetica antiviolazione oppure chiusi e sigillati con sigillo adesivo a nastro non rinnovabile sul quale l'interessato e l'operatore addetto ai prelievi appongono congiuntamente la propria firma. La raccolta della matrice urinaria deve essere effettuata in locali dove non siano presenti possibili fonti di inquinamento del campione quali acqua, saponi o detersivi di alcun tipo. Il materiale adoperato per effettuare la raccolta deve essere integro e sigillato, fino al momento in cui viene consegnato al soggetto interessato. Successivamente al prelievo, al fine di verificare la non adulterazione del campione, vengono misurati il pH e la temperatura della matrice.

Matrice: Fluido Orale

Il fluido orale o saliva, miscela di secrezioni delle ghiandole parotide, sottomascellare, sublinguale e salivare minore, contiene mucina, batteri, leucociti, cellule epiteliali, liquido dello spazio sottogengivale e trasudato mucoso.

La saliva può essere connotata come un ultra-filtrato plasmatico naturale ed è costituita da acqua per il 99.4% e da proteine (mucina, lisozima, immunoglobuline, albumina) in quantità di 0.15-4.0 g/L.

Il pH varia nell'intervallo 6.2-7.4 (un incremento della velocità di flusso può determinare l'aumento del pH fino ad un valore massimo di 8.0, a causa dell'incremento dei livelli di bicarbonato).

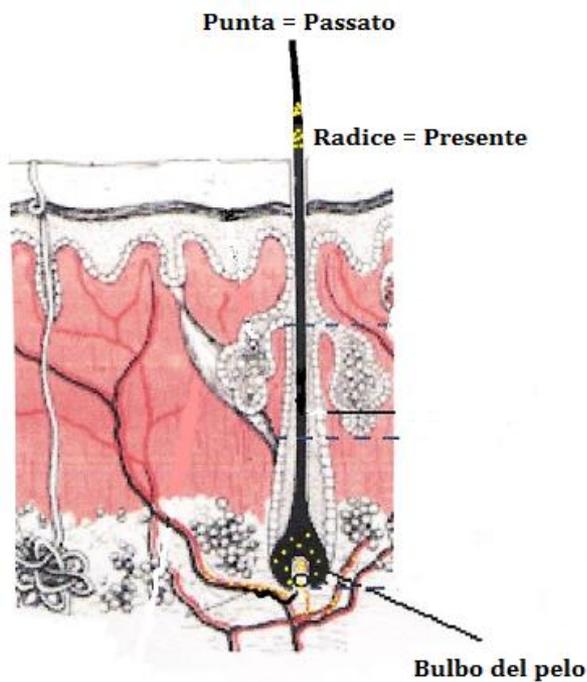
I campioni di fluido orale devono essere trattati come materiale biologico potenzialmente infetto al pari del sangue.

Prelievo:

La saliva può essere raccolta semplicemente, con carattere di non invasività, espellendo almeno 10 mL di fluido orale in un contenitore graduato o provetta, in un periodo di tempo di circa 30 minuti o finché non è stato raggiunto il volume definito. Attendere almeno 10 minuti dall'ingestione di cibo, bevande o farmaci prima della raccolta del campione. Sono attualmente in fase di definizione studi approfonditi sulla stabilità delle sostanze d'abuso nella saliva e sulla modalità di raccolta della saliva utilizzando stimolatori salivari. Per motivi amministrativi e/o giudiziari, i campionamenti devono essere effettuati a vista ed i contenitori devono essere dotati di chiusura ermetica antiviolazione oppure chiusi e sigillati con sigillo adesivo a nastro non rinnovabile sul quale l'interessato e l'operatore addetto ai prelievi appongono congiuntamente la propria firma. È stato osservato che la presenza di conservanti (sodio azide 0.1% e tampone citrato pH 4) previene la degradazione delle droghe per un periodo di 1 settimana se mantenuta a 25 - 37 C e fino a due mesi se mantenuta a 4 - 20 C.

Matrice: Cheratinica

I capelli hanno velocità di crescita variabile tra 0.8 e 1.4 cm/mese e possono essere considerati come “memoria” delle sostanze tossiche presenti nell’organismo al momento della crescita del pelo. I metalli, gli altri xenobiotici ed i loro metaboliti presenti nell’organismo vengono incorporati in misura variabile nella matrice cheratinica durante la crescita del capello e/o pelo e le loro concentrazioni possono essere correlate ai periodi di tempo (mesi, anni) in cui sono state assunte le sostanze tossiche.



Vantaggi:

prelievo non invasivo possibilità di campionare grandi quantità, ampia finestra di rilevazione (settimane - mesi) con ricostruzione della storia, delle assunzioni in funzione della lunghezza dei capelli. Matrice difficilmente adulterabile.

Svantaggi:

procedure poco standardizzate sulle modalità di prelievo, di trattamento dei campioni e di estrazione dei metaboliti dalla matrice cheratinica, valori soglia (cut-off) non ben definiti, contaminazione esogena ambientale, variabilità correlata al colore dei capelli ed all’origine etnica, scarsa correlazione tra dose assunta e concentrazione trovata, possibili interferenze per uso di particolari saponi detergenti o tinture.

È difficile risalire con assoluta precisione al momento esatto di assunzione di una droga d'abuso, tuttavia è possibile che l'analisi segmentale dei capelli nello stesso individuo possa collocare temporalmente la frequenza delle assunzioni, con una certa variabilità legata alla differente velocità di crescita. Le droghe d'abuso si legano alla matrice cheratinica attraverso il flusso ematico, la secrezione delle ghiandole sebacee e sudoripare ed è altresì possibile una contaminazione ambientale dovuta ad esposizione esterna. E' possibile comunque distinguere il contenuto endogeno da quello esogeno ricercando i principali metaboliti derivanti dalla trasformazione metabolica della droga assunta ed analizzando i liquidi di lavaggio dei capelli prima delle procedure di estrazione, per assicurarsi dell'assenza della sostanza ricercata.

Come già detto variabili importanti sono, il colore dei capelli e l'origine etnica: i capelli più scuri fissano più metaboliti rispetto a quelli chiari, i capelli dei Mongoloidi e degli Africoidi ne trattengono quantità superiori rispetto ai Caucasici.

Prelievo:

Si preleva una ciocca di capelli nella zona nucale delle dimensioni di una matita e si arrotola su se stessa prima del taglio in modo da effettuare una recisione uniforme (circa 300 mg di capelli). Si taglia la ciocca ponendo le forbici aderenti al cuoio capelluto. Una volta effettuato il taglio, i capelli possono essere fissati con uno spago annodato il più vicino possibile alla parte dei capelli prossimale al cuoio capelluto (mezzo centimetro circa) in modo da evidenziare il segmento iniziale. Nel caso in cui i capelli fossero più corti di 1 cm si può ricorrere al prelievo dei peli pubici o di quelli ascellari.



A causa della estrema variabilità delle fasi di crescita/quiescenza e sollecitazione ed usura fisica, i risultati ottenuti sui peli pubici non possono essere correlati con certezza al periodo di esposizione, rendendo ardua la datazione analitica. I peli ascellari, inoltre, cedono in parte le sostanze trattenute per adsorbimento sugli indumenti.

Conservazione, manipolazione e movimentazione del campione

All'interno del laboratorio devono essere predisposte procedure e modalità operative mirate alla buona conservazione del campione.

Tali modalità devono assicurare: l'identificazione dei luoghi di conservazione dei campioni idonei al buon mantenimento degli stessi durante tutte le fasi del procedimento analitico.

Per i campioni da conservare a bassa temperatura (sangue, saliva ed urine) devono essere previsti frigoriferi diversi, per lo stoccaggio a breve, a medio e lungo termine.

La quota da analizzare nell'immediato o entro le 48 ore va conservata in frigorifero (+4 C) mentre le aliquote destinate all'analisi di conferma/revisione vanno conservate a -20 C. Inoltre, devono essere previste opportune procedure documentate che permettano l'immediata rintracciabilità del campione in ogni fase di movimentazione dello stesso.

Catena di custodia

La “*Catena di custodia*” deve consentire di:

Identificare chi ha consegnato il campione;

Identificare chi ha accettato il campione;

Identificare l’ubicazione del campione;

Conoscere tutti i nominativi di coloro che lo hanno movimentato, fino alla restituzione od allo smaltimento;

Risalire alla data di ogni movimentazione.

Le registrazioni dell’applicazione di tali procedure devono essere mantenute almeno fino alla restituzione o smaltimento del campione: o per i campioni risultati positivi, sia nei test di screening che nell’analisi di conferma, va prevista la conservazione dell’aliquota destinata all’eventuale analisi di revisione, per almeno un anno, o maggiore se diversamente regolamentato.

Il laboratorio deve adottare opportune procedure per la conservazione del controcampione.

CUT-OFF

Il Cut off è una concentrazione convenzionale (valore soglia) individuata nell'esigenza operativa di:

- Discriminare i campioni positivi dai negativi con i metodi di screening.
- Garantire la confermabilità dei risultati positivi con tecnica alternativa dotata di maggiore sensibilità e specificità.

Il cut off per lo screening immunochimico è solitamente quello consigliato dal produttore del metodo.

Il cut off per l'analisi di conferma deve essere di norma inferiore e dipende dalla sensibilità del metodo impiegato e fa riferimento alle singole sostanze ricercate.

A tal proposito nelle tabelle seguenti sono indicati i cut - off da applicare per screening e conferma nella ricerca di sostanze stupefacenti e psicotrope in urina, capelli e saliva.

Urina

SCREENING	(ng/ml)	CONFERMA	(ng/ml)
Cocaina Metaboliti	300	Benzoilecgonina	150
Cannabinoidi	50	THCCOOH	15
Amfetamine	500	Amfetamina	200
Metamfetamina		Metilamfetamina	
		MDA, MDMA, MDEA	200
Metadone	300	Metadone	100
Eddp	100	EDDP	100
Buprenorfina		5 Buprenorfina totale ^a	5
		Norbuprenorfina	5

Capelli

		ng/mg
oppiacei	morfina	0,2
	6 acetilmorfina	0,2
cocaina	cocaina	0,5
	benzoilecgonina e/o altri metaboliti	0,05
amfetaminici	amfetamina, metamfetamina, MDA, MDMA	0,2
cannabinoidi	THC	0,05
	THCCOOH	0,0002

Saliva

SCREENING	(ng/ml)	CONFERMA	(ng/ml)
Oppiacei	40	Morfina totale	40
		6Acetilmorfina	4
Cocaina Metaboliti	20	Cocaina	8
		Benzoilecgonina	8
Cannabinoidi	4	THC	2
Amfetamina e derivati	50	Amfetamina e derivati	50

Metodiche analitiche

Le metodiche analitiche devono essere sviluppate e validate in modo da assicurare la massima affidabilità del dato, sia in termini di identificazione che di dosaggio degli analiti di interesse.

Il metodo deve avere sensibilità idonea allo scopo e deve utilizzare i giusti indicatori per la finalità a cui è rivolto (si deve ad es. ricercare il maggior numero possibile di metaboliti per stabilire l'assunzione di una sostanza).

➤ Perché metodiche di screening in un laboratorio di 2 livello ?

Le metodiche analitiche di screening devono essere orientate alla determinazione del maggior numero di sostanze/classi di sostanze con una elevata sensibilità garantendo allo stesso tempo la minore incidenza di falsi positivi.

➤ Perché metodiche di conferma ?

Le metodiche di conferma devono mirare alla identificazione diretta del singolo analita con una tecnica che dia informazioni sulla struttura della sostanza.

Le metodiche di conferma debbono inoltre, ove richiesto, garantire la corretta quantificazione della sostanza.



Metodiche di screening

Le metodiche di screening devono dare informazioni circa la possibile presenza di una o più sostanze/classe di sostanze con la massima sensibilità e specificità raggiungibili in questa sede preliminare. E' consigliabile validare internamente al laboratorio il metodo, al fine di escludere l'effetto matrice, e di dare ripetibilità e linearità al dato che deve essere intorno 25% del cut-off stabilito.

Si deve quindi identificare, sulla base dei risultati ottenuti con i test di screening, le molecole da sottoporre ad analisi di conferma, al fine di una corretta diagnosi di tossicodipendenza. Sebbene per la maggior parte dei kit diagnostici comunemente utilizzati nei test di screening venga proposto uno specifico cut-off, sarebbe auspicabile verificarne l'attendibilità e, se necessario, modificarlo per le esigenze specifiche del tipo di determinazione da effettuare.

Nelle metodiche di screening vengono comunemente impiegate tecniche:

Immunochimiche (Enzime linked Immunoassay	(ELISA)
Radioimmunoassay	(RIA)
Fluorimetric Polarization Immunoassay	(FPIA)
Gas Cromatografia	(GC)

I risultati delle analisi di screening, se utilizzati per finalità diagnostiche medico-legali, debbono comunque necessariamente essere confermati mediante analisi di conferma.



Metodiche di conferma

I metodi di conferma debbono garantire l'identificazione e la quantificazione delle sostanze di interesse e dei loro metaboliti con idonea sensibilità e specificità. La metodica di conferma deve fornire indicazioni riguardo la struttura della molecola. A tale scopo devono perciò essere utilizzate tecniche basate sulla spettrometria di massa (MS, MS ad alta risoluzione (HRMS), ecc.) abbinate a tecniche separative cromatografiche (GC, HPLC, elettroforesi capillare (EC)).

L'impiego di tecniche immunochimiche, anche se basate su un principio diverso rispetto alle tecniche impiegate nello screening, non sono accettabili nelle metodiche di conferma; non è parimenti accettabile per le analisi di conferma l'impiego di tecniche cromatografiche che non forniscano informazioni strutturali sulla molecola (GC con un rivelatore a ionizzazione di fiamma o azoto/fosforo, HPLC con rivelatore ultravioletto, ecc).

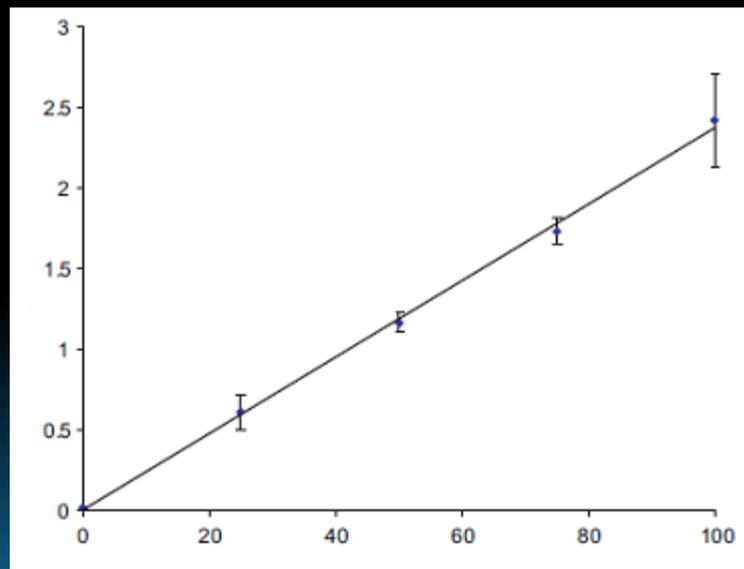
Qualora si debba dare un risultato di positività al di sopra di un cut-off, il metodo di conferma deve inoltre garantire l'attendibilità del dato quantitativo tramite la stima dell'incertezza di misura associata alla determinazione analitica.

L'analisi di conferma, ove possibile, dovrebbe essere effettuata su una aliquota di campione diversa rispetto a quella utilizzata per lo screening. Nel caso di conferme quantitative sarebbe auspicabile utilizzare almeno due aliquote di campione ed esprimere il risultato come media dei valori, specialmente nel caso in cui il valore stimato in sede di screening sia prossimo al cut-off della sostanza.

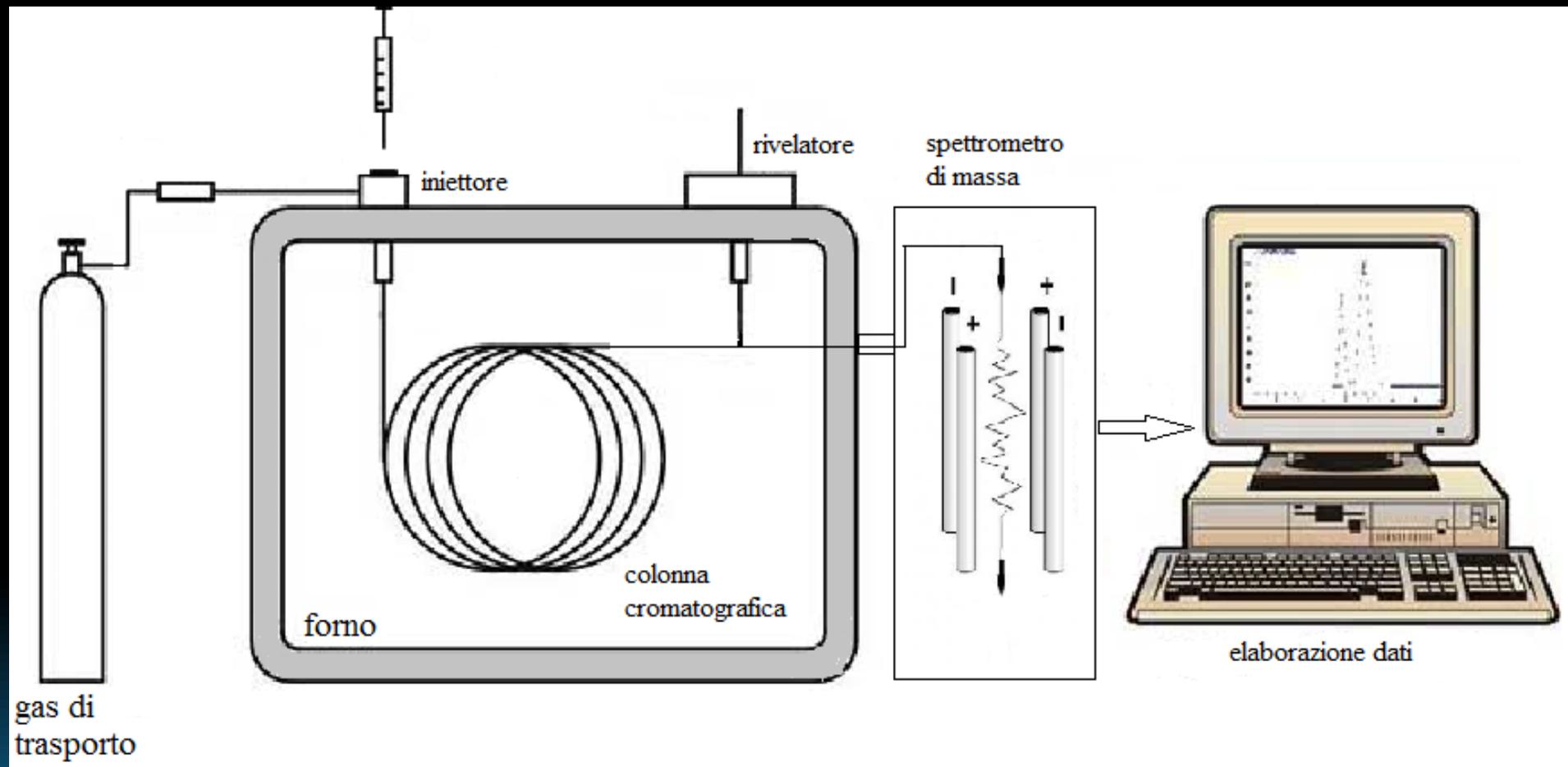
Per ogni analisi di conferma devono sempre essere processati insieme ai campioni incogniti almeno un campione esente da analiti di interesse ed un campione di controllo positivo ad una concentrazione equiparabile a quella stimata nel campione in sede di screening.

I controlli, contenenti una quantità nota di standard (farmaco/i -droga/he - metabolita/i), devono essere il più possibile simili ai campioni biologici.

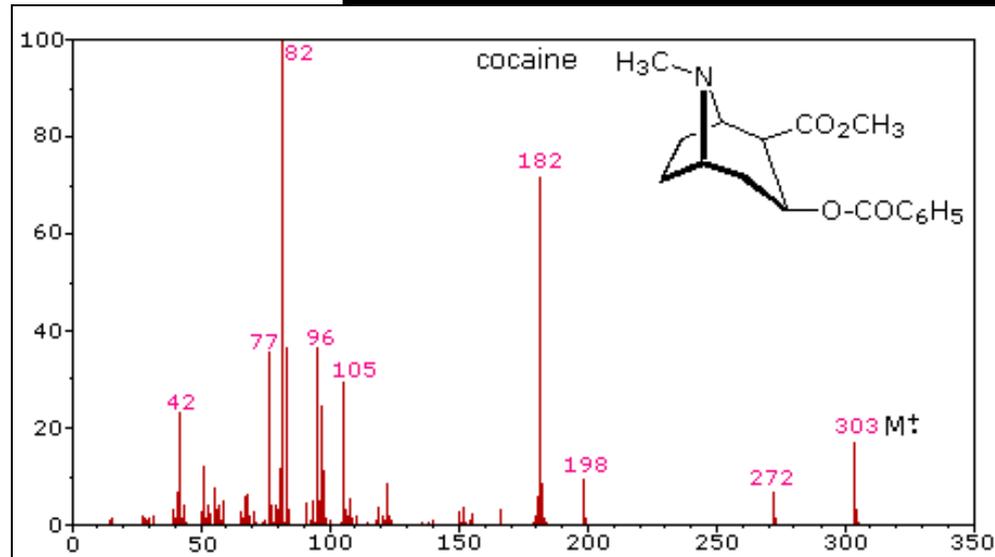
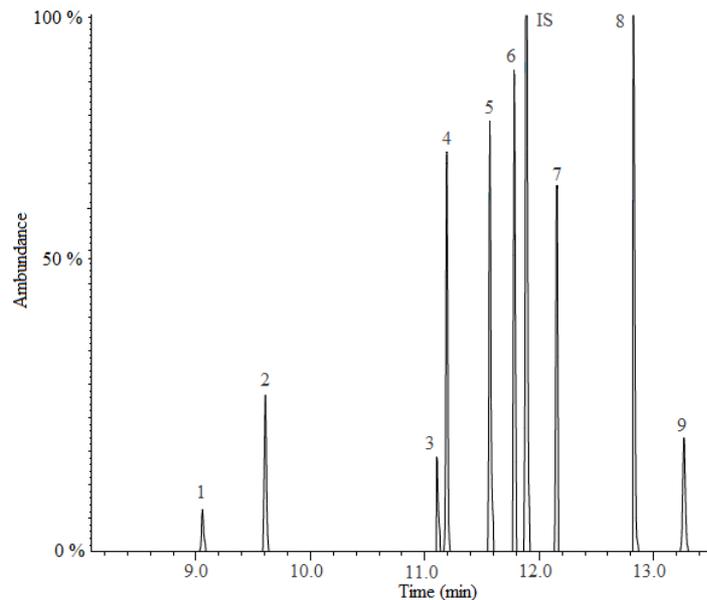
Nel caso in cui alla sostanza da confermare sia associabile un cut-off dovrebbe essere preparata contestualmente anche una curva di taratura comprendente campioni di controllo a concentrazione pari a quella di cut-off, alla metà del cut-off e al doppio della concentrazione di cut-off.



Schema strumento analisi Gas Cromatografo accoppiata alla Spettrometria di Massa (GC/MS)



Separazione cromatografica e di massa della Cocaina

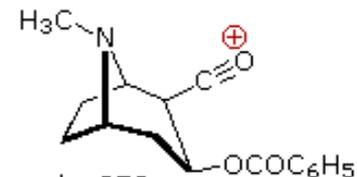


1 Amfetamina (A); 2 Metamfetamina (MA); 3 Metilen-diossiamfetamina (MDA); 4 Ketamina (K); 5 Metilen-diossietamfetamina (MDMA); 6 Metilen-diossietamfetamina (MDE); 7 N-metil-1-(1,3-benzodiossoli-5-il)-2-butanamina (MBDB); 8 Metadone (M); 9 Cocaina (C); 10 Cocainaetilene (CE); IS Metilendirossipropilamfetamina (MDPA)

[M - 105]

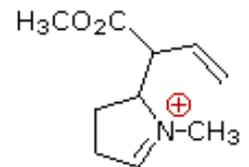
$m/z = 198$

α -cleavage



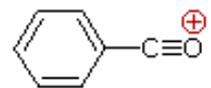
$m/z=272$

α -cleavage



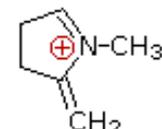
initial $m/z=182$

C-Y cleavage



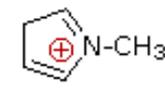
$m/z=105$

α -cleavage



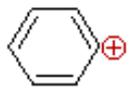
$m/z=96$

initial α -cleavage



$m/z=82$

initial α -cleavage

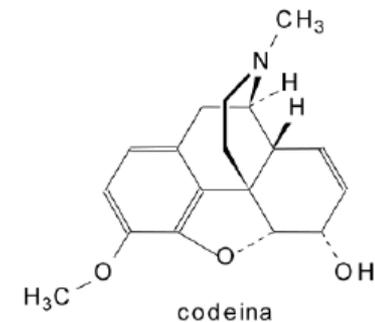
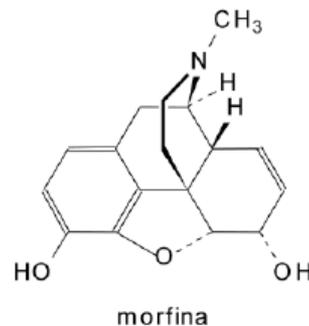
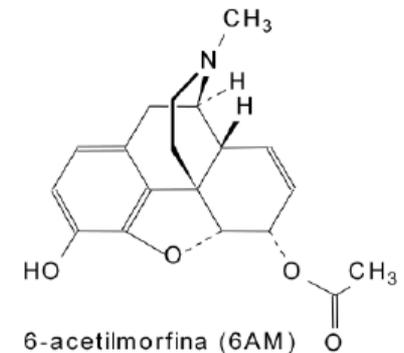
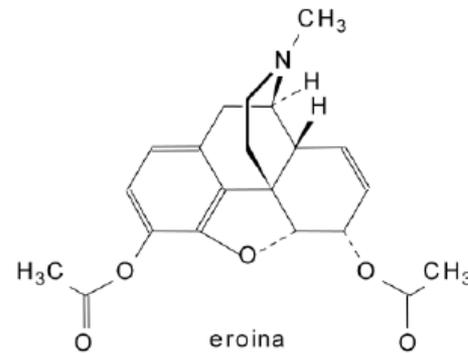


$m/z=77$

loss of CO from 105

Eroina

Opiaceo di semisintesi
Polvere nocciola/bianca
Analgesia, sonnolenza, variazioni
d'umore, offuscamento mentale
depressore respiratorio a livello
centrale
Dipendenza fisica, psichica, tolleranza.
Sindrome d'astinenza
Narcotismo acuto: variabilità
concentrazione p.a.- variabilità grado
di tolleranza



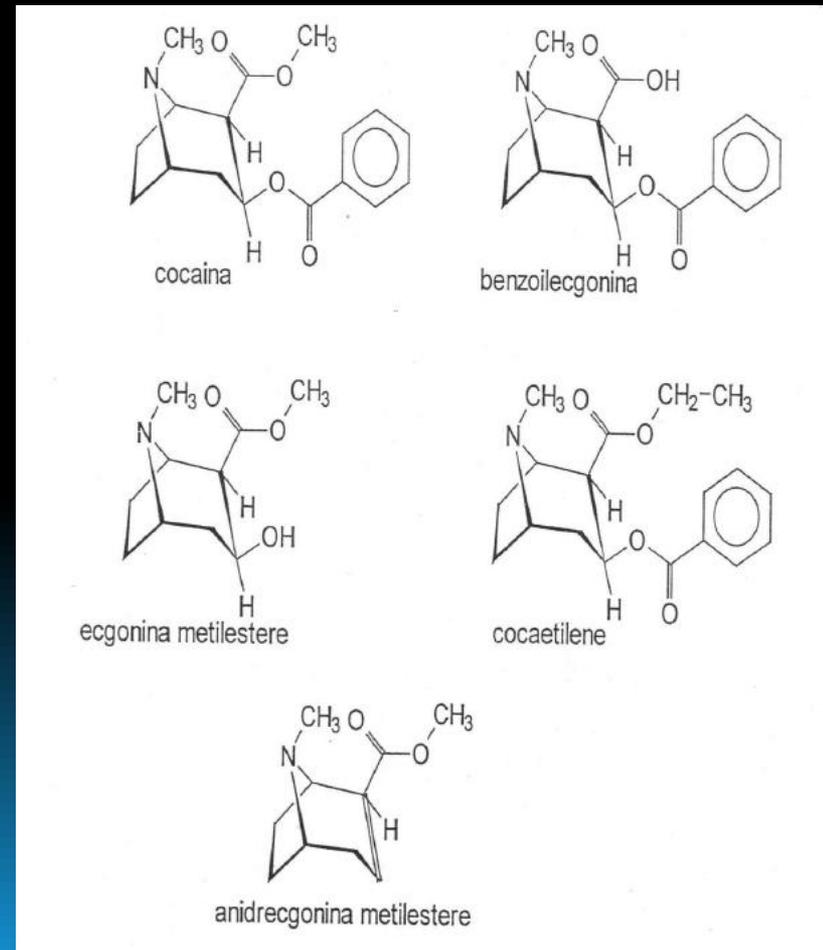
Cocaina

Erytroxilon coca: arbusto di altezza variabile 2-5m.
Foglia ovale o lanceolata verde scuro, margini lisci
Polvere bianca (cocaina cloridrato) schegge o palline
bianco-sporco o grigie o marrone chiaro (cocaina
base)

Stimolante del SNC. Potente effetto SM: aumenta la
contrattilità del cuore, la frequenza cardiaca e la PA.
Uso cronico: grave depressione psicofisica (psicosi
paranoiche, alterazioni del comportamento motorio).
Tolleranza inversa:alcuni degli effetti aumentano col
progredire dell'intossicazione cronica. Intossicazione
acuta:eccitazione, tachicardia, midriasi, delirio,
convulsioni coma.

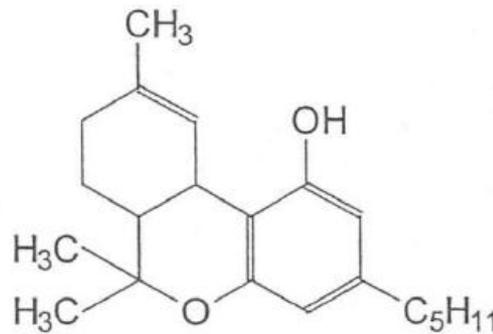
Morte per arresto cardio respiratorio in tempi
brevissimi.

L'uso di coca può causare aritmie cardiache, infarto
del cuore e del cervello, convulsioni e tremori

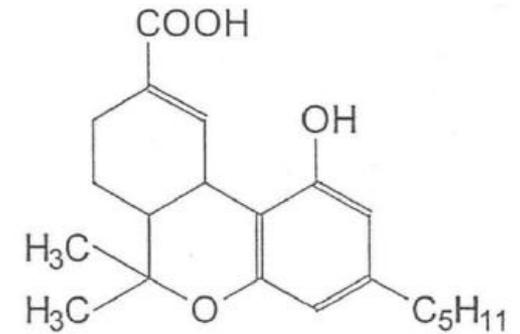


Cannabis

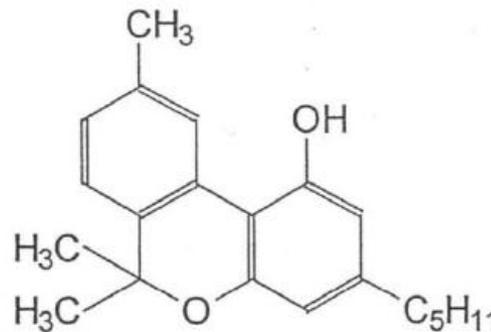
Pianta erbacea, altezza 1-2m
(anche >3m) fiori a spiga
nella pianta femminile Foglie
alterne 5-11 segmenti
lanceolato-acuminati, seghettati
Principio attivo : δ 9 THC
Convinzione personale del
soggetto (euforia
comunicabilità, nausea
palpitazioni sonnolenza)
Dosi > 100 mg : forte agitazione,
iperattività.
Dosi > 200 mg effetto
psicotossico con allucinazioni
Forte dipendenza psichica



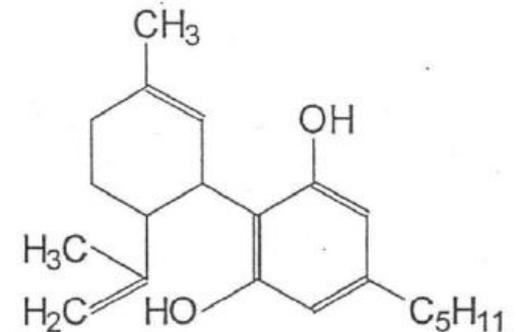
THC



THC-COOH



cannabinolo



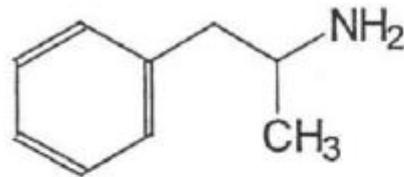
cannabidiolo

Anfetamine - Ecstasy

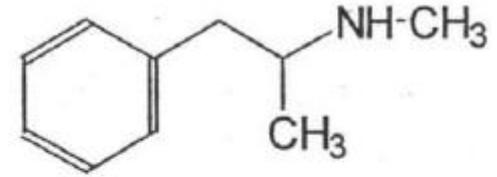
Sostanze di sintesi con effetti stimolanti simili alla cocaina. Inducono dipendenza.
Tolleranza inversa. Le complicazioni legate all'uso, sono simili alla cocaina.

MDMA droga di sintesi
compresse

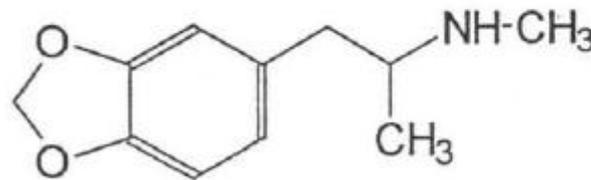
Empatogena o entactogena Il deficit di SH che si instaura a seguito dell'assunzione di ecstasy è considerato responsabile della depressione che a volte segue l'effetto stimolante dell'ecstasy.
L'intossicazione acuta da ecstasy si manifesta con gli stessi sintomi del colpo di calore. Gli effetti stimolanti pregiudicano le capacità di stimare i rischi connessi a determinati comportamenti (es. guida veloce).



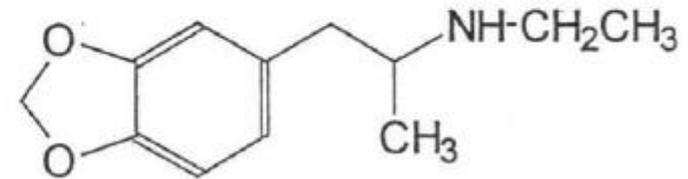
amfetamina



metamfetamina



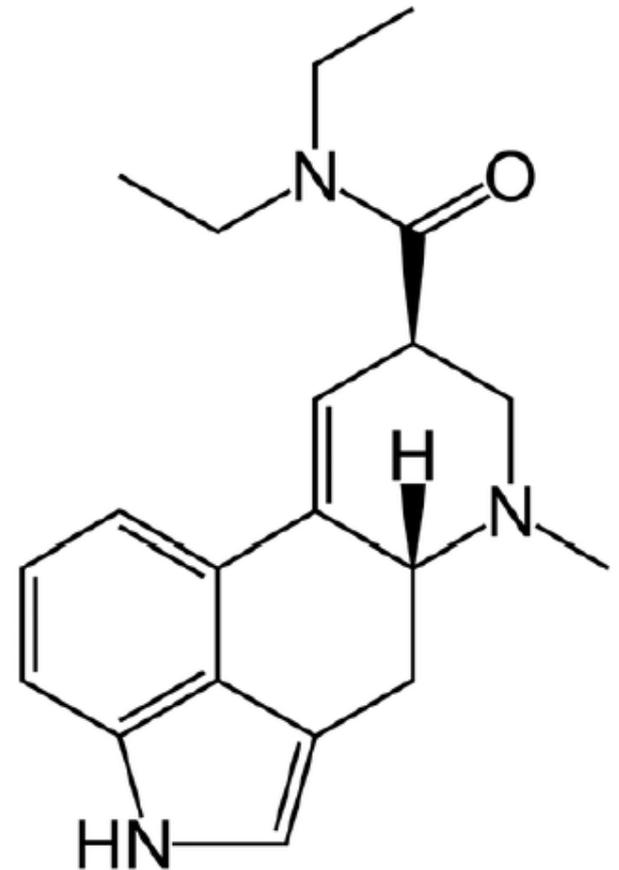
MDMA



MDEA

LSD

Allucinazioni, spersonalizzazioni , visioni mistiche
disintegrazione degli schemi spazio temporali, sensazione di
separazione dal corpo Complicanze all'uso di allucinogeni:
problemi psichiatrici, facilitano l'instaurarsi di comportamenti
paranoici e di sindromi psicotrope latenti



Grazie per l'attenzione



Droga