

Il dosaggio delle droghe d'abuso nelle urine e nei capelli: linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità

P. Zuccaro - E. Marchei
M. Pellegrini - I. Palmi
C. Mortali - S. Pichini

Reparto
Farmacodipendenza,
Tossicodipendenza e
Doping
Dipartimento del Farmaco
Istituto Superiore di Sanità
Roma

Proposte di linee guida per il dosaggio delle droghe d'abuso nelle urine (1) e nei capelli (2) sono state elaborate negli ultimi dieci anni dall'Istituto Superiore di Sanità al fine di attivare nella comunità scientifica e negli addetti ai lavori un dibattito che consenta di uniformare e standardizzare, a livello nazionale, le procedure analitiche ed organizzative dei laboratori del Servizio Nazionale Sanitario che si occupano d'analisi di sostanze d'abuso.

Le analisi delle sostanze d'abuso a fini clinici, epidemiologici o medico-legali possono effettuarsi su diverse matrici biologiche sia convenzionali (sangue, urine) che non convenzionali (capelli, saliva, sudore, meconio).

L'urina è considerata la matrice di elezione, in quanto, a differenza del sangue, consente un prelievo non invasivo, la possibilità di campionare grandi volumi e di determinare le sostanze e i loro metaboliti anche a distanza di alcuni giorni dall'assunzione. Vi sono però degli svantaggi legati alla scarsa rilevanza clinica delle concentrazioni trovate in questo liquido biologico e al rischio che l'urina possa essere facilmente adulterata con l'aggiunta di sostanze che ne variano il volume o le sue caratteristiche chimico-fisiche. Per questo si rende necessario controllare alcuni parametri quali il pH, la temperatura e la densità. Inoltre il dosaggio delle sostanze d'abuso



nelle urine non consente di provare un uso cronico o passato.

Nel sangue la presenza di sostanze d'abuso e loro metaboliti è rilevabile ad elevate concentrazioni solo se il prelievo viene eseguito poche ore dopo l'assunzione; infatti le concentrazioni diminuiscono in maniera molto sensibile nel giro di poche ore indicando così solo un'esposizione recente.

Oltre a questi due liquidi biologici normalmente usati nella determinazione di sostanze d'abuso e/o loro metaboliti, da diversi anni è stata presa in considerazione la possibilità di utilizzare matrici non convenzionali.

Tra queste la saliva, il sudore e i capelli che sono le matrici biologiche su cui si è focalizzato l'interesse della ricerca internazionale.

Il motivo che ha portato ad utilizzare le matrici non convenzionali nelle analisi farmacotossicologiche risiede nella non invasività del prelievo che si può effettuare anche in ambiente non medico, nella possibilità utilizzare test speditivi "on-site" e nel caso dei capelli nella possibilità di incrementare la finestra di tempo in cui la sostanza d'abuso è rilevabile.

Infatti l'analisi delle sostanze d'abuso nei capelli può essere utilizzata per provare un uso, un abuso o un misuso protratto nel tempo e fornire dati analitici con valore medico-legale.

Per questo motivo la determinazione nei capelli può essere richiesta in caso di morti correlate all'uso di farmaci e/o sostanze d'abuso, valutazione della idoneità alla guida, responsabilità criminale, affidamento di minori, esposizione prenatale a farmaci e sostanze d'abuso.

D'altra parte, esistono ancora parecchi punti da chiarire affinché questo tipo d'analisi possa essere accettata routinariamente in ambito medico-legale per quantificare il consumo di una determinata sostanza o l'esposizione ad essa.

Gli svantaggi sono: la diversa cinetica di incorporazione delle sostanze dovuta alla velocità di crescita del capello, la produzione di sebo e di sudore e la contaminazione esterna che rende necessario un lavaggio

con solventi al fine di eliminare il più possibile le sostanze esogene senza di fatto estrarre le sostanze contenute nel capello. Vi è inoltre difficoltà a reperire standard di riferimento.

Di seguito dettaglieremo le caratteristiche fondamentali per l'analisi delle sostanze d'abuso sia nelle urine che nei capelli. Queste analisi hanno caratteristiche in comune (es. test di validazione e metodiche di conferma) e caratteristiche proprie della matrice (es. test di screening, digestione della matrice cheratinica).

Procedure analitiche

Per quel che concerne le procedure su qualsiasi matrice biologica, per ogni campione debbono essere chiaramente indicate le modalità di prelievo, conservazione e trasporto. Inoltre la quantità di campione biologico ritenuta sufficiente per l'esecuzione dell'analisi deve essere congrua con la possibilità di ripetizione dell'analisi, con il numero degli analiti oggetto d'indagine, con la finalità qualitativa e/o quantitativa dell'esame.

Le metodiche analitiche utilizzate in laboratorio sono di due tipi: metodiche iniziali o di screening e metodiche di conferma.

Analisi iniziali (test di screening): sono quei test utilizzati al fine di analizzare in poco tempo un gran numero di campioni in maniera economica, efficace e standardizzata. Questi test permettono di escludere i campioni che risultano negativi, ossia quei campioni che non contengono la sostanza o la classe di sostanze indagata oppure quelli in cui la concentrazione è al di sotto di un valore soglia (cut-off). Non bisogna però confondere il valore del cut-off con il limite di determinazione del metodo, che è la più bassa concentrazione che può essere determinata.

Le metodiche che si possono utilizzare sono, per la maggior parte, di tipo immuno-chimico.

Per ognuna di queste tecniche esistono in commercio diversi kit che possono differire per la scelta dell'anticorpo (policlonale o monoclonale), per la metodologia di esecuzione del test e per sensibilità e specificità.

Classe di sostanze (ng/ml)	Concentrazione (ng/ml)
Oppiacei	300 ^(a)
Cocaina Metaboliti	300
Cannabinoidi	50
Anfetamine ed Analoghi	1000
MDMA	300
Benzodiazepine	500
Metadone	300

^(a) 25 ng/ml per test immunochimico specifico per la morfina libera

Tab. 1
Concentrazione soglia (cut-off) nei test iniziali per la positività delle classi di sostanze nelle urine

Tutte le case produttrici riportano nel kit un valore di cut-off analitico confrontabile con quello indicato nella tabella 1, che illustra i cut-off secondo le linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità (1) e in accordo con quelli raccomandati dalla Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMSHA).

Sarebbe auspicabile che tutti i laboratori utilizzassero gli stessi valori di cut-off e uniformassero le procedure per poter confermare i risultati delle analisi eseguite in tutto il territorio nazionale.

Tab. 2
Procedure di digestione della matrice cheratinica

Tipo di Digestione	Vantaggi	Svantaggi
Enzimatica		<ul style="list-style-type: none"> ● Controllo delle temperatura pH e attività enzimatica ● ripetibilità non ottimale ● estrazione successiva del campione
Basica (NaOH 1.0 M)	<ul style="list-style-type: none"> ● Completa dissoluzione della matrice ● adatta per cannabinoidi, benzodiazepine e nicotina 	<ul style="list-style-type: none"> ● Idrolisi di Eroina, 6-mam e cocaina ● estrazione successiva del campione
Acida (HCl 0.1 M)		<ul style="list-style-type: none"> ● non completa dissoluzione della matrice ● non adatta per la ricerca degli oppiacei ● estrazione successiva del campione
Alcol Metilico	<ul style="list-style-type: none"> ● assenza di processi di idrolisi ● applicabile con metodi d'analisi sensibili e specifici ● no estrazione successiva del campione 	<ul style="list-style-type: none"> ● non completa dissoluzione della matrice ● potere estrattivo basso

A tutt'oggi non esistono test di screening per la matrice cheratinica e non sono state stabilite concentrazioni soglia (cut-off) ufficiali dei vari xenobiotici nel capello che permettano di dichiarare la positività o la negatività ad una certa sostanza.

Esiste un'unica proposta riguardante oppiacei e cocaina secondo cui concentrazioni di 6-monoacetilmorfina inferiori a 0,5 ng/mg di capello e di cocaina inferiori a 1 ng/mg di capello escluderebbero il consumo; valori di 6-monoacetilmorfina compresi fra 0.5 e 2 ng/mg di capello e di cocaina compresi fra 1 e 4 ng/mg di capello indicherebbero un consumo basso; valori di 6-monoacetilmorfina compresi fra 2 e 10 ng/mg di capello e di cocaina compresi fra 4 e 20 ng/mg di capello indicherebbero un consumo medio e valori di 6-monoacetilmorfina superiori a 10 ng/mg di capello e di cocaina superiori a 20 ng/mg di capello indicherebbero un consumo elevato (3).

Negli ultimi anni vari ricercatori hanno verificato, comunque, la possibilità di adattare all'analisi del capello kit validati per l'analisi delle sostanze d'abuso nelle urine.

Un campione trovato positivo nel test iniziale, se non viene verificato con un test di conferma non ha valore medico-legale. E' necessario tenere presente che la positività ai test iniziali può essere dovuta anche all'assunzione dei farmaci o all'ingestione di sostanze particolari (esempio: semi di papavero nel caso degli oppiacei).

Analisi di conferma: le analisi di conferma servono a verificare che non ci siano risultati falsi positivi dovuti alla non specificità dei test iniziali.

E' consigliabile eseguire l'analisi su una seconda aliquota del campione sul quale è stato effettuato il test iniziale. L'analisi di conferma si deve basare su principi fisici e chimici diversi da quelli dei test iniziali e deve essere di tipo quantitativo.

I campioni riservati all'analisi di conferma subiscono da prima un processo di estrazione degli analiti dalla matrice biologica al fine di purificare il campione e concentrare gli analiti stessi.

I processi estrattivi principalmente utiliz-

zati sono: l'estrazione con solventi o miscele di solventi non miscibili con l'urina o con altra matrice (estrazione liquido-liquido) e l'estrazione dell'urina o di altra matrice per ripartizione tra una fase solida e un solvente di eluizione (estrazione in fase solida, SPE).

Nel caso della matrice cheratinica è necessaria una digestione previa del campione polverizzato mediante l'utilizzo del mulino capelli o finemente tagliato.

Le principali procedure di digestione sono riportate in tabella 2.

Attualmente la metodica digestiva di elezione è quella in ambiente acido in quanto non determina la completa distruzione dei biomarcatori, quali ad esempio la 6-monoacetilmorfina nel caso degli oppiacei. L'unica metodica esente da fenomeni di idrolisi è quella in alcol metilico, ma attualmente non è più in uso dato lo scarso potere estrattivo.

Tutti i processi di digestione richiedono una successiva estrazione.

I test di conferma sono generalmente basati su metodiche cromatografiche quali gascromatografia (GC) e cromatografia liquida (LC) accoppiate alla spettrometria di massa. In tal modo si uniscono le caratteristiche di separazione proprie della cromatografia con la specificità propria della spettrometria di massa.

Il valore soglia (cut-off) dei test di conferma deve essere posto ad una concentrazione uguale o più bassa rispetto al cut-off dei test immunochimici quando viene confermato il singolo farmaco o il metabolita (Tabella 3).

Anche questi valori sono riportati nelle linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità (1) in accordo con quelli della Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMSHA).

Come per i test di screening, anche per i test di conferma non esistono concentrazioni soglia (cut-off) ufficiali dei vari xenobiotici nel capello.

Convalida delle metodiche

Le metodiche analitiche che vengono utilizzate per l'analisi di conferma della presenza delle sostanze d'abuso nelle matrici

Classe di sostanze	Concentrazione
OPPIACEI:	
● Morfina (libera+coniugata)	300 ng/ml
● Morfina 3-glucuronide	(1)
● Morfina 6-glucuronide	(1)
● 6-monoacetilmorfina	(2)
● Codeina	300 ng/ml
COCAINA METABOLITI:	
● Benzoilecgonina	150 ng/ml
● Ecgoninametilestere	(2)
CANNABINOIDI:	
● Delta 9 Tetraidrocannabinolo Acido Carbossilico	15 ng/ml
● Glucuronide del Delta 9 Tetraidrocannabinolo Acido Carbossilico	(2)
AMFETAMINE ED ANALOGHI:	
● Amfetamine	500 ng/ml
● Metamfetamine	500 ng/ml
● 3,4 Metilendioossimetamfetamina (MDMA)	1000 ng/ml
● Metilendioossimetamfetamina (MDA)	1000 ng/ml
BARBITURICI:	
● Fenobarbital	500 ng/ml
● Secobarbital	500 ng/ml
● Amobarbital	500 ng/ml
BENZODIAZEPINE:	
● 7 Amminoflunitrazepam	500 ng/ml
● Nordiazepam	500 ng/ml
● Oxazepam	500 ng/ml
METADONE:	
● 2 Etildene-1,5-dimetil- 3,3-difenilpinolidene (EDDP)	(2) 300 ng/ml

(1) *metabolita presente nell'urina che può essere dosato tal quale oppure insieme alla morfina in seguito ad un processo di idrolisi (acida o enzimatica) per rompere il legame con il glucuronide.*

(2) *Altro metabolita presente nell'urina.*

biologiche devono essere validate prima di poter entrare nella routine di un laboratorio. La convalida si prefigge lo scopo di documentare le caratteristiche del metodo analitico al fine di permettere una valutazione obiettiva dei risultati. Per tale scopo deve essere approntata una specifica descrizione del protocollo di analisi.

Ciascun passaggio della procedura deve

Tab. 3
Concentrazione soglia (cut-off) nei test di conferma per la quantificazione delle singole sostanze nelle urine

essere analizzato per determinare tutte quelle variabili che possono influenzare la stima dell'analita nella matrice biologica.

Le metodiche analitiche che vengono utilizzate nel laboratorio d'analisi per il dosaggio delle sostanze d'abuso e/o loro metaboliti nei liquidi biologici devono essere validate prima di poter essere utilizzate nella routine (4,5).

Nello schema di validazione (Tabella 4) devono essere valutati i seguenti parametri:

Specificità: indica la capacità del metodo di differenziare e quantificare l'analita senza subire interferenze da parte di altre sostanze note e non presenti nel campione. Un test statistico permetterà poi di valutare se esistono differenze significative tra i dati ottenuti da un'analisi effettuata in presenza ed una seconda analisi effettuata in assenza di sostanze note diverse dall'analita del campione (metaboliti, prodotti di degradazione, altri xenobiotici).

Se il metodo permette la determinazione simultanea di più analiti, la specificità deve essere testata per ogni analita.

Limite di quantificazione (LOQ) e Limite di rivelazione (LOD): il LOQ è la più bassa

concentrazione dell'analita che può essere calcolata con una precisione e una accuratezza prestabilita. Il LOD è la minima concentrazione di un analita che si può distinguere da un campione bianco. Rappresenta, quindi, la più bassa concentrazione per valutare qualitativamente la presenza o l'assenza di un analita.

La deviazione standard (SD) della risposta di cinque campioni bianchi viene utilizzata per la determinazione del LOQ (10 SD) e del LOD (3 SD).

Calibrazione: la curva di calibrazione è la relazione che lega la risposta del metodo di analisi al rapporto tra la concentrazione dell'analita e la concentrazione dello standard interno.

Lo standard interno dovrebbe essere una sostanza con proprietà chimico-fisiche del tutto simili a quelle dell'analita in esame. Inoltre non deve essere un metabolita dell'analita o un farmaco che possa essere assunto e non deve interferire con la corsa cromatografica.

L'intervallo di misura deve includere le concentrazioni che si trovano generalmente in vivo. Si valuta quindi se l'equazione che lega le due variabili è lineare e se la

Campione	I Giorno		II Giorno			III Giorno
	Matrice	Senza Matrice	Matrice			Matrice
			C/S 0	C/S 1	C/S 2	
Con 0	4	2	2	-	-	5
Cal 1	4	2	2	-	-	2
Con CI	-	-	3	3	3	3
Cal 2	4	2	2	-	-	2
Con CM	-	-	3	3	3	3
Cal 3	4	2	2	-	-	2
Cal 4	4	2	2	-	-	2
Con CS	-	-	3	3	3	3
Cal 5	4	2	2	-	-	2

Con 0 = matrice bianca; Cal 1 - Cal 5 = campioni di calibrazione;
 Con CI = controllo inferiore; Con CM = controllo medio;
 Con CS = controllo superiore; C/S = cicli di congelamento/scongelo

Tab. 4
 Schema di validazione
 di un metodo analitico
 in matrice biologica