

Aspetti procedurali e problemi d'interpretazione nell'analisi di sostanze d'abuso

Rosanna MANCINELLI e Maria Soccorso GUIDUCCI

Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Negli ultimi anni il panorama dell'*addiction* ha assunto connotazioni diverse sia a livello nazionale che internazionale diversificandosi nel tipo di sostanze e nelle modalità e vie di assunzione. In questo contesto il laboratorio riveste un ruolo importante per la identificazione di sostanze, alcune di recente introduzione, e la rilevazione di soggetti assuntori per finalità diverse. In questo lavoro sono evidenziati alcuni aspetti dell'indagine tossicologica: dalle nuove possibilità analitiche, in termini di tecniche e procedure, all'uso di materiali biologici diversi, ai problemi di validazione ed interpretazione. Attenzione particolare è posta alle cosiddette *designer drugs*, all'uso di test "fuori laboratorio" estremamente utili per i problemi legati alla sicurezza sanitaria e sociale, alle abitudini poliassuntive che propongono problematiche aggiuntive in termini di interpretazione, rischio e trattamento.

Parole chiave: analisi tossicologiche, fluidi biologici, amfetamino-derivati, poliassunzione.

Summary (*Procedural and interpretative problems in the determination of drugs of abuse*). - Addiction scene is showing rapid changes about substances and patterns of use/abuse. Increasing requirements from clinical and forensic fields to identify drugs of abuse and to find them at ever decreasing levels in biological samples, have led to a great improvement in the state of the art of analytical toxicology. This paper discusses various aspects of these developments highlighting possibilities and problems that make the toxicological determination to be evaluated with prudence, keeping in mind that these results involve legal aspects too. Special attention is focused to the so-called "designer drugs", to the outside laboratory assays and to the problems due to poly-drugs assumption.

Key words: drug test, poly-assumption, toxicological analysis, biological fluids, designer drugs.

Introduzione

Compito del laboratorio, in ambito tossicologico, è la produzione di un dato che, al di là di ogni ragionevole dubbio, accerti la presenza o assenza di sostanze potenzialmente nocive nel campione biologico e, in caso positivo, consenta di determinarne identità e quantità. Questi particolari risultati analitici non hanno solo ricaduta nella diagnosi e terapia, come per altre analisi di laboratorio, ma anche in altri settori: i risultati ottenuti, infatti, possono condurre a decisioni amministrative e legali in contesti diversi dall'ambito forense, al controllo nei luoghi di lavoro, all'accertamento di doping negli uomini e negli animali, al controllo del contratto terapeutico nei programmi di riabilitazione, alla sicurezza stradale, all'accertamento di intossicazioni da contaminazione ambientale, ad accertamenti a scopo assicurativo, settori cioè che implicano ricadute importanti nella vita sociale e civile di un individuo [1]. In passato, l'indagine tossicologica

era fornita da pochi laboratori strettamente specialistici, soprattutto in casi *postmortem*, per accertamenti di sospetto avvelenamento o per incidenti di lavoro. Perciò le sostanze ricercate erano relativamente poche, le concentrazioni nei materiali biologici piuttosto elevate e contenuto il numero di analisi richieste. Negli ultimi anni, a causa soprattutto della grande espansione dei problemi droga-correlati, l'esigenza e quindi la richiesta di risposte analitiche in ambito tossicologico è molto aumentata. La maggior parte delle determinazioni oggi si effettua su prelievi da persone viventi con concentrazioni da rilevare per lo più molto basse. Inoltre il numero ed il tipo di sostanze da ricercare ed identificare si è enormemente allargato. La ricerca di una sempre maggiore affidabilità del dato e, di conseguenza, la riduzione del margine di errore è divenuta quindi un obiettivo più difficile da raggiungere e ciò ha portato negli ultimi anni ad un grande sviluppo nello studio di tecniche, procedure e strumentazione. La ricerca di sostanze nel campione

che arriva al laboratorio tossicologico può essere diretta, per una sostanza o gruppo di sostanze già individuate o sospettate, o indiretta per cercare sostanze di cui è incerta sia la presenza che la natura. Quest'ultima, sicuramente, richiede un approccio più complesso. Di fatto, specie nell'ambito della determinazione di sostanze d'abuso, anche quando la sostanza presente è conosciuta o sospettata è buona norma verificare sempre l'eventuale presenza di altre molecole dal momento che, nell'attuale panorama dell'abuso, l'intossicazione da poliassunzione è la regola piuttosto che l'eccezione. A rendere il problema ancor più complesso, non sono soltanto cambiamenti di modalità e vie di assunzione ma anche il numero crescente di sostanze di sintesi introdotte sul mercato. Nuove molecole, soprattutto amfetamino-derivati le cosiddette *designer drugs*, sono continuamente proposte sul mercato sia per attrarre consumatori sia per eludere i controlli giudiziari che possono intervenire su sostanze già conosciute e tabellate [2]. Il numero di molecole di sintesi descritte dalla letteratura underground [3] è molto elevato, anche se non tutte sono disponibili sul mercato e la loro corretta identificazione risulta a volte davvero difficile. Per risolvere almeno in parte questo problema, Hartstra *et al.* [4, 5] hanno messo a punto modelli probabilistici computerizzati per confrontare i dati analitici della sostanza sconosciuta con quelli in database di sostanze già identificate. Affinché questo sistema sia davvero efficiente ed efficace è però essenziale lo sforzo, peraltro già in atto, di lavorare di concerto tra laboratori nazionali ed internazionali e di organizzare una rete di banche dati costantemente aggiornate.

I problemi, anche analitici, posti dall'attuale panorama dell'abuso sono quindi molteplici e saranno qui messi in evidenza alcuni degli aspetti relativi alla determinazione delle sostanze d'abuso con particolare attenzione verso le nuove molecole di sintesi (*designer drugs*) che, ad oggi, rappresentano il problema emergente in termini di effetti, controllo, rilevazione.

Scelta del metodo

L'analisi di sostanze d'abuso si effettua con uno screening preliminare utilizzando metodi molto praticabili e con sensibilità ed universalità ottimali per differenziare e rivelare/individuare campioni positivi nel minor tempo possibile ed escludere subito i campioni che non contengono sostanze o loro metaboliti. Successivamente, nei campioni presunti positivi, si passa all'analisi di conferma per l'identificazione e quantificazione delle sostanze presenti tramite indagini più complesse basate su principi diversi da quelle di screening. Per lo screening in matrice biologica vengono utilizzati immunodosaggi

mentre per la conferma si usano tecniche cromatografiche e, in particolare, la gas cromatografia con rivelazione di massa (GC-MS) universalmente considerata il metodo di riferimento. Sul mercato sono disponibili radioimmunosaggi, enzimosaggi e FPIA (*fluorescence polarization immunoassay*) anche per lo screening di metilendiossiamfetamino-derivati nelle urine. Ad esempio, una assunzione di 140 mg di MDE (metilendiossietilamfetamina o EVE) risulta positiva a FPIA fino a 60 ore dopo l'assunzione [6]. L'uso di immunosaggi offre il vantaggio della grande praticabilità in termini di semplicità, velocità e favorevole rapporto costo/beneficio: è possibile analizzare molti campioni in tempi brevi, senza pretrattamento del campione, identificando positività per classi di sostanze. Ha però anche degli svantaggi: il numero degli anticorpi verso le varie sostanze dovrebbe essere maggiore per migliorare la possibilità di differenziazione, il limite di sensibilità è piuttosto elevato e per un largo spettro di sostanze analoghe, la reattività crociata degli anticorpi disponibili può costituire un fattore confondente [1]. Ci sono inoltre ancora difficoltà legate all'interferenza della matrice e alla purificazione e stabilità del recettore. Perciò procedure ulteriori e più specifiche sono necessarie per la conferma e per differenziare le sostanze poiché anche farmaci non elencati tra le sostanze d'abuso possono dare risultati positivi. Per questo, ogni risultato positivo deve essere confermato con l'analisi di secondo livello. D'altro canto, anche la GC-MS, pur essendo il metodo di riferimento non è infallibile e ha le sue limitazioni. Ad esempio, richiede procedure anche complesse di estrazione e derivatizzazione del campione che comportano manipolazione e quindi rischio di alterazione del campione stesso. Del resto l'estrazione del campione è un prerequisito essenziale per la cromatografia nel campione biologico per isolare dalla matrice le sostanze e scindere i loro metaboliti, presenti di solito sotto forma di coniugati. La successiva derivatizzazione rende le sostanze estratte evidenziabili nella fase finale della separazione cromatografica. Nel caso degli amfetaminici, che ad oggi costituiscono un problema emergente, la scissione dei coniugati non è necessaria per rilevare amfetamine o metamfetamine ma è indispensabile per l'analisi delle *designer drugs* amfetamino-derivate. Infatti, per quanto riguarda le molecole più rappresentative di questo gruppo quali MDA (metilendiossiamfetamina), MDMA (metilendiossimetamfetamina), MDEA (metilendiossietilamfetamina), MBDB (metilbenzodiossolbutanamina) i loro principali metaboliti sono gli idrossi-metossi metaboliti escreti nelle urine completamente coniugati. Studi sul metabolismo di MDEA hanno dimostrato che il suo idrossi metossi metabolita può essere individuato per 7-8 giorni dall'ingestione mentre il composto originario (*parent drug*) si rileva solo per 2 o 3 giorni.

I coniugati possono essere scissi per idrolisi enzimatica delicata, ma che richiede tempi piuttosto lunghi ed è indicata nell'ambito di controlli di abuso di droga e di verifiche di doping. Nelle analisi tossicologiche in emergenza, invece, è preferibile effettuare una idrolisi acida forte ma veloce anche se esiste il rischio di formazione di artefatti. La successiva derivatizzazione delle amfetamine è necessaria per aumentare le loro proprietà gas-cromatografiche, per formare frammenti meglio individuabili e riconoscibili all'identificazione di massa, per introdurre atomi alogeni per la ionizzazione chimica negativa o la rivelazione a cattura di elettroni, per differenziare gruppi funzionali o formare diastereomeri per l'analisi chirale. Ogni procedura ha vantaggi e svantaggi da valutare a seconda delle caratteristiche sia dei campioni che delle procedure cromatografiche che si intendono utilizzare [7]. Per quanto riguarda la GC-MS, oltre alle considerazioni legate alla complessità delle procedure per la preparazione del campione, bisogna considerare il fatto che la strumentazione è costosa ed è necessaria buona esperienza dell'operatore per una corretta interpretazione del risultato.

Buone prospettive di maggiore praticabilità ci vengono dagli studi sull'uso di un altro tipo di cromatografia, quella liquida ad alta pressione (HPLC). Questo tipo di separazione cromatografica è molto diffuso nei laboratori d'analisi per la sua grande versatilità ed ha avuto in questi anni grande sviluppo. È applicabile più universalmente della GC-MS dal momento che permette anche la determinazione di sostanze termolabili, non polari e non volatili come metaboliti, coniugati e peptidi e si adatta meglio, quindi, al campione biologico. Le molecole separate in HPLC possono essere rilevate con molti sistemi diversi: tra quelli ad oggi disponibili, ricordiamo le misure di assorbimento con DAD (*diode array detection*), la misura fluorimetrica, elettrochimica e, più recentemente, la rivelazione di massa che permette prestazioni ancor più elevate in termini di sensibilità. Per quanto riguarda le *designer drugs*, sono state studiate molte procedure diverse in HPLC. Recentemente è stata messa a punto presso l'Istituto Superiore di Sanità una procedura HPLC idonea alla determinazione simultanea di MDMA, MDA, MDEA, MBDB sia in matrice biologica (sangue, urina, saliva) sia in reperti di strada [8]. Con questa procedura, non solo è possibile effettuare la determinazione di più molecole in tempi ridotti (15 minuti) e in matrici diverse, ma soprattutto si ha il grande vantaggio, innovativo rispetto a lavori precedenti, che il campione viene analizzato tal quale senza procedure di estrazione. Si riducono così drasticamente i volumi di campione necessario per la determinazione e i possibili errori dovuti alla manipolazione del campione come, ad esempio, la perdita di sostanze. Infatti, durante le

procedure classiche di estrazione per le amfetamine, si effettua una fase di evaporazione che può portare ad un errore particolarmente significativo considerato che le amfetamine sono, appunto, sostanze volatili. Per ovviare a questo inconveniente sono stati suggeriti accorgimenti e procedure aggiuntive che introducono comunque ulteriori, possibili fonti di errore.

Infine, tra le tecniche cromatografiche, è interessante ricordare la "antica" cromatografia su strato sottile (TLC) che, pur con i suoi limiti di efficienza di separazione e di riproducibilità, rimane una tecnica molto versatile, semplice, veloce e, non ultimo, economica che permette di analizzare più campioni contemporaneamente. Inoltre, variando opportunamente il metodo di rivelazione, si possono ottenere buoni risultati in termini di potere di identificazione e anche di quantificazione [9]. Queste caratteristiche ne rendono possibile l'utilizzo anche in situazioni di particolare disagio dove, per motivi diversi, non è possibile disporre di strumentazioni sofisticate e costose e di personale esperto. Inoltre, è stato dimostrato che la TLC può essere usata anche in condizioni climatiche estreme, come nei paesi tropicali, applicando appropriate correzioni [10].

La scelta del metodo risulta quindi molto ampia e dettata da considerazioni diverse. Essa deve essere valutata nell'ambito generale dell'attività di laboratorio tenendo conto dei costi, della quantità di lavoro prevista, del livello di sensibilità e affidabilità richiesto, della pratica e esperienza del personale, dell'uso finale del dato prodotto.

Scelta del campione biologico

Ad oggi, la tossicologia clinica e forense utilizza materiali biologici diversi. I materiali classici di riferimento sono urina e sangue ma da diversi anni si stanno intensificando gli studi su capelli, sudore, saliva e meconio. L'urina è il campione di scelta soprattutto per lo screening e identificazione di sostanze sconosciute poiché è disponibile in maniera non invasiva, in quantità abbondante e contiene concentrazioni di droghe relativamente alte. Però in questa matrice devono essere identificati anche o esclusivamente i metaboliti delle droghe. Storicamente, gli immunosaggi sono stati sviluppati per le determinazioni nelle urine e quindi gli anticorpi sono rivolti ai metaboliti delle sostanze (es. benzoilecgonina per la cocaina). Recentemente sono stati messi a punto anche metodi cromatografici più semplici e veloci per l'analisi di amfetamine e metamfetamine usando tecniche di *solid phase micro extraction* che sono considerate ad oggi molto promettenti per l'analisi delle sostanze d'abuso nelle urine [11]. L'analisi di campioni di sangue, insieme a quelli di urina, ha

acquistato molto favore negli ultimi anni: infatti problemi clinici e forensi possono essere risolti in maniera più soddisfacente e completa e l'interpretazione dei dati è più corretta quando, oltre ai risultati ottenuti nelle urine, è disponibile anche la determinazione quantitativa nel sangue. Il plasma è il campione di scelta per la quantificazione ematica, ma le attuali procedure di preparazione ed analisi del campione hanno reso possibile l'uso di sangue intero anche nella fase di screening. Un vantaggio importante del sangue è che la matrice è relativamente omogenea poiché i parametri fisiologici possono variare entro limiti ristretti e la droga può essere rivelata appena dopo l'assunzione prima che venga metabolizzata e filtrata; lo svantaggio è costituito dall'invasività del prelievo, dalla limitata quantità di campione, dalla difficoltà di conservare opportunamente il campione o dalla difficoltà di analisi quando il sangue è vecchio, emolizzato o prelevato *postmortem*. Non c'è ancora una procedura universale per lo screening di sostanze d'abuso nel sangue come è accaduto per le urine a seguito della disponibilità degli immunosaggi. È ipotizzabile però che, dato l'interesse ed il numero di studi su questo argomento, ciò sarà possibile in un prossimo futuro [12]. I tempi di determinazione nei liquidi biologici variano a seconda della farmacocinetica e farmacodinamica di ogni sostanza. Alcune droghe sono rilevabili per parecchi giorni, come i cannabinoidi, per altre come le *designer drugs* MDMA, MDA, MDE, MBDB gli studi effettuati hanno dimostrato che il picco di concentrazione nel plasma si raggiunge tra le 2 e le 4 ore mentre l'emivita plasmatica risulta di 5 e 10 ore. La concentrazione massima urinaria è circa 100 volte quella plasmatica [6]. Per queste sostanze dunque la finestra temporale in cui rilevare positività risulta piuttosto limitata ed è quindi meno facile dimostrarne l'assunzione soprattutto se si ricercano le *parent drug*.

Matrici non convenzionali: capelli

Attualmente l'analisi dei capelli è usata per la determinazione di sostanze d'abuso per uso forense, problemi di sicurezza stradale, medicina del lavoro e tossicologia clinica. La Società dei Tossicologi Forensi e la Società di Analisi dei Capelli, hanno pubblicato molto su questo argomento e ci sono molte aspettative sul ruolo dell'analisi dei capelli per applicazioni tossicologiche. La determinazione nei capelli è effettuata essenzialmente in GC-MS utilizzando una grande varietà di procedure di estrazione con risultati più o meno simili. Ad oggi, esistono anche studi sui test immunologici e sull'uso di HPLC/DAD o fluorimetria [13]. Gli immunosaggi per l'analisi nei capelli devono avere cross-reattività sia con le *parent*

drug che con i loro metaboliti lipofili trovati nei capelli, perciò gli immunodosaggi disponibili per le urine non possono essere usati per i capelli. Inoltre, non devono avere interferenze con la matrice dissolta e quindi gli immunodosaggi in fase omogenea risultano non idonei dal momento che la matrice capelli frequentemente interferisce nella rilevazione del segnale. I risultati migliori si ottengono con anticorpi legati ad un supporto come nel caso di *coated tube* per *radioimmunoassay* e *coated plate* per il test ELISA. I primi ad essere usati per l'analisi delle droghe capelli furono i *radioimmunoassay*, oggi si preferiscono EIA ed ELISA da utilizzare scegliendo idonei *cut off* (valori soglia) individuati sulla base delle concentrazioni trovate nei capelli. Anche in questa matrice, sono numerosi gli studi che riguardano amfetamina e metamfetamina e, più recentemente, l'attenzione si è focalizzata sulle cosiddette *designer drugs* che, come già detto, rappresentano oggi un problema di primaria importanza nello scenario dell'abuso. L'MDMA fu la prima *designer drug* ad essere identificata nei capelli ed è la sostanza più frequentemente trovata soprattutto in Europa; perciò deve essere inclusa in tutte le procedure di screening nei capelli [14]. A tutt'oggi ci sono problemi aperti per l'analisi nei capelli dal momento che le informazioni sulla comparabilità dei risultati tra laboratori e l'accordo sulla loro interpretazione non sono ancora del tutto soddisfacenti. Infatti variabili come il tasso di crescita legato a età, genere, etnia e variabilità individuale, e la non completa conoscenza dei meccanismi di incorporazione delle sostanze nei capelli rendono difficile l'interpretazione del risultato e la estrapolazione di dati su tempi e dosi di assunzione. In questa matrice particolare, poi, pesa particolarmente il problema della contaminazione ambientale e dell'interferenza dovuta a trattamenti cosmetici che possono influire sulla concentrazione delle sostanze nei capelli e costituire una significativa fonte di errore.

La determinazione di sostanze nei capelli quindi, pur suscitando grande interesse, necessita ancora del supporto di ulteriori studi per quanto riguarda farmacocinetica e farmacodinamica, per l'applicazione di procedure analitiche e per l'interpretazione dei risultati.

Saliva e sudore

Nell'ultimo decennio si è andato sempre più ampliando l'interesse verso l'uso di saliva e sudore come matrici possibili per la determinazione di sostanze d'abuso. I motivi che hanno portato a questo interesse sono essenzialmente legati alla maggiore praticabilità del prelievo di questi materiali. Ciò può costituire un fattore determinante quando l'analisi si effettua, ad esempio, nell'ambito del monitoraggio di persone in trattamento,

nell'accertamento di uso di sostanze tra i detenuti, nei controlli sui conducenti di auto e negli ambienti di lavoro. In queste particolari situazioni, la finestra di rilevazione dell'uso di droga, l'informazione cercata, la non invasività del prelievo e i costi di campionamento e di analisi sono fattori da valutare a fronte del fatto di ottenere la stessa informazione in urina, sangue o capelli.

La saliva è composta da acqua per il 99%, proteine 0,3% e mucina 0,3%. La bassa concentrazione di proteine rende minimo il legame con la sostanza se comparato a quello del plasma. Il pH della saliva non stimolata è 5,6-7 e aumenta sotto stimolazione fino ad un massimo di 8 e poichè le concentrazioni di sostanze nella saliva dipendono in parte dal suo pH, dipendono quindi anche dal grado di stimolazione. Anche la via di somministrazione costituisce un fattore significativo: nel caso della cocaina è stato dimostrato infatti che la concentrazione nella saliva non riflette subito i livelli plasmatici quando la cocaina è somministrata per via intranasale o fumando [15]. I rapporti plasma/saliva della cocaina fumata e di quella assunta per via endovenosa diventano sovrapponibili solo dopo 4 ore dall'assunzione quando i livelli sono più bassi. Escludendo fattori legati a contaminazione ambientale, la presenza di droga nella saliva è comunque una buona indicazione della presenza di droghe nel plasma. Gli studi nella saliva hanno avuto particolare impulso soprattutto per l'applicazione a studi epidemiologici sull'uso di alcol e nicotina. Infatti per quanto riguarda l'alcol in quanto causa principale di incidenti stradali [16, 17] in diversi studi la saliva viene usata per determinare indirettamente l'alcolemia "sul campo" tramite test rapidi effettuati con dispositivi monouso. È stato dimostrato infatti tramite studi *in vivo* [18] che la concentrazione di etanolo nella saliva corrisponde a quella attuale nel sangue con il vantaggio di ottenere il campione in modo non invasivo. Per quanto riguarda la nicotina e il suo metabolita cotinina, gli studi sulla determinazione nella saliva sono legati anche all'intensificarsi degli studi sull'esposizione a fumo passivo e all'applicazione in campo assicurativo per calcolare il rischio associato al fumo di sigaretta [15].

Anche il sudore costituisce materiale utile per determinazioni tossicologiche. Il sudore è quello non visibile che si distribuisce sulla pelle per diffusione, e quello visibile che aumenta molto la sua escrezione in situazioni di stress ed esercizio fisico. Le ghiandole del sudore si sviluppano in stretta associazione con i capelli e a volte si aprono dentro i follicoli dei capelli tanto che il sudore sembra fornisca il maggior contributo all'apparizione delle droghe nei capelli. Sebbene la secrezione sia acquosa, contiene anche secrezioni sebacee che possono trasportare e assorbire molte sostanze. Quindi le concentrazioni possono variare a seconda del punto del corpo da cui si preleva il sudore poichè le sostanze liposolubili possono essere trattenute o secrete nel sebo.

In alcuni lavori sperimentali [15] è stata valutata la persistenza sulla pelle umana di THC, cocaina e il suo metabolita benzoilecgonina e si è trovato che le sostanze erano ancora rilevabili a 18 ore dall'applicazione sulla pelle. Il sudore contiene esterasi non specifiche e altri enzimi che permettono la degradazione della droga sulla superficie della pelle ma sembra che non riescano a idrolizzare la cocaina che rimane sulla pelle non metabolizzata e ciò pone il problema della possibilità di falsi positivi dovuti a contaminazione esterna. Sono ad oggi disponibili svariati dispositivi commerciali per la raccolta di saliva e sudore e la determinazione analitica può essere effettuata con procedure diverse. Ricordiamo la cromatografia su strato sottile con reazioni colorate; gas cromatografia con rivelatori a ionizzazione di fiamma, azoto-fosforo, a cattura di elettroni, a spettrometria di massa; HPLC con rivelatore UV, DAD (*diode array detector*), fluorimetrico, elettrochimico o a spettrometria di massa; il RIA. Le procedure di estrazione per la cromatografia sono comunque necessarie e risultano piuttosto complesse considerato anche il ridotto volume di campione ottenibile.

Ci sono due fattori limitanti per l'uso di queste matrici: la quantità che si può raccogliere è inferiore a quella delle urine e le concentrazioni nelle urine sono più elevate rispetto a saliva e sudore perché le sostanze sono concentrate dai reni. Il volume del campione ottenibile risulta elemento critico soprattutto per l'applicazione forense perché è necessario poter conservare una parte di campione per eventualmente ripetere il test in caso di risultato positivo. Perciò non è particolarmente facile che si scelga di analizzare basse concentrazioni in matrici complesse piuttosto che concentrazioni più alte in altra matrice a meno che, in particolari condizioni, la facilità di prelievo rispetto ad altre matrici come urina, sangue o capelli diventi fattore determinante per la fattibilità della determinazione e tale esigenza superi il costo e le difficoltà tecniche dell'analisi. In un interessante studio europeo, pubblicato nel 2000, *Evaluation of different roadside drug tests* [19] sono stati riportati i risultati della valutazione di svariati dispositivi analitici per l'analisi sul campo di urina, saliva (o, per meglio dire, fluido orale) e sudore. Lo studio si è svolto in 8 nazioni e sono stati testati 2968 soggetti per valutare l'idoneità di dispositivi e di fluidi biologici diversi ai fini del controllo di conducenti sospettati di guida sotto effetto di droga. I risultati hanno dimostrato buona corrispondenza dei valori urinari con quelli ematici di riferimento e l'uso di saliva e sudore assai promettente ma con necessità di ulteriori studi. Soprattutto per il sudore è necessario verificare i risultati su un numero maggiore di casi. Per i campioni contenenti MDMA o sostanze simili, furono testati 18 diversi *on site* test e si è dimostrato che i test per la metamfetamina mostrano maggiore sensibilità rispetto a quelli per l'amfetamina. Risultati sicuramente

più affidabili in termini di specificità e sensibilità sono stati ottenuti considerando insieme i risultati dei test per amfetamine e metamfetamine.

Nello studio è stata anche valutata la praticabilità e “gradibilità” del campione da prelevare. I dati ottenuti indicano che il prelievo di saliva e sudore è accettato meglio di quello di urina sia dai conducenti che dai poliziotti. Dallo studio è emerso anche chiaramente che, comunque, le forze di polizia sentono molto l’esigenza di disporre di strumenti analitici per poter intervenire efficacemente sulla strada e vedono con favore l’uso dei *roadside* test per verificare e limitare i comportamenti a rischio. Si è altresì evidenziato che sono necessari ulteriori studi per approntare dispositivi più affidabili e per valutare se ed in quale misura i risultati nei diversi fluidi biologici siano attendibili e veramente predittivi del valore ematico al di là di interferenze dovute, per esempio, a contaminazioni esterne.

Un discorso trasversale: l’alcol

Quando si affronta la ricerca indiretta di sostanze in un campione biologico, il National Institute of Drug Abuse (NIDA) nel *Mandatory guidelines for federal work place drug testing programs* del 1988 [20], raccomanda di ricercare 5 classi di sostanze: amfetamine e metamfetamine, morfina e codeina, cocaina come benzoilecgonina, cannabis come 11-nor-D9-THC-9- acido carbossilico, fenciclidina. Oggi, in considerazione dell’attuale panorama dell’abuso, sarebbe opportuno aggiungere a questa lista anche la ricerca dell’etanolo la cui assunzione molto spesso si associa a quella di altre sostanze determinando effetti sinergici e quindi situazioni potenzialmente più pericolose. Soprattutto per quanto riguarda i giovani e il loro atteggiamento nei confronti dell’alcol, studi epidemiologici nazionali come il TO.DI.3 del 1994 effettuato sui 26 067 giovani di leva ed europei come l’ESPAD (European School Survey on Alcohol and Drugs) svolto nel 1995 testando circa 60 000 studenti europei nati nel 1979, riportano che la maggior parte degli studenti in tutti i paesi riferisce un consistente consumo di alcol e che esiste una relazione positiva tra uso di alcol e uso di sostanze. Le tipologie assuntive che studi epidemiologici recenti e diversi vanno configurando attribuiscono all’alcol un ruolo diverso e più significativo che in passato come amplificatore e modificatore di effetti dovuti ad altre sostanze e con aggravio di problemi comportamentali e sanitari. Il dato “alcolemia” può risultare quindi molto significativo ed è bene quindi prevedere sempre la possibilità che il campione tossicologico venga analizzato anche a questo scopo e fare in modo che ciò si realizzi in modo affidabile. La determinazione dell’etanolo può essere realizzato in modi e campioni

biologici diversi con procedure e strumentazioni praticabili e affidabili [21, 22]. È essenziale però, per rendere possibile e affidabile questa determinazione, osservare con attenzione alcuni semplici ma essenziali accorgimenti nelle fasi di prelievo e trattamento del campione. Infatti quando si effettua un prelievo di sangue non bisogna usare disinfettanti contenenti etanolo ma acqua ossigenata o uno dei molti disinfettanti senza alcol oggi facilmente disponibili sul mercato. Al momento del prelievo, sia esso di sangue, saliva o urina è necessario utilizzare contenitori a chiusura ermetica che non permettano l’evaporazione. Quando si effettuano operazioni all’esterno, tipo separazione del siero/plasma o travaso in altri contenitori per l’analisi, le operazioni vanno eseguite velocemente richiudendo il contenitore al più presto. Bastano infatti pochi minuti a temperatura ambiente per causare una significativa perdita di etanolo per evaporazione. L’applicare e acquisire consuetudine a questi semplici accorgimenti può essere ben ripagata dalla possibilità di ottenere un dato molto significativo non solo a livello clinico ma anche forense per l’accertamento delle condizioni dell’individuo e il suo eventuale trattamento.

Trattamento del campione

In linea generale, sarebbe ideale effettuare al più presto dopo il prelievo tutte le determinazioni analitiche nei campioni biologici poiché i meccanismi enzimatici continuano a lavorare e si introducono svariate possibilità di errore. Se ciò non è possibile, è necessario porre subito in frigorifero il campione prelevato (urina, siero, plasma, saliva) e, se si prevede che l’analisi non verrà effettuata subito, separare il campione in aliquote e congelarle. Sarà così possibile analizzare lo stesso campione più volte, indipendentemente, in tempi e luoghi diversi, senza dover sottoporre a congelamento e scongelamento tutto il materiale con possibile alterazione del campione stesso e diminuzione dell’affidabilità del risultato. Il sangue intero deve essere analizzato subito se deve essere evitata l’emolisi; se si usa plasma o siero questo deve essere separato subito dalle cellule, refrigerato e/o congelato in aliquote per le analisi da effettuare più tardi. Sono stati prodotti svariati studi sulla stabilità delle sostanze conservate in condizioni diverse. In alcuni studi sulla stabilità dei cannabinoidi, fu dimostrato che si aveva una significativa perdita, superiore al 22,4%, nei campioni di urina conservati a temperatura ambiente per 10 giorni. Perdite più modeste (8,1%) furono osservate quando le urine erano conservate in frigorifero per quattro settimane. Comunque il comportamento risultò non uguale per tutti i campioni e dipendente dalla differente stabilità dei

cannabinoidi presenti in ciascun campione di urina. È stata anche segnalata perdita di cannabinoidi probabilmente dovuta a processi di adsorbimento delle molecole al contenitore di plastica [23]. Per quanto riguarda sangue e plasma, studi di conservazione a -10, 4 °C e temperatura ambiente [24] hanno dimostrato che, dopo un mese, non si notavano differenze di concentrazione dei cannabinoidi, dopo due mesi le concentrazioni decrescevano significativamente nei campioni a temperatura ambiente, mentre nei campioni a 4 e -10 °C le concentrazioni risultavano stabili almeno per quattro mesi. Entro le 24 ore non si rilevava alcuna differenza a prescindere da volume di campione e differenza di temperatura (-10, 4 °C o temperatura ambiente). Studi sulla morfina nelle urine [25] hanno dimostrato che la diminuzione di concentrazione era minima dopo 12 mesi di conservazione a -20 °C e che i campioni a pH più basso avevano decomposizione più lenta. Anche altri studi sugli oppiacei in plasma, sangue intero, urina indicano la temperatura di -20 °C idonea alla conservazione più lunga nel tempo [26, 27]. Per la cocaina si è dimostrato, ad esempio [28], che è relativamente stabile nella saliva congelata e ancor più stabile se questa è acidificata. Studi sulla stabilità di cocaina, benzoilecgonina, metamfetamina, amfetamina, morfina non coniugata, codeina e fenciclidina [29] valutata in un periodo di cinque anni in campioni di sangue prelevato con anticoagulante fluoruro di sodio e ossalato di potassio, dimostrarono che cocaina e benzoilecgonina avevano scarsa stabilità e la conferma quantitativa risultava affidabile solo se effettuata entro un limitato periodo di tempo, metamfetamina e fenciclidina erano abbastanza stabili e avevano un'alta probabilità di conferma ad analisi successive, mentre la morfina non coniugata mostrava ampie variazioni. Infatti all'inizio la concentrazione di morfina diminuiva, poi aumentava a distanza di 3 anni, e infine diminuiva a distanza di 4-5 anni. È importante quindi valutare bene il problema del trattamento preanalitico del campione e sarebbe anzi opportuno che il laboratorio che effettua analisi tossicologiche predisponesse una procedura standardizzata per il prelievo e la corretta conservazione dei campioni analitici. Non ultimo, per garantire la "autenticità" del campione biologico, devono essere specificate e osservate tutte le procedure per il prelievo e la successiva catena di custodia del campione stesso data la natura e la ricaduta anche forense dell'accertamento tossicologico.

Conclusioni

Negli ultimi anni è stata posta molta enfasi sulla qualità e affidabilità dei risultati delle analisi tossicologiche. Considerato che i risultati analitici possono avere un grande impatto sulle decisioni prese dalla giustizia criminale o civile, essi devono garantire il più

elevato grado di affidabilità. Ciò comporta il rafforzamento delle regole di buona pratica di laboratorio tramite l'uso di procedure standardizzate, di metodologie validate e il continuo confronto con programmi di controllo qualità interno ed esterno nell'ambito di sistemi di accreditamento dei laboratori [30]. I cambiamenti nel panorama dell'abuso e l'esperienza degli ultimi anni hanno dimostrato che molti laboratori hanno grande difficoltà con sostanze nuove o che capitano più raramente. Perciò, oltre alla necessità di programmi di controllo, è necessario anche allargare il numero delle sostanze da includere nei protocolli analitici valendosi della collaborazione e comunicazione tra laboratori nazionali ed internazionali, grazie anche all'aiuto di nuovi strumenti tecnologici come la comunicazione globale offerta da Internet.

Per quanto riguarda l'interpretazione del risultato, l'esperienza di tutti i giorni insegna che essa deve essere fatta con estrema cautela per molte ragioni. Tra queste possiamo citare che, ad esempio, spesso il dato è relativo ad una occasione soltanto. Possono inoltre esserci differenze che dipendono dal fluido biologico e non sempre si conoscono esattamente i rapporti tra sangue ed altri compartimenti del corpo (sangue/cervello, sangue/saliva, sangue/tessuti); le sostanze possono ridistribuirsi dopo la morte o essere soggette a decomposizione; infine, l'effetto di sostanze o combinazione di sostanze può essere diverso a seconda di sesso, razza, età, malattie, tolleranza. Attualmente, è oggetto di intensi studi il polimorfismo metabolico geneticamente determinato del citocromo P450 che costituisce una delle principali ragioni di variazione interindividuale nella risposta all'assunzione di particolari sostanze [6]. La strada della migliore conoscenza dei polimorfismi enzimatici permetterà di comprendere i meccanismi per cui, ad esempio, una intossicazione da destrometorfano, sostanza relativamente poco tossica, sia risultata letale in un soggetto con una carenza metabolica [1] e come possa risultare mortale anche una sola assunzione di sostanze come l'ecstasy [31]. Inoltre c'è ancora molto da esplorare sugli effetti della poliassunzione e sui fenomeni di sinergia che possono innescarsi e indurre effetti diversi e più pericolosi rispetto alle sostanze assunte separatamente.

A complicare i problemi di interpretazione intervengono anche altri fattori come la presenza di molecole simili per struttura a quelle d'abuso ma di uso farmacologico. Soprattutto per quanto riguarda l'interpretazione di reperti di amfetamina (AM) e metamfetamina (MA) può non essere facile la discriminazione tra abuso di amfetamine o legittima assunzione di un farmaco. Infatti si sa che AM e MA si possono formare metabolicamente dai farmaci come etilamfetamina, dimetilamfetamina, femcamina,

mefenorex, clobenzorex, fenproporex [7]. Sono stati effettuati studi sul metabolismo di questi farmaci per riuscire ad individuare metaboliti specifici utili per la differenziazione dalle sostanze d'abuso. Le principali vie metaboliche sono: idrossilazione seguita da metilazione di uno dei gruppi idrossi; N-demetilazione e/o N-alchilazione ad AM o MA; deaminazione ossidativa. Comunque, non tutti i metaboliti possono essere evidenziati in ogni caso. Purtroppo i composti di origine (*parent drug*), sono di solito rilevabili soltanto per alcune ore dopo l'ingestione e perciò non sono molto utili come composti target per la differenziazione. I corrispondenti idrossi metaboliti che non sono N-dealchilati e perciò specifici per la data sostanza, possono essere rilevati per un tempo molto più lungo. Comunque, nell'ultima fase dell'escrezione, AM o MA sono spesso i soli metaboliti che possono essere ritrovati nelle urine e in tali campioni non può essere differenziata l'assunzione di sostanze illecite da quella di farmaci. Ciò significa che la positività urinaria di AM o MA può anche derivare dall'assunzione di farmaci leciti e la differenziazione nella fase finale di escrezione non è sempre possibile a prescindere dal metodo usato. Forse la risposta a questo problema verrà dall'approfondimento degli studi sugli enantiomeri che potrebbe fornire la possibilità di distinguere le sostanze su base enantioselettiva.

Molto comunque resta ancora da fare per risolvere i tanti problemi anche analitici legati allo studio delle nuove sostanze d'abuso.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 10 luglio 2002.

BIBLIOGRAFIA

- Rokus A, de Zeeuw RA. Recent developments in analytical toxicology: for better or for worse. *Toxicol Lett* 1998;102-3:103-8.
- Christophersen AS. Amphetamine designer drugs-an overview and epidemiology. *Toxicol Lett* 2000;112-3:127-31.
- Shulgin A, Shulgin A. *Pihkal. A chemical love story*. Berkeley, CA: Transform Press; 1991.
- Harstra J, Franke JP, de Zeeuw RA. Computerized identification of toxic substances and their metabolites: GIT. *Labor-Med* 1995;18:272-9.
- Harstra J. *Computer aided identification of toxicologically relevant substances by means of multiple analytical methods*. PhD Thesis. University of Groningen, 1995.
- Maurer HH, Bickeboeller-Friedrich J, Kraemer T, Peters FT. Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs (Ecstasy). *Toxicol Lett* 2000;112-3:133-42.
- Kraemer T, Maurer HH. Determination of amphetamine, metamphetamine and amphetamine-derived designer drugs or medicaments in blood and urine. *J Chrom B* 1998;713:163-87.
- Mancinelli R, Gentili S, Guiducci MS, Macchia T. Simple and reliable high-performance liquid chromatography fluorimetric procedure for the determination of amphetamine-derived designer-drugs. *J Chrom B* 1999;735:243-53.
- De Zeeuw RA. Drug screening in biological fluids. The need for a systematic toxicological approach. *J Chrom B* 1997;689:71-9.
- De Zeeuw RA, Franke JP, Van Halem M, Schaapman S, Logawa E, Siregar CJP. TLC under tropical conditions: impact of high temperature and high humidities on screening systems for analytical toxicology. *J Chrom* 1994;664:263-70.
- Mikio Yashiki, Thoru Kojima, Tetsui Miyazaki, Nobuyuki Nagasawa, Yasumasa Iwasaki, Kenji Hara. Detection of amphetamines in urine using head space-solid phase micro extraction and chemical ionization selected ion monitoring. *Forensic Sci Intern* 1995;76:169-77.
- Moeller MR, Steinmeyer S, Kraemer T. Determination of drugs of abuse in blood. *J Chrom B* 1998;713:91-109.
- Spiehler Vina. Hair analysis by immunological methods from the beginning to 2000. *Forensic Sci Intern* 2000;107(1-3):249-59.
- Wennig R. Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Sci Intern* 2000;107(1-3):5-12.
- Kidwell DA, Holland JC, Athanaselis S. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chrom B* 1998;713:111-35.
- Taggi F, Macchia T, Mancinelli R, Dracos A, Martinangeli A, Avico U. Alcol ed incidenti stradali. Aspetti epidemiologici e problemi di rilevazione. *Alcolologia* 1989;1(3):207-15.
- Macchia T, Mancinelli R, Dell'Utri A, Gentili S, Guiducci M, Simeoni MT, Avico U, Maggio A, Gesumundo C, Merli F, Cotichini R, Fondi G, De Martino A, Dominici R, Taggi F. Quantificazione dell'alcolemia per studi epidemiologici nella prevenzione degli incidenti stradali. *Boll Med Ital Trasporti* 1991;2:5-19.
- Mancinelli R. Determinazione diretta e indiretta dell'alcolemia: considerazioni metodologiche e strumentali nell'analisi di diversi fluidi biologici. In: Avico U, Macchia T, Dell'Utri A, Mancinelli R. *La droga e le tossicodipendenze. Aspetti normativi, sociali, sanitari, diagnostici e terapeutici*. Milano: Clas International; 1992.
- Verstraete A, Puddu M. *D4 evaluation of different roadside drug tests*. Brussels: European Commission; 2000. (Transport 4th RTD framework programme. Project Profile: ROSITA)
- Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs final guidelines; Notice. *USA Federal Register* 1988;(53):11978.
- Macchia T, Mancinelli R, Gentili S, Dell'Utri A, Guiducci MS, Fondi G, Taggi F, Avico U. Confronto tra AED3, ADX, e RANDOM 120 per il dosaggio dell'etanolo nei liquidi biologici. *Ligand Quart* 1992;3:20-7.
- Macchia T, Mancinelli R, Gentili S, Lugaresi EC, Raponi A, Taggi F. Ethanol in biological fluid: HS-GC measurement. *J Anal Toxicol* 1995;19(4):241-6.
- Golding Fraga S, Diaz-Flores Estevez J, Diaz Romero C. Stability of cannabinoids in urine in three storage temperature. *Ann Clin Lab Sci* 1998;28(3):160-2.
- Johnson JR, Jennison TA, Peat MA, Foltz RL. Stability of delta 9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxyTHC and 11-nor-9-carboxy-THC in blood and plasma. *J Anal Toxicol* 1984;8(5):202-4.
- Chang BL, Huang MK, Tsai YY. Total morphine stability in urine specimens stored under various conditions. *J Anal Toxicol* 2000;24(6):442-7.

26. Rop PP, Grimaldi F, Burle J, De Saint Leger MN, Viala A. Determination of 6-monoacetylmorphine and morphine in plasma, whole blood and urine using HPLC with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994;661(2):245-53.
27. Milne RW, Nation RL, Reynold GD, Somogyi AA, Van Crugten JT. HPLC determination of morphine and its 3-6-glucoronide metabolites: improvement to the method and application to stability studies. *J Chromatogr* 1991;565(1-2):457-64.
28. Cone EJ, Menchen SL. Stability of cocaine in saliva. *Clin Chem* 1988;34(7):1508.
29. Giorgi SN, Meeker JE. A 5-years stability study of common illicit drugs in blood. *J Anal Toxicol* 1995;19(6):392-8.
30. Ferrara SD, Tedeschi L, Frison G, Brusini G. Quality control in toxicological analysis. *J Chrom B* 1998;713:227-43.
31. Parr MJ, Low HM, Botterill P. Hyponatraemia and death after "ecstasy" ingestion. *Med J Aust* 1997;166(3):136-7.