COCAINA
4.2

LA DIAGNOSI LABORATORISTICA: ASPETTI TECNICI

Teodora Macchia, Stefano Gentili

Dipartimento del Farmaco- Istituto Superiore di Sanità

In campo sanitario, il ruolo del laboratorio nell'analisi delle sostanze d'abuso riveste una particolare importanza nell'ambito della diagnosi, della prognosi e del controllo del programma terapeutico.

In particolare, risulta spesso essenziale il coinvolgimento di uno specialista, il tossicologo clinico, per la specifica competenza in questo settore analitico. Le indagini tossicologiche non sono tecnicamente e concettualmente raffrontabili alle indagini chimico-cliniche ampiamente utilizzate in ambito sanitario. Per la corretta refertazione ed interpretazione del risultato sono infatti, indispensabili conoscenze sulla farmacocinetica e sul metabolismo delle singole sostanze anche in funzione dei risvolti legali, oltre che sanitari, che tali indagini possono comportare.

La diagnosi chimico-tossicologica dell'assunzione di sostanze è infatti, richiesta per molteplici problematiche ed il laboratorio riveste un ruolo e una responsabilità fondamentali che possono essere sostenute da professionisti con un'esperienza negli specifici accertamenti analitici. Esperienza circa la composizione quali-quantitativa degli stupefacenti immessi sul mercato della droga e circa la loro presenza nei campioni biologici di assuntori e dipendenti, presenza varia e imprevedibile.

Questo aspetto è particolarmente delicato nel caso delle poliassunzioni dove più sostanze sono presenti contemporaneamente e ciascuna, probabilisticamente, a livelli di concentrazione al di sotto dei cut-off comunemente utilizzati nei metodi immunochimici di screening. Inoltre, l'ingresso nel consumo di nuove sostanze, prevalentemente di sintesi, ha una concreta possibilità che siano presenti sostanze e metaboliti per i quali le consuete procedure di accertamento risultano "cieche", pertanto inefficaci. Questa eventualità è da considerare quando il laboratorio è coinvolto nella diagnosi (ad esempio in medicina d'urgenza), nel monitoraggio terapeutico, negli accertamenti a fini epidemiologici o nei controlli per finalità amministrative e legali.

Nel seguito, le problematiche sopra accennnate verranno sviluppate in riferimento alla cocaina, oggetto del presente volume.

Alcune note sono necessarie alla comprensione di quanto verrà nel seguito trattato.

Cenni sul Metabolismo

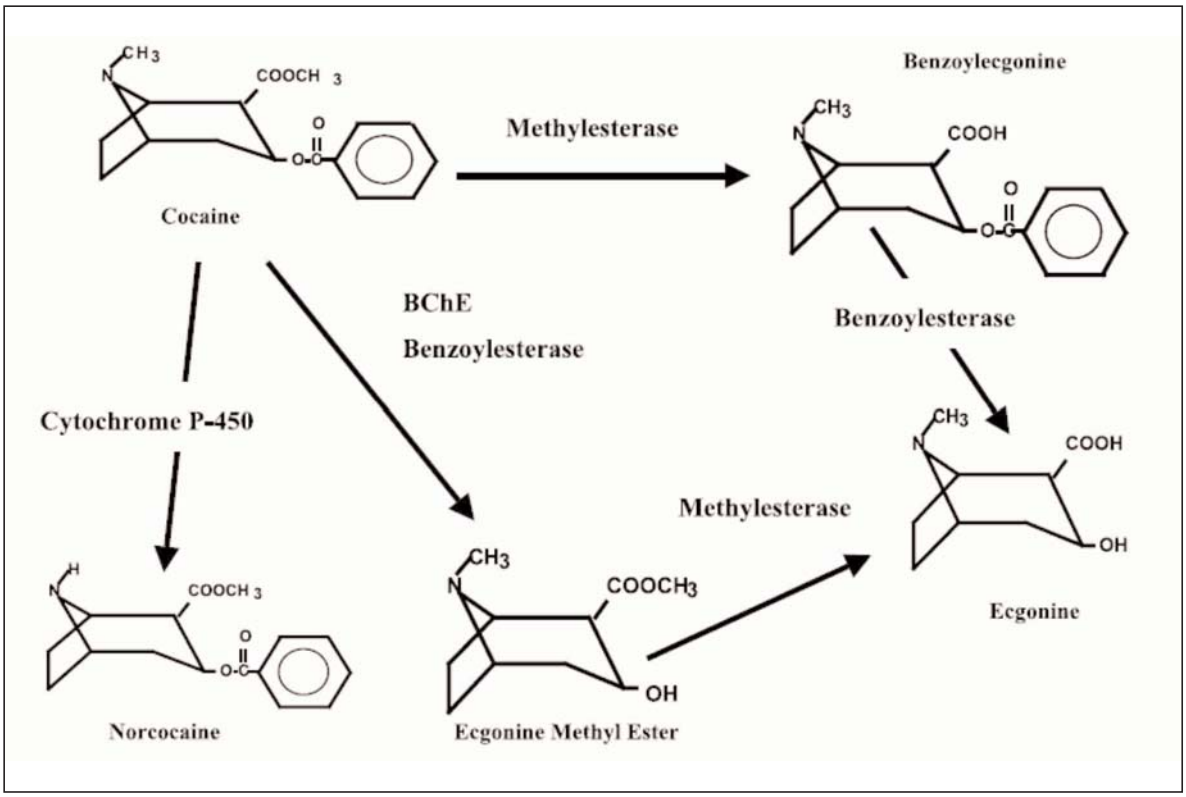
La cocaina è un estere della ecgonina ed è caratterizzata da una parte idrofila sita sull'atomo di azoto (N) in posizione 8 (azoto amminico terziario con caratteristiche basiche) ed una parte idrofoba localizzata sull'anello aromatico periferico.

L'anello aromatico è legato con un legame estereo al resto della molecola, all'anello piperidinico nella conformazione più stabile "a sedia". La cocaina è un composto otticamente attivo; l'isomero levogiro è quello farmacologicamente attivo. La formula bruta è $C_{17}H_{21}NO_4$; il peso molecolare = 303, 36.

Una volta che la cocaina è stata assunta e assorbita dall'organismo, esterasi operano una prima idrolisi del gruppo metilico con produzione di benzoilecgonima (principale metabolita) e metanolo. Una seconda idrolisi trasforma la benzoilecgonina in ecgonina ed acido benzoico. Quest'ultimo viene poi trasformato in acido ippurico.

Nel metabolismo della cocaina il fegato ha attività maggiore del rene, dell'encefalo e del muscolo nell'idrolizzare cocaina e benzoilecgonina. La Figura 1 schematizza i principali percorsi metabolici della cocaina nell'organismo.

Fig. 1 Metabolismo della cocaina nell'uomo (da Bowman et al. 1999) [1]



La cocaina viene assorbita attraverso tutte le mucose e nel tratto gastrointestinale. Essendo un vasocostrittore, il suo assorbimento è in genere lento, ma può essere influenzato dall'assunzione combinata con altre sostanze (es. cannabis o alcol) e dalla via di assunzione che modula anche la distribuzione nei vari comparti. Metaboliti diversi vengono formati in condizioni particolari e sono rilevabili nei campioni biologici. È quanto avviene, ad esempio, per assunzione combinata di cocaina ed alcol. In questa condizione, che si verifica frequentemente nei consumatori, per transesterificazione della cocaina nel fegato in presenza di alcol, si forma un etil analogo della cocaina, la **Cocaetilene** (benzoilecgonina etil estere) con attività biologica sui neuroni dopaminergici simile alla cocaina. Un altro metabolita insolito si rileva nei campioni biologici a seguito del consumo di cocaina base, crack, per fumo. Si tratta della **Metilecgonidina**, agonista mu-

scarinico, e del suo metabolita (formato per esterasi) Ecgonidina. Questi due metaboliti sono considerati markers biologici per differenziare l'uso di cocaina per fumo rispetto alle altre vie di assunzione [2]. Elementi di base sulla farmacocinetica e sul metabolismo della cocaina sono essenziali per guidare la scelta della matrice biologica da utilizzare e la metodologia analitica più adatta in base alle finalità dell'accertamento ed all'utilizzo del dato di laboratorio.

La trattazione di tutti gli aspetti tecnici che influiscono direttamente o indirettamente sulla diagnosi laboratoristica sarebbe molto ampia. Considerato l'obiettivo del presente volume, focalizzeremo quindi l'attenzione su aspetti tecnici di particolare rilevanza.

Procedure e Tecniche Analitiche

Occorre prima di tutto tener presente che, rispetto alle analisi chimico-cliniche convenzionali, la determinazione di sostanze stupefacenti necessita di diverso approccio valutativo e di modifiche alle pratiche di laboratorio nelle diverse fasi della procedura: dalla scelta della matrice al prelievo del campione, alla sua conservazione, al trattamento pre-analitico, alle garanzie della catena di custodia, all'esame analitico propriamente detto ed al cuti-off utilizzato, al monitoraggio di qualità esterno e interno, alla formulazione e valutazione del dato analitico. I risultati di laboratorio sono il prodotto di processi articolati e complessi in cui tutte le fasi richiedono di essere mantenute nella migliore efficienza e monitorate con rigore perché possano essere attendibili e quindi utili. Questi requisiti, pur antieconomici in termini di tempo e di denaro, sono non solo necessari, ma indispensabili in quanto gli accertamenti sulle sostanze d'abuso sono utilizzati per scopi non esclusivamente sanitari.

Dato l'obiettivo del presente manuale, concentreremo l'attenzione all'ambito clinico.

Preparazione del campione

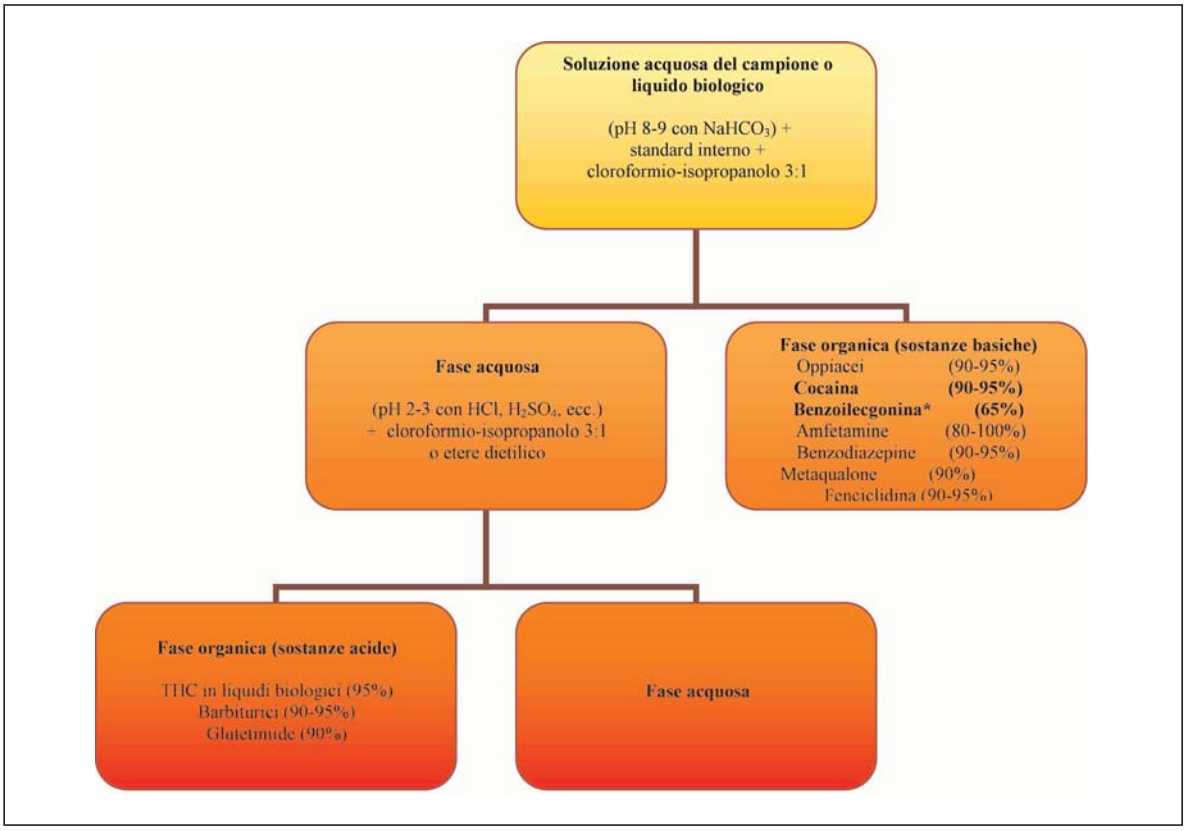
L'analisi strumentale per la determinazione delle sostanze d'abuso in matrici biologiche è preceduta, nelle gran parte dei casi, da un insieme di operazioni finalizzate all'isolamento dello xenobiotico dalla matrice. Vengono di seguito riportate le principali tecniche estrattive finalizzate allo scopo.

Estrazione in fase liquida

Per quanto riguarda i liquidi biologici, nei quali le principali sostanze di abuso si presentano in elevata percentuale in forma coniugata, è importante tenere presente la necessità di un'eventuale preventiva idrolisi (acida o alcalina, ad esempio con acido cloridrico o sodio idrossido a 50 °C per 30 min; enzimatica, ad esempio con glucuronidasi/solfatasi a pH 5 e 37 °C per 24 ore) per liberare la sostanza dal suo legame con l'acido glucuronico o con l'acido solforico che la rende idrosolubile e quindi non estraibile con solventi organici. La Figura 2 riporta il procedimento orientativo di un'estrazione liquido/liquido che comprende un elenco esemplificativo di sostanze estratte, con l'indicazione media della loro resa di estrazione.

Esistono rapporti volumetrici ottimali tra soluzione da estrarre e solvente estraente, da valutare volta per volta: generalmente essi sono nel rapporto di 1:1. È buona regola effettuare l'estrazione due o più volte con volumi inferiori di solvente. Allo stesso procedimento sarà sottoposta una soluzione dello standard della sostanza da dosare, in quanto, per un dosaggio accurato, è neces-

Figura 2. Linee orientative per un'estrazione liquido / liquido



*__La Benzoilecgonina__ per il suo carattere anfotero si estrae con difficoltà in queste condizioni. La sua estrazione è più efficace con sistemi solido/liquido.

sario trattare lo standard con lo stesso procedimento utilizzato per il campione. I componenti della frazione acida possono essere ulteriormente separati tra loro, sulla base delle caratteristiche di acidità, operando estrazioni successive a diversi pH (ad esempio pH 8-9 e pH 13-14).

Per i liquidi biologici, soprattutto quando i campioni vengono processati in GLC, può essere necessaria una purificazione più accurata ripetendo il ciclo di estrazioni.

Estrazione in fase solida

Mediante l'uso di colonnine cromatografiche, si vanno sempre più affermando metodi di estrazione solido/liquido soprattutto per i liquidi biologici, cui ci si riferisce negli esempi che seguono. Questi metodi sono certamente più vantaggiosi dell'estrazione liquido/liquido, perché permettono, in un solo passaggio, la purificazione del campione senza la necessità di estrazioni a diversi pH, impiegando minori quantità di campione e di solventi. Si evita, inoltre, la formazione di schiume, che si formano facilmente nel trattamento di campioni biologici per le elevate quantità di proteine presenti e che, comunque, comportano un abbassamento della resa di estrazione, dell'accuratezza e della riproducibilità del dosaggio. Sono disponibili diversi tipi di colonnine: per ognuno di essi è necessario mettere a punto le singole fasi del procedimento, per ottimizzare la resa dell'estrazione. Nella Tabella 1 si riportano, come esempio, una serie di indicazioni per l'estrazione della cocaina e metaboliti.

Tabella 1. Schema orientativo per l'estrazione solido/liquido di cocaina e metaboliti.

Sostanze: **cocaina, norcocaina, benzoilnorecgonina**	Sostanza: **benzoilecgonina**
Campione: siero, urina (acidificata con acido acetico 1%	Campione: urina (alcalinizzata a pH 9,5)
Colonnina: scambio cationico forte, condizionata con cloroformio/metanolo (50:50), metanolo ac. Acetico 1%	Colonnina: fase inversa (C18) condizionata con metanolo, acqua
Lavaggio: acido acetico 1%, acqua, metanolo	Lavaggio: acqua, metanolo
Eluizione: metanolo/tampone pH 10 (50:50)	Eluizione: cloroformio/metanolo (50:50)
Recupero: 99-100%	Recupero: 80-90%

L'estrazione in fase solida **(SPE)** è una tecnica di preparazione del campione largamente diffusa e utilizza dispositivi monouso contenenti sostanze assorbenti con particelle impaccate di varia porosità. Sono oggi disponibili numerosi materiali con diverse caratteristiche, ad es., di specificità, selettività, immunoaffinità. Gli analiti sono trasferiti sulla fase solida dove sono ritenuti e, successivamente, recuperati per eluizione attraverso un liquido, un fluido o desorbimento termico nella fase gassosa. Le sostanze nel campione biologico possono essere così isolate, concentrate, purificate (per semplificazione della matrice), e trasferite dalla complessa matrice biologica ad un diverso solvente o alla fase gassosa. I vantaggi di questa procedura sono tanti (basso costo, processare il campione richiede poco tempo, bassi volumi di solventi, procedure semplici, possibilità di automazione); ci sono però anche dei limiti. Tra questi, la non ottimale riproducibilità, i meccanismi di ritenzione possono influire sul recupero, limitata capacità di volume del campione. La selezione dei dispositivi riveste un aspetto importante nell'utilizzo della tecnica [3].

La microestrazione in fase solida **(SPME),** è una tecnica estrattiva tra le più recenti, che offre diversi vantaggi come semplicità e rapidità operativa. Questa metodica impiega un ago in silice fusa rivestito con un film di fase stazionaria di varia natura (fibra) che scorre all'interno di un ago di acciaio montato su un'apposita siringa.

La SPME può essere eseguita per immersione della fibra direttamente nella soluzione acquosa o, in caso di sostanze volatili o semivolatili, esponendo la fibra nello spazio di testa.

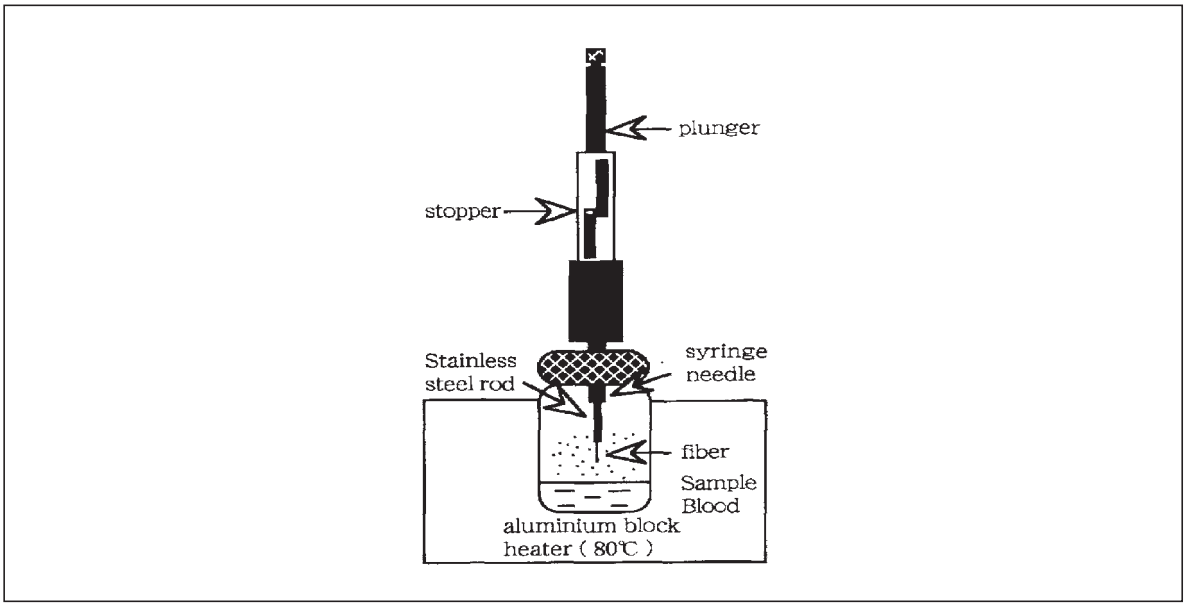
Le sostanze saranno quindi adsorbite in funzione della loro affinità per la fase stazionaria della fibra fino al raggiungimento dell'equilibrio con la matrice del campione. Il desorbimento termico degli analiti avviene esponendo la fibra direttamente nell'iniettore del gas cromatografo.

La Figura 3 riporta il principo della SPME utilizzata in spazio di testa (HS) in un'applicazione su campione di sangue.

La tecnica HS-SPME è più semplice e rapida rispetto ai metodi di estrazione convenzionali liquido-liquido (LLE) e solido-liquido (SPE). Il cromatogramma risulta molto più pulito ed il metodo analitico più sensibile per l'elevata capacità di adsorbimento delle sostanze in fase gassosa.

La tecnica HS-SPME, in gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) è stata, ed è sempre più spesso impiegata per la determinazione di molte molecole in diversi settori di applicazione; questa tecnica è stata applicata anche a sostanze utilizzate in ambito ricreazionale, compresa la cocaina. Una interessante e rapida applicazione sui capelli, (utilizzabile anche su plasma, urine, saliva e sudore) è stata messa a punto per finalità anche di screening presso il Dipartimento del Farmaco dell'Istituto Superiore di Sanità [5]. Data la possibilità di utilizzare questo metodo semplice e rapido su diverse matrici biologiche, e per la possibilità di

Figura 3: Schema di microestrazione in fase solida (SPME) in spazio di testa (HS). (da N. Nagasawa et al. 1996) [4].



utilizzo in ambito di screening colmando le attuali lacune dei metodi immunochimici, si ritiene utile riportarne le condizioni operative ed i parametri analitici-strumentali.

Preparazione del campione

[Capelli] Lavare i capelli per 5 minuti con acqua deionizzata e successivamente per 5 minuti con acetone in bagno ad ultrasuoni. Asciugare sotto flusso di azoto a temperatura ambiente e tagliare in segmenti di 3 millimetri circa.

[Urina] Non è necessario pre-trattamento del campione.

[Saliva, siero, plasma] Porre il 200 µl del campione in una provetta conica Falcon da 15 ml, aggiungere 5 µl di Standard Interno (MDPA 5 µg/ml), 10 µl di acido tricloroacetico al 40%. Centrifugare per 5 minuti a 2600 rpm, raccogliere il sopranatante.

[Sudore] Rimuovere cartoncino assorbente da dispositivo campionamento o cerotto di raccolta.

Procedura analitica

[Capelli] Porre 10 mg di capelli lavati, 5 µl di Standard Interno (MDPA 5 µg/ml) in una provetta di vetro a chiusura meccanica per spazio di testa da 20 ml contenente 200 µl di HCL 1M, chiudere ermeticamente e riscaldare per 60 minuti a 60°C in termostato. Dopo raffreddamento,

separare l'estratto e trasferirlo in una provetta in vetro a chiusura meccanica da 2 ml contenente 80 mg di carbonato di potassio (K_2CO_3). Chiudere ermeticamente la provetta ed esporre la fibra per l'adsorbimento a 90ºC per 5 minuti in blocco riscaldante. Introdurre la siringa nell'iniettore ed esporre la fibra per 5 minuti.

[Urina] Porre 200 µl di campione, 5 µl di Standard Interno (MDPA 5 µg/ml) in una provetta di vetro a chiusura meccanica da 2 ml contenente 80 mg di carbonato di potassio (K_2CO_3). Chiudere ermeticamente la provetta ed esporre la fibra per l'adsorbimento a 90ºC per 5 minuti in blocco riscaldante. Introdurre la siringa nell'iniettore ed esporre la fibra per 5 minuti.

[Saliva, siero, plasma] Porre il sopranatante raccolto in una provetta di vetro a chiusura meccanica da 2 ml contenente 80 mg di carbonato di potassio (K_2CO_3). Chiudere la provetta ed esporre la fibra per l'adsorbimento a 90ºC per 5 minuti in blocco riscaldante. Chiudere ermeticamente la provetta ed esporre la fibra per l'adsorbimento a 90ºC per 5 minuti in blocco riscaldante. Introdurre la siringa nell'iniettore ed esporre la fibra per 5 minuti.

[Sudore] Porre il cartoncino assorbente in una provetta di vetro a chiusura meccanica da 2 ml contenente 80 mg di carbonato di potassio (K_2CO_3), 5 µl di Standard Interno (MDPA 5 µg/ml). Chiudere ermeticamente la provetta ed esporre la fibra per l'adsorbimento a 90ºC per 5 minuti in blocco riscaldante. Introdurre la siringa nell'iniettore ed esporre la fibra per 5 minuti.

Parametri strumentali

Gas Cromatografo 6890 Plus, Mass Selective Detector 5973N (Agilent Technologies – Milano, Italia); colonna (5% PH ME Siloxane, film thickness 0,33 µm): lunghezza 12.5 m, ID 0.20 mm).
SPME Fiber Assembly 23 GA, 100 µm PDMS 57342-U

Temperatura della colonna	60°C (2 minuti isoterma) fino a 250°C (incremento 20°C/min) e 5 minuti isoterma finale
Temperatura della porta d'iniezione	250° C
Temperatura della sorgente ionica	230°C
Temperatura della linea di trasferimento	280°C
Flusso gas (elio)	1 ml/min
Desorbimento della fibra	250°C per 5 minuti nell'iniettore

Sostanze rilevate con questa procedura HS-SPME in GC/MS

Sostanze	*Tempi di ritenzione*	*Ioni*
MA	5.60	*58, 91, 77
MDMA	8.08	*58, 77, 135
MDE	8.36	*72, 135,44
MBDB	8.62	*72, 135,44
MDPA (I.S.)	8.88	*86, 44, 135
Ketamine	10.01	*180, 182, 209
Metadone	11.39	*72, 294, 91
Cocaina	11.73	*182, 82, 303

* Ione usato per la quantificazione

Tecniche analitiche e strumentali

Metodi di screening e metodi di conferma

Generalmente le analisi nei liquidi biologici comportano un primo stadio, cosiddetto di screening, e un'eventuale seconda analisi, specialmente nei casi di risultato positivo, di conferma con un metodo di secondo livello, comunque diverso, in genere basato sulla cromatografia preferibilmente accoppiata alla spettrometria di massa.

Usualmente per lo screening vengono utilizzate metodiche immunochimiche, in quanto dotate di caratteristiche quali elevata sensibilità, velocità di analisi, non necessità di pretrattamento del campione, possibilità di automazione. Ovviamente, se da una parte le elevate sensibilità escludono o riducono fortemente l'eventualità di falsi negativi, dall'altra l'evenienza di falsi positivi è molto verosimile, soprattutto per il principio su cui si basano questi metodi, cioè una reazione antigene-anticorpo che presenta spesso una specificità di gruppo. A causa, quindi, di queste possibili cross-reazioni, i risultati positivi necessitano di una conferma, mediante metodi diversi, altamente specifici, con limiti di rilevabilità generalmente inferiori al valore del cutoff utilizzato nello screening: tali caratteristiche sono proprie dei metodi cromatografici.

Le schede tecniche relative ai metodi immunochimici e cromatografici più utilizzati nell'analisi delle sostanze d'abuso in matrici biologiche sono riportate in appendice.

La Tabella 2 schematizza le condizioni sperimentali delle tecniche cromatografiche di base per l'analisi della cocaina e dei suoi metaboliti.

Gli R_f e i tempi di ritenzione riportati si devono ritenere puramente indicativi, in quanto la loro riproducibilità è fortemente influenzata dalle condizioni operative e contingenti. In alcuni casi vengono indicati il fattore di capacità K' o l'indice di ritenzione: entrambi, per le modalità con le quali sono calcolati, rendono più comparabili tra di loro i dati provenienti da diversi laboratori.

Per quanto riguarda gli standard interni utilizzabili in HPLC e GC, l'operatore è libero di scegliere le sostanze più idonee sulla base delle indicazioni degli Organismi internazionali, della letteratura scientifica, dell'esperienza personale e della disponibilità.

Utili indicazioni e soluzioni tecnico-analitiche per la determinazione della cocaina e metaboliti in diverse matrici biologiche con le più moderne tecniche cromatografiche sono contenute in numerosi lavori. La tabella 3 riporta quelli più significativi per le procedure di trattamento del campione, le condizioni analitiche, le performance, le matrici biologiche adoperate. In alcuni dei lavori citati sono stati operati confronti con metodi immunochimici di screening.

Tabella 2. Condizioni analitiche e strumentali per l'analisi di cocaina e suoi metaboliti in cromatografia di base.

Cromatografia su strato sottile

Lastra
Gel di silice con indicatore di fluorescenza

Sistemi solvente
A. cloroformio-diossano-etile acetato-ammoniaca (25:60:10:5)
B. metanolo-ammoniaca (100: 1,5)
C. cicloesano-toluene-dietilamina (75:15:10)

Rivelatori
Luce UV
Vapori di iodio
Reattivo iodoplatinico
Reattivo di Dragendorff

R_f (in percento)

Sostanza	Sistema A	Sistema B	Sistema C
Cocaina	81	59	56
Ecgonina	0	84	0
Metilecgonina	61	65	44
Benzoilecgonina	0	25	0
Cinnamoilcocaina	83	59	51
Tetracaina	63	56	25
Benzocaina	77	80	11
Lidocaina	77	69	40-55*
Procaina	61	55	8-16*

(*) Si forma una strisciata, non una macchia.

HPLC

Metodo A
Colonna: C_{18} (16 cm x 5 mmØ);
Solvente: metanolo/acqua/acido fosforicoL/n-esilamina (15:35:50:0,7):
Flusso: 2m:/min; Programma: isocratica; Rivelatore: UV 230 nm

Metodo B
Colonna: silice (12,5 cm x 4,9 mmØ);
Solvente: ammonio perclorato 0,01 M in metanolo (pH 6,7);
Flusso: 1 mL/ min; Programma: isocratica; Rivelatore: UV 230 nm

Standard intero
Lidocaina, procaina

Fattori di capacità

Sostanza	Metodo A	Metodo B
Procaina	0,0	1,9
Lignocaina	0,8	0,6
Cocaina	2,7	2,8
Cis-cinnamoilcocaina	6,3	—
Amilocaina	7,2	—
Butacaina	9,0	1,2
Trans-cinnamoilcocaina	10,6	----
Benzocaina	20,1	0,1

Gas-cromatografia

Condizioni operative
Colonna: impaccata (SE-30; OV-1; OV-17); Gas di trasporto: azoto (30 L/min); Rivelatore: FID; Temperatura: iniettore 220 °C; colonna 220 °C; rivelatore 300 °C; Derivatizzante: Trimetilsililacetamide

Colonna: capillare (12,5 m x 0,32 mmØ) (SE-30; OV-17); Gas di Trasporto: elio (50 mL/sec); Rivelatore: NPD (2 mL/min H_2; 80 mL/min aria); temp. Iniettore 180°C; 110 °C; colonna: 1 min a 110 °C a 10 °C/ min fino a 280 °C, mantenuto per 7 min; rivelatore 300 °C

Standard interno
Butilantrachinone, tetrafeniletilene

Fattori di capacità

Sostanza	Colonna capillare SE-30	Colonna capillare OV-17
Benzocaina	5,0	7,3
Lidocaina	8,6	9,8
Cocaina	11,8	13,7
Tetracaina	12,1	13,4
Bupivacaina	12,5	13,6
Benzoilecgonina	14,8	17,1
Dibucaina	16,0	17,3

Assorbimento ottico UV

La cocaina assorbe nell'UV ed è quindi possibile usare questa tecnica per le soluzioni purificate. I massimi di assorbimento e gli assorbimenti specifici (E1%) e molari (_), riportati in Tabella, riferiscono a soluzioni acide (HCl 0,1 N).
Contrariamente a quanto ancora riportato in alcuni testi, l'ecgonina non contenendo sistemi insaturi coniugati, è del tutto trasparente alla luce UV.

Sostanza	_ max (nm)	_	E1%
Cocaina	233	13.000	383
	274	1.130	33
Benzoilecgonina	234	12.500	376
Benzocaina (*)	272	1.500	90
	278	1.400	85
Lidocaina	263	475	19
	272	400	17
Procaina	279	2.500	100

(*) In soluzione alcalina presenta un unico massimo a 285 nm (E1% = 930)

In letteratura sono stati proposti altri metodi meno usuali per la determinazione di cocaina e metaboliti, soprattutto nella saliva: la voltammetria [18], e la fosforimetria [19].

Tabella 3. Tecniche, matrici biologiche e sensibilità analitica di metodi cromatografici per la determinazione di cocaina e suoi metaboliti.

Tecnica	Matrice	Sensibilità		Analita	Bibliografia
HPLC-DAD	urine	µg/mL	0.08 0.15	cocaina benzoilecgonina	M.R.Brunetto e al., 2005 [6]
HPLC-UV	siero urine	µg/mL	0.5 1.0	benzoilecgonina benzoilecgonina	M.W. Linder e al., 2000 [7]
LC-MS-MS	capelli	LOQ pg/mg	10 16	cocaina benzoilecgonina	R.Kronstrand e al., 2004 [8]
GC-MS HS-SPME	saliva	LOQ ng/mL	5	cocaina	M.Yonamine e al, 2003 [9]
GC-MS	saliva	LOQ µg/L	2.5 2.5	cocaina benzoilecgonina	E.Kolbrich e al., 2003 [10]
GC-MS	siero saliva	LOD µg/L	8 20	cocaina, benzoilecgonina cocaina, benzoilecgonina	S.W.Toennes e al., 2005 [11]
GC-MS	urine	LOD ng/mL	1 2	benz.ecgonina, ecgonina metil estere, norcocaina cocaina, cocaetilene	R.De La Torre e al., 1995 [12]
GC-MS	sangue	LOD ng/mL	10	metilecgonidina, ecgonidina	K.B. Scheidweiler e al., 2003 [13]
GC-MS HS-SPME	capelli	LOQ ng/mg	1	cocaina	S.Gentili e al., 2004 [5]
GC-MS SPME	capelli	LOD ng/mg	0.1 0.5	cocaina, cocaetilene benzoilecgonina	F.Crossi Pereira deToledo e al., 2003 [14]
GC-MS SPME	capelli	LLOQ ng/mg	0.4	cocaina, cocaetilene	A.M.Bermejo e al., 2006 [15]
GC-PICI-MS	sudore	LLOQ ng/cerotto o ng/mL estr.	4 1.6	cocaina, benzoilecgonina, ecgonina metil estere	D.E. Moody e al., 2004 [16]
LC-MS	meconio	LOQ µg/g	0.0045 0.0013	p-idrossi benzoilecgonina* m-idrossi benzoilecgonina*	S.Pichini e al., 2005 [17]

* Si formano nel metabolismo fetale della cocaina e sono per questo considerate indicatori dell'esposizione intrauterina alla sostanza.
LOD (Limit of Detection) = Limite di rilevabilità; LOQ (Limit of Quantification) = Limite di quantificazione.

Matrici biologiche e interpretazione del risultato analitico

Per una corretta interpretazione, non basta la pur necessaria "lettura" del risultato sulla base della precisione e accuratezza del metodo e dell'esperienza dell'analista. Per l'analisi di liquidi

biologici la situazione è leggermente più complessa. Infatti, prescindendo dalle condizioni individuali, molti sono i fattori che influenzano il risultato. Tra questi: la quantità e lo schema metabolico della sostanza assunta; la frequenza dell'uso; il tempo intercorso tra il prelievo e l'ultima assunzione; la sensibilità della metodica e la scelta del cutoff; il tipo di matrice biologica esaminata, la concomitante assunzione di più sostanze, la presenza di sostanze o condizioni interferenti.

Un risultato positivo implica solamente che il soggetto ha assunto la sostanza, ma non fornisce altre informazioni sulla dose, sul momento di assunzione, sulle modalità di uso o abuso.

Ci si trova perciò di fronte a questo tipo di quesiti:

– il soggetto assume la sostanza in seguito a prescrizione medica?
– il soggetto assume la sostanza cronicamente o solo saltuariamente?
– il soggetto è dipendente da tale sostanza?
– la metodica è sufficientemente sensibile e/o il cut-off è stato scelto oculatamente?
– il soggetto non ha mai assunto la sostanza?
– il soggetto assume la sostanza saltuariamente, ma non l'ha assunta recentemente?
– il soggetto, in previsione dell'analisi, ha diluito, adulterato o scambiato le urine?

Questo punto è importante perché implica una serie di considerazioni sulle modalità e condizioni di prelievo del campione e sulla definizione di parametri obiettivi, quali temperatura, pH peso specifico, che possano escludere una sofisticazione o sostituzione delle urine. Esistono diverse sostanze che, aggiunte al campione, possono renderlo negativo, soprattutto a un'analisi con metodi immunochimici: cloruro, bicarbonato, ipoclorito di sodio, succo di limone, detergenti liquidi, acqua ossigenata. Per la facilità con cui tali "manomissioni" possono essere ope-

Tabella 4. Esito ed interpretazioni del risultato di un test in campioni biologici

Esito del test	Significato chimico	Significato clinico
Positivo	Il composto è presente nel liquido biologico	Il composto è stato assunto, ma non se ne conoscono le modalità
Negativo	Il composto non è presente	Il composto non è stato assunto: - mai - in dose e/o con frequenza - sufficiente - in un periodo di tempo - sufficiente prima del prelievo
Falso positivo Risultato positivo in un liquido biologico che non contiene la sostanza	Il risultato è positivo per: - cut off troppo basso - errore nella procedura analitica	Il risultato positivo è attribuibile: - fisiologicamente a sostanze normalmente presenti nello organismo - farmacologicamente alla presenza di un'altra sostanza più o meno analoga
Falso negativo Risultato negativo in un liquido biologico che contiene la sostanza	Il risultato è negativo per: - cut off troppo alto - sensibilità non sufficiente - errore nella procedura analitica	Il risultato è negativo per: - diluizione delle urine per forte ingestione di liquidi - sofisticazione delle urine

rate, non è superfluo sottolineare la necessità di un'adeguata catena di custodia che inizi già dal momento del prelievo.

Nella Tabella 4 vengono schematicamente riportate alcune possibili interpretazioni del risultato di una'analisi in liquidi biologici dal punto di vista chimico o da quello clinico.

È noto che alcune sostanze e farmaci possono interferire con i test immunochimici dando un esito falsamente positivo per la sostanza ricercata. I metodi cromatografici metterebbero al riparo da questi inconvenienti. Diversa è la questione se la sostanza, nello specifico la cocaina, viene utilizzata non a scopo di abuso, ma somministrata per finalità diagnostiche. È il caso del "test alla cocaina" per la diagnosi della sindrome di Horner. Una soluzione di cocaina al 4-10% viene utilizzata per uso topico oftalmico. Con gli usuali cutoff SAMHSA per lo screening e la conferma, nel paziente la sostanza, il metabolita, è rilevata nelle urine sino a 2 giorni dopo la somministrazione [20], risultando (criticamente per le possibili conseguenze) in una positività che nulla ha a che fare con l'uso voluttuario.

Le analisi tossicologiche si avvalgono di diverse matrici biologiche che da sole, o in abbinamento tra loro, consentono di esprimere una diagnostica appropriata alle diverse finalità per le quali è richiesta. Va subito precisato che il sangue (considerato un "tessuto" più che un fluido) rappresenta ancora oggi la matrice di elezione per rilevare l'attualità d'uso. Questo aspetto è fondamentale soprattutto negli accertamenti per intossicazione acuta e per la valutazione dell'impairement del soggetto.

Ciascuna matrice biologica presenta vantaggi e limiti, la sua idoneità risponde a criteri di finalizzazione dell'indagine, alle caratteristiche di farmacocinetica delle sostanze, alle metodologie analitiche da adoperare, alla praticabilità del prelievo nel contesto operativo del momento.

Nella Tabella 5 vengono sintetizzate peculiarità e limiti delle matrici biologiche più utilizzate al difuori del sangue.

Tabella 5. Caratteristiche delle principali matrici biologiche utilizzate oltre al sangue.

• Caratteristiche	urine	saliva	sudore	capelli
• Finestra rilevazione	2-3 giorni	poche ore	1 settimana	mesi/anni
• Tecnica analitica pr.	immunochim. + GC/MS	GC/MS + immun	GC/MS	GC/MS
• Durata analisi	+ o +++	+++	+++	++++
• Costo	+ o +++	+++	+++	++++
• Tipo di misura	incremento	incremento	cumulativo	cumulativo
• Adulterazione	possibile	difficile	difficile	+ difficile
• Conservazione	- 20 °C	- 20 °C	- 20 °C	T. amb.
• Prelievo	invasivo	non-invasivo	non-invasivo	non-invasivo
• Analiti principali	metaboliti	sost. madre	sost. madre	sost. madre
• Conc.nella matrice	elevata	bassa	bassa	bassa

Urina

La possibilità di ottenere più facilmente un campione di urina, in consistente quantità, rende questa matrice ampiamente utilizzata nello screening per ogni finalità. In ambito clinico, la analisi tossicologica in urine riguarda l'identificazione della sostanza, prevalentemente dei metaboliti, più che la quantificazione la quale risente di notevole variabilità inter- ed intra-individuale.

A livello di screening, infatti, il valore quantitativo di per sé non è significativo al fine di determinare l'epoca di assunzione, la dose assunta, il grado di dipendenza e di performance del soggetto, l'intensità della cura necessaria, il rispetto del contratto terapeutico durante il trattamento.

L'interpretazione di un test urinario deve tener conto di vari fattori, non ultimi i tempi di rilevabilità della sostanza e dei suoi metaboliti.

I metaboliti della cocaina vengono eliminati con diversa rapidità nelle urine, ma sono tutti generalmente escreti entro due giorni dall'ultima assunzione. Dopo tale periodo, non si rilevano tracce urinarie. La finestra di rilevabilità varia anche in funzione della via di assunzione della cocaina, dall'abitudine assuntiva (la quantità di metaboliti escreti aumenta anche del 50% nella condizione di assunzione cronica), dalle caratteristiche dei metodi utilizzati per lo screening e la conferma (in particolare dei loro cutoff), dall'associazione con altre sostanze, dalle caratteristiche del campione esaminato (la quota escreta di sostanza e metaboliti è pH dipendente, ad eccezione della benzoilecgonina che è una molecola anfotera). Una dose di 20 mg di cocaina per via endovenosa può essere rilevata al massimo fino ad 1,5 giorni. Dosi di strada, assunte per altra via, sono rilevabili sino ad 1 settimana; dosi molto elevate sino a 3 settimane [21].

La concentrazione di cocaina e metaboliti varia in termini quantitativi, e talvolta qualitativi, a seconda della via di assunzione per differenze nell'assorbimento, nel metabolismo e nell'escrezione. Tali differenze si possono riflettere nei risultati dell'analisi urinaria. Dopo la somministrazione di singole dosi bioequivalenti di cocaina per via endovenosa, intranasale e per fumo, la cocaina si presenta con il suo picco nel primo campione raccolto entro 1 ora e scompare (al di sotto del limite di rilevazione pari a 1 ng/mL) entro 24 ore. La benzoilecgonina risulta il metabolita a più elevata concentrazione e rappresenta il 39%, 30% e 16% della dose assunta rispettivamente con le tre diverse modalità per le quali la somma di ecgonina metil estere e di 6 metaboliti minori corrisponde, rispettivamente, al 18%, 15% ed 8%. La anidroecgonina metil estere è presente in tracce, 0.02%, nelle urine a seguito di assunzione per fumo [22]. Le analisi sono state effettuate con un metodo immunochimico su TDx ed un metodo gas cromatografico accoppiato alla spettrometria di massa con un LOD (limite di rilevazione) pari a 1ng/mL. Sono state inoltre rilevate Norcocaina (attiva nella epatotossicità cocaina-mediata) e Cocaetilene formata per metabolismo epatico a seguito di assunzione combinata cocaina-alcol. Questa combinazione produce un incremento della concentrazione di cocaina nel sangue e nel cervello, inibisce la produzione di benzoilecgonina ed ecgonina metil estere, si associa ad un significativo incremento della concentrazione di Norcocaina. L'interazione con etanolo incrementa quindi l'attività e la tossicità della cocaina [23]. Queste osservazioni sottolineano ancora una volta come il dato quantitativo urinario sia influenzato da un insieme di variabili, oltre che dalla dose assunta, e come sia opportuno abbinare alla determinazione urinaria della cocaina un'analisi alcolemica.

Anche l'abitudine assuntiva può influenzare il dato di laboratorio. Pochi studi riportano dati di laboratorio in urine di assuntori pesanti. Sono quindi particolarmente interessanti i risultati ottenuti in uno studio su assuntori cronici in un periodo mirato di sospensione della cocaina

[24]. Le indicazioni emerse sono utili per interpretare correttamente il risultato analitico.

Con il metodo semi-quantitativo FPIA, cutoff in equivalenti di benzoilecgonina < 300 ng/mL, dopo 24, 48 e 72 ore la benzoilecgonina si riduceva, rispettivamente, al 33%, 8% e 4%. Il primo campione negativo si otteneva, in media, dopo 43.6 ± 17.1 ore. Nel 70% dei casi le urine erano positive almeno una volta dopo essere risultate negative e la positività era rilevabile in media per 4,5 giorni, cioè ben oltre le 48 ore dell'attesa finestra di rilevazione [25]. Il tempo di rilevabilità è ulteriormente allungato se si normalizza per la creatinina (cutoff di 300 ng di equivalenti benzoilecgonina/mg di creatinina); in media si passa da 81 ore (34-162) ad 88.4 ore (35.6-235). Questo accorgimento può sopperire ad alcuni limiti dello screening urinario. Infatti, la diagnosi d'uso di cocaina basata su analisi delle urine può perdere molti casi per la breve emivita di eliminazione delle sostanze e per la velocità con cui risultano sotto soglia. A tale riguardo, per estendere il tempo medio di rilevabilità, è stato proposto il sistema di abbassare le concentrazioni di cutoff, cosa però che non sempre è corretta ed opportuna soprattutto per risvolti amministrativi e legali dell'accertamento. Nel caso in cui l'accertamento nelle urine tenda a verificare l'abitudine assuntiva del paziente, più che lo stato attuale di intossicazione, è utile ricorrere all'utilizzo della matrice cheratinica, anche con metodo immunochimico. L'analisi del capello per la cocaina è altamente sensibile e specifico nell'identificarne l'uso pregresso; risulta utile in una situazione di sospetto (es. ricovero per problemi cardiocircolatori) ma di risultato urinario negativo, o per confermare un self-report d'uso[26].

I risultati falsi negativi

Un aspetto tecnico importante della diagnostica di laboratorio è rappresentato dall'individuazione e gestione dei falsi negativi. La delicatezza della questione è facilmente intuibile se consideriamo lo sviluppo del drug testing in urine per finalità sempre più ampie (doping compreso) ed il parallelo fiorire di un mercato di adulteranti, prodotti di sostituzione e paraphernalia per "alterare" il campione urinario, indirettamente "sabotare" la fase analitica e produrre un risul-

Figura 4

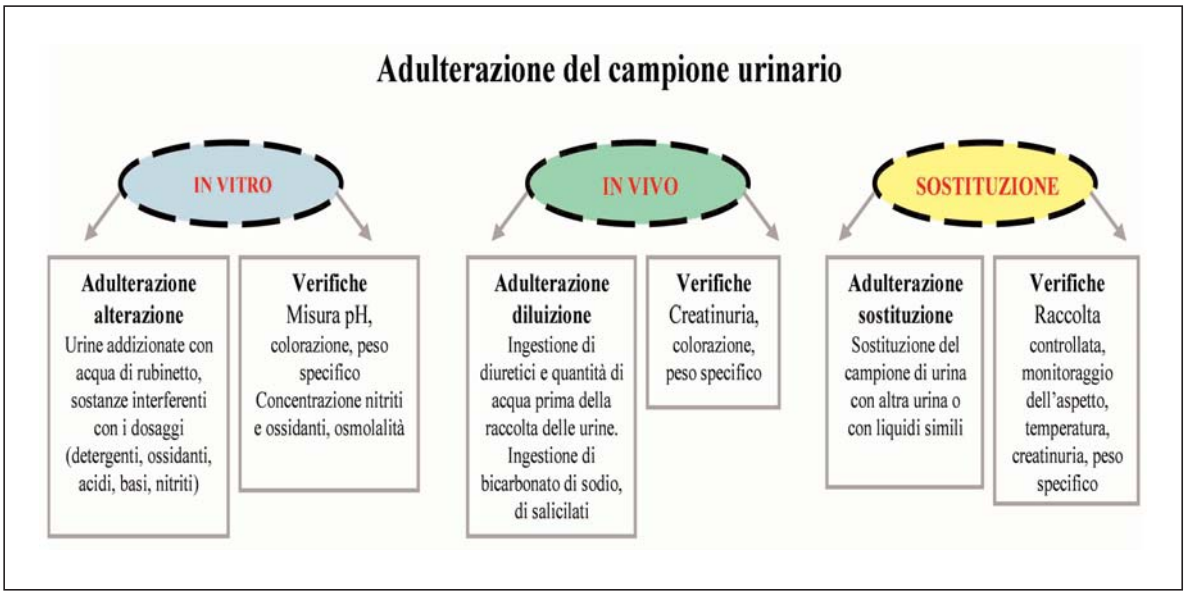


Tabella 6. Secondo le indicazioni SAMHSA, un campione di urina è da considerare:

- diluito se	creatinina	< 20 mg/dL
	peso specifico	< 1.003
- sostituito se	creatinina	< 5 mg/dL
	peso specifico	< 1.001 o > 1.020
- adulterato se	pH	< 3 o > 11
	conc. Nitriti	> 500 µg/mL

tato negativo il quale, tranne rare eccezioni, esclude la possibilità che il campione sia riesaminato. Si comprende, di conseguenza, come l'individuazione in fase preanalitica di campioni alterati o contraffatti rappresenti un aspetto essenziale per l'attendibilità/utilità della diagnosi di laboratorio.

A tale scopo, ci sono pratiche dettate dal buon senso (come la concentrazione per evaporazione naturale dei campioni sospetti), suggerite da linee guida (come la determinazione della creatinina urinaria), promosse da associazioni scientifiche e organismi internazionali [27, 28]. Nella Tabella 6 sono indicate le più diffuse modalità di contraffazione del campione, le possibili verifiche da effettuare per la sua individuazione ed i livelli decisionali di alcuni parametri secondo le indicazioni SAMHSA.

La Figura 4 riporta le principali condizioni che alterano il campione urinario e le più diffuse verifiche per individuare un campione non idoneo.

L'adulterazione delle urine può essere ottenuta anche con l'aggiunta di sostanze biologicamente attive come le proteasi. Si tratta di enzimi che agiscono su amminoacidi o gruppi funzionali o su proprietà fisiche. Un esempio è la papaina, ottenuta dal lattice della papaia, che può idrolizzare esteri e ammidi. Il suo potenziale d'uso, come adulterante, è elevato in funzione della sua stabilità anche a temperatura ambiente, perché non produce anomalie nell'aspetto del campione, è poco costosa, di facile reperibilità. Tuttavia, uno studio accurato [29], rileva che la papaina ha forti effetti distorcenti su THC e benzodiazepine, ma non sulla cocaina.

In letteratura vengono suggerite diverse strategie di approccio al problema dei falsi negativi. Ad esempio, l'abbassamento dei cutoff di screening e di conferma. Verso questa soluzione è orientato il DHHS (Department of Human and Health Services) che, implementando le regole indicate nelle "Mandatory Guidelines for Federal Register Workplace Drug Testing Program", nel Draft 4 di revisione delle linee guida, reso noto nel settembre 2001, propone di abbassare da 300 a 150 ng/mL (cocaina metabolita) il cutoff dello screening ed a 100 ng/mL (benzoilecgonina) quello per la conferma della cocaina nelle urine. Infine, l'aplicazione dell'approccio sviluppato da E.J.Cone [30], basato sui rapporti tra risposte all'analisi immunologica con campioni drug-free, è risultato efficace nell'individuare campioni falsi negativi e aumentare di circa il 50% la positività del metabolita della cocaina nelle urine. Questo approccio è risultato soddisfacente per distinguere falsi negativi da negativi veri ed incrementare la rilevazione di campioni positivi.

L'applicabilità dell'approccio attraverso l'abbassamento dei livelli dei cutoff è stata studiata valutando la performance analitica e l'accuratezza di tre sistemi immunoenzimatici (EMIT, EIA, FPIA) nelle nuove condizioni [31]. L'importanza di questa valutazione è facilmente comprensi-

bile poiché in alcune popolazioni di pazienti concentrazioni "clinicamente significative" di sostanze nelle urine possono non essere rilevate con i cutoff SAMHSA in uso corrente. Le precisioni dei tre sistemi commerciali valutati nello studio risultavano adeguate a rilevare le sostanze sotto i cutoff SAMHSA.

Importante sottolineare che l'applicazione di questo criterio consentirebbe un uso più efficiente delle risorse per i tests di conferma ed una migliore rilevazione dell'uso di sostanze.

La stabilità

Un'altra questione importante riguarda la **stabilità** della cocaina e metaboliti nei campioni biologici dopo il prelievo.

La conoscenza di questa caratteristica risulta critica per un'appropriata interpretazione dei risultati analitici ed è indispensabile per la validazione delle tecniche analitiche in matrice biologica [32]. Ciò è tanto più vero se si considera che i campioni non sempre vengono analizzati subito dopo il prelievo.

Per quanto riguarda la cocaina e i suoi metaboliti, diversi lavori riportano dati sulla stabilità durante la conservazione dei campioni. Sono anche state proposte procedure per verificare omogeneità e stabilità di alcuni analiti tenendo soprattutto in considerazione le esigenze dei controlli antidoping [33]. È opportuno considerare le caratteristiche di stabilità delle molecole anche in fase di estrazione del campione. Ad es. nel trattamento del campione di capelli, la cocaina viene idrolizzata chimicamente nell'ambiente basico prevalentemente utilizzato nella miscela di estrazione e facendo rilevare ecgonina metil estere. In capelli di assuntori, il rapporto della cocaina con la benzoilecgonina è risultato intorno a 3,5 e con la ecgonina metil estere di 1:50. Per preservare la cocaina, ma anche altre sostanze, nella miscela di estrazione da processare in ELISA o GC-MS, viene suggerita un'estrazione con aggiunta di metanolo-acido tricloroacetico (TCA) (9:1) (2 ml) [34]. È interessante sottolineare come a fronte della sua "delicatezza" nell'analisi del capello la cocaina risulta, in vitro, essere la sostanza con maggiore affinità per la melanina rispetto alle 20 sostanze d'abuso più diffuse [35]. Uno studio sulla stabilità in vitro di cocaina, benzoilecgonina, ecgonina metil estere o ecgonina in sangue fresco intero e plasma (0.25% di potassio fluoruro) fornisce utili indicazioni [36]. Le concentrazioni decrescono sensibilmente con l'aumentare del tempo di conservazione e della temperatura; la ecgonina è la sola stabile a temperatura ambiente, l'idrolisi della cocaina in ecgonina metil estere si verifica molto più rapidamente nel plasma che nel sangue intero. In ogni caso, la presenza di prodotti di idrolisi della cocaina nel campione di sangue o plasma fornisce un'evidenza oggettiva di assunzione di cocaina . La determinazione della ecgonina sembra utile anche in caso di campioni non idoneamente conservati in quanto è il solo metabolita stabile anche a temperatura ambiente.

La degradazione enzimatica della cocaina nei campioni di sangue inizia quasi al momento del prelievo. Di conseguenza anche il trasporto e le condizioni di conservazione risultano cruciali per l'analisi tossicologica. Per ovviare, o limitare, questo "inconveniente" è consigliato l'uso per il prelievo di Vacutainer commerciali (tappo grigio) che contengono come anticoagulante ossalato di potassio e fluoruro di potassio come inibitore della colinesterasi plasmatica. In questo modo si può inibire il catabolismo della cocaina per un limitato periodo di tempo [37].

Per quanto riguarda le urine, le condizioni di conservazione considerate ottimali per cocaina e metaboliti sono -15°C a pH 5.0, ottenuto preferibilmente con acido ascorbico. In queste condizioni, meglio se al buio ed in provette non silanizzate, si previene la degradazione dei nostri analiti per almeno 110 giorni [38].

Sangue

Una diagnosi di laboratorio completa si dovrebbe avvalere dei risultati relativi a un campione di sangue.

Molti problemi clinici e forensi, nonché attinenti alla sicurezza stradale, richiedono la determinazione quantitativa delle sostanze nel sangue spesso da affiancare ai risultati ottenuti nelle urine. In ambito clinico, la matrice ematica viene utilizzata soprattutto per risolvere problemi legati ad intossicazioni acute e in medicina d'urgenza. Prevalentemente vengono utilizzati plasma e siero, ma lo sviluppo di nuove procedure di preparazione e analisi del campione consentono l'uso di sangue intero anche in analisi di primo livello, cioè di screening.

La matrice ematica (il sangue è frequentemente definito "tessuto" biologico) è abbastanza omogenea dato che i suoi parametri fisiologici hanno margini ristretti di variazione; riflette un uso attuale perché la cocaina, come le altre sostanze, è rilevabile a breve distanza dall'assunzione (da pochi minuti o comunque entro un'ora a seconda della via di assunzione), consente di rilevare la sostanza madre prima che venga metabolizzata.

Limitazioni all'uso di questa matrice sono rappresentate soprattutto dall'invasività del prelievo, dalla necessità che esso venga effettuato da personale specializzato, dalla delicatezza della sua manipolazione (dal trattamento preanalitico agli aspetti infettivologici) e conservazione, dalla instabilità di molti analiti. Inoltre, le concentrazioni delle sostanze sono anche 100 volte inferiori a quelle urinarie e questo richiede opportune scelte analitiche. Altro limite è l'instabilità di molti analiti, in particolare della cocaina.

Per ovviare, o limitare, questo "inconveniente" sono state testate alcune soluzioni e proposti accorgimenti riportati nel precedente paragrafo sulla stabilità.

L'efficacia di queste precauzioni è ancor più evidente quando gli stessi prelievi di sangue vengono effettuati sia in Vacutainer senza additivi che in Vacutainer con fluoruro/ossalato come stabilizzanti [39]. In campioni reali prelevati con le due modalità, siero e plasma sono stati analizzati con il metodo di screening FPIA e di conferma in GC-MS. Le concentrazioni di cocaina metabolita nei campioni con stabilizzanti erano in media doppie rispetto ai campioni non stabilizzati.

La cocaina come tale non risultava in nessuno dei campioni prelevati normalmente, ma nel 65% dei campioni stabilizzati. Nell'8% di questi campioni era rilevata anche la cocaetilene confermando l'effetto stabilizzante anche su questo metabolita. L'ecgonina metil estere, in termini quantitativi, era circa la metà rispetto alle aliquote non stabilizzate (l'effetto inibente del fluoruro si esplica inibendo la colinesterasi plasmatica che trasforma la cocaina in ecgonina metil estere), ma la benzoilecgonina era inaspettatamente più elevata.

La stabilità della benzoilecgonina risulta controversa. I risultati di diverse ricerche sono utilmente riportati nel citato lavoro di Toennes [39].

Un altro elemento rende il sangue meno adatto delle urine nelle indagini ad ampio raggio sulle sostanze d'abuso: la quantità più limitata del campione prelevato.

La quantità di campione disponibile è un parametro importante, e a volte limitante, nella scelta del metodo analitico. Le metodiche cromatografiche, ad esempio, richiedono generalmente una maggiore quantità di campione e per la non sempre elevata sensibilità dei metodi correntemente utilizzati e per il necessario pretrattamento del campione. Nonostante queste "restrizioni", l'utilizzo del sangue per l'analisi quantitativa di cocaina e suoi metaboilti risulta necessario in molti casi che giungono ai Dipartimenti di Emergenza.

Dato il carattere del presente Manuale, si farà riferimento esclusivamente alle applicazioni diagnostiche di interesse in campo clinico.

Medicina d'urgenza

Sono disponibili diversi metodi per la rilevazione di sostanze d'abuso in pazienti presso i Dipartimenti di medicina di urgenza dove il ruolo del laboratorio di tossicologia è quello di fornire elementi per supportare o escludere rapidamente la diagnosi di intossicazione/avvelenamento.

Molto spesso però l'analisi richiede diverse ore anche a causa della necessità di trasporto del campione e le procedure di laboratorio. Di conseguenza, l'impatto del supporto tossicologico analitico sulla cura del paziente al momento dell'ingresso in emergenza è pressoché nulla. Data la diffusione delle sostanze d'abuso è però sempre più spesso necessario avvalersi di uno screening tossicologico, anche qualitativo, nell'immediatezza dell'ingresso del paziente. A questo scopo, sono disponibili testi rapidi generalmente immunologici sufficientemente validi per una primissima indicazione, da utilizzare direttamente al letto del soggetto. Il pannello di molecole rilevabili copre le classi di sostanze d'abuso più tradizionali, ma non comprende le sostanze di sintesi che via via si sono diffuse nell'abuso (es. amfetaminosimili, ketamina ed altre) e tantomeno adulteranti e tagli che si possono trovare in eroina e cocanina di strada contribuendo, o determinando, l'episodio acuto.

È d'obbligo segnalare subito due limitazioni al loro utilizzo, limitazioni che affliggono la maggior parte dei metodi di screening anche in laboratorio. In primo luogo, nei casi (frequenti) di poliassunzione, le singole sostanze sono presenti sottosoglia, cioè a concentrazioni inferiori di cut-off dei tests immunochimici che non hanno quindi possibilità di rilevarne la presenza. In secondo luogo, i problemi che portano gli assuntori ad intossicazioni acute e a condizioni che richiedono interventi di urgenza, sono non di rado legati alla presenza di determinati tagli, o adulteranti, presenti nelle miscele di strada. A titolo di esempio si ricordano i ricoveri in urgenza per cocaina-atropina in Italia, come in altri paesi europei, o i casi riportati in letteratura di cocaina adulterata con benzocaina [40]. In tali casi il ricorso all'esperienza della Tossicologia Clinica dei Centri Antiveleno (CAV), di campioni ematici e di procedure analitiche sofisticate è d'obbligo.

Per un'utile e corretta diagnostica di laboratorio in ambito della medicina d'urgenza sono indispensabili robuste conoscenze sul metabolismo e la farmacocinetica delle sostanze.

In alcune condizioni patologiche la vita media della cocaina che è, in condizioni normali, di 60-90 minuti risulta alterata. Questo si verifica, ad esempio, in condizioni di elevata temperatura [41]. Una temperatura corporea elevata (>40°C) si presenta in circa la metà dei pazienti con delirio di eccitazione [42], nei quali però solitamente si rilevano concentrazioni basse di cocaine in autopsia. L'effetto della temperatura corporea sembrerebbe la causa. L'effetto risulta però contenuto in soggetti con delirio da cocaina, con elevate concentrazioni della sostanza in ingresso, con elevata temperatura corporea ma ancora in vita [43]. Si rileva in tali casi la presenza di norcocaina, normalmente assente, a sostegno del danno epatico presente.

In sintesi, i risultati analitici devono essere interpretati e utilizzati con cautela ed esperienza tossicologica, non esclusivamente sulla base di cognizioni tecnico-analitiche, perché siano di reale aiuto alla valutazione clinica soprattutto laddove ci sia un'apparente discordanza [44].

Circa la concordanza tra determinazione della cocaina/metabolita in urine e siero con la diagnosi medica, è utile sottolineare come la determinazione sierica della cocaina aumenti anche del 300% il valore predittivo della diagnosi di laboratorio per intossicazione acuta da cocaina [45]. Si evince che la reale situazione del paziente in medicina d'urgenza può essere tossicologicamente e correttamente meglio inquadrata analizzando siero o plasma; nonostante ciò, nella maggior parte delle situazioni si continua ad utilizzare il solo campione urinario. Tale prassi

contribuisce ad una significativa sottostima del coinvolgimento della cocaina in episodi traumatici.

Questa scelta "riduttiva" è dettata prevalentemente dal fatto che test rapidi e metodiche di screening tossicologici sono calibrati e validati sulle urine. Ci sono pochi metodi disponibili per uno screening sufficientemente ampio e rapido nel siero. Tale inconveniente potrebbe essere superato, con le opportune accortezze, dall'utilizzo dell'HPLC, in particolare del REMEDI, per finalità cliniche [46] o da metodi in HS-SPME GC-MS proposti allo scopo [5].

Ci sono pochi lavori sulla validazione dei test rapidi utilizzabili per lo screening di droghe nello specifico campo dell'urgenza dove i pazienti non sono dipendenti da sostanza, ma si presentano con sospetto di intossicazione da droghe, dove sono più probabili le interferenze con altre sostanze, dove ci può essere il problema della capacità di infermieri e medici ad eseguire ed interpretare correttamente il test. I dati disponibili si riferiscono al Triage Panel (7 sostanze d'abuso e antidepressivi triciclici) affidabile soprattutto per la cocaina [47]. Da sottolineare che una positività con questi test non significa meccanicamente intossicazione dalla sostanza, ma deve essere valutata alla luce del decorso clinico e confermata con metodi di secondo livello in caso si osservino incoerenze con il quadro clinico o quando occorra un riscontro quantitativo. A quet'ultimo riguardo sono necessarie alcune considerazioni.

Mentre c'è accordo sul dato qualitativo, molto si discute sull'effettiva utilità (per la cura del paziente in urgenza) del dato quantitativo di cocaina e metaboliti ad eccezione ovviamente di casi particolari (es. discordanze tra osservazione clinica e riscontro tossicologico).

Si rileva infatti la mancanza di una correlazione statisticamente significativa tra gravità dei sintomi clinici, esigenze di trattamento, esito e le concentrazioni riscontrate di cocaina e metaboliti. A sostegno di quetsa affermazione ricordiamo che le concentrazioni sono soggette a variabilità in funzione di diversi fattori. Il dato quantitativo può invece essere impiegato molto utilmente come indicatore per pazienti che, pur asintomatici all'ingresso in medicina d'urgenza, avrebbero bisogno di un intervento terapeutico specifico e di ricovero ospedaliero per elevata probabilità di sviluppare patologie cocaina-relate [48].

Per l'interesse clinico, è anche utile ricordare le applicazioni della diagnosi d'uso di cocaina in campo ostetrico-ginecologico, durante la seconda fase della gestazione (per l'esposizione fetale) ed alla nascita del bambino. Tecniche di secondo livello vengono utilizzate su liquidi biologici, capelli, meconio per queste finalità.

Matrici alternative

La tecnologia è andata sviluppando sistemi sempre più accurati per l'identificazione delle sostanze d'abuso e, conseguentemente, dei loro assuntori. L'analisi nelle urine continua ad essere la più diffusamente utilizzata, ma l'impiego di matrici alternative offre alcuni vantaggi e, nel tempo, ha consentito lo sviluppo di procedure a buon livello di performance e standardizzazione.

I limiti delle matrici alternative sono progressivamente ridotti dalla ricerca analitica e dalla tecnologia, il consenso su aspetti particolarmente delicati quali i cut-off, la costruzione e l'interpretazione dei risultati è in fase di consolidamento nella comunità scientifica internazionale e negli Organismi regolatori. Si propongono linee guida che procedono parallelamente a quelle per il drug testing nelle urine. Tra i problemi tecnici per una maggiore diffusione di queste matrici (utili a coprire diverse finestre temporali di rilevazione): -necessità di appositi materiali per il controllo di qualità; -standardizzazione delle procedure anche al fine di escludere contaminazioni passive; -cut-off idonei e condivisi; - programmi di formazione per chi deve interpretare i risultati in base alle conoscenze scientifiche esistenti sulla disposizione delle sostanze e le cine-

tiche nelle matrici alternative; - nuove tecniche analitiche per lo screening e le conferme; - biomarkers per la normalizzazione dei risultati del test (come la creatinina per le analisi in urine); - maggiori conoscenze sulla relazione tra concentrazioni e tempo-dose-frequenza dell'assunzione; -interpretazione dei risultati discordanti rispetto alle analisi in urine.

Al momento, in campo clinico, il capello, e il sudore risultano maggiormente considerati soprattutto in relazione ai trattamenti. Dispositivi di ultima generazione per la rilevazione on-site di sostanze nel sudore iniziano ad essere adoperati anche come pre-screening in ambito di urgenza e di trattamento. In quest'ultimo contesto, ad es., un test settimanale per la cocaina attraverso cerotto per il sudore, rileva l'uso di cocaina più del monitoraggio trisettimanale delle urine. Alla stessa stregua, l'analisi del capello sembra più efficace delle urine nel rilevare l'uso di cocaina, ma soprattutto nell'identificare soggetti con problemi seri di abuso [49]. Caratteristiche, vantaggi e limiti di matrici convenzionali e alternative sono sintetizzate nella Tabella 5. Si ritiene tuttavia utile fornire qualche elemento in più relativamente a capelli e sudore.

Capello

Il meccanismo di incorporazione e fissazione delle sostanze xenobiotiche nel capello non è ancora conosciuto nei dettagli, ma sono sufficientemente noti i fattori legati alle caratteristiche del capello che incidono sulla relazione dose-concentrazione rilevabile. Tra questi fattori, ad esempio, il colore, la razza, trattamenti cosmetici, colorazioni, spessore del fusto.

In linea generale, le sostanze vengono incorporate nella matrice cheratinica attraverso lo scambio tra il sangue circolante e le cellule del bulbo pilifero. Una volta fissate nella parte prossimale del capello, esse vengono rese rilevabili man mano che il capello cresce superando il cuoio capelluto ad una velocità media di 1-1.5 cm/mese con una variabilità legata al singolo soggetto (ad esempio alla zona della testa), alla stagionalità ed altro. Attraverso la lunghezza del capello è possibile rilevare l'assunzione cronica o, su segmenti sempre più distali, "leggere" l'abitudine assuntiva del soggetto.

Le concentrazioni delle sostanze e loro metaboliti nei capelli sono di gran lunga inferiori a quelle rilevabili nelle urine; di conseguenza, l'analisi richiede una sensibilità dell'ordine dei nano-e picogrammi, una specificità per le sostanze lipofile e l'assenza di effetti matrice. Questi requisiti sono soddisfatti da metodi cromatrografici quali la GC-MS, GC-MS-MS; LC-MS, LC-MS-MS. A scopo di screening, potrebbero essere adoperati anche metodi immunochimici poco costosi, rapidi e più semplici da utilizzare, ma che presentano notevoli limiti anche di interpretazione. Tra i limiti analitici, la necessità che la "digestione" non denaturi le proteine che costituiscono gli anticorpi dei reagenti. In questi casi è quindi preferibile una "digestione" enzimatica ad una chimica. Una digestione fortemente acida o basica (richiesta per molte sostanze) deve essere ricondotta ad un pH neutro prima della analisi immunochimica che, nel caso dei capelli, richiede una calibrazione con standard di capelli "fortificati" e processati come il campione per correggere possibili effetti matrice. Una sufficiente sensibilità e specificità è soddisfatta da metodi radioimmunometrici quali-quantitativi [50] ed ELISA [51].

Possiamo tuttavia affermare che la quasi totalità dei test su matrice cheratinica (capelli, peli, unghie) viene effettuata con metodi cromatografici accoppiati alla spettrometria di massa, metodi che consentono la rilevazione (mirata) di molte sostanze, dei loro metaboliti, dei rapporti fra questi ultimi (rapporti marker di consumo attivo) e consentono di rilevare la presenza di adulteranti e tagli.

Tra le applicazioni del test sul capello, la rilevazione della esposizione a droghe in utero, l'e-

sposizione passiva dei bambini in casa di consumatori, nel campo giudiziario, sul luogo di lavoro, per le problematiche legate alla patente, nei trattamenti di detossificazione, in campo clinico nei casi in cui la finestra di rilevazione delle urine e del sangue (da un'ora a massimo 2-3 giorni per i metaboliti) non sia sufficiente per l'inquadramento diagnostico.

Il test sul capello rappresenta un marker biologico affidabile per valutare l'esposizione quantitativa e temporale alle sostanze d'abuso, cosa che sangue, urina e saliva non sono in grado di indicare. Di conseguenza, questa analisi ha una indubbia ed esclusiva utilità diagnostica [51].

Sudore

Tra le matrici biologiche alternative, il sudore (traspirato) comincia ad essere utilizzato, se pur con le dovute cautele, per rilevare la presenza di cocaina (come di altre sostanze d'abuso) in medicina d'urgenza, nel trattamento, sui luoghi di lavoro, in ambito militare, in ambito giudiziario e nei controlli dei conducenti per la sicurezza stradale. Il metodo di prelievo è il meno invasivo fra quelli disponibili, sono remote le possibilità di adulterare il campione, c'è un'ampia finestra di rilevabilità. L'identificazione della sostanza madre e dei metaboliti, le basse concentrazioni degli analiti, il tempo di rilevazione, le relazioni tra dose e concentrazione rappresentano aspetti importanti per valutare l'analisi della cocaina nel sudore. Altro elemento rilevante è rappresentato dal cut-off sulla scelta del quale, la comunità scientifica ha a lungo discusso per trovare una accordo.

Recentemente la Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) ha proposto un cut-off di 25 ng/cerotto per lo screening di cocaina/metabolita nel sudore e 25 ng/cerotto per la conferma di cocaine o benzoilecgonina [52].

I meccanismi di incorporazione delle sostanze nel sudore non sono ancora completamente chiariti.

La sostanza, non ionizzata, passerebbe per diffusione passiva dai capillari alle ghiandole sudoripare. Al basso pH del sudore, le sostanze possono ionizzarsi accumulandosi nel campione, possono attraversare gli strati (derma ed epiderma) della pelle ed essere raccolte in superficie con appositi dispositivi come cerotti protetti da contaminazioni esterne attraverso una pellicola, oppure da piccole superfici assorbenti che vengono strofinati sulla pelle .

Occorre però tener presenti fattori di variabilità come la diversa produzione di sudore, la possibile contaminazione ambientale, la perdita di sostanze per degradazione del dispositivo di raccolta o per riassorbimento attraverso la pelle, fattori legati all'escrezione delle sostanze e loro metaboliti nel sudore. Uno studio condotto recentemente [53], ha fatto per primo chiarezza su molti di questi aspetti. È stata studiata la relazione tra dose somministrata e concentrazione di cocaina e metaboliti nel sudore. È stata utilizzata una metodica con estrazione in fase solida e gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa per l'analisi quantitativa di cocaina, benzoilegonina, ecgonina metil estere, cocaetilene, norcocaina, m-idrossicocaina, p-idrossicocaina, p- idrossibenzoilecgonina, m- idrossibenzoilecgonina.

I risultati riflettevanno l'escrezione della sostanza somministrata e sono stati valutati in relazione al cut-off pari al LOQ del metodo (2,5 ng/cerotto) ed al cut-off di 25 ng/cerotto del SAMHSA.

La cocaina era l'analita primario (97%), e spesso il solo (59%) rilevato nel sudore; la ecgonina metil estere era più frequente rispetto alla benzoilecgonina e a concentrazione più elevata. Cocaina e ecgonina metil estere sono state rilevate già entro 1-2 ore; la benzoilecgonina non prima delle 4-8 ore. La maggior parte delle molecole era comunque escreta entro 24 ore dalla somministrazione.

In base ai risultati, lo studio conclude che l'analisi del sudore rappresenta un metodo efficace e attendibile per il monitoraggio dell'uso di cocaina.

Conclusioni

Nella diagnostica di laboratorio applicata alle sostanze di abuso, la corretta lettura del risultato analitico prodotto su qualunque matrice biologica richiede necessariamente una valutazione clinica, la conoscenza dei percorsi metabolici delle sostanze in esame, la farmacocinetica e farmacodinamica, le peculiarità delle vie di assunzione per le concentrazioni relative delle singole sostanze e dei metaboliti, la stabilità degli stessi nel campione durante la conservazione, la conoscenza dei problemi tecnici legati ad una corretta scelta ed utilizzazione delle procedure analitiche.

Tutto questo allo scopo di fornire non solo dati, ma risultati utili per le finalità richieste. Infine, ma non in ordine di importanza, si sottolinea la necessità che il laboratorio sia periodicamente informato circa le sostanze utilizzate sul proprio territorio ricordando come le performance dei metodi analitici, soprattutto quelli di screening, siano significativamente e direttamente influenzati dalla prevalenza del fattore che con essi si intende rilevare.

Bibliografia

[1] B.P.Bowman, S.R.Vaughan, Q.D.Walker, S.L.Davis, P.J. Little, N.M.Scheffler, B.F.Thomas, C.M.Kuhn. Effects of sex and gonadectomy on cocaine metabolism in the rat. J. Pharmacol.Exp. Ther. 290(3):1316-23, 1999.

[2] K.B. Scheidweiler, M.A. Plessinger, J. Shojaie, R.W.Wood, and T.C.Kwong. Pharmacokinetics and Parmacodynamics of Methylecgonidine, a Crack Cocaine Pyrolyzate. J. Pharmacol. Exp. Ther. 307 (3) 1179-1187, 2003.

[3] C.F.Poole, New trends in solid-phase extraction. Trends Anal. Chem. 22 (6): 362-373, 2003.

[4] N.Nagasawa, M.Yashiki, Y.Iawasaki, K.Hara, T.Kojima. rapid analysis of amphetamines in blood using head space-solid phase microextraction and selected ion monitoring. Forens. Sci. Int. 78: 95-102, 1996.

[5] S.Gentili, M.Cornetta, T.Macchia. Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair. J. Chromatogr. B, 801: 289-296, 2004.

[6] M.R.Brunetto, Y. Delgado Cayama, L.Gutierrez Gracia, M.Gallignani, M.A.Obando. Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatography system with diode-array detection. J.Pharmac.Biomed.Anal. 37: 115-120, 2005.

[7] M.W.Linder, G.M.Bosse, M.T.Henderson, G.Midkiff, R.Valdes Jr. Detection of cocaine metabolite in serum and urine: frequency and correlation with medical diagnosis. Clin.Chim.Acta, 295: 179-185, 2000.

[8] R.Kronstrand, I.Nystrom, J.Strandberg, H.Druid. Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MS-MS. Forensic Sci.Int. 145: 183-190, 2004.

[9] M.Yonamine, N.Tawil, R.L.de Moraes Moreau, O.Alves Silva. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. J.Chromatogr.B, 789: 73-78, 2003.

[10] E.A.Kolbrich, I.Kim, A.J.Barnes, E.T.Moolchan, L.Wilson, G.A.Cooper, C.Reid, D.Baldwin, C.W.Hand, and M.A.Huestis. Cozart RapiScan Oral Fluid Drug Testing System: An Evaluation of Sensitivity, Specificity, and Efficiency for Cocaine Detection Compared with ELISA and GC-MS Following Controlled Cocaine Administration. J.Anal.Toxicol. 27: 407-411, 2003.

[11] S.W.Toennes, S.Steinmeyer, H.J.Maurer, M.R.Moeller, and G.F.Kauert. Screening for Drugs of Abuse in Oral Fluid: Correlation and Analysis Results with Serum in Forensic Cases. J.Anal.Toxicol. 29: 127-132, 2005.

[12] R. De La Torre, J.Ortuno, M.L.Gonzales, M.Farré, J.Cami and J.Segura. Detrmination of cocaina and its metabolites in human urine by gas chromatography/mass-spectrometry after simultaneous use of cocaina and ethanol. J.Pharm.Biomed.Anal. 13(3): 305-312, 1995.

[13] K.B.Scheidweiler, M.A.Plessinger, J.Shojaie, R.W.Wood, and T.C.Kwong. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methylecgonine, a Crack Cocaine Pyrolyzate. J.Pharm.Exp.Ther. 307 (3): 1179-1187, 2003.

[14] F.Crossi Pereira de Toledo, M.Jonamine, R.L. de Moraes Moreau, O.Alves Silva. Determination of cocaina, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. J.Chromatogr.B, 798:361-365, 2003.

[15] A.M.Bermejo, P.Lòpez, I.Alvarez, M.J.Tabernero, P.Fernandez. Solid-phase microextraction for the determination of cocaine and cocaethylene in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. Forensic Sci.Int. 156: 2-8, 2006.

[16] D.E.Moody, A.C.Spanbauer, J.L.Taccogno, and E.K.Smith. Comparative Analysis of Sweat Patches for Cocaine (and Metabolites) by Radioimmunoassay and Gas Chromatography-Positive Ion Chemical Ionization-Mass Spectrometry. J.Anal.Toxicol., 28: 86-93, 2004.

[17] S.Pichini, E.Marchei, R.Pacifici, M.Pellegrini, J.Lozano, O.Garcia-Algar. Application of validated high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay to the analysis of m- and p-hydroxybenzoylecgonine in meconium. J.Chromatogr.B, 820: 151-156, 2005.

[18] V.Pavlova, V.Mirceski, S.Komorsky-Lovric, S.Petrovska-Jovanovic, B.Mitrevski. Studying electrode mechanism and analytical determination of cocaine and its metabolites at the mercury electrode using square-wave voltammetry. Ann.Chim.Acta 512: 49-56, 2004.

[19] A.D.Campiglia, T.Vo-Dinh. Rapid screening method for cocaina and benzoylecgonine in saliva samples. Anal.Chim.Acta 372: 349-355, 1998.

[20] D.M.Jacobson, R.Berg, G.F.Grinstead, and J.R.Kruse. Duration of Positive Urine for Cocaine Metabolite after Ophthalmic Administration: Implications for Testing Patients With Suspected Corner Sindrome Using Ophthalmic Cocaine. Am.J.Ophthalmol. 131:742-747, 2001.

[21] M.Vandevenne, H.Vandenbussche, A.Verstraete. Detection time of drugs of abuse in urine. Acta Clin. Belg. 55(6): 323-33, 2000), (H.E.Hamilton, J.E.Wallace, E.L.Jr Shimek, P.Land, S.C,Harris, J.C.Christenson. Cocaine and benzoylecgonine extraction in humans. J.Forensic Sci. 22(4): 697-707, 1997.

[22] (E.J.Cone, A.Tsadik, J.Oyler, W.D.Darwin. Cocaine Metabolism and Urinary Excretion After Different Routes of Administration. Ther. Drug. Monit., 20 (5): 556-560, 1998.

[23] S.M.Roberts, R.D.Harbison, R.C.James. Inhibition by ethanol of the metabolism of cocaine to benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in mouse and human liver. Drug Metab Dispos, 21: 537-41, 1993.

[24] K.L.Preston, D.H.Epstein, E.J.Cone, A.T.Wtsadik, M.A. Huestis, and E.T.Moolchan. Urinary Elimination of Cocaine Metabolites in Chronic Cocaine Users During Cessation.

J.Anal.Toxicol., 26 (7): 393-400, 2002.
[25] A.J.Saxon, D.A.Calsin, V.M.Haver, C.J.Delaney. Clinical evaluation of urine screening for drug abuse. West.J.Med., 149: 296-303, 1988.
[26] F.Ursitti, J.Klein, G.Koren. Use of hair analysis for confirmation of self-reported cocaine use in users with negative urine tests. J.Toxicol.Clin.Toxicol., 39 (4): 361-6, 2001.
[27] R.Borriello, M.Caligara, M.Chiarotti, S.D.Ferrara, R.Gagliano-Candela, F.Gigli, M.Licata, P.Procaccianti. Linee guida per i laboratori di analisi delle sostanze d'abuso in campioni biologici. Boll.Farmacodip. e Alcolis., XXV (1-2) 2002.
[28] SAMHSA, HHS. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs. General Register 70 (15) January 255, 2005.
[29] D.L. Burrows, A. Nicolaides, P.J. Rice M. Dufforc, D.A. Johns and K.E. Ferslew. Papain: A. Novel Urine Adulterant. J. Anal. Toxicol. 29: 275-295, 2005.
[30] E.J.Cone, A.H.Sampson-Cone, W.D.Darwin, M.A.Huestis and J.M.Oyler. Urine Testing for Cocaina Abuse: Metabolic and Excretion Patterns Following Different Routes of Administration and Methods for Detecting of False-Negative Results. J.Anal.Toxicol., 27: 386-401, 2003.
[31] V.I.Luzzi, A.N.Saunders, J.W.Koenig, J.Turk, S.F.Lo, U.C.Garg and D.J.Dietzen. Analytical Performance of Immunoassay for Drugs of Abuse Below Established Cutoff Values. Clinical Chemistry, 50 (4): 717-722, 2004.
[32] US Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry, enter for Drug Evaluation and Research. (CDER), Rockville, May 2001.
[33] C.Jimenèz, R.Ventura, J.Segura, R. de la Torre. Protocols for stability and homogeneity studies of drugs for its application to doping control. Analytica Chimica Acta, 515: 323-331, 2004.
[34] J.Segura, C.Stramesi, A.Redòn, M.Ventura, C.J.Sanchez, G.Gonzàles, L.San, M.Montagna. Immunological screening of drugs of abuse and gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of opiates and cocaine in hair. J.Chromatogr.B, 724: 9-21, 1999.
[35] Y.Nakahara. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. J.Chromatogr.B, 733: 161-180, 1999.
[36] G.Skopp, A.Klingman, L.Potsch, R.Mattern. In vitro stability of cocaine in whole blood and plasma including ecgonine as a target analyte. Ther.Drug.Monit. 23 (2): 174-81, 2001.
[37] R.C. Baselt. R.F. Shaw, and R.Mc Evilly. Effect of sodium fluoride on cholinesterase activity in postmortem blood. J. Forensic Sci. 30: 1206-1209 (1985)] [D.S. Isenschmid B.S. Levine, and J.H. Caplan. A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites. J. Anal. Toxicol. 13: 250-256, 1989.
[38] M.J.Hippenstiel, B.Gerson. Optimization of storage conditions for cocaine and benzoylecgonine in urine: a reviw. J.Anal.Toxicol. 18 (2): 104-9, 1994.
[39] S.W. Toennes, and G.F. Kauert. Importance of Vacutainer Selection in Forensic Toxicological Analysis of Drugs of Abuse. J. Anal. Toxicol. 25: 339-343, 2001.
[40] C.D. McKinney K.F. Postiglione, D.A. Herold. Benzocaine-adulterated street cocaina in association with methemoglobinemia. Clin Chem., 38 (4): 596-7, 1992.
[41] R. Walker, G. Simmons, A. Robinson, M. Hall. The effect of increased temperature on the rate of cocaine metabolism in blood. 50th Annual Meeting of the American Academy of Forensis Science. San Francisco, February 10, 1998.
[42] C.V. Wetli, D. Mash, S.B. Karch. Cocaine–associated agitated delirium and the neuroleptic malignant syndrome. Am.J.Emerg.Med. 14 (4): 425-428, 1996.
[43] K. Blaho, S. Winbery, L. Park, B. Logan, S.B. Karch, L.A. Barker. Cocaine Metabolism in

Hyperthermic patients with excited delirium. J.Clin.Forens.Med. 7: 71-76, 2000.
[44] A.S. Brett. Implications of discordance between clinical impression and toxicology analysis in drug overdose. Arch. Intern. Med. 148: 437-41, 1998.
[45] M.W. Linder, G.M. Bosse, M.T. Henderson, G. Midkiff, R. Valdes Jr. Detection of cocaine metabolite in serum and urine: frequency and correlation with medical diagnosis. Clin. Chim. Acta, 295: 179-185, 2000.
[46] N. Sadeg, G. Francois, B. Petit. Automated liquid-chromatographic analyzer used for toxicology screening in a general hospital: 12 months experience. Clin. Chem. 43: 498-504, 1997.
[47] C. Tomaszewski, J.Runge, M.Gibbs, S.Colucciello, M.Price. Evaluation of rapid bedside toxicology screen in patients suspected of drug toxicity. J.Emerg.Med., 28 (4): 389-394, 2005.
[48] K. Blaho, B. Logan, S. Winbery, L. Park, and E. Schwilke. Blood Cocaine and Metabolite Concentrations, Clinical Findings, and Outcome of Patients Presenting to an ED. Am J. Emerg. Med. 18: 593-598, 2000.
[49] E.J. Cone. Legal, Workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale. Forensic. Sci. Interm. 121: 7-15, 2001.
[50] M.Cassani, V. Spiehler. Analytical requirements, perspectives and limits of immunological methods for drugs in hair. Forens. Sci. Int. 63 (1-3): 175-84, 1993
[51] J. Klein, T. Karaskov, G. Koren. Clinical application of hair testing for drugs of abuse – the Canadian ex perience. Forens. Sci. Int. 107: 281-288, 2000.
[52] US Department of Health and Human Services. Proposed revision to mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs. Fed. Regist. 69: 19673-732, 2004.
[53] S.L. Kacinko, A.J. Barnes, E.W. Schwilke, E.J. Cone, E.T. Moolchan and M.A. Huestis. Disposition of Cocaine and its Metabolites in Human Sweat after Controlled Cocaina Administration, Clinical Chemistry 51(11): 2085-2094, 2005

Appendice

L'approvvigionamento delle sostanze di riferimento (es. standard analitici) rappresenta un aspetto non trascurabile per il laboratorio che effettua analisi tossicologiche. La normativa in vigore, DPR 309/90 e successive modifiche, prevede specifici adempimenti.
Per acquistare e detenere sostanze comprese nelle tabelle degli stupefacenti è necessario:
presentare domanda di autorizzazione in carta legale a: **Ministero della Salute- Direzione Generale dei Farmaci e dei Dispositivi Medici -Ufficio Centrale Stupefacenti – Viale della Civiltà Romana, 7 - 00144 ROMA.** Sono esentati dall'obbligo di uso di carta legale Istituti Universitari, Enti ed Istituti dello Stato e tutti gli altri Enti esonerati da tale uso; in questo caso, la domanda potrà essere presentata su carta intestata dell'Ente e firmata dal Legale Rappresentante dello stesso.
La domanda dovrà contenere:
a) **una dettagliata descrizione ed il relativo scopo delle sperimentazioni** che si intendono effettuare;
b) i **nomi ed i quantitativi ponderali delle sostanze** di cui si chiede l'approvvigionamento (le sostanze devono essere indicate con la denominazione riportata nel Decreto di approvazione delle Tabelle delle sostanze stupefacenti e
psicotrope e successivi aggiornamenti o con la Denominazione Comune Internazionale);

c) **nome ed indirizzo delle ditte fornitrici** (C.A.P. compreso), le quali dovranno essere a loro volta autorizzate da questo Ministero;
d) **autodichiarazione con dati anagrafici (luogo e data di nascita) e qualifica della persona che si assume la responsabilità della detenzione e dell'uso scientifico** di dette sostanze, il quale assume in entrata su apposito registro
vidimato dall'Autorità Sanitaria Locale le stesse e si munisce, ai fini della registrazione di scarico, delle dichiarazioni rilasciate dai singoli ricercatori, sperimentatori o periti;
e) **firma e timbro del direttore del centro;**
IN CASO DI ACQUISTO DA **FORNITORE ESTERO**:
• dovrà essere specificato il quantitativo totale della sostanza richiesta espresso in **base anidra**;
• dovrà essere versata una tassa di concessione governativa di **€ 18,88 sul c/c n.60413416** intestato a "Ministero Salute - Dir. Gen. dei Farmaci e dei Dispositivi medici - Ufficio Centrale Stupefacenti - V.le della Civiltà Romana, 7 - 00144 ROMA -" ed inviare copia originale del bollettino allo stesso indirizzo.
• andrà indicata la **Dogana di entrata** nel territorio nazionale, previo accordo con la Ditta fornitrice, se non sia quest'ultima appartenente ad un Paese dell'Unione Europea.
Si richiede inoltre di informare tempestivamente l'Ufficio Centrale Stupefacenti in ordine alla data dell'avvenuta movimentazione e alla quantità delle sostanze espresse in base anidra.

Tecniche immunochimiche

I metodi immunochimici si basano sulla competizione per un determinato sito di legame specifico (che può essere un sito anticorpale o recettoriale, presente in difetto nell'ambiente di reazione) tra l'analita (cioè la sostanza nel campione in esame) e l'analita marcato (tracciante), legato cioè a una particolare molecola o atomo che ne consenta la misura, aggiunto in concentrazione nota alla miscela di reazione e di cui si possa, grazie appunto alla specifica marcatura, determinare la quota che si è legata al sito specifico oppure quella il cui legame è stato inibito dalla presenza dell'analita.
Tale competizione, come tutte le reazioni di equilibrio, è regolata dalla legge di azione delle masse, per cui tanto più analista è presente nel campione, tanto più tracciante sarà escluso dal legame con l'anticorpo. Se viene determinata la frazione libera, il valore ottenuto sarà direttamente proporzionale alla concentrazione di analita, si avrà, invece, una relazione inversa, se viene determinata la frazione legata.
Le cross-reazioni con metaboliti della sostanza in esame presenti nelle urine anche in quantità rilevanti possono costituire un vantaggio, quando viene richiesta la quota totale di sostanza escreta nelle urine.
I metodi immunochimici più diffusi vengono classificati in base alla particolare marcatura utilizzata che, di conseguenza, prevede sistemi di rilevazione diversi.
Il **RIA** (Radio Immuno Assay) prevede l'uso di un antigene marcato con un isotropo radioattivo: i più usati sono il trizio (^{3}H, emivita 12 anni) e lo iodio (^{125}I, emivita 56 giorni). L'**EIA** (Enzyme Immuno Assay) si basa sull'uso di un tracciante marcato con un particolare enzima di cui viene determinata l'attività dopo che la reazione di competizione tra l'antigene freddo (analita) e l'antigene marcato ha raggiunto l'equilibrio. Tale attività risulta proporzionale alla concentrazione dell'analita, direttamente o inversamente a seconda della particolare metodica utilizzata. Tra le metodiche EIA, una valida alternativa al RIA è rappresentata dall'**EMIT** (enzyme multiplied immunoassay techique) che utilizza traccianti marcati con enzimi come il lisozima,

la glucosio-6-fosfato deidrogenasi, la malato deidrogenasi (che hanno periodi di validità più elevata rispetto ai traccianti radioattivi).
L'EMIT opera in fase omogenea ed è, perciò, suscettibile di ampia automazione, il che lo rende adatto, ad esempio, a essere utilizzato in programmi di screening. La velocità con cui viene condotta l'analisi, inoltre, fa sì che tale metodica possa venire applicata efficacemente anche in alcuni problemi clinici, come, ad esempio, l'identificazione rapida dell'agente intossicante, durante un'emergenza per avvelenamento. In ogni caso, anche l'EMIT è una metodica soggetta a numerose interferenze. Il **FIA** (Fluoro Immuno Assay) prevede l'uso di un tracciante marcato con una molecola fluorescente. La misura viene effettuata mediante la misura dell'intensità di fluorescenza, dopo idonea eccitazione, sulla frazione libera o su quella legata opportunamente separate. Fluoresceina, rodamina, umbelliferoni, (derivati della 7-idrossicumarina), isoluminolo, nicotinamide sono le molecole fluorescenti più utilizzate. Anche con i metodi FIA è possibile operare in fase omogenea ed eterogenea. In quest'ultimo caso, si elimina l'interferenza dovuta alla fluorescenza intrinseca della matrice del campione, il che determina, almeno teoricamente, un aumento di sensibilità. Il dosaggio fluoroimmunologico omogeneo con maggiore applicazione è quello basato sulla polarizzazione di fluorescenza (**PFIA**, Polarization Fluoro Immuno Assay).
I metodi basati sull'inibizione dell'emoagglutinazione (**HI**-Hemoaglutination Inhibition) si basano sulla proprietà di un antisiero di provocare l'agglutinazione di emazie tannate e sensibilizzate con il relativo antigene (analita).

Tecniche cromatografiche

Le tecniche cromatografiche si inquadrano come metodi di conferma quali-quantitativa in quanto permettono un'identificazione sicura e un dosaggio accurato delle sostanze presenti in un dato campione. Infatti, uno dei maggiori pregi della cromatografia è quello di riuscire a separare i componenti di miscele mediante la loro distribuzione differenziale tra due fasi, una stazionaria e una mobile. La fase stazionaria, contenuta in una colonna di dimensioni opportune, oppure distribuita su un lastra, è costituita da un solido o da un liquido adeguatamente supportato; la fase mobile è costituita da un liquido o da un gas. In base al carattere della fase mobile si distinguono i due tipi principali di cromatografia: quella in fase liquida e quella in fase gassosa.
La natura della fase stazionaria solida prevede un meccanismo prevalentemente di adsorbimento (per il quale le sostanze sono separate in base alla loro polarità), oppure meccanismi particolari, quali scambio ionico ed esclusione molecolare; una fase stazionaria liquida, invece, prevede un meccanismo di ripartizione, per il quale i composti sono separati in base alla loro differente solubilità.
Gli svantaggi della cromatografia risiedono, soprattutto, nei tempi richiesti dall'analisi, nella dipendenza di un'esecuzione affidabile dall'abilità e dall'esperienza dell'operatore, nel pre-trattamento cui deve essere necessariamente sottoposto il campione, più o meno articolato a seconda della tecnica da applicare.

Tecniche cromatografiche di base:
La **TLC** (Thin Layer Chromatography) è uno dei metodi cromatografici più tradizionali, che trova largo uso per la sua semplicità, rapidità e per i suoi costi contenuti.
La fase stazionaria (gel di silice, allumina, cellulosa, kieselghur) è uniformemente applicata su una lastra di vetro, di alluminio o di plastica. Tali fasi sono caratterizzate dalla grandezza delle

particelle che le costituiscono e dallo spessore dello strato (dell'ordine dei decimi di mm. La diversa capacità di ripartizione dei componenti di una miscela nei sistemi di sviluppo più frequentemente utilizzati conferisce alla TLC una versatilità di applicazioni riscontrabili solo con allestimenti assai complessi in altre tecniche cromatografiche. Le sostanze presenti nelle miscele in esame vengono identificate in base al loro R_f(rapporto tra il percorso della sostanza e il fronte di migrazione del solvente) e allo specifico comportamento verso taluni reattivi e/o fonti di eccitazione molecolare (radiazioni UV a 254 nm e 360 nm).
L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) rappresenta la soluzione strumentale più efficace della cromatografia liquida e si avvale di una strumentazione standardizzata e sufficientemente automatizzata. A seconda del tipo di fase stazionaria e di sistema eluente, si distinguono una tecnica in fase diretta e una in fase inversa. Nella prima, la fase stazionaria è polare (tra le fasi più usate ci sono zuccheri, amido, silicati di alluminio e magnesio, gel di silice, allumina), mentre la fase mobile è apolare, rappresentata generalmente dai più comuni solventi organici (cloroformio, tetracloruro di carbonio, metanolo). La tecnica in fase inversa, assai più versatile e di più ampia potenzialità rispetto alla prima, prevede, invece, una fase stazionaria apolare (come silice modificata dal legame con catene idrocarburiche) e una fase mobile polare (miscele di metanolo, acetonitrile, acqua, tamponi acquosi). I rivelatori più usati per l'HPLC sono lo spettrofotometro e lo spettrofluorimetro per sostanze fluorescenti. I rivelatori più sensibili sono quelli elettrochimici (amperometrici: 50-100 pg, coulometrici: 10-20 pg) e lo spettrometro di massa (1-5 pg), ciascuno idoneo a risolvere problemi specifici.
L'accuratezza e la precisione delle misure sono elevate, anche per l'uso di standard interni aggiunti al campione prima di sottoporlo al procedimento analitico. L'identificazione dei singoli componenti di una miscela avviene sulla base dei loro tempi di ritenzione (t_r) e fattori di capacità K' nel sistema adottato.
La gas-cromatografia in fase solida (GSC) e in fase liquida (GLC) utilizza un gas inerte (elio, argon, azoto) come fase mobile e come fase stazionaria un solido o, più spesso, un liquido adsorbito su un supporto inerte. La GLC costituisce la tecnica di più vasta applicazione, data l'estrema versatilità delle condizioni adottabili.
I componenti del campione, vaporizzato e trasportato dal gas, vengono separati in base alla loro polarità, ai loro punti di ebollizione e al loro peso molecolare.
Accuratezza e precisione delle misure sono elevate e così pure la specificità nell'identificazione dei composti in esame. I rivelatori usati in gas-cromatografia si distinguono in distruttivi e non distruttivi. I rivelatori a ionizzazione (a fiamma di idrogeno [FID), azotofosforo [NPD] e a cattura di elettroni [ECD]sono del tipo distruttivo.
Di sensibilità superiore, lo spettrometro di massa è un rivelatore molto particolare, sempre più spesso utilizzato all'uscita di una colonna cromatografica. L'uso di questo rivelatore permette un metodo conclusivo di conferma, ma la sua diffusione è ancora limitata dal costo e dall'esperienza specifica richiesta all'operatore.
L'analisi quantitativa necessita, come di consueto, di standard interni, più spesso rappresentati dagli stessi composti in esame marcati con un isotopo radioattivo (più frequentemente deuterio) che ne altera solo la massa . Essi mantengono lo stesso comportamento per quanto riguarda la separazione cromatografia, ma sono facilmente distinguibili dallo spettrometro di massa.
La derivatizzazione preliminare della molecola permette di superare le limitazioni all'uso della tecnica gas-cromatografica per l'analisi di sostanze tremolabili o ad elevato punto di ebollizione o che si degradano termicamente in colonna. Con i trimetilsililderivati, ad esempio, è possibile migliorare la volatilità o la stabilità termica di alcuni composti e quindi la risoluzione o efficienza della separazione