

## Linee guida: applicabilità ai test di screening e conferma nella determinazione delle droghe d'abuso

M. Jug

Laboratorio Ricerche Cliniche, Ospedale Maggiore, Azienda Ospedaliera "Ospedali Riuniti", Trieste

### Introduzione

Nel Laboratorio di Ricerche Cliniche dell'Ospedale Maggiore di Trieste si ricercano nelle urine come droghe d'abuso le seguenti sostanze: amfetamine/ecstasy, barbiturici, benzodiazepine, cannabinoidi, cocaina, metadone, oppiacei e naltrexone. Fino allo scorso anno si offriva anche la ricerca di LSD, ma la totale assenza di richieste ha indotto a ritirare il test.

Alcune sono droghe che derivano da fonti vegetali, come gli oppiacei dal *Papaver somniferum*, la cocaina dall'*Erythroxylon coca*, e i cannabinoidi dalla *Cannabis sativa*; altre sono molecole di sintesi che, prescrivibili come farmaci, possono dar luogo ad abuso.

Il nostro Laboratorio accoglie le richieste con fini esclusivamente clinici. Gli utenti sono il Pronto Soccorso, la Medicina d'Urgenza, il Servizio Psichiatrico di diagnosi e cura, il Servizio Ostetrico dell'Ospedale Infantile (per gestanti e neonati di madri tossico-dipendenti), ma soprattutto i SERT che richiedono in particolare la ricerca di metadone, oppiacei e naltrexone per il controllo della compliance alla terapia di disassuefazione. Nonostante la legge 162/90 abbia coinvolto fortemente i Laboratori con le richieste di ricerca delle droghe d'abuso sia negli assuntori cronici che in quegli occasionali, in Italia non sono mai state formulate linee guida per disciplinare questo campo analitico.

Abbiamo pertanto consultato le linee guida T/DM8-A del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) "*Urine Drug Testing in the Clinical Laboratory; Approved Guideline*" e quelle della Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) "*Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs*".

Le linee guida NCCLS: riguardano i programmi di controllo eseguiti su urine e finalizzati a prevenire le conseguenze sanitarie ed economiche dell'abuso da parte di studenti, atleti, lavoratori e persone in cerca d'impiego e non riguardano, invece, i test richiesti per motivazioni cliniche (pazienti in condizioni acute in cui si sospetti l'assunzione di sostanze stupefacenti). Le linee guida SAMHSA: riguardano i lavoratori di Enti Federali che debbono essere sottoposti a programmi di controllo e prevenzione sia per la loro salute

individuale sia per la sicurezza degli utenti di tali Enti. Le linee guida NCCLS sono organizzate in capitoli dedicati alla fase preanalitica (raccolta, conservazione e trasporto del campione), alla fase analitica (metodologie e struttura del laboratorio) ed alla fase postanalitica (refertazione, archiviazione e mantenimento dei campioni). L'organizzazione delle linee guida SAMHSA è analoga, ma più articolata per la finalità legale specifica del programma.

Abbiamo voluto compiere uno studio comparato di tali linee guida tenendo conto anche delle proposte delle Case produttrici delle metodiche da noi adottate e delle esperienze finora maturate, nell'intento di meglio adattare queste linee guida alla realtà italiana.

### Fase preanalitica

L'attenzione delle linee guida è rivolta all'identificazione del soggetto in esame, alla prevenzione della sostituzione mediante l'opportuna catena di custodia, al rilievo di eventuali adulterazioni (tramite la determinazione della temperatura del campione entro i primi quattro minuti dall'emissione, del pH, della creatinuria che, se < 20 mg/dL, è indice di sospetta diluizione).

Il nostro Laboratorio riceve i campioni da parte dei Reparti e Servizi inviati senza effettuare di norma questo genere di controlli data la natura clinica della nostra attività. Le determinazioni a fini legali sono sostenute dall'Istituto di Medicina Legale della locale Università.

Le richieste per pazienti acuti sono una piccola parte dell'attività svolta, mentre le richieste dai SERT nel 2000 sono state 15000 (Tab. I).

Tabella I. Test su droghe d'abuso eseguiti nell'anno 2000.

| Test               | Richieste urgenti | Richieste routine | Totali |
|--------------------|-------------------|-------------------|--------|
| amfetamine/ecstasy | 276               | 2.922             | 3.198  |
| barbiturici        | 355               | 2.640             | 2.995  |
| benzodiazepine     | 374               | 3.473             | 3.847  |
| cannabinoidi       | 276               | 2.542             | 2.818  |
| cocaina            | 266               | 8.571             | 8.837  |
| metadone           | 265               | 14.532            | 14.797 |
| oppiacei           | 283               | 14.903            | 15.186 |
| naltrexone         | /                 | 496               | 496    |

Le richieste urgenti, spesso richiedenti l'intero pannello di droghe ricercabili nelle urine, arrivano in Laboratorio mediamente in 30 minuti e vengono evase entro un'ora.

La raccolta dei campioni ai SERT è più complessa: l'orario di accettazione dei pazienti va dalle 9 alle 13 e dalle 19 alle 20 dal lunedì al venerdì, dalle 9 alle 13 al sabato.

Il campione viene prodotto, sotto il controllo di un infermiere, in un contenitore e quindi trasferito in un vacutainer di vetro da 10 mL mediante un apposito aspiratore; il campione viene identificato con l'apposizione di un'etichetta con codice a barre corrispondente a quella del modulo di richiesta e quindi riposto in frigorifero (2-8 °C). Il modulo di richiesta riporta le generalità del paziente in modo semi-anonimo, poiché il sistema informatico del Laboratorio necessita della data di nascita, del sesso e di almeno due lettere del nome e cognome.

I campioni vengono recapitati dai SERT al Laboratorio dal servizio trasporti dell'Azienda Sanitaria, ogni giorno dal lunedì al venerdì: questo comporta l'inconveniente che i campioni raccolti al venerdì sono processati soltanto il lunedì successivo.

A questo proposito, il NCCLS raccomanda di eseguire il test entro 5 giorni di conservazione a 2-8 °C, anche se mette in guardia dai fenomeni di instabilità delle sostanze e segnala il possibile adsorbimento dei cannabinoidi sulle pareti di vetro delle provette. La ditta Dade-Behring, produttrice dei test EMIT da noi adottati, raccomanda una conservazione in frigorifero <24 ore, poi il campione dovrebbe essere congelato; raccomanda inoltre di provare il pH di ogni campione (dev'essere tra 5 e 8). La ditta Abbott, anch'essa da noi utilizzata, raccomanda che i campioni vengano analizzati entro 48 ore di refrigerazione. La nostra esperienza ha evidenziato che un campione risultato positivo per cannabinoidi se rianalizzato dopo 24 ore può risultare negativo perché il valore decresce sotto quello del cut-off.

Se i campioni sono stati raccolti da molte ore prima di essere recapitati al Laboratorio, la precipitazione dei sali causa torbidità e formazione di abbondante sedimento, soprattutto se il campione è stato refrigerato: in tal caso, bisogna centrifugare il campione a 12.000 giri. Tutti i campioni vanno comunque portati a temperatura ambiente prima di essere analizzati. Presso il nostro Laboratorio eseguiamo l'analisi della creatinuria sui campioni di aspetto dubbio o comunque su richiesta del SERT.

### Fase analitica

Il laboratorio deve poter offrire un pannello di test per droghe d'abuso adeguato all'epidemiologia locale, aggiornando l'offerta di test se il consumo di droghe d'abuso nella popolazione servita va incontro a cambiamenti. I metodi devono avere una risposta adeguata alla situazione clinica che ha originato la richiesta analitica.

In primo luogo, debbono essere eseguiti test di screening per separare i campioni negativi da quelli positivi ed a tale scopo sono indicati i metodi immunochimici e quelli in cromatografia su strato sottile (TLC).

#### Metodi immunochimici in fase omogenea

Sono i metodi più adatti per rispondere ai quesiti dei Clinici essendo metodi diretti, automatizzati, veloci, di facile esecuzione, richiedono piccoli volumi di campione e forniscono una risposta semiquantitativa oppure numerica (variazione di densità ottica oppure la concentrazione). Nel nostro Laboratorio sono i metodi di screening adottati sia nel settore Urgenze sia nel settore di Farmaco-tossicologia che espleta soprattutto le richieste provenienti dai SERT. Lo strumento da noi adottato è l'RXL Dimension (Dade-Behring) che utilizza il metodo immunochimico EMIT (Enzyme multiplied immunoassay test); i reattivi sono forniti in cartucce pronte all'uso.

I metodi EMIT sono basati sulla competizione per i siti leganti dell'anticorpo tra il farmaco d'abuso presente nel campione ed il farmaco marcato con l'enzima glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G6PDH). La specificità del metodo dipende dal lotto di anticorpi usato e può variare tra lotto e lotto di cartucce reagenti (Tab. II).

Tabella II. Metodiche EMIT - RxL Dade Behring.

| Test           | Molecola calibrata              | Anticorpi diretti contro             |
|----------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| amfetamine     | d-amfetamina                    | d-amfetamina,<br>d-metamfetamina     |
| barbiturici    | secobarbital                    | secobarbital                         |
| benzodiazepine | lormetazepam                    | diazepam                             |
| cocaina        | benzoilecgonina                 | benzoilecgonina                      |
| metadone       | metadone                        | metadone                             |
| oppiacei       | morfina                         | morfina                              |
| cannabinoidi   | 11-nor- D <sup>9</sup> THC COOH | Δ <sup>9</sup> -tetraidrocannabinolo |

Vediamo ad esempio il metodo per i metaboliti urinari della cocaina: la cartuccia contiene lotti combinati di anticorpi policlonali reattivi al benzoilecgonina e di molecole di benzoilecgonina marcate con G6PDH. Le molecole di benzoilecgonina presenti nell'urina del campione e quelle del reattivo si legano ai siti anticorpali; l'enzima coniugato al benzoilecgonina che non si è legato all'anticorpo resta attivo e può catalizzare l'ossidazione di glucosio-6-fosfato con la contemporanea riduzione di NAD<sup>+</sup> a NADH. Si registra quindi una variazione di densità ottica (DO) inversamente proporzionale alla concentrazione della sostanza d'abuso presente nel campione, secondo una curva di calibrazione non lineare appositamente allestita. Risulta però che anche campioni totalmente privi della sostanza in esame possono dar luogo a variazioni di DO e si impone la scelta di un cut-off.

Il cut-off si può definire una soglia di sensibilità, scelta in base agli obiettivi analitici e alla popolazione servita, che distingue i campioni in negativi e positivi (Tab. III).

**Tabella III. Comparazione tra livelli di cut-off consigliati e sensibilità analitica.**

| Test           | Cut-off        | Cut-off              | Sensibilità (ng/mL) |
|----------------|----------------|----------------------|---------------------|
|                | SAMHSA (ng/mL) | Dade Behring (ng/mL) |                     |
| amfetamine     | 500            | 1000                 | 500                 |
| barbiturici    | /              | 200                  | 20                  |
| benzodiazepine | /              | 200                  | 30                  |
| cannabinoidi   | 50             | 50                   | 15                  |
| cocaina        | 150            | 300                  | 35                  |
| metadone       | /              | 300                  | 107                 |
| oppiacei       | 2000           | 2000                 | 140                 |

Le linee guida NCCLS non indicano valori di cut-off, ma raccomandano che il laboratorio calcoli la soglia dopo aver analizzato urine sicuramente negative della popolazione locale. Per assicurare la riproducibilità dei risultati, alla concentrazione di cut-off si dà di solito un valore superiore al limite di sensibilità: un metodo consigliato è quello di elaborare il valore medio dei campioni negativi più o meno 2 DS e usare questo come cut-off.

*Cromatografia su strato sottile (TLC: Thin Layer Chromatography).*

È un metodo indiretto che richiede volumi elevati di campione, relativamente lento, utilizza talvolta sostanze nocive, può analizzare pochi campioni per volta, è esclusivamente manuale, abbisogna di una interpretazione soggettiva che richiede un'adeguata esperienza e fornisce una risposta soltanto di tipo qualitativo.

Il nostro Laboratorio utilizza la TLC per le richieste specifiche per l'Ecstasy e per tutti i campioni che sono risultati positivi per le amfetamine al test immunochimico, in modo da dirimere il problema della cross-reattività degli anticorpi nei confronti di Amfetamine, Antidepressivi Triciclici e Fenotiazine, data la somiglianza strutturale di varie molecole appartenenti a queste tre classi; inoltre, viene utilizzata su urine e/o succo gastrico nei casi di intossicazioni polifarmacologiche (tentati suicidi). Il nostro Laboratorio la utilizzava anche per la ricerca del naltrexone fino al '92, quando il nostro gruppo di Tossicologia riuscì ad elaborare un metodo qualitativo in HPLC con rivelatore UV. La TLC viene eseguita solo dal personale della sezione di farmaco-tossicologia, data la complessità della metodica.

Il nostro Laboratorio utilizza il metodo Toxi-Lab della ditta Medical Systems che consente di identificare un ampio spettro di sostanze. Sono disponibili due sistemi cromatografici su strato sottile: il Toxi-Lab A per sostanze basiche e neutre (analgesici, stimolanti, sedativi, alcune droghe d'abuso quali amfetamine ed ecstasy, morfina, codeina, metadone, ecc.) ed il Toxi-Lab B per sostanze acide e neutre (es. barbiturici ed altri ipnotici). I due sistemi si possono usare su fluidi biologici (urine, siero, succo gastrico) e su campioni solidi o liquidi di altra natura.

La prima fase consiste nell'estrazione delle sostanze da determinare dal fluido biologico mediante i Toxi-Tubi che contengono una miscela di solventi, di sali tamponati a pH noto, un colorante di fase ed una resina.

Gli estratti vengono concentrati su un'apposita piastra riscaldante: le sostanze ignote si depositano sui dischi di cromatografia e questi sono posti negli appositi spazi della lastrina di cromatografia. Le lastre di cromatografia sono costituite da rettangoli di microfibra di vetro, ricoperti sulle due facce di gel di silice. Alla base presentano sei fori: nei due fori centrali sono posti i dischi con i campioni (si possono quindi eseguire due sole analisi per volta), mentre i quattro fori esterni sono occupati da dischi standard contenenti una quarantina di sostanze addizionate di un colorante rosa che segnala il fronte della migrazione. Le lastre sono quindi immerse in contenitori contenenti piccole quantità di liquidi organici ed avviene così l'eluizione dei campioni e degli standard che consente la migrazione dei farmaci sui cromatogrammi. Infine, si immergono le lastre nei reagenti cromogeni e si procede all'identificazione delle macchie risultanti confrontando la posizione, il colore (per visione diretta e in camera di Wood) della macchia ignota con quelle dello standard adiacente con simile Rf e analoghe caratteristiche cromatiche.

I materiali vanno conservati fra i 25 e 30°C negli appositi vasetti contenenti un essiccatore. Sono suscettibili di contaminazione e vanno manipolati sempre con pinze pulite. Il Laboratorio dev'essere in grado di assicurare una bassa probabilità di falsi positivi, anche in situazioni in cui per legge non sono richiesti test di conferma. I test di conferma debbono comunque essere eseguiti con una metodica che utilizza principi analitici diversi da quelli del test di screening: attualmente i metodi consigliati si eseguono su strumentazioni complesse quali CG-MS, HPLC-MS e CE-MS, affidati a personale particolarmente preparato (Tab. IV).

**Tabella IV. Metodologia test di conferma per droghe d'abuso.**

|         | Sistema di separazione                  | Rivelatore            |
|---------|---|-----------------------|
| CG-MS   | Gas cromatografia                       | Spettrometro di massa |
| HPLC-MS | Cromatografia liquida ad alta pressione | Spettrometro di massa |
| CE-MS   | Elettroforesi capillare                 | Spettrometro di massa |

Il NCCLS raccomanda che i test di conferma siano eseguiti in CG-MS, apparecchiatura di cui non siamo forniti; eventuali richieste del medico curante di approfondimento e conferma di risultati di screening vengono perciò inoltrate ad altri Laboratori.

### Fase postanalitica

Il risultato finale viene espresso come campione positivo o negativo per la ricerca della sostanza o della classe volute.

Negatività significa che la sostanza non è determinabile, perché non è mai stata assunta o assunta con dose o frequenza insufficiente, o assunta in un periodo di tempo troppo lontano dalla produzione del campione, o che le urine sono state diluite per dolo o per ingestione massiccia di liquidi oppure sono state adulterate.

Positività significa che la sostanza è presente nell'urina, ma nulla si può dire sulla quantità della dose né sul momento dell'assunzione dato che la concentrazione urinaria della sostanza d'abuso non è in alcun modo correlata con la concentrazione ematica della sostanza e non può pertanto fornire informazioni cliniche sulla disabilità psico-fisica del paziente quando ha prodotto il campione; la risposta positiva può essere anche dovuta alla presenza di sostanze che danno cross-reattività con la sostanza in esame.

I metodi immunochimici possono dare una risposta numerica di concentrazione apparente, perché elaborata verso la curva di taratura e, come evidenziato in Tabella II, il può non essere diretto contro la sostanza realmente assunta dal paziente.

Migliori informazioni cliniche si ottengono dalla ricerca quantitativa delle sostanze d'abuso nel sangue, ma i metodi e le strumentazioni sono ancora troppo indaginosi per poter essere adottati dai Laboratori di ricerche cliniche.

Il NCCLS raccomanda che la trasmissione dei risultati avvenga per iscritto, per evitare facili malintesi. Il nostro Laboratorio trasmette quotidianamente i risultati ai SERT via fax entro le ore 13, mentre i referti scritti sono consegnati il giorno successivo; i risultati delle richieste urgenti sono comunicati telefonicamente al Medico richiedente od a personale sanitario da lui delegato. Quest'ultima prassi sarà abbandonata non appena completato il collegamento telematico tra Reparti e Laboratorio.

*Mantenimento dei campioni:* il NCCLS raccomanda di conservare in frigorifero i campioni, in vista di ulteriori richieste analitiche, non oltre i tempi di stabilità delle sostanze d'abuso; se necessario tempi maggiori, conservare a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Conservazione dei fogli di lavoro, dei cromatogrammi e delle stampate strumentali:* NCCLS raccomanda un periodo di due-tre anni per la gran parte delle situazioni cliniche. I risultati veri e propri devono essere conservati per un periodo più lungo, in accordo con la giurisprudenza locale sulle cause civili. Nella nostra realtà, data la penuria di spazi archivistici i fogli di lavoro e simili sono conservati per sei mesi; i risultati sono memorizzati nel sistema informatico e recuperabili entro 5 anni.

*Controllo di qualità:* programma intralaboratorio che tende a valutare la attendibilità del sistema analitico per campioni contenenti concentrazioni note di sostanze. Il NCCLS raccomanda per ogni batch di analisi l'esecuzione di controlli: un campione di urina certificato esente da sostanze, uno contenente concentrazioni tra il 50-80 % della soglia che serve da controllo negativo; uno contenente concentrazioni tra il 110-125 % della soglia o più che serve come controllo positivo. Nella nostra realtà sono in uso controlli della Dade Behring come negativo e positivo costituiti da urine addizionate di sostanze d'abuso, che vengono eseguiti almeno una volta nelle 24 ore. NCCLS raccomanda che 1% dei campioni o almeno uno per batch sia costituito da campioni ciechi: questa direttiva al momento non viene seguita.

*Proficiency testing o test di abilità:* è un programma interlaboratorio finalizzato a verificare la validità e specificità dei metodi usati per l'analisi qualitativa e quantitativa di campioni che possono contenere o non contenere analiti prescelti da una lista preventivamente comunicata al laboratorio.

Il nostro Laboratorio aderisce al programma di proficiency testing organizzato dal CBFT (Centre of Behavioural and Forensic Toxicology) dell'Università di Padova, che prevede quattro invii annuali di sei campioni incogniti ciascuno. Il programma si articola in tre livelli: un primo in cui il laboratorio deve riconoscere le classi di sostanze; un secondo in cui deve riconoscere le singole sostanze; un terzo in cui deve fare analisi quantitativa delle singole sostanze. Il nostro laboratorio partecipa al primo livello del proficiency testing.

## Conclusioni

I contenuti generali delle linee guida si trovano già compresi nei diversi capitoli del manuale dell'accreditamento, a cui il laboratorio si sta preparando secondo la normativa della Regione Friuli Venezia Giulia.

I contenuti specifici devono essere frutto di un processo di consenso anche a livello locale, di equilibrio tra risorse di struttura e personale, tra richieste motivate dei clinici e offerte motivate del Responsabile, perseguendo l'obiettivo di aderire a una pratica di lavoro sempre più basata sull'efficacia dei risultati.

## Bibliografia

1. Malizia E. Ed. Tascabili Newton. Le droghe. 1997:12-15.
2. Ferrara SD. Il laboratorio di tossicologia e farmacologia clinica. Torino: Ed. Medico Scientifiche 1989:665-812; 857-81.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Urine drug testing in the clinical laboratory; Approved Guideline. NCCLS Document T/DM8-A. Villanova, PA: NCCLS 1999;vol.19,n.6.
4. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs. Comunicazione F. Tagliaro, Istituto di Medicina Legale UCSC Roma, all'incontro di aggiornamento "Il laboratorio di tossicologia clinica: attualità e prospettive", Trieste 26-01-2001.
5. Tagliaro F. Comunicazione all'incontro di aggiornamento "Il laboratorio di tossicologia clinica: attualità e prospettive", Trieste 26-01-2001.
6. Franceschin A. Comunicazione all'incontro di aggiornamento "Il laboratorio di tossicologia clinica: attualità e prospettive", Trieste 26-01-2001.
7. Gregori P, Fernetich E, Giacomini G. Metodo in HPLC per la ricerca di naltrexone nelle urine di tossicodipendenti. *Biochimica Clinica* 1994;18:68.
8. Reattivo di Dragendorf, Clarke's isolation and identification of drugs, 1986, modificato con l'aggiunta di iodio. Manuale Toxi-Lab for rapid drug detection, Medical Systems, pag 7.