



**Università degli Studi di Napoli
"FEDERICO II"**

**DOTTORATO DI RICERCA
IN AMBIENTE, PREVENZIONE E MEDICINA PUBBLICA
(XXV ciclo)**

Coordinatore Ch.mo Prof. Claudio Buccelli

INDIRIZZO SCIENZE BIOLOGICHE FORENSI

TESI DI DOTTORATO

**Validazione di metodi analitici per la determinazione di
sostanze d'abuso in matrice urinaria:
analisi di screening e analisi di conferma**

Tutor
Ch.mo Prof. Antonio Acampora

Dottoranda
Veronica Settembre

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

INDICE

	<i>pag</i>
INTRODUZIONE	<i>1</i>
1. Sostanze stupefacenti: classificazione ed effetti	<i>1</i>
1.1. Amfetamine	<i>3</i>
1.2. Cocaina	<i>6</i>
1.3. Cannabinoidi	<i>8</i>
1.4. Oppiacei	<i>10</i>
2. L'uso delle sostanze stupefacenti in Europa e in Italia	<i>14</i>
3. Analisi di sostanze stupefacenti: scopi e aspetti normativi	<i>15</i>
4. Analisi tossicologiche di stupefacenti in ambito forense: aspetti analitici	<i>18</i>
5. Teoria delle tecniche analitiche	<i>21</i>
5.1. Metodi di conferma	<i>21</i>
5.2. Gas-cromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa con Ionizzazione Elettronica (GC/EI-MS)	<i>21</i>
5.3. Metodi di screening	<i>23</i>
5.4. Metodi di quantificazione	<i>25</i>
6. Validazione di un metodo analitico	<i>27</i>
6.1. Parametri di validazione dei metodi di conferma	<i>28</i>
6.2. Parametri di validazione dei test di screening	<i>32</i>
7. Scopo del progetto	<i>36</i>

PARTE SPERIMENTALE	38
8. Materiali	38
9. Metodi di validazione delle analisi di conferma	39
9.1. Procedure di estrazione SPE	39
9.2. Condizioni strumentali	43
9.3. Parametri di acquisizione	45
9.4. Preparazione dei campioni	46
10. Metodi per la validazione delle tecniche di screening	50
10.1. Preparazione dei campioni	50
10.2. Screening <i>on-site</i>	54
10.3. Test di screening con strumenti da banco	54
10.4. Analisi GC/MS-SIM	56
RISULTATI E DISCUSSIONE	57
11. Validazione delle analisi di conferma	57
12. Validazione delle tecniche di screening	64
CONCLUSIONI	81
ABBREVIAZIONI	83
BIBLIOGRAFIA	85

INTRODUZIONE

Le sostanze stupefacenti sono conosciute e usate dall'uomo sin da epoche antichissime, quando erano considerate magiche ed erano impiegate nei riti religiosi poiché il loro consumo era visto come unico modo per avvicinarsi alla percezione degli Dei.

Oggi l'abuso/uso di sostanze psicoattive è spesso espressione di un disagio fisico o emotivo che una persona vive senza essere capace di risolverlo, ma nello stesso tempo anche un eccessivo stato di benessere può provocare, soprattutto in giovani e adolescenti, un'irrefrenabile necessità di scoprire "sensazioni nuove". La personalità, le situazioni individuali, familiari e sociali, e la mancanza di valori morali creano le condizioni ottimali che spingono un soggetto all'uso sfrenato di sostanze stupefacenti, nella speranza di trovare in esse un mezzo di benessere e felicità apparente.

1. Sostanze stupefacenti: classificazione ed effetti

Per *droga* s'intende qualsiasi sostanza che abbia un effetto sul sistema nervoso centrale e che sia capace di alterare l'equilibrio psicofisico di un soggetto.¹

L'uso della droga determina l'insorgere di fenomeni patologici ad essa correlati, che sono determinati dalle rispettive proprietà tossicologiche degli stupefacenti, dalle modalità di assunzione e più in generale, dalle condizioni di vita dell'assuntore.²

Le sostanze stupefacenti possono essere classificate in base a molteplici criteri.

I *criteri giuridici* risentono delle legislazioni dei singoli Stati. In Italia, le sostanze stupefacenti o psicotrope sottoposte alla vigilanza e al controllo del

Ministero della Salute sono raggruppate in conformità ai parametri di cui all'art. 14, D.P.R. n.309/90 e successive modifiche, in due tabelle (di cui la seconda è divisa in cinque sotto tabelle) che contengono l'elenco di tutte le sostanze e i preparati indicati nelle convenzioni e negli accordi internazionali e sottoposte a continuo aggiornamento.³

Il ***criterio di pericolosità*** distingue le sostanze d'abuso in rapporto alla loro pericolosità individuale e collettiva. A tal proposito abbiamo una distinzione in droghe pesanti e leggere. Tale classificazione dipende più dal giudizio sociale che dall'effettiva tossicità delle sostanze ed è discutibile, in quanto le droghe sono definite con i suddetti aggettivi senza alcun riferimento a dose e modalità d'assunzione.

Il ***criterio di preparazione*** è utilizzato principalmente in aggiunta alle altre classificazioni. Il profilo farmacologico, nonché la concentrazione di principio attivo di una sostanza d'abuso sono condizionati dalla modalità di preparazione della stessa; distinguiamo, quindi, i principi attivi semisintetici e sintetici, grezzi o semilavorati rispetto a quelli naturali.³

Secondo i ***criteri farmacologici***, invece, possiamo suddividere le droghe in base all'attività da loro esercitata sul Sistema Nervoso Centrale (S.N.C.) in tre sottogruppi diversi (Tabella 1): deprimenti l'attività del S.N.C. (narcotici, barbiturici, alcool etilico e solventi organici), stimolanti l'attività del S.N.C. (cocaina, amfetamine, caffeina e antidepressivi) e psichedelici (derivati della cannabis e allucinogeni).²

Deprimenti l'attività del S.N.C.	Stimolanti l'attività del S.N.C.	Psichedelici
Alcool etilico Inalanti, solventi organici Narcotici (oppio, morfina, eroina) Barbiturici	Cocaina Amfetamine Caffeina Antidepressivi	Cannabis ^a (hashish, marijuana) Allucinogeni (LSD, Mescalina, psilocibina, scopolamina)

Tabella 1: Classificazione sintomatologica delle principali droghe psicoattive.

^aLa cannabis provoca effetti tipici non raggruppabili con quelli delle altre droghe.

Nei seguenti sotto paragrafi s'illustrano le caratteristiche farmacodinamiche e farmacocinetiche delle principali classi di sostanze stupefacenti.

1.1. Amfetamine

Le amfetamine sono sostanze di origine sintetica ad azione stimolante sul S.N.C. che agiscono sulla regolazione del sonno, dell'umore, dell'appetito e appartengono al gruppo delle ammine simpatico-mimetiche.²

L'amfetamina (Figura 1), il capostipite del gruppo, fu sintetizzata per la prima volta nel 1887, ma fu caratterizzata da un punto di vista farmacotossicologico solo nel 1935; fu usata a scopo terapeutico per la terapia dell'asma. L'amfetamina può essere assunta per via intra nasale, per via endovenosa o orale.

La metamfetamina (Figura 1) è assunta per via orale, ma anche fumata utilizzando le pipe e assunta per endovena; la somministrazione per fumo ed endovena provoca una rapida dipendenza psicologica.

Gli analoghi metilendiossi dell'amfetamina includono la 3,4-metilendiossi-amfetamina (MDA; Figura 1), la 3,4-metilendiossi-metilamfetamina (MDMA; Figura 1) e la 3,4-metilendiossi-etilamfetamina (MDEA; Figura 1); queste sono definite "*designer drugs*", poiché ricalcano lo scheletro di sostanze stupefacenti classiche come appunto l'amfetamina.⁴ In particolare, l'MDMA fu sintetizzato nel 1912 dalla Merck e commercializzato nel 1914 come farmaco anoressizzante; esso rappresenta il componente principale delle compresse di "ecstasy", definita come "*droga entactogena*"; con tale termine si sottolineano le proprietà dell'ecstasy di indurre uno stato psicologico tale da aumentare le capacità introspettive dei soggetti che ne fanno uso.

Attualmente si ritiene che l'attività dell'amfetamina e delle sostanze amfetaminosimili si realizzi attraverso molteplici azioni:

- inibizione delle monoamminossidasi (MAO)

- azione diretta sul rilascio di noradrenalina e dopamina dalle terminazioni nervose
- blocco del reuptake delle catecolamine dal vallo sinaptico
- azione diretta sui recettori adrenergici e dopaminergici

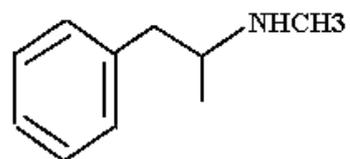
Farmacocinetica

Nell'uomo l'assorbimento delle amfetamine somministrate per via orale è rapido; il picco plasmatico si raggiunge in circa 2 ore e l'emivita è intorno alle 6-7 ore.

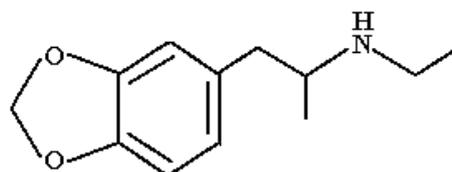
La maggior parte delle amfetamine viene escreta per via renale in forma parzialmente immodificata insieme a metaboliti idrossilati o deaminati.

La più importante via di metabolizzazione è la N-dealchilazione, una reazione ossidativa, catalizzata dal sistema del citocromo P-450, che porta alla formazione di MDA quale principale metabolita dell'MDMA e dell'MDEA.⁴

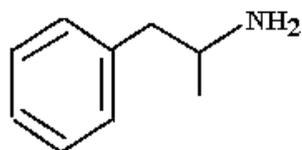
L'escrezione urinaria dipende fortemente dal pH: aumenta nelle urine acide (circa il 70% delle amfetamine vengono escrete nelle prime 24 ore e circa il 90% durante i primi 4 giorni) e diminuisce nelle urine basiche (il 45% nelle prime 24 ore e il 70% entro 5 giorni dall'assunzione).⁴⁻⁵



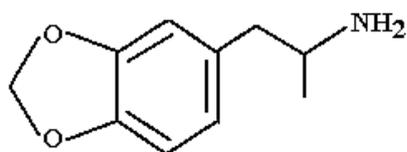
Metamfetamina



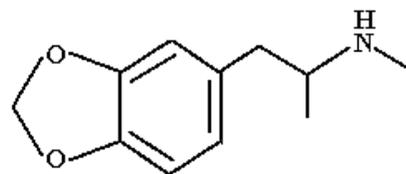
MDEA



Amfetamina



MDA



MDMA

Figura 1: Strutture molecolari di metamfetamina, MDEA, amfetamina, MDA, MDMA.

1.2. Cocaina

La cocaina (Figura 2) è una sostanza alcaloide estratta dalle foglie di *Erythroxylon coca*, una pianta originaria delle Ande. Nel 1860 Albert Niman isolò il principio chimico della coca, realizzando la “cocaina”. Il mondo medico pensò di promuoverne l’uso per la terapia della depressione, oltre che dell’asma e dell’obesità, ignorando l’incremento della relativa dipendenza e degli effetti collaterali.⁶ La cocaina comunque, deve essere considerata una scoperta importante della medicina moderna, perché fu il primo anestetico locale, permettendo grandi progressi di alcune forme di chirurgia, quale quella oftalmica.

La cocaina si lega ai trasportatori della ricaptazione della dopamina nel sistema nervoso centrale, inibendo il reuptake sia della dopamina sia dell’adrenalina. Uno dei sistemi neurali più interessato dall’azione della cocaina trova origine in una regione molto profonda del cervello chiamata “area ventrale del tegmento” (AVT), i cui neuroni si estendono al “Nucleus accumbens”, una delle aree chiave del piacere nel cervello.⁷

Farmacocinetica

La cocaina è assorbita rapidamente da tutti i siti di applicazione comprese le mucose, il tratto gastrointestinale e i polmoni. E’ inattivata sia nel plasma sia nel fegato.

La cocaina ha un’emivita biologica di 30-90 minuti, è quasi completamente metabolizzata dalle colinesterasi presenti sia nel plasma che nel fegato e solo piccole quantità sono escrete immodificate.⁶

Il metabolita principale è il composto inattivo benzoilecgonina (BEG; Figura 2), che può essere ritrovato nell’urina per circa 3 giorni e molto a lungo (15-22 giorni) nei consumatori cronici. Altro metabolita inattivo è l’ecgoninametilestere (EME; Figura 2), mentre solo una piccola quantità di cocaina è metabolizzata ad un intermedio attivo (norcocaina).

La rivelazione di benzoilecgonina nell'urina, comunque costituisce la base per l'accertamento dell'utilizzo di cocaina.

L'uso di cocaina inoltre, associato al consumo di alcool porta alla formazione del cocaetilene (Figura 2), un metabolita attivo, che è eliminato più lentamente della cocaina e ciò determina problemi di accumulo e una maggiore tossicità.⁷⁻⁸

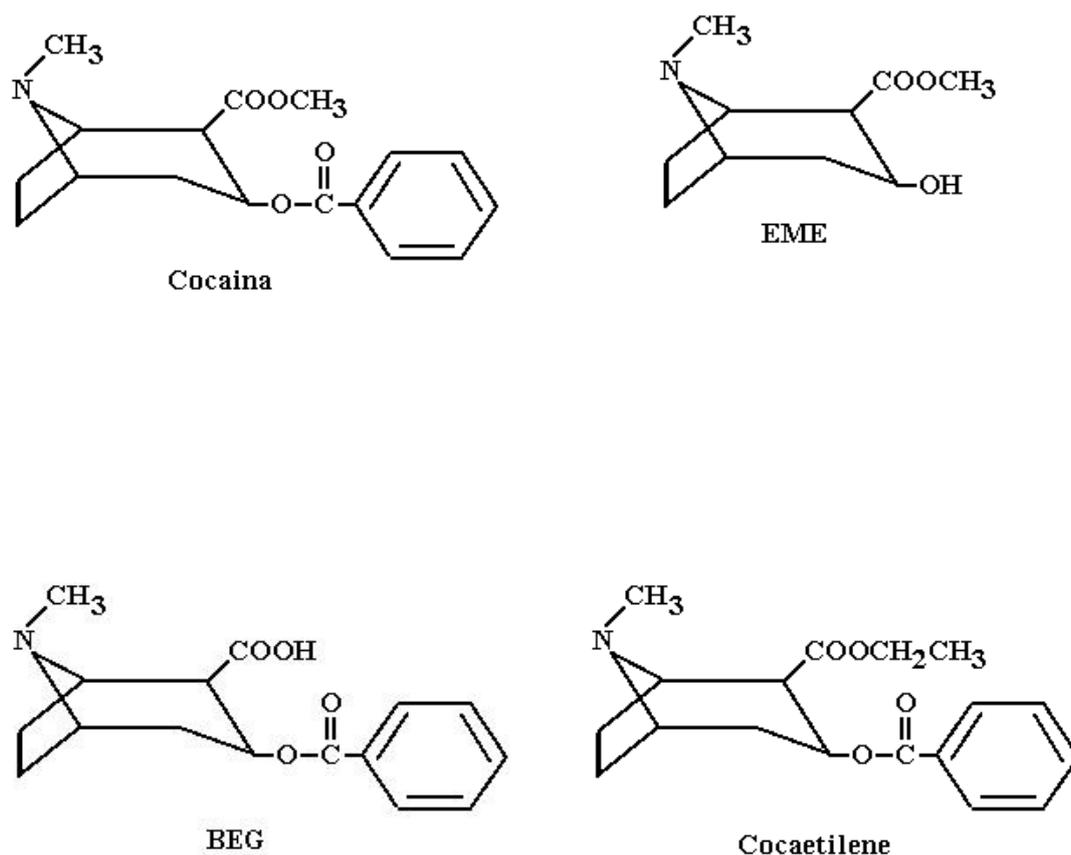


Figura 2: Strutture molecolari di cocaina, EME, BEG, cocaetilene.

1.3. Cannabinoidi

Nella *Cannabis*, da cui si prepara l'hashish e la marijuana, sono stati individuati oltre 60 tipi di cannabinoidi, di cui i più rappresentativi sono: il cannabigerolo (CBG), il cannabicromene (CBC), il cannabidiolo (CBD), il Δ 9-tetraidrocannabinolo (Δ 9-THC), Δ 8-THC, ed il cannabinolo (CBN).

Il Δ 9-THC (Figura 3) è in larga parte responsabile degli effetti farmacologici e delle proprietà psicoattive della cannabis, sebbene altri composti della pianta contribuiscano a taluno di questi effetti.¹⁰

Con il *DM 18 Aprile 2007*, l'introduzione del Δ 9-THC, del trans- Δ 9-THC (Dronabinol) e del Nabilone (cannabinoidi di sintesi) in Farmacopea, nella Tabella II, sezione B delle sostanze stupefacenti e psicotrope, rende possibile utilizzare tali sostanze nella terapia farmacologica (terapia del dolore, sclerosi multipla) e pone i presupposti per l'autorizzazione all'immissione in commercio nel mercato italiano.¹¹

L'azione dei cannabinoidi è mediata dal legame con specifici recettori (CB) appartenenti al sistema cannabinergico, sistema legato alla presenza di endocannabinoidi (anandamide, 2-arachidonoilglicerolo, 2-arachidonil-gliceril-etero, virodamina, N-arachidonoildopamina), ai quali è stato attribuito fisiologicamente un ruolo di regolazione inibitoria dell'eccitabilità neuronale.

I CB appartengono alla classe dei recettori accoppiati alle proteine G e possono essere distinti in due gruppi in base alla localizzazione anatomica:

➤ **CB 1:** individuati principalmente nell'encefalo, in particolare a livello dei gangli basali.

➤ **CB 2:** espressi principalmente sulle cellule T del sistema immunitario e a livello della milza.

Farmacocinetica

Il metabolismo del THC avviene soprattutto nel fegato ad opera delle idrossilasi microsomiali e i principali metaboliti ossidrilici sono: l'11-(OH)- Δ 9-THC (molto più attivo del Δ 9-THC), l'8- α -(OH)- Δ 9-THC, l'8- β -(OH)- Δ 9-THC.

Altri metaboliti sono l'8-cheto- Δ^9 -THC, il 9-10-epossido- Δ^9 -THC e l'acido 11-nor-THC-9-carbossilico (**THC-COOH**; Figura 3); quest'ultimo rappresenta il principale metabolita e la sua presenza in urina è essenziale per l'accertamento dell'abuso dei cannabinoidi.

Nel sangue il Δ^9 -THC, a causa della sua lipofilia, si lega alle lipoproteine plasmatiche (α e β lipoproteine) e si accumula nei tessuti lipidici permanendo nell'organismo anche per diverse settimane, per tale motivo i tempi di eliminazione sono molto lunghi e in THC-COOH può essere ritrovato in urina fino a 40 giorni.¹²

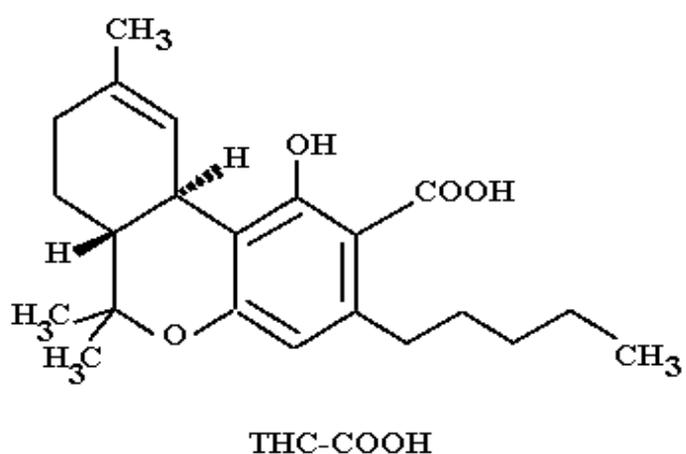
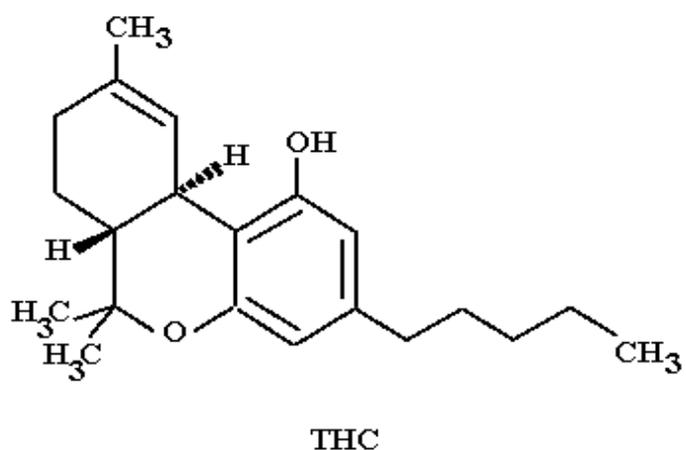


Figura 3: Strutture molecolari del THC e THC-COOH.

1.4. Oppiacei

Gli oppiacei rappresentano un gruppo di sostanze alcaloidi contenute nell'*oppio*, un essudato (lattice) secco che si estrae dalle capsule verdi del *Papaver Somniferum*.

Le sostanze alcaloidi contenute nell'oppio fino ad oggi conosciute sono più di 25 e possono essere distinte in due categorie strutturali: alcaloidi benzilisoquinolinici e alcaloidi fenantrenici; di questi ultimi il principale rappresentante è la morfina (che costituisce circa il 10% dell'oppio).²

La morfina (da Morfeo, Dio greco del sonno; Figura 4) è considerata il prototipo dei farmaci ad azione narcotico-analgesica ed è utilizzata attualmente per le sue proprietà farmacologiche nella terapia del dolore, mentre è il suo derivato semisintetico, l'*eroina* (3,6-diacetilmorfina; Figura 4), ad essere protagonista del mercato illecito degli stupefacenti. In Italia il trattamento della tossicodipendenza è stato contraddistinto a partire dagli ultimi decenni dall'uso del *metadone* (Figura 5), mentre la *buprenorfina* (Figura 5) è stata introdotta sul mercato italiano solo all'inizio del 2000.¹³

Il meccanismo d'azione degli oppiacei è correlato alla loro stereoselettività nei confronti di un sito di recettoriale specifico.¹⁴

La scoperta e la localizzazione di questi recettori hanno fornito i presupposti per la ricerca, l'isolamento e la caratterizzazione di sostanze endogene capaci di interagire con essi. Attualmente si conoscono tre famiglie di oppioidi endogeni: le *endorfine*, le *encefaline*, le *dinorfine*.

Sono stati identificati tre tipi di recettori degli oppioidi: μ , δ e κ , i quali presentano una concentrazione diversa in base alla localizzazione anatomica (principalmente midollo spinale, tronco cerebrale, locus coeruleus, diencefalo, telencefalo).

Le proprietà stupefacenti degli oppioidi appaiono legate soprattutto alla rispettiva capacità di agonismo col recettore μ , la cui attivazione, frenando a livello della AVT la tonica inibizione esercitata da neuroni gabaergici sui neuroni dopaminergici, determina un cospicuo aumento, dose dipendente, della

concentrazione extraneuronale di dopamina a livello del circuito mesolimbico di reward.

Il *metadone* è un agonista dei recettori oppioidi; esplica la sua azione principalmente a livello dei recettori μ ed è utilizzato al fine di stabilizzare l'occupazione dei recettori per gli oppiacei, normalizzando il rilascio di dopamina ed il tono del sistema oppiatergico.

La *buprenorfina*, invece, è un agonista parziale dei recettori μ , per cui è in grado di coprire il bisogno compulsivo di sostanze fino ad annullarne l'uso, ma senza raggiungere gli effetti collaterali degli agonisti completi.¹⁵

Farmacocinetica

L'eroina è metabolizzata, principalmente a livello epatico, in *6-monoacetilmorfina* (6-MAM; Figura 4) per idrolisi del legame estereo in posizione 3, e poi a *morfina* (Figura 4) per idrolisi di un ulteriore legame estereo in posizione 6. Morfina e 6-MAM sono i principi attivi responsabili dell'azione farmacologica dell'eroina stessa e risultano essere i principali metaboliti ritrovati nei liquidi biologici. In realtà, l'escrezione urinaria avviene per il 90% come morfina-glucuronato e solo nei primi minuti è possibile rilevare nel sangue il primo prodotto di idrolisi, cioè la 6-MAM.⁵

Un'ulteriore conferma dell'abuso di eroina può essere fornita dalla presenza di *codeina*. Quest'ultima infatti, è estratta dall'oppio come impurezza assieme alla morfina e, una volta assorbita, è metabolizzata ed escreta parzialmente nelle urine come sostanza immodificata.⁵

Il *metadone* e la *buprenorfina* si differenziano dall'eroina essenzialmente per la farmacocinetica: il buon assorbimento per via orale permette l'abbandono della pratica della somministrazione endovenosa e sopprime l'astinenza da oppiacei.¹⁶

La principale via biochimica del metabolismo del metadone è la N-demetilazione nel fegato che coinvolge la catalisi del citocromo P450, soprattutto del CYP3A4.

Questo produce due due metaboliti farmacologicamente inattivi: 2-etilidene-1,5-dimetil-3,3-difenilpyrrolidine (EDDP) e 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirrolina (EMDP).¹⁷

L'**EDDP** (Figura 4) è il principale metabolita urinario usato, insieme al metadone stesso, per l'accertamento di assunzione di quest'ultimo.

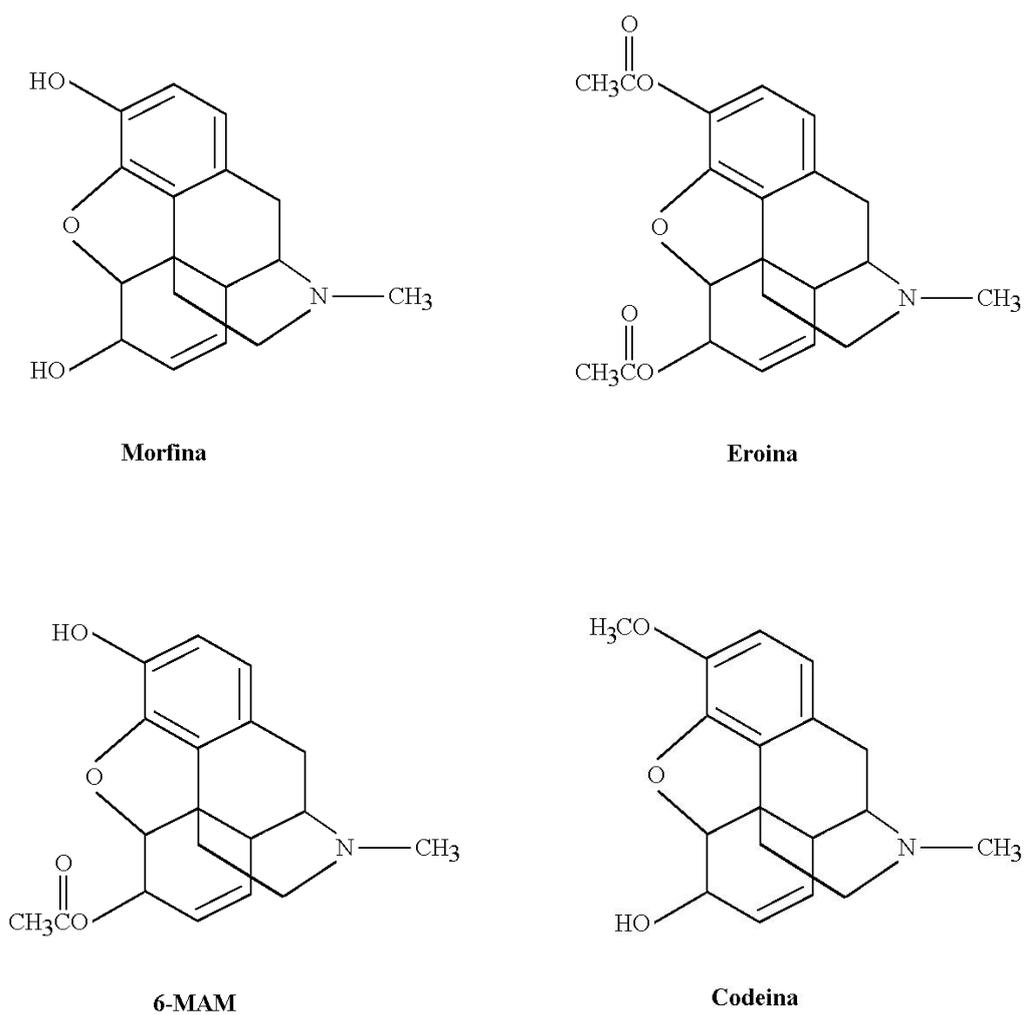


Figura 4: Strutture molecolari di morfina, eroina, 6-MAM, codeina.

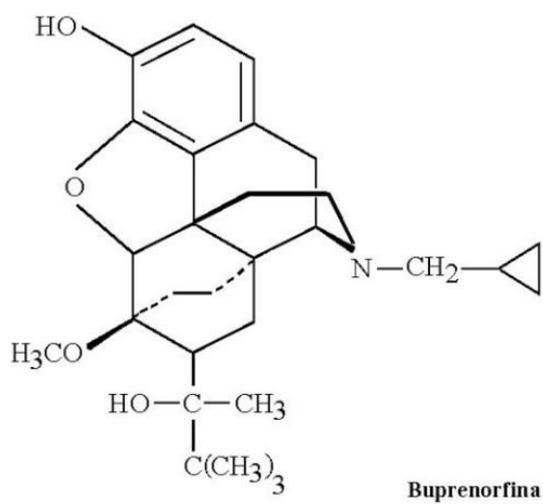
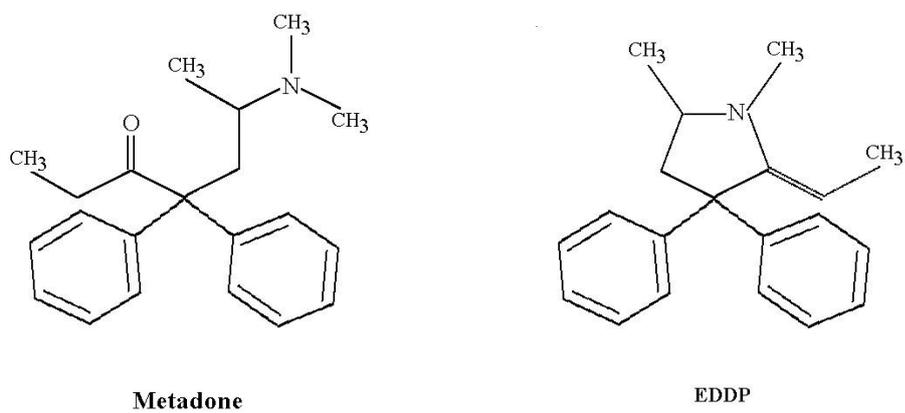


Figura 5: Strutture molecolari di metadone, EDDP e buprenorfina.

2. L'uso delle sostanze stupefacenti in Europa e in Italia

L'abuso delle sostanze stupefacenti costituisce una problematica rilevante, considerando il significativo impatto che tale fenomeno ha non solo sull'incremento delle attività criminali, ma anche sugli incidenti stradali e sui luoghi di lavoro.

Secondo il rapporto 2012 dell'European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA)¹⁸, il consumo è stabile o in declino; nonostante ciò le percentuali di consumo di droghe tra la popolazione europea restano allarmanti. Dalla stima delle percentuali di utilizzatori europei, con un'età compresa tra i 15-64 anni, è emerso che la sostanza più usata nell'ultimo anno è la cannabis (6.8% della popolazione europea di riferimento), seguita dalla cocaina (1.2%), ecstasy (0.6%), amfetamine (0.6%), oppioidi (consumatori stimati: 1.4 milioni di europei).

Il consumo di sostanze stupefacenti in Italia, rispecchia molto la situazione generale europea, in particolare, dai dati evidenziati dalle indagini demoscopiche e statistiche delle Relazioni annuali al Parlamento, dall'anno 2008 al 2012, si evidenzia una regressione sensibile del consumo delle sostanze stupefacenti. Infatti, già nel 2010 è mostrata una riduzione del 25.7% dei consumatori (intendendo con questo termine sia quelli occasionali che con dipendenza da sostanze/uso quotidiano) rispetto all'anno 2008.¹⁹ Tale decremento è diventato ancora più significativo nel 2012, in cui si è avuto un ulteriore calo di utilizzatori pari al 20.4% rispetto al 2010.²⁰

Nell'ultima indagine italiana (2012), su un campione di soggetti di età compresa tra 15-64 anni, le percentuali di consumo sono risultate rispettivamente di 0.08% per l'eroina (0.17% nel 2010), 0.29% per la cocaina (0.43% nel 2010), 1.82% per la cannabis (3.00% nel 2010), per gli stimolanti – amfetamine – ecstasy 0.04% (0.15% nel 2010), per gli allucinogeni 0.05% (0.10% nel 2010). Questo incoraggiante risultato è il frutto di una cooperazione delle Forze dell'Ordine che agiscono sul contrasto del narcotraffico e di coloro

che lavorano nell'ambito della cura e prevenzione della tossicodipendenza, nonché della riabilitazione e reinserimento, sia in ambito sociale che lavorativo.²⁰

3. Analisi di stupefacenti: scopi e aspetti normativi

L'uso di droghe e il fenomeno della tossicodipendenza è considerato un grave problema sociale da prevenire e fronteggiare su diversi livelli, al fine di ridurre i soggetti coinvolti sia nelle pratiche di consumo, che nelle attività criminali ad esso connesse.²¹

La normativa italiana punta, quindi, a limitare il consumo di droga nel paese attraverso diverse aree di intervento, che comprendono: legislazione e attività di contrasto, giustizia e tutela minorile, monitoraggio del fenomeno, prevenzione, cura e riabilitazione.²¹

La strategia d'intervento prevede, in molti di questi settori, la promozione di drug testing e/o analisi specifiche effettuate presso laboratori tossicologici.

In particolare le indagini tossicologiche finalizzate a determinare un eventuale uso/abuso di droghe vengono applicate a svariati ambiti e per diversi scopi:

a) analisi a scopo clinico: principalmente orientate alla diagnosi e alla cura dei tossicodipendenti afferenti a strutture pubbliche o private, determinando quali droghe o combinazione di droghe un soggetto può avere assunto, in modo da provvedere all'opportuno trattamento.

b) analisi in ambito sportivo (anti-doping): molte sostanze stupefacenti sono elencate nel D.M. del 24.01.2007 "Revisione della lista dei farmaci, delle sostanze biologicamente o farmacologicamente attive e delle pratiche mediche, il cui impiego è considerato doping, ai sensi della legge 14 dicembre 2000, n. 376."²²⁻²³

c) analisi per scopi amministrativi e forensi: comprendono una varietà di situazioni in cui la legislazione dispone il controllo dell'integrità psico-fisica di

un soggetto; a tal proposito, possono essere disposti accertamenti per evidenziare assunzione di droghe in casi di:

- Imputabilità di reato connesso ad uno stato di tossicodipendenza;
per il nostro Codice Penale (art.85) è imputabile colui che ha la capacità di intendere e volere. A tal proposito le alterazioni psico-fisiche di un assuntore possono escludere o diminuire l'imputabilità di quest'ultimo.²⁴ Inoltre, il DPR 309/909 (art 95),³ dispone che una persona condannata per reati connessi in relazione al proprio stato di tossicodipendenza, sconti la sua pena in istituti idonei, in quanto ha diritto a partecipare a programmi di diagnosi, cura e riabilitazione, al pari dei cittadini in stato di liberta".²⁵

- Custodia minorile;
la L. n. 54/2006 e L. n. 149/2001,²⁶⁻²⁷ regolano, rispettivamente, l'affidamento di minori in caso di separazione/divorzio dei coniugi e in caso di adozione. In entrambi i casi si prevede, ai fini della custodia, che i genitori (naturali o adottivi) debbano possedere un'idoneità psico-fisica tale da poter svolgere il ruolo di educatore nell'interesse del minore.

- Idoneità alla guida;
in base all'art. 187 del D.lgs 30.4.1992 n. 285²⁸ e successive modifiche²⁹⁻³⁰⁻³¹ è vietato guidare in condizioni di alterazione fisica e psichica correlata all'uso di sostanze stupefacenti o psicotrope.

In particolare, al comma 2 del suddetto D.lgs si prescrive che gli organi di Polizia Stradale possono sottoporre i conducenti ad accertamenti qualitativi non invasivi, anche attraverso apparecchi portatili. In caso di esito positivo, tuttavia, è necessario effettuare, secondo protocollo e presso opportune strutture, degli esami specifici volti ad accertare la presenza di sostanze stupefacenti o psicotrope.³²

- Idoneità al servizio militare;

come previsto dall'art. 91 del D.P.R. 14 febbraio 1964 n. 237 e dal D.P.R. n. 496 del 20 maggio 1964 non sono ammessi ad eseguire il servizio militare le persone dedite all'uso di sostanze stupefacenti.³³

- Sicurezza sul lavoro;

la sorveglianza sanitaria, come inteso dal D.Lgs. 81/08,³⁴ prevede all'art. 41 comma 4, l'effettuazione di visite mediche (preassuntive, periodiche, preventive, a seguito di un incidente o se il datore di lavoro ha un ragionevole sospetto che il dipendente faccia uso di droghe illegali) finalizzate alla verifica di assenza di condizioni di alcol dipendenza e di assunzione di sostanze psicotrope.

Lo scopo primario del suddetto decreto è la tutela della salute del lavoratore stesso, ma non è presente in esso un riferimento preciso al comportamento che il medico del lavoro deve avere qualora ci fossero particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi.

A tal proposito, invece, il D.P.R. n.309/90,³ all'art. 125 prevede l'espletamento di accertamenti in negativo, cioè di "assenza" di tossicodipendenza nei confronti di appartenenti alle categorie dei lavoratori destinati a mansioni che comportano rischi per la salute e incolumità altrui. Tuttavia, solo a partire dal 2007, con il Provvedimento della Conferenza Unificata n. 99 del 2007,³⁵ vengono definite in Allegato 1 (Tabella 2) le mansioni ritenute a rischio per l'incolumità di terzi; l'elenco comprende direttori delle centrali nucleari, autisti e piloti, i lavoratori del settore delle costruzioni (ad esempio macchinisti dei carrelli elevatori e lavoratori che operano oltre due metri di altezza), i lavoratori del settore fuochi d'artificio (compresa la produzione, trasporto, stoccaggio e vendita).

La Conferenza Permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano del 2008,³⁶ invece, definisce in Allegato A, le procedure operative per l'espletamento degli accertamenti previsti; tali

procedure sono state recepite dalla Regione Campania con Deliberazione n. 1448 del 11 settembre 2009.³⁷

L'esecuzione di questi controlli su lavoratori adibiti a mansioni a rischio è previsto in diversi casi: pre-affidamento della mansione, periodicamente (con frequenza annuale), per ragionevole dubbio, dopo un incidente, prima del rientro nella mansione a rischio dopo esito positivo per assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope.

Il riscontro di positività alle sostanze e/o dipendenza di questi lavoratori dovrà necessariamente portare alla messa in sicurezza di tali soggetti con conseguente allontanamento temporaneo dalla mansione. Contestualmente, però, il lavoratore avrà diritto ad opportuni trattamenti e alla conservazione del posto di lavoro durante il periodo di cura. Tali accertamenti eseguiti periodicamente e senza preavviso possono creare un forte deterrente all'uso di sostanze stupefacenti, prevenendo danni che potrebbero derivare dall'esercizio improprio di particolari attività lavorative effettuate da persone in stato di alterazione psico-fisica.

4. Analisi tossicologiche di stupefacenti in ambito forense: aspetti analitici

Le analisi tossicologiche con valenza legale possono assumere carattere di prova giudiziaria e, quindi, hanno necessità di possedere requisiti di affidabilità e di certezza, dimostrabili attraverso una documentazione chiara di ogni fase analitica affrontata.

Il primo punto da valutare, in corretto protocollo, è la scelta della matrice, questa può essere di tipo “convenzionale” (sangue, urina) o “alternativa” (matrice cheratinica, saliva, sudore).³⁸ Tale scelta è indirizzata in base all'informazione temporale circa il momento dell'assunzione che si vuole ottenere. In particolare, in caso in cui si debba stabilire un'attualità d'uso, le

matrici da analizzare sono sangue e/o saliva, al contrario, la matrice pilifera è usata per determinare lo stato di assuntore cronico.

Le procedure analitiche, comunque, prevedono nella maggior parte dei casi, l'utilizzo della **matrice urinaria**, in quanto consente un prelievo non invasivo, la possibilità di campionare grandi volumi e l'opportunità di determinare le sostanze e i loro metaboliti a distanza di giorni dall'assunzione (a seconda della farmacocinetica delle sostanze).³⁹

Di norma il campione urinario è analizzato in fase preliminare mediante un test di screening, al fine di escludere i campioni che non contengono stupefacenti o quelli che li contengono ad una concentrazione al di sotto di un limite soglia, definito *cut-off* analitico. Si sottolinea che un esito positivo riscontrato con uno screening non ha valore legale,³⁸ ma a tal proposito è necessario verificare l'effettiva positività di un campione mediante un'analisi di conferma, effettuata con metodiche più specifiche; queste ultime si basano su principi chimico-fisici diversi da quelli dei test iniziali e hanno *cut-off* analitici inferiori o uguali ai precedenti.

Il **cut-off** è una soluzione amministrativa scelta per discriminare i campioni positivi da quelli negativi e assume valori diversi a seconda della matrice e della tecnica adoperata. Tali valori sono principalmente stabiliti sulla statistica di campioni provenienti da soggetti non assuntori di stupefacenti.

Quando, infatti, si rileva nel campione una concentrazione uguale o inferiore al limite di *cut-off* non si può essere certi dell'avvenuta assunzione della droga, piuttosto la presenza di questa può essere attribuita a sostanze interferenti; l'introduzione dei valori di *cut-off* rende, quindi, più efficace l'interpretazione dei dati analitici e consente di non incorrere in eventuali falsi positivi.

La scelta dei *cut-off*, oltre ad essere fatta in base a criteri di tipo analitico, ha lo scopo di uniformare i risultati, in termini di positività o negatività, provenienti da diversi laboratori e ottenuti mediante metodi e strumenti con differenti sensibilità analitiche. A tal proposito, i valori soglia sono spesso stabiliti dalle normative che si avvalgono dell'esecuzione delle suddette analisi.

Di seguito riportiamo i cut-off urinari (sia di conferma che di screening) scelti per il presente lavoro di tesi (Tabelle 2 e 3) e riportati nella normativa per gli accertamenti sui lavoratori le cui mansioni comportino rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi.³⁶⁻³⁷

Droghe d'abuso	Cut-off (ng/mL)
Oppiacei e metaboliti	100
Cocaina e metaboliti	100
Cannabinoidi	15
Amfetamine, Metamfetamina	250
3,4-metilenediossimetamfetamina	250
Metadone	100
Buprenorfina ^a	5

Tabella 2: Livelli di cut-off delle analisi di conferma previsti dal Provvedimento n. 178/csr del 18.09.2008.

^aCut-off riportato nella Deliberazione della Regione Campania n.1448 del 11.9.2009.

Droghe d'abuso	Cut-off (ng/mL)
Oppiacei e metaboliti	300
Cocaina e metaboliti	300
Cannabinoidi	50
Amfetamine, Metamfetamina	500
3,4-metilenediossimetamfetamina	500
Metadone	300
Buprenorfina ^a	5

Tabella 3: Livelli di cut-off dei test di screening previsti dal Provvedimento n. 178/csr del 18.09.2008.

^aCut-off riportato nella Deliberazione della Regione Campania n.1448 del 11.9.2009.

5. Teoria delle tecniche analitiche

5.1. Metodi di conferma

Le tecniche di conferma, come detto precedentemente, devono basarsi su principi chimico-fisici diversi da quelli dei test di screening, identificare e quantificare le sostanze in esame e avere una sensibilità uguale o maggiore al valore soglia dei test iniziali (Tabella 2).

Le analisi di conferma devono essere specifiche per singolo analita, per ovviare alla non specificità assoluta dei test di screening, questi ultimi, infatti, basandosi su reazioni antigene-anticorpo possono originare dei risultati falsi positivi, conseguenti a delle reazioni di cross-reattività con altre sostanze o farmaci eventualmente presenti in urina.

La tecnica di elezione per un'analisi di conferma è la gas-cromatografia accoppiata ad uno spettrometro di massa.

5.2. Gas-cromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa con Ionizzazione Elettronica (GC/EI-MS)

La gas-cromatografia è una tecnica separativa ad alto potere risolutivo che consente la separazione di sostanze presenti in miscele complesse in base a proprietà chimico-fisiche quali temperatura di ebollizione e polarità delle molecole.

Come tutte le cromatografie, si basa sulla diversa ripartizione di sostanze volatili tra una fase stazionaria ed una fase mobile, in funzione dell'affinità di ogni sostanza con esse.

L'analisi può essere effettuata su composti di per se volatili, sui gas o sui composti che attraverso derivatizzazione diventano volatili.

In gas-cromatografia la fase stazionaria è generalmente costituita da un film sottile spesso qualche micrometro distribuito sulla parete interna di una colonna

di lunghezza superiore ai 10 metri e di diametro inferiore al millimetro (colonna capillare).

La fase mobile è un gas, detto anche gas di trasporto o carrier. Generalmente, vengono scelti gas chimicamente inerti, a bassa viscosità ed ottenibili ad elevata purezza quali l'azoto, l'elio o l'argon. Il campione, posto in testa alla colonna e sottoposto al flusso costante del gas di trasporto, viene separato nelle sue componenti in funzione sia di quanto queste siano affini (di solito per polarità) alla fase fissa sia dalla temperatura della colonna, che può essere tenuta costante ("isoterma") o fatta variare secondo un gradiente desiderato.

Al variare della temperatura, ogni componente della miscela si ripartisce in maniera differente tra la fase stazionaria e la fase vapore e viene dunque eluito in tempi diversi.

Il tempo che intercorre tra l'introduzione del campione in colonna e la massima risposta del rivelatore è definito tempo di ritenzione (RT) ed è caratteristico di ogni sostanza. Dal tempo di ritenzione di ogni picco è possibile dedurre l'identità del composto eluito; dall'area o dall'altezza dei picchi è possibile ricavare le concentrazioni o le quantità assolute dei vari composti presenti nel campione analizzato.

I parametri che influenzano la separazione cromatografica di una miscela dipendono, oltre che dalla natura chimico-fisica di ciascuna sostanza, dalla fase stazionaria, dalle dimensioni della colonna capillare, dal flusso del gas di trasporto e dal gradiente di temperatura utilizzato.

L'utilizzo, come sistema di rilevazione, di uno spettrometro di massa direttamente collegato ad un gas-cromatografo, consente invece di identificare univocamente ciascuna sostanza, non solo in base al tempo di ritenzione ma anche mediante il relativo spettro di massa.

La spettrometria di massa consente di misurare il rapporto massa/carica (m/z) dell'analita e, quindi, di ricavare informazioni riguardanti la composizione elementare e di determinare la struttura della sostanza in esame e/o procedere ad un'accurata analisi quantitativa. Tale tecnica è sensibile, specifica e di elevata

riproducibilità. Inoltre, messo a punto il metodo analitico, la procedura può essere applicata nelle analisi di routine.

La spettrometria di massa si basa sulla ionizzazione, frammentazione delle molecole e sulla separazione degli ioni generati (in fase gassosa e sottoposti ad un campo elettromagnetico in condizioni di vuoto spinto) mediante opportuni analizzatori. Ogni ione corrispondente ad un determinato valore di m/z genera una corrente ionica che viene acquisita e registrata, dando luogo allo spettro di massa.

Ciascuna sostanza si ionizza e si frammenta secondo regole ben precise, che dipendono dalla struttura della molecola stessa e pertanto, mostra uno spettro di massa caratteristico, definito “impronta digitale”.

5.3. Metodi di screening

Sono tecniche analitiche, il cui risultato positivo è da considerarsi preliminare e come tale non può assumere valenza forense;³⁸ queste analisi, infatti, forniscono un risultato presuntivo, ovvero la probabile positività di un campione rispetto ad una sostanza o classe di sostanze in riferimento ad un valore di cut-off prestabilito (Tabella 3).

Sul mercato sono disponibili diverse tipologie di dispositivi; inoltre, esistono kit che analizzano diverse matrici (urina, saliva, sangue, sudore)³⁸ ma, come sottolineato in precedenza, l’urina è la matrice principalmente utilizzata per la maggior parte delle finalità diagnostiche.

In particolare, le principali tecniche analitiche di screening si possono distinguere in:

a) **Metodi immunocromatografici:** basati sul legame competitivo. Il kit è generalmente costituito da una membrana su cui sono immobilizzati anticorpi monoclonali e i corrispondenti coniugati per ciascuna classe di sostanze. Le droghe/metaboliti eventualmente presenti, in urina competono con il relativo coniugato per i medesimi siti di legame dell’anticorpo. Quando si effettua il test

il campione urinario migra lungo la membrana per capillarità, se le sostanze/metaboliti non sono presenti o sono presenti in concentrazione inferiore al cut-off di riferimento, le particelle legate agli anticorpi, verranno catturate dal relativo coniugato immobilizzato ed una banda colorata comparirà nella zona del risultato del test (test negativo). Tale banda non risulta visibile quando la droga è presente in concentrazione superiore al cut-off, infatti, la sostanza andrà a competere con il coniugato presente nel test, andando a saturare tutti i siti di legame dell'anticorpo (test positivo).⁴⁰ La maggior parte dei dispositivi che si basano su questo metodo permettono un'analisi di tipo *on-site*.

b) **Metodi immunofluorimetrici (FPIA):** le molecole di droga/metabolita eventualmente presenti nel campione e il coniugato-fluoresceina tracciante competono per i siti di legame degli anticorpi .

Quando il tracciante viene eccitato da un fascio di luce polarizzata linearmente, emette fluorescenza con un grado di polarizzazione inversamente proporzionale alla sua velocità di rotazione, per cui la polarizzazione della luce aumenta quando il tracciante si lega all'anticorpo; se l'analita è presente nel campione compete con il tracciante, diminuendo il grado di polarizzazione, per cui l'intensità di quest'ultima sarà correlata alla concentrazione della sostanza nel campione urinario. Tale metodica prevede, inoltre, l'uso di calibratori di polarizzazione a quantità note e crescenti, permettendo, oltre che ad un'analisi qualitativa, una preliminare analisi semiquantitativa.

c) **Metodi immunoenzimatici:** Anche il test immunoenzimatico, come l'ELISA, è un metodo di screening che sfrutta la reazione del legame tra antigene e anticorpo. Nel metodo diretto l'anticorpo di una specifica sostanza ricopre il fondo piatto di un pozzetto. L'aggiunta del campione positivo determina l'aggancio dell'agonista (droga/metabolita) con l'anticorpo presente nel pozzetto. Successivamente viene aggiunto il complesso enzima-coniugato. Questo complesso compete, con gli eventuali analiti presenti nel campione, per un numero limitato di siti di legame disponibili sull'anticorpo adeso. L'eccesso del complesso coniugato-enzima che non ha reagito è allontanato previo

lavaggio con una soluzione tampone. In seguito all'aggiunta di un cromogeno è possibile determinare la presenza del coniugato legato. Nel metodo indiretto invece, è il coniugato-enzima che ricopre il fondo del pozzetto. In questo caso il campione viene aggiunto insieme con l'anticorpo (anticorpo primario) specifico.

L'anticorpo in assenza di positività si legherà al coniugato presente sul fondo del pozzetto, in caso contrario tale legame sarà inibito in modo competitivo dalla presenza di droghe/metaboliti nel campione. Per determinare la presenza o meno della sostanza nel campione è necessario aggiungere un secondo anticorpo (anticorpo secondario), che legato covalentemente all'enzima, interagirà con l'anticorpo primario. Anche in questo caso aggiungendo il cromogeno è possibile determinare la presenza del coniugato. La lettura colorimetrica prevede l'utilizzo di uno spettrofotometro che generalmente indica il valore dell'assorbanza ad una determinata lunghezza d'onda in funzione della concentrazione.

In entrambi i metodi, diretto e indiretto, l'intensità della colorazione sviluppata è inversamente proporzionale alla quantità di farmaco nel campione.

Si sottolinea che i test immunocromatografici sono generalmente test speditivi, che possono essere effettuati *on-site* e forniscono un dato oggettivo di positività o negatività; i test immunofluorimetrici e immunoenzimatici, invece sono principalmente eseguiti con strumenti da banco dal personale qualificato nei laboratori tossicologici ed elaborano un risultato di tipo semiquantitativo.

5.4. Metodi di quantificazione

L'analisi quantitativa consiste nella determinazione delle concentrazioni degli analiti e dei loro principali metaboliti nella matrice presa in esame.

La determinazione quantitativa necessita di calibranti in cui gli analiti sono presenti a titolo noto. La tecnica di quantificazione più adoperata in GC/MS è la *retta di calibrazione*, per la quale si preparano e si analizzano campioni urinari

contenenti quantità note e variabili di analita e quantità note e costanti di un appropriato standard interno (IS), in modo da mimare le condizioni analitiche di campioni reali. I campioni, preparati per la costruzione di una retta, vengono analizzati mediante GC/MS e per ogni analisi è misurato il rapporto tra le aree dei picchi cromatografici dell'analita e dello standard interno adoperato (risposta analitica).

La quantificazione avviene confrontando la risposta analitica ottenuta dall'analisi dei campioni reali con quella corrispondente ai campioni a titolo noto. Tale raffronto può essere eseguito adoperando diverse metodiche di quantificazione, tra cui le curve di calibrazione.

L'utilizzo di una molecola quale *standard interno* rende i risultati delle analisi indipendenti da eventuali errori di diluizione, da variazioni del volume di campione introdotto nello strumento di analisi, dal recupero di estrazione o da eventuali perdite di campione durante le varie fasi analitiche.

L'indipendenza da tutti questi fattori deriva dal fatto che la quantificazione si basa su misure relative e cioè sulla misura del rapporto tra l'area dell'analita e quella dello standard interno.

Sostanze deuterate, con caratteristiche chimico-fisiche identiche a quelle degli analiti di interesse (temperatura di ebollizione, coefficienti di ripartizione, lipofilia, risposta all'analisi GC/MS ecc.) rappresentano gli standard interni ideali in quanto vengono estratti, purificati e rivelati in modo del tutto analogo alle molecole in esame, garantendo così un'estrema riproducibilità analitica.

La costruzione delle rette di calibrazione prevede che i risultati siano riportati in diagrammi: sull'asse delle ascisse si pone la concentrazione dell'analita; sull'asse delle ordinate il rapporto tra le aree dei picchi cromatografici relativi all'analita ed allo standard interno. Qualora la risposta strumentale risulti lineare nel range di concentrazioni preso in esame, l'interpolazione dei dati comporta la formulazione dell'equazione di una retta di taratura, con un coefficiente di correlazione prossimo all'unità.

La concentrazione degli analiti nei campioni reali viene calcolata inserendo il valore del rapporto tra le aree dei picchi cromatografici dell'analita e dello standard interno (valore misurato mediante l'analisi) nell'equazione della curva di calibrazione: la concentrazione dell'analita nel campione incognito è data dal valore della x, mediante l'equazione inversa:

$$x = (y - b) / a$$

x= concentrazione incognita analita

a= coefficiente angolare

b= intercetta

y = valore del rapporto tra le aree dei picchi cromatografici dell'analita rispetto allo standard interno.

6. Validazione di un metodo analitico

La “validazione” di un metodo analitico consiste in una raccolta di dati sperimentali, allo scopo di dimostrare l'adeguatezza e l'attendibilità della procedura analitica adoperata, per identificare e/o quantificare una sostanza di interesse. In altre parole, affinché i risultati forniti dall'analisi di un campione incognito, mediante l'applicazione di una specifica procedura analitica, siano accreditati e abbiano validità generale, la procedura analitica adoperata deve soddisfare specifici requisiti (parametri di validazione), i quali attestano, appunto, la “bontà” dell'analisi.

6.1. Parametri di validazione dei metodi di conferma

Linearità

L'intervallo di calibrazione o linearità rappresenta l'intervallo all'interno del quale un metodo è in grado di produrre risultati quantitativi che soddisfano predeterminati criteri di accettabilità.³⁸

La linearità della risposta analitica è valutata calcolando l'equazione della curva di calibrazione ($y = ax + b$) e il relativo coefficiente di correlazione (R^2): quanto più il valore di R^2 è prossimo all'unità, tanto più si verifica una correlazione di tipo lineare tra la risposta strumentale e la concentrazione di un analita.

Sensibilità e specificità

Con tali termini si intende la capacità di un metodo analitico di differenziare e quantificare l'analita in presenza di altri composti nel campione. A tal proposito sono analizzati campioni bianchi (a controllo negativo) dell'opportuna matrice al fine di individuare eventuali interferenze. È possibile, quindi, valutare la presenza/assenza di eventuali interferenti al tempo di ritenzione degli analiti e calcolare, inoltre il *limite di rivelabilità (LOD)* e il *limite inferiore di quantificazione (LLOQ)*. Il primo è inteso come la più piccola quantità di analita in un campione che determina un segnale distinguibile dal segnale prodotto da un controllo negativo, il secondo rappresenta la concentrazione più piccola di analita che il metodo è in grado di misurare con sufficiente precisione e accuratezza.³⁸

La Figura 6 illustra la relazione tra il bianco, il limite di rilevazione (LOD) e il limite di quantificazione (LLOQ). L'LOD è definito come la somma della media delle concentrazioni fittizie dei bianchi e 3 volte la deviazione standard, mentre l'LLOQ è calcolato come somma della media delle concentrazioni fittizie dei bianchi e 10 volte la deviazione standard.

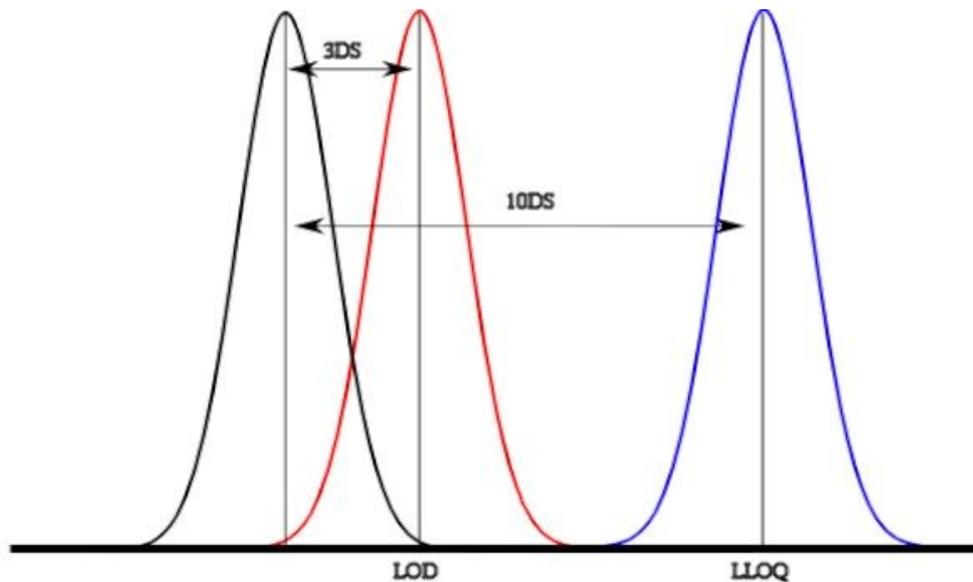


Figura 6: Illustrazione del concetto di limite di rilevabilità e limite di quantificazione, mostrando le distribuzioni teoriche normali associate con un bianco di matrice.

Precisione e accuratezza

L'accuratezza descrive quanto la media dei risultati ottenuti sia prossima al valore vero (teorico). Essa si determina analizzando campioni con quantità note di analita: il valore di concentrazione ottenuto dall'analisi si confronta poi con quello vero (nominale), valutando percentualmente quanto si discosta da quest'ultimo, secondo la seguente formula:

$$(C_{\text{MIS}} - C_{\text{NOM}}) / C_{\text{NOM}} * 100$$

C_{NOM} = Concentrazione nominale

C_{MIS} = Concentrazione misurata

Il parametro “precisione” è connesso al concetto di riproducibilità analitica e si valuta attraverso la determinazione della deviazione standard (SD) e del coefficiente di variazione (CV%), quest’ultimo è un indice percentuale che correla l’errore della misura al valore medio di concentrazione ottenuto durante le analisi.

$$SD = [(\sum x_i - X_m)^2 / (N-1)]^{1/2} = \text{deviazione standard}$$

$$CV\% = SD / X_m \times 100 = \text{coefficiente di variazione}$$

L’accuratezza deve rientrare nel 15% del valore vero (nel 20% per l’LLOQ), analogamente la precisione, espressa come CV% non deve deviare dal valore nominale più del 15% (più del 20% per l’LLOQ).⁴¹

Recupero

La percentuale di recupero (rec%) è un indice dell'efficienza della procedura di estrazione dell'analita dalla matrice. Esso si valuta facendo il rapporto tra le pendenze (coefficienti angolari) delle curve di taratura relative alla matrice urinaria ($a_{\text{non estratto}}$) e al solvente puro (a_{estratto} , che rappresenta il 100% del recupero) moltiplicato per 100, come riportato in Figura 7.

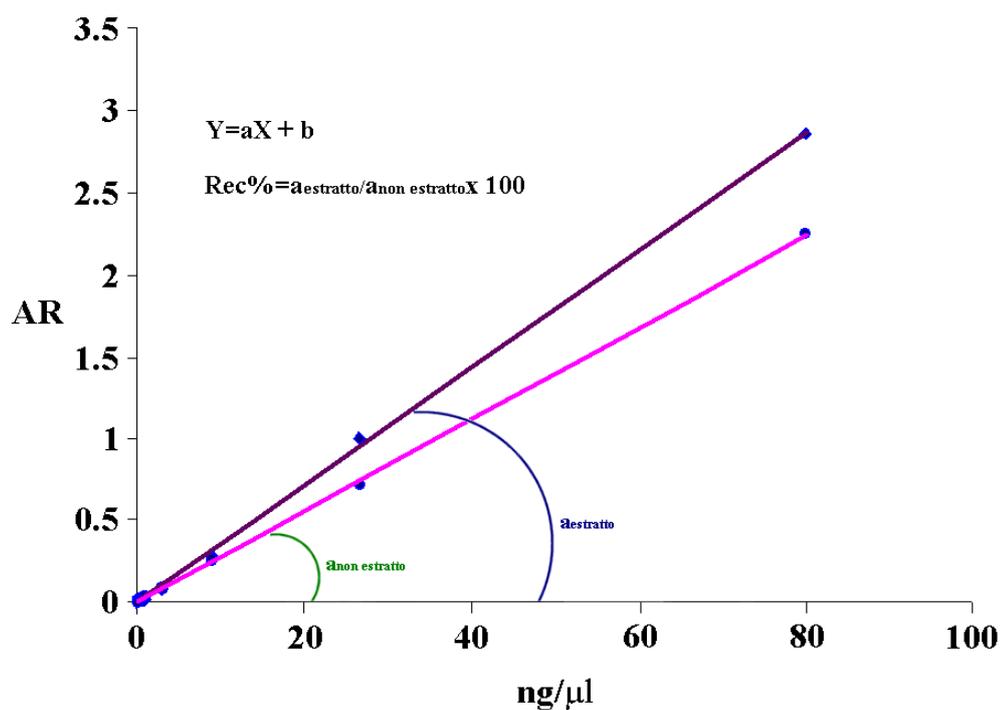


Figura 7: Fattore di recupero medio %.

6.2 Parametri di validazione dei test di screening

Per la validazione dei test di screening i risultati sono elaborati in termini di veri positivi (VP), falsi positivi (FP), veri negativi (VN) e falsi negativi (FN), al fine di determinare la sensibilità (sens%), specificità (spec%) e l'accuratezza (acc%) del metodo.⁴²

In una situazione ideale ci si aspetta che un test di screening sia in grado di discriminare perfettamente due popolazioni (positivi e negativi) non sovrapponibili, come rappresentato nella Figura 8, dove il cut-off rappresenta il valore soglia del test.

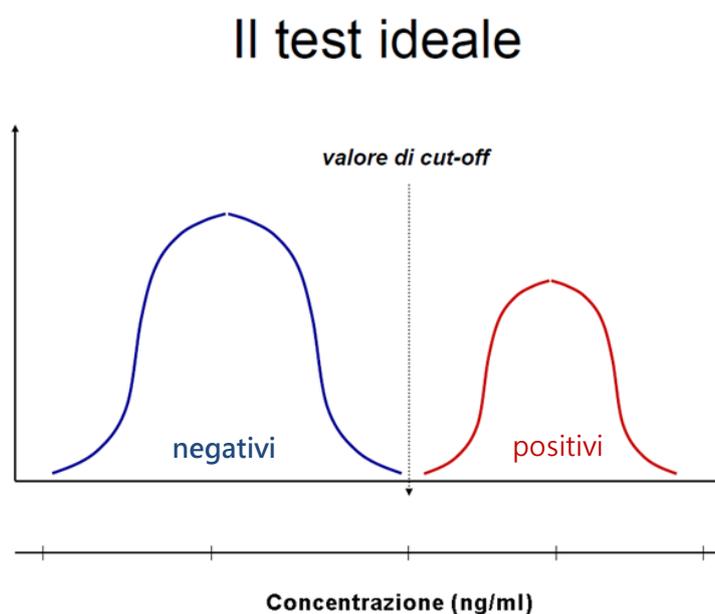


Figura 8: Distribuzione dei risultati in un test ideale.

In realtà quello che solitamente avviene è che le due popolazioni si sovrappongono in parte (Figura 9), ed il test necessariamente identificherà come positivi alcuni campioni negativi (FP, falsi positivi) e come negativi alcuni campioni invece positivi (FN, falsi negativi).

Il test reale...

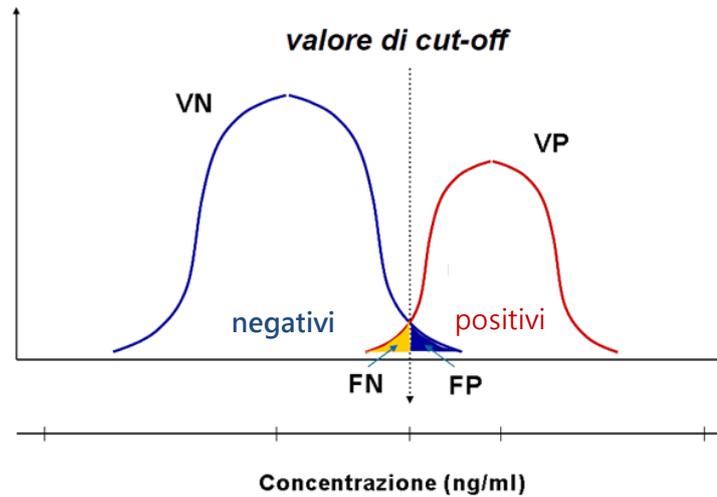


Figura 9: Distribuzione dei risultati in un test reale.

Saranno, invece, veri positivi (VP) i campioni positivi identificati dal test come positivi e veri negativi (VN) i campioni negativi identificati dal test come negativi.

Specificità

In termini statistici, la specificità di un test di screening è la capacità di dare un risultato negativo per campioni sicuramente non contenenti sostanze stupefacenti (VN); essa si esprime come il rapporto fra i veri negativi e il totale dei negativi elaborati dal test (rappresentato dalla somma dei veri negativi e dei falsi positivi):

$$\text{spec\%} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP}) \times 100$$

La specificità di un test sarà inversamente proporzionale alla quota di «falsi positivi», cioè dei campioni negativi identificati, però, dal test come positivi. Un test molto specifico, in definitiva, diminuisce la probabilità che un soggetto non assuntore risulti positivo al test.

Sensibilità

Con il termine sensibilità si indica la capacità intrinseca di un test di screening di individuare in una popolazione di riferimento i soggetti assuntori (VP). Tale concetto si contrappone a quello di specificità cioè la capacità del test di individuare come negativi i soggetti non dediti all'utilizzo di sostanze stupefacenti.

La sensibilità è data dalla proporzione dei campioni realmente positivi (VP) rispetto al totale di campioni risultati positivi al test (VP +FN):

$$\text{sens}\% = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN}) \times 100$$

Un test sarà tanto più sensibile, quanto più bassa risulterà la quota di falsi negativi, cioè di campioni contenenti droga erroneamente identificati dal test come negativi. Un test molto sensibile, in definitiva, consente di limitare la possibilità che un assuntore risulti negativo al test.

Accuratezza

Rappresenta la capacità del test di dare risultati veri, ovvero è il grado di corrispondenza tra dato teorico e quello reale e può essere determinata con la seguente equazione:

$$\text{acc \%} = (\text{VP} + \text{VN}) / (\text{VP} + \text{VN} + \text{FP} + \text{FN}) \times 100$$

Nel caso delle metodiche da banco, il cui dato è di tipo semiquantitativo, l'accuratezza può essere determinata confrontando le determinazioni quantitative dei test con i dati ottenuti dall'analisi in GC/MS:

$$\text{acc \%} = (\text{media delle conc.}_{\text{test semiquantitativo}} - \text{media delle conc.}_{\text{GC/MS-SIM}}) / \text{media delle conc.}_{\text{GC/MS-SIM}} \times 100$$

7. Scopo del progetto

Considerando che la normativa italiana prevede l'utilizzo delle metodiche di screening e/o conferma per determinare l'uso/abuso di sostanze stupefacenti, è essenziale che tali tecniche analitiche rispettino dei parametri al fine di garantire l'affidabilità del risultato.

Il progetto del dottorato, pertanto, ha avuto l'obiettivo di validare i principali metodi analitici, sia di screening che di conferma, usati per la ricerca delle sostanze d'abuso in urina.

La prima fase del lavoro ha previsto l'ottimizzazione e la validazione di metodiche analitiche di conferma per le principali classi di sostanze stupefacenti, che prevedono una procedura di estrazione dalla matrice mediante l'utilizzo della tecnica SPE (estrazione in fase solida) e la determinazione analitica eseguita adoperando la gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS).

Pertanto sono stati valutati i principali parametri di validazione quali:

- costruzione di curve di calibrazione per la quantificazione di sostanze in matrice
- studio dei parametri di specificità, sensibilità, accuratezza e precisione delle metodiche adottate
- studio del recupero di estrazione

Nella seconda fase del progetto di ricerca è stato ritenuto necessario effettuare una valutazione dei parametri di sensibilità, specificità e accuratezza di alcuni dispositivi messi in commercio per l'effettuazione di test di screening, al fine di verificare l'attendibilità dei risultati di questi ultimi.

In particolare, sono stati messi a confronto tre dispositivi progettati per l'effettuazione dei test di screening:

1) il Cozart® DDS-202P-UR3 (DDS-UR), un dispositivo rapido on-site per il rilevamento simultaneo di tutte le sostanze d'abuso indicate nella legislazione italiana e scelto per le sue specifiche tecniche corrispondenti alle prescrizioni di legge.

2) il sistema Abbot AxSYM, un sistema di immunodosaggio FPIA (Fluorescence Polarization Immunoassay).

3) il DSX Best 2000, un sistema automatizzato per ELISA.

Le metodiche in GC/MS, precedentemente validate, sono stata utilizzate come metodologie di riferimento per la conferma qualitativa e quantitativa dei campioni sottoposti alle prove di screening, al fine di escludere qualsiasi errore di preparazione o eventuale degradazione degli analiti.

Gli esperimenti sono stati condotti sulla base delle sostanze e sui cut-off elencati nelle normative nazionali e regionali,³⁶⁻³⁷ precedentemente menzionate, finalizzate agli accertamenti, previsti dalla 309/90,³ sui lavoratori le cui mansioni comportino rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi.

PARTE SPERIMENTALE

8. Materiali

Le soluzioni standard di droghe usate sono: Morfina (MOR), 6-Monoacetilmorfina (6-MAM), morfina-3 β -glucuronide (MOR-3 β -Glu), morfina-6 β -glucuronide (MOR-6 β -Glu), codeina (COD), cocaina (COC), benzoilecgonina (BEG), ecgoninametilestere (EME), cocaetilene (CocEth), 11-nor-9-carbossi-delta-9-tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC-COOH), amfetamina (AMP), 3,4-metilendioossiamfetamina (MDA), metamfetamina (MAMP), 3,4-metilendioossimetamfetamina (MDMA), metadone (MTD), 2-etilidene-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina perclorato (EDDP), buprenorfina (BUP). Tutte le soluzioni standard sono state fornite in soluzione metanolica 400ng/mL, eccetto le soluzioni di COC, CocEth, EME e 6-MAM fornite come soluzioni in acetonitrile 400ng/mL. I deuterati utilizzati come standard interni sono: BEG-D₃, Δ^9 -THCCOOH-D₃, AMP-D₆, MAMP-D₅, MDMA-D₅ in soluzioni metanoliche 1mg/mL, MOR-D₃, MTD-D₃, BUP-D₄ in soluzioni metanoliche 100ng/mL, MDA-D₅ in soluzione metanolica 400ng/mL, e COC-D₃, EME-D₃ in acetonitrile, rispettivamente 1mg/mL e 100ng/mL. Tutti gli standard e deuterati sono stati acquistati da Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas).

I derivatizzanti adoperati per l'analisi di conferma in GC/MS sono l'N, O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetammide (BSTFA) e l'anidride eptafluorobutirrica (HFBA) forniti dalla Acros (Morris Plains, NJ).

I test di screening on-site sono stati eseguiti utilizzando il DDS-202P-UR3 (DDS-UR) della Concateno (Oxfordshire, UK). I test immunoenzimatici con strumentazione da banco, sono stati eseguiti attraverso due sistemi: il sistema AxSYM della Abbott Diagnostics Division (Abbott Park, Illinois) e il DSX sistema automatico per ELISA fornito dalla Bouty S.p.a. (Sesto San Giovanni, Milano). I kit utilizzati per i test ELISA sono della Cozart-Concateno (Oxfordshire, UK). Le analisi di conferma in GC/MS sono state condotte

impiegando un sistema costituito da uno spettrometro di massa DSQ II, con analizzatore a singolo quadrupolo, accoppiato a un gas cromatografo FOCUS GC, dotato di un autocampionatore AS 3000 (tutti forniti da ThermoFisher - San Josè, CA).

Le cartucce adottate per l'estrazione in fase solida (SPE) delle droghe dalle urine sono le Screen-C (55µm, 70A) 200mg/3mL della Phenomenex (Torrance, CA, USA).

La separazione cromatografica è stata eseguita mediante colonna capillare Rxi-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm) fornita dalla Restek (Bellefonte, PA, USA).

I reagenti e i solventi utilizzati nelle analisi sono prodotti dalla CARLO ERBA (Italia).

9. Metodi per la validazione delle analisi di conferma

9.1. Procedure di estrazione SPE

Amfetamine

A 3mL di urina sono aggiunti prima dell'estrazione SPE, 2mL di tampone fosfato 0.1M pH6.0.

L'estrazione è condotta con cartucce Screen-C; queste ultime sono condizionate con 2mL di metanolo, seguiti da 2mL di tampone fosfato 0.1M a pH6.0. Il campione è quindi caricato in colonna ed estratto a flusso costante (circa 1mL/min.). Successivamente le cartucce sono sottoposte a lavaggio con 1mL di acido acetico 1M e lasciate quindi ad asciugare per 10 min. sotto vuoto. Viene poi eseguito un secondo lavaggio con 6mL di metanolo e le cartucce sono fatte riasciugare sotto vuoto. La fase di eluizione degli analiti è eseguita con due aliquote da 2mL di una miscela (estemporanea) di isopropanolo-diclorometano (80:20, v:v), al 2% di ammoniaca; prima della fase di eluizione, nelle provette di

raccolta, vengono messi 50 μ L di una soluzione metanolica acidificata con acido cloridrico (9:1), al fine di evitare la volatilizzazione delle amfetamine. L'eluato è poi portato a secco sotto azoto (N₂).

Per la derivatizzazione sono addizionati 100 μ L di HFBA (dopo aver verificato l'assenza di qualsiasi traccia di solvente) e i campioni sono posti in un bagnetto con termostato a 70°C per 20 min. In seguito, il derivatizzato è portato a secco e ripreso con 50 μ L di etilacetato. Si procede, quindi, con l'analisi in GC/MS.

Cocaina

L'estrazione è condotta con cartucce Screen-C; queste sono condizionate con 2mL di metanolo, seguiti da 2mL di tampone fosfato 0.1M pH6.0. Il campione è quindi caricato in colonna ed estratto a flusso costante (circa 1mL/min.). Successivamente le cartucce sono sottoposte a lavaggio con 6mL di acqua bidistillata, seguiti da 3mL di acido cloridrico 0.1N, 9mL di metanolo e lasciate quindi ad asciugare per 15 min. sotto vuoto. La fase di eluizione degli analiti è eseguita con due aliquote da 2mL di una miscela (estemporanea) di diclorometano-metanolo (8:2, v:v), al 2% di ammoniaca. L'eluato è portato a secco sotto N₂.

Per la derivatizzazione di cocaina si aggiungono 50 μ L di BSTFA (dopo aver verificato l'assenza di qualsiasi traccia di solvente) e si pongono i campioni in un bagnetto con termostato a 75°C per 20 min. Si procede con l'analisi in GC/MS.

Cannabinoidi

Per tutti i campioni è eseguita un'idrolisi basica mediante aggiunta di 300µL di idrossido di potassio 10M e incubando per 15 min. a 60°C, al fine di liberare la percentuale di THC-COOH glucoronato derivante dal metabolismo.

Dopo aver lasciato raffreddare i campioni, questi vengono addizionati di 400µL acido acetico glaciale e 3mL di una soluzione di acido fosforico 50mM, allo scopo di portare il pH dell'urina tra 4.0 e 5.0.

Le cartucce Screen-C sono condizionate con 1mL di metanolo, seguiti da 1mL di sodio acetato 0.1M al 5% di metanolo.

Il campione è quindi caricato in colonna ed estratto a flusso costante (circa 1mL/min.). Successivamente le cartucce sono sottoposte a lavaggio con 2mL di una soluzione di acqua bidistillata e metanolo (40:60, v:v) e lasciate quindi asciugare per 15 min. sotto vuoto. La fase di eluizione degli analiti è eseguita con due aliquote da 2mL di una miscela di esano-etilacetato (75:25, v:v) all'1% di acido acetico glaciale. L'eluato è poi portato a secco sotto N₂.

Per la derivatizzazione del THC-COOH si aggiungono 50µL di BSTFA e si pongono i campioni in un bagnetto con termostato a 75°C per 20 min. Si procede con l'analisi in GC/MS.

Oppiacei

I campioni sono sottoposti a idrolisi acida aggiungendo ai 3mL di urina, 1mL di acido cloridrico al 37% e incubando per 20 min. a 120°C. Dopo aver lasciato raffreddare i campioni, a questi sono addizionati 600µL di Tris Buffer 2.0M (pH8.1) e 400µL di idrossido di potassio 10M saturato con bicarbonato di potassio, assicurandosi che il pH sia compreso tra 8.0 e 9.0 e aggiustandolo eventualmente con piccole aliquote di acido cloridrico 1.0M o idrossido di potassio 10M saturato con bicarbonato di potassio.

La procedura di estrazione è identica a quella descritta per i cocainici.

Il metadone e il suo metabolita EDDP non necessitano di derivatizzazione, per cui i campioni, dopo essere stati portati a secco, sono stati direttamente ripresi con 50 μ L di etilacetato e esaminati in GC/MS.

La morfina e la buprenorfina, invece, sono state derivatizzate con 50 μ L di BSTFA a 75°C per 20 min. e analizzate in GC/MS.

Si evidenzia che mentre la morfina e la buprenorfina sono sottoposte ad idrolisi acida per ottenere le sostanze in forma libera dalla percentuale di prodotto metabolico glucuronato, per il metadone tale idrolisi è stata necessaria allo scopo di avere una riproducibilità del metodo analitico con urine diverse; tale riproducibilità non si otteneva senza idrolisi, probabilmente a causa di interazioni con altre sostanze presenti in urina.

9.2. Condizioni strumentali

Colonna cromatografica	Rxi-5MS (30m x 0.25mm x 0.25 μ m)
Carrier gas	He
Flusso carrier gas	1.0mL/min.
Temperatura dell'iniettore (split/splitless)	200°C (per il metadone) 250°C (per la buprenorfina) 245°C (per le altre)
Tecnica di iniezione	splitless
Volume di iniezione	1.0 μ L
Temperatura transfer line	300°C (per la buprenorfina) 260°C (per le altre)
Energia degli elettroni	70eV
Temperatura sorgente di ionizzazione	220°C (per la buprenorfina) 240°C (per le altre)

Le programmate di temperatura sono diverse per ogni classe di sostanze:

~ Cocaina, oppiacei, amfetamine:

60°C a 20°C/min.

100°C per 1 min. a 10°C/min.

280°C per 5 min.

~ Cannabinoidi

150°C a 10°C/min.

300°C per 1 min.

~ Metadone

100°C per 1 min. a 20°C/min.

310°C per 5 min.

~ Buprenorfina

100°C per 1 min. a 20°C/min.

300°C per 11 min. a 20°C/min.

9.3. Parametri di acquisizione

I parametri di acquisizione variano a seconda dell'analita e del derivatizzante adoperato. Di seguito sono riportati i tempi di ritenzione e gli ioni acquisiti in modalità SIM per ogni sostanza (Tabella 4).

Analiti	T_r (min.)	Ioni selezionati (m/z)
<i>Cocaina</i>	18.54	82.09-182.07-303.16
<i>Benzoilecgonina</i>	19.13	240.17 - 256.17 - 361.40
<i>EME</i>	11.81	82.08 - 96.08 - 240.15
<i>Cocaetilene</i>	19.04	196.05 - 271.18 - 317.23
<i>Cocaina-D₃</i>	18.52	85.08 - 185.10 - 306.31
<i>EME-D₃</i>	11.79	85.11 - 99.11 - 243.16
<i>Benzoilecgonina-D₃</i>	19.12	243.13 - 259.17 - 364.22
<i>Morfina</i>	21.33	401.00 - 414.00 - 429.00
<i>Morfina-D₃</i>	21.31	404.00 - 417.00 - 432.00
<i>Metadone</i>	9.57	72.08 - 165.10 - 223.10 - 294.21
<i>EDDP</i>	9.04	262.17 - 276.19 - 277.23
<i>Metadone-D₃</i>	9.56	72.12 - 165.09 - 226.11 - 297.16
<i>Buprenorfina</i>	19.45	450.27 - 482.32 - 506.36
<i>Buprenorfina-D₄</i>	19.40	454.00 - 486.00 - 510.00
<i>THC-COOH</i>	14.72	473.27 - 488.30 - 489.29
<i>THC-COOH-D₃</i>	14.70	476.27 - 491.31 - 492.33
<i>Amfetamina</i>	8.98	91.08 - 118.11 - 240.03
<i>Metamfetamina</i>	9.98	118.11 - 210.03 - 254.05
<i>MDA</i>	12.91	162.11 - 240.03 - 375.07
<i>MDMA</i>	14.09	162.10 - 210.04 - 254.05
<i>Amfetamina-D₆</i>	8.93	93.09 - 123.13 - 244.05
<i>Metamfetamina-D₅</i>	9.93	120.11 - 213.06 - 258.09
<i>MDA-D₅</i>	12.88	167.13 - 244.06 - 380.09
<i>MDMA-D₅</i>	14.06	163.10 - 213.04 - 258.07

Tabella 4: Tempi di ritenzione e ioni caratteristici degli analiti.

9.4. Preparazione dei campioni

Linearità

Mediante successive diluizioni sono state preparati cinque punti per le curve di calibrazione in matrice urinaria a concentrazione nota e decrescente per ogni classe di sostanze (Tabella 5). Sono state preparate, inoltre, soluzioni a titolo noto per ciascun analogo deuterato, utilizzate come standard interno (Tabella 6).

Il range di concentrazione delle rette di calibrazione, riportato in Tabella 5, è stato scelto tenendo conto, per ogni sostanza, del proprio valore di cut-off relativo alla conferma,³⁶⁻³⁷ in modo che esso fosse sempre compreso tra i punti D ed E. I campioni sono stati estratti in base alle procedure descritte precedentemente e analizzati in GC/MS.

Concentrazioni in urina (ng/mL)	A	B	C	D	E
<i>Cocaina e metaboliti</i>	1'040	520	260	130	65
<i>Oppiacei^a</i>	1'040	520	260	130	65
<i>Metadone e EDDP</i>	1'040	520	260	130	65
<i>Buprenorfina</i>	64	32	16	8	4
<i>Cannabinoidi</i>	160	80	40	20	10
<i>Amfetamine</i>	2'400	1'200	600	300	150

Tabella 5: Concentrazioni a titolo noto in urina per ogni classe di sostanze e metaboliti ottenute per la curva di calibrazione.

^aMOR, 6-MAM, COD.

	Deuterati (IS)	Concentrazioni soluzioni deuterati (ng/μL)
Cocaina e metaboliti	Benzoilecgonina-D ₃	20
	EME-D ₃	
	Cocaina-D ₃	
Oppiacei	Morfina-D ₃	20
Metadone EDDP	Metadone-D ₃	20
Buprenorfina	Buprenorfina-D ₄	10
Cannabinoidi	THC-COOH-D ₃	10
Amfetamine	Amfetamina-D ₆	20
	Metamfetamina-D ₅	
	MDMA-D ₅	
	MDA-D ₅	

Tabella 6: Componenti delle soluzioni di IS e rispettive concentrazioni.
^aMOR, 6-MAM, COD.

Specificità e sensibilità

Per la valutazione di tali parametri sono stati preparati 5 campioni a controllo negativo (bianchi), addizionati soltanto degli standard interni per ogni classe di sostanze. I bianchi sono stati estratti secondo le procedure relative alle varie classi di sostanze e analizzati in GC/MS.

Precisione e accuratezza

I campioni Quality Control (QC) per determinare la precisione (CV%) e l'accuratezza (acc%) del metodo analitico sono stati preparati tenendo presente l'intervallo di calibrazione e i cut-off analitici. In particolare sono stati preparati tre campioni in urina (3mL) in triplicato, con concentrazioni (QC₁, QC₂, QC₃) corrispondenti a 3 volte il cut-off, 2 volte il cut-off e il cut-off stesso (Tabella 7), a questi sono stati aggiunti quantità fisse dei corrispondenti IS.

I campioni, dopo essere stati estratti secondo le procedure relative alle diverse classi di sostanze stupefacenti (descritte in precedenza), sono stati analizzati in GC/MS.

	[urina] ng/ μ L		
	QC ₁	QC ₂	QC ₃
<i>Cocainici e metaboliti</i>	900	300	100
<i>Oppiacei^a</i>	900	300	100
<i>Metadone</i>	900	300	100
<i>Buprenorfina</i>	45	15	5
<i>Cannabinoidi</i>	60	30	15
<i>Amfetamine</i>	2'250	750	250

Tabella 7: Concentrazioni dei campioni urinari usati come QC per determinare acc% e CV%.

^aMOR, 6-MAM, COD.

Recupero

Sono state preparate, per ogni classe di stupefacenti, 3 soluzioni standard in metanolo (CH₃OH) a concentrazione decrescente (Tabella 8).

50µL di queste soluzioni, preparate estemporaneamente e addizionate di volumi fissi delle soluzioni di standard interni (IS), sono state portate a secco sotto N₂, derivatizzate opportunamente (vedi procedure di estrazione delle varie classi di stupefacenti) e analizzate in triplicato in GC/MS. Altri 50µL delle soluzioni standard sono stati addizionati a 3mL di urina proveniente da soggetti non assuntori, anche in questo caso abbiamo ottenuto tre concentrazioni urinarie decrescenti (Tabella 8), comprese nel range delle curve di calibrazione e delle quali la più bassa coincide con il valore del cut-off analitico. I campioni, preparati in triplicato sono stati prima estratti secondo le procedure analitiche e successivamente al protocollo di estrazione sono stati addizionati di un volume costante di IS, portati a secco sotto N₂, derivatizzati e analizzati in GC/MS.

	[urina] ng/mL			[CH ₃ OH] ng/µL		
	A	B	C	A	B	C
<i>Cocainici e metaboliti</i>	100	300	900	6	18	54
<i>Oppiacei^a</i>	100	300	900	6	18	54
<i>Metadone</i>	100	300	900	6	18	54
<i>Buprenorfina</i>	5	15	45	0.3	0.9	2.7
<i>Cannabinoidi</i>	15	30	60	3	9	18
<i>Amfetamine</i>	250	750	2·250	15	45	135

Tabella 8: Concentrazioni delle soluzioni standard ed in urina preparate per le prove di recupero d'estrazione.

^aMOR, 6-MAM, COD.

10. Metodi per la validazione delle tecniche di screening

10.1. Preparazione dei campioni

Lo studio è stato basato sull'analisi in triplicato di campioni urinari, provenienti da soggetti non dediti all'uso/abuso di droghe illecite e addizionati di concentrazioni note di ogni classe di sostanze stupefacenti previste dalla normativa italiana.³⁶⁻³⁷

In particolare, sono stati preparati campioni con tre livelli di concentrazione per ogni classe di sostanze: il primo corrispondente ai cut-off di legge (A), il secondo e il terzo corrispondenti, rispettivamente a due volte e tre volte il cut-off (B e C) (Tabella 9) . Per ogni concentrazione sono stati preparati tre campioni, utilizzando urine di volontari diversi, e ciascun campione è stato testato con screening on-site in triplicato.

Inoltre, per ogni classe di droghe, l'analita e/o i principali metaboliti urinari sono stati aggiunti in quantità diverse, secondo le loro percentuali di escrezione urinaria (Tabella 9),⁴³⁻⁴⁴⁻⁴⁵ in modo che la loro somma corrispondesse alle tre concentrazioni utilizzate in questo studio. Sebbene non espressamente menzionato nella legislazione italiana, sono stati condotti altri esperimenti, ripetendo i saggi dei campioni contenenti cocaina e addizionando a quest'ultima, oltre la BEG (metabolita principale), il CocEth,⁴⁵ al fine di mimare la contestuale assunzione di cocaina e alcool.

Un'aliquota degli stessi campioni è stata addizionata di una quantità nota di IS (Tabella 9), come descritto per i metodi di conferma. I campioni sottoposti a screening sono stati analizzati in GC/MS e i rispettivi analiti sono stati quantificati mediante curve di calibrazione.

<i>Droghe d'abuso</i>	Analiti addizionati (%)	Concentrazione urinaria			I.S. ^a
		A (ng/mL)	B (ng/mL)	C (ng/mL)	
<i>Oppiacei</i>	MOR-3-β-Glu, 63.15%	189.4	378.8	568.1	MOR-D ₃
	MOR-6-β-Glu, 19.55%	58.6	117.5	176.6	
	MOR, 15.04%	45.2	90.0	135.0	
	6-MAM, 2.26%	6.8	13.7	20.3	
Concentrazione totale (ng/mL)		300.0	600.0	900.0	
<i>Cocaina</i>	BEG, 58.5%	175,5	350,0	525.0	BEG-D ₃
	EME, 38.0%	114.0	228.0	324.5	EME-D ₃
	COC, 3.5%	10.5	21.0	31.5	COC-D ₃
Concentrazione totale (ng/mL)		300.0	600.0	900.0	
<i>Cocaina+alcool</i>	BEG, 47.9%	143.7	287.4	431.1	BEG-D ₃
	CocEth, 33.4%	100.2	200.4	300.6	COC-D ₃
	COC, 18.7%	56.1	112.2	168.3	
Concentrazione totale (ng/mL)		300.0	600.0	900.0	
<i>Cannabinoidi</i>	Δ ⁹ -THCCOOH, 11.2%	50.0	100.0	150.0	Δ ⁹ THCCOOH-D ₃
Concentrazione totale (ng/mL)		50.0	100.0	150.0	
<i>AMP</i>	AMP, 100%	500.0	1'000.0	1'500.0	AMP-D ₆
Concentrazione totale (ng/mL)		500.0	1'000.0	1'500.0	
<i>MAMP</i>	MAMP, 87.8%	438.5	877.0	1'315.5	MAMP-D ₅
	AMP, 12.3%	61.5	123.0	184.5	AMP-D ₆
Concentrazione totale (ng/mL)		500.0	1'000.0	1'500.0	
<i>MDMA</i>	MDMA, 90.3%	445.0	891.0	1'337.0	MDMA-D ₅
	MDA, 9.7%	54.0	109.0	163.0	MDA-D ₅
Concentrazione totale (ng/ml)		500.0	1'000.0	1'500.0	
<i>Metadone</i>	MTD, 43.4%	130.2	260.4	390.6	MTD-D ₃
	EDDP, 56.6%	169.8	339.6	509.4	
Concentrazione totale (ng/mL)		300.0	600.0	900.0	
<i>Buprenorfina</i>	BUP, 0.14%	5.0	10.0	15.0	BUP-D ₄
Concentrazione totale (ng/mL)		5.0	10.0	15.0	

Tabella 9: Schema della preparazione dei campioni, secondo le percentuali di escrezione riportate in letteratura.

^aI.S.: deuterati usati come standard interni ed aggiunti come soluzione metanolica 20 ng/mL, tranne per il THC-COOH e buprenorfina (I.S. 10 ng/mL).

In una prima fase sono stati preparati un numero di 81 campioni (Figura 10): 3 urine x 3 concentrazioni x 9 droghe d'abuso (8 classi di sostanze previste dalla normativa ed inoltre, è stata considerata l'evenienza di una contemporanea assunzione di cocaina e alcool). Ogni campione è stato diviso in tre aliquote, delle quali: una da 2mL è stata analizzata in triplicato con il test on-site, la seconda da 2mL con la strumentazione da banco AxSYM e la terza da 3mL è stata confermata e quantificata con metodica GC/MS validata.

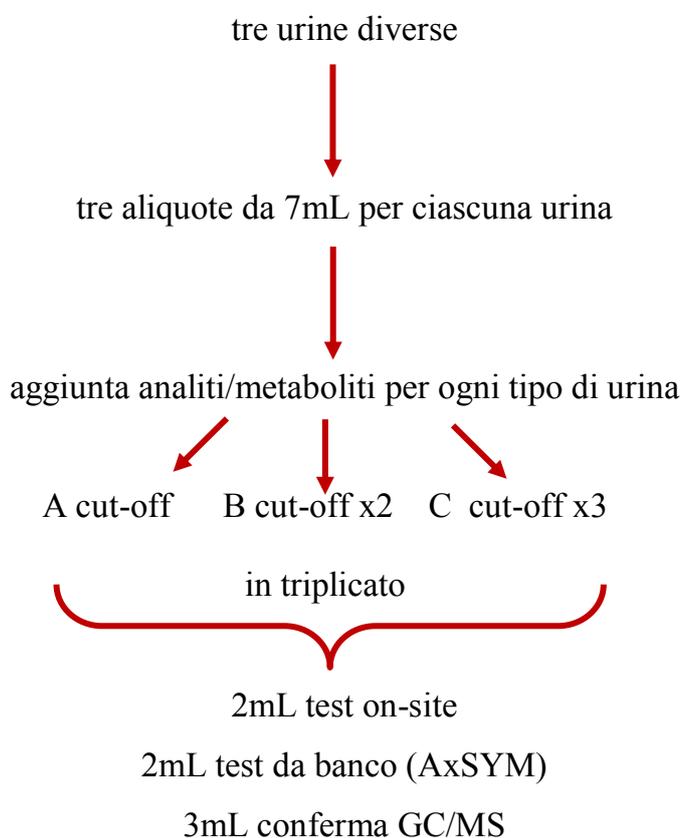


Figura 10: Schema della preparazione dei campioni urinari utilizzati per la prima fase di validazione dei test di screening.

In una seconda fase sono stati preparati altri 81 campioni (Figura 11) con concentrazioni e percentuali di analiti/metaboliti analoghe ai precedenti; i campioni sono stati divisi in due aliquote, delle quali la prima è stata processata con tecnica ELISA e la seconda in GC/MS.

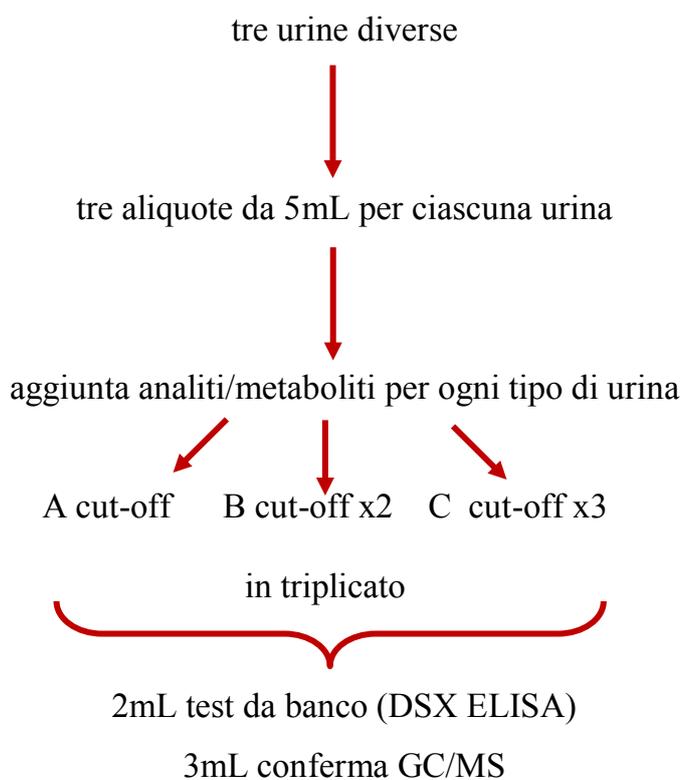


Figura 11: Schema della preparazione dei campioni urinari utilizzati per la seconda fase di validazione dei test di screening.

Per il DSX i campioni contenenti un determinato gruppo di sostanze/metaboliti sono stati analizzati anche con i kit specifici di altre classi al fine evidenziare un eventuale reattività crociata.

10.2. Screening *on-site*

Gli screening *on-site* sono stati eseguiti secondo le specifiche del produttore.⁴⁶

I test sono costituiti da un pannello reattivo con supporto in plastica. Un'aliquota del campione urinario è stata prelevata con la pipetta fornita nel kit, 7-8 gocce di urina sono state poste sulla cartuccia e quest'ultima è stata inserita all'interno del DDS-UR.

Dopo 7-8 min. il dispositivo ha generato e stampato automaticamente i risultati del test, in termini di analiti positivi/negativi.

In totale sono stati eseguiti 243 test di screening: 3 urine x 3 concentrazioni x 9 droghe d'abuso x 3 replicati.

10.3. Test di screening con strumento da banco

Le seconde aliquote dei campioni urinari preparati nella prima fase sono state analizzati con lo strumento da banco AxSYM; le analisi sono state eseguite in base alle istruzioni del produttore.⁴⁷⁻⁴⁸⁻⁴⁹⁻⁵⁰⁻⁵¹

Il sistema AxSYM effettua un saggio immunologico a fluorescenza polarizzata (FPIA) e consente la determinazione semiquantitativa delle droghe d'abuso in base a curve di taratura a sei punti. In particolare, secondo le specifiche del produttore, i range delle curve di calibrazione usati sono:

- 0-1'000ng/mL per gli oppiacei;
- 0 -5'000ng/mL per la cocaina;
- 0-135ng/mL per i cannabinoidi;
- 0-8'000ng/mL per amfetamina/metamfetamina;
- 0-4'000ng/mL per il metadone.

I campioni addizionati di buprenorfina non sono stati analizzati, in quanto il kit specifico non viene fornito dal costruttore. Dobbiamo tener presente, inoltre, che non esistono kit per l' AxSYM che leggono specificamente l'MDMA; a tal proposito i campioni contenenti quest'ultimo sono stati testati con il kit per

l'AMP/MAMP.

Le aliquote dei campioni urinari preparati nella seconda fase di validazione dei test di screening, sono state analizzate con il DSX Best 2000 ELISA System, secondo indicazioni del produttore.⁵²⁻⁵³⁻⁵⁴⁻⁵⁵⁻⁵⁶⁻⁵⁷⁻⁵⁸

Il DSX esegue in modo automatizzato un saggio immunoenzimatico ELISA e anch'esso permette una quantificazione approssimativa degli analiti in base a curve di taratura a quattro punti. I range delle curve di calibrazione usati sono:

- 0-1000ng/mL per gli oppiacei, cocaina e metadone;
- 0-2000ng/mL per amfetamina/metamfetamina/MDA/MDMA;
- 0-200ng/mL per i cannabinoidi;
- 0-5ng/mL per la buprenorfina.

Le prestazioni di entrambi i dispositivi da banco, precedentemente descritti, possono essere controllate analizzando tre campioni di controllo qualità (QC).

I risultati semiquantitativi sono stati generati automaticamente dai due sistemi e i campioni sono stati considerati positivi o negativi tenendo presente i cut-off della legislazione italiana (Tabella 3, vedi pag. 20).³⁶⁻³⁷

10.4. Analisi GC/MS-SIM

Le aliquote restanti dei campioni, analizzati con le tre tecniche, sono state sottoposte a procedure di conferma validate, al fine di escludere un'eventuale degradazione degli analiti durante le fasi di manipolazione o un errore dell'analista durante la preparazione del campione stesso. Tali procedure sono state descritte dettagliatamente nei paragrafi precedenti. La Tabella 10 riporta, per ogni analita, gli intervalli di concentrazione delle curve di calibrazione (su cinque punti diversi dallo zero) usate per la quantificazione; tali range sono stati scelti in base alle concentrazioni delle singole sostanze e metaboliti usate per gli esperimenti di validazione delle tecniche di screening (vedi Tabella 9).

<i>Droghe d'abuso</i>		<i>Curva di calibrazione (ng/mL)</i>
<i>Oppiacei</i>	MOR	100.0-1600.0
<i>Cocaina</i>	BEG	50.0-800.0
	EME	
	COC	5.0-80.0
<i>Cocaina+alcool</i>	BEG	50.0-800.0
	CocEth	
	COC	
<i>Cannabinoidi</i>	Δ^9 -THCCOOH	10.0-160.0
<i>AMP</i>	AMP	150.0-2400.0
<i>MAMP</i>	MAMP	100.0-1600.0
	AMP	50.0-800.0
<i>MDMA</i>	MDMA	142.6-2371.9
	MDA	20.0-289.5
<i>Metadone</i>	MTD	60.0-960.0
	EDDP	60.0-960.0
<i>Buprenorfina</i>	BUP	4.0-64.0

Tabella 10: Range di concentrazione delle curve di calibrazione per quantificare i campioni sottoposti a screening.

RISULTATI E DISCUSSIONE

11. Validazione delle analisi di conferma

Linearità

La *linearità* della risposta è stata valutata calcolando per ogni analita l'equazione della curva di calibrazione e il relativo coefficiente di correlazione (R^2): quanto più il valore di R^2 è prossimo all'unità, tanto più si verifica una correlazione di tipo lineare tra la risposta strumentale e la concentrazione dell'analita.

Per ciascuna sostanza in esame è stato, pertanto, necessario costruire una retta di taratura in matrice urinaria, come descritto precedentemente. Dai cromatogrammi ottenuti è stato possibile ricavare il rapporto tra l'area del picco di ogni analita e quella dello IS per ogni punto della retta di calibrazione e tale rapporto è stato riportato su un grafico in funzione della concentrazione.

Le equazioni delle rette di taratura ($y = ax + b$), così ottenute ed i corrispettivi coefficienti di correlazione, sono riportati in Tabella 11.

Stupefacenti	Equazione della retta di taratura	R²
<i>Cocaina</i>	Y= 0.0380386+0.0042343*X	1.0000
<i>Benzoilecgonina</i>	Y= 0.033813+0.00295037*X	0.9999
<i>Cocaetilene</i>	Y= 0.00453549+0.00036437*X	0.9997
<i>EME</i>	Y= 0.0297869+0.00330664*X	0.9997
<i>Morfina</i>	Y= 0.0278924+0.00154294*X	1.0000
<i>Metadone</i>	Y= 0.0329112+0.00289758*X	0.9998
<i>EDDP</i>	Y= 0.51614+0.0657464*X	0.9999
<i>Buprenorfina</i>	Y= 0.0360275+0.0613472*X	0.9999
<i>THC-COOH</i>	Y= 0.00622123+0.00594601*X	0.9991
<i>Amfetamina</i>	Y= 0.00375073+0.00291008*X	0.9999
<i>Metamfetamina</i>	Y= 0.00038726+0.00315138*X	0.9998
<i>MDA</i>	Y= 0.00883405+0.00565717*X	0.9998
<i>MDMA</i>	Y= 0.0126012+0.00318627*X	1.0000

Tabella 11: Equazioni della curva di calibrazione di ogni analita e rispettivi coefficienti di correlazione.

Come si evince dalla Tabella sopra riportata, i criteri di linearità sono rispettati per tutte le sostanze prese in esame, in quanto i valori di R² sono tutti prossimi all'unità. Si sottolinea che per la 6-MAM non è riportata una curva di calibrazione, come non sono riportati gli altri risultati di validazione, mostrati in seguito, in quanto la 6-MAM è completamente deacetilata a morfina durante la fase di idrolisi acida prevista dalla metodica; tale dato è confermato dalla rivelazione di morfina-D₆ in campioni in cui era stata addizionata 6-MAM-D₆ come standard interno.

Tuttavia, è possibile effettuare una procedura analitica senza idrolisi in modo da evidenziare 6-MAM, al fine di discriminare tra l'assunzione di eroina e quella di morfina.

Specificità e sensibilità

Gli esperimenti finalizzati alla determinazione di tali parametri sono stati eseguiti analizzando matrici urinarie (5 per ogni classe di sostanze) prive di analiti e addizionate del solo standard interno.

Le analisi dei campioni in GC/MS hanno mostrato un'ottima specificità della metodica, in quanto non sono stati rilevati composti interferenti caratterizzati da ioni con rapporto m/z uguali a quelli degli analiti ed eluenti allo stesso tempo di ritenzione; le analisi sono state condotte per ogni classe di sostanze/metaboliti, utilizzando i rispettivi parametri d'acquisizione in modalità SIM. Inoltre, è stato adoperato il rapporto tra l'area relativa al rumore di fondo in corrispondenza del tempo di ritenzione di ogni analita e l'area dei rispettivi deuterati, per quantificare, mediante curve di calibrazione, l'ammontare *fittizio* presente in ciascun bianco.

Sono state, quindi, ricavate le concentrazioni medie e le deviazioni standard (SD) e sono stati calcolati i parametri di LOD e LLOQ (Tabella 12) come la somma tra media delle concentrazioni fittizie e rispettivamente 3 e 10 volte la SD.

Stupefacenti	LOD (ng/mL)	LLOQ (ng/mL)	SD
<i>Cocaina</i>	0.9	1.8	0.1
<i>Benzoilecgonina</i>	0.02	0.04	0.01
<i>Cocaetilene</i>	4.0	8.1	0.6
<i>EME</i>	11.8	26.4	2.1
<i>Morfina</i>	3.5	4.9	0.2
<i>Metadone</i>	25.3	33.2	1.1
<i>EDDP</i>	15.1	15.7	0.1
<i>Buprenorfina</i>	0.05	0.1	0.01
<i>THC-COOH</i>	6.9	9.5	0.4
<i>Amfetamina</i>	0.02	0.03	0.01
<i>Metamfetamina</i>	7.1	7.4	0.04
<i>MDA</i>	0.6	1.2	0.1
<i>MDMA</i>	13.4	34.7	3.0

Tabella 12: LOD, LLOQ e rispettive SD di tutti gli analiti.

I risultati riportati in tabella mostrano valori LOD ed LLOQ inferiori al punto più basso della retta di calibrazione e comunque più bassi dei cut-off previsti dalla normativa, per cui le metodiche sono utilizzabili per la quantificazione di campioni urinari risultati positivi ai test di screening.

Precisione e accuratezza

Accuratezza e precisione sono state calcolate rispettivamente come la deviazione percentuale dalle concentrazioni nominali (acc%) ed il coefficiente di variazione percentuale (CV%).

Per assicurare riproducibilità dell'intero metodo di analisi, accuratezza e precisione sono state calcolate mediante l'analisi di nove QC, preparati indipendentemente dai punti della retta e contenenti tre livelli di concentrazione urinaria compresi tra il Punto A ed il Punto E delle rispettive curve di taratura. I valori ottenuti sono mostrati in Tabella 13.

Come è possibile notare dai valori riportati, sia l'accuratezza che la precisione rientrano nel 15% per le concentrazioni alta e media e nel 20% per la concentrazione uguale al cut-off, per cui i parametri di validazione sono soddisfatti.

	QC ₁ (900ng/mL)		QC ₂ (300ng/mL)		QC ₃ (100ng/mL)	
	acc%	CV%	acc%	CV%	acc%	CV%
<i>Cocaina</i>	0.4±0.9	0.9	-7.6±0.4	0.3	16.40±0.40	0.48
<i>EME</i>	-0.8±1.8	1.7	-13.9±3.4	3.0	7.82±5.21	5.65
<i>Benzoilecgonina</i>	0.8±0.3	0.3	-2.8±0.5	0.5	7.98±0.38	0.41
<i>Cocaetilene</i>	2.9±1.0	1.1	0.4±1.2	1.2	-1.01±1.16	1.15
<i>Morfina</i>	-3.5±3.8	3.7	-11.0±1.4	1.2	-2.6±2.3	2.2
<i>Metadone</i>	8.0±5.7	3.6	11.1±3.3	5.4	10.9±6.4	2.7
<i>EDDP</i>	0.6±3.3	0.6	0.6±2.6	0.8	-0.2±2.1	1.2
	QC ₁ (135ng/mL)		QC ₂ (45ng/mL)		QC ₃ (15ng/mL)	
<i>THC-COOH</i>	-0.5±2.8	2.8	-3.0±4.7	4.5	-9.4±3.9	3.5
	QC ₁ (2'250ng/L)		QC ₂ (750ng/mL)		QC ₃ (250ng/mL)	
<i>Amfetamina</i>	-2.0±1.0	6.8	8.3±1.5	1.6	6.5±1.1	2.8
<i>Metamfetamina</i>	8.0±3.6	3.4	4.2±12.0	11.5	8.5±4.9	4.5
<i>MDMA</i>	5.2±12.5	11.9	-7.2±14.2	14.3	2.4±1.8	1.8
<i>MDA</i>	1.8±15.0	14.8	2.3±8.4	8.2	1.9±7.6	7.4
	QC ₁ (45ng/mL)		QC ₂ (15ng/mL)		QC ₃ (5ng/mL)	
<i>Buprenorfina</i>	-5.2±3.0	3.0	-6.1±0.1	0.1	-8.0±1.1	1.1

Tabella 13: Deviazioni percentuali dalle concentrazioni nominali (Acc%) ed i coefficienti di variazione percentuale (CV%).

Recupero

Gli esperimenti di recupero sono stati condotti comparando campioni non estratti, che rappresentano il 100% del recupero, con i campioni estratti, contenenti gli analiti a tre diverse concentrazioni (bassa, media, alta). Sono quindi state costruite e rapportate tra loro due curve di calibrazione: una in matrice ed una in metanolo.

Il concetto di recupero “medio” si basa sulla constatazione che il recupero di un analita da una matrice complessa può variare in maniera rilevante a seconda del livello di concentrazione dell’analita stesso. Per la valutazione del recupero sono state messe a confronto le pendenze delle rette di taratura estratte e non estratte (come riportato precedentemente nel paragrafo 6.1).

I recuperi percentuali ottenuti per ciascun analita sono riportati in Tabella 14.

Sostanza	rec%
<i>Cocaina</i>	83.3
<i>EME</i>	75.5
<i>Benzoilecgonina</i>	100
<i>Cocaetilene</i>	100
<i>Morfina</i>	100
<i>Metadone</i>	83.0
<i>EDDP</i>	99.3
<i>THC-COOH</i>	82.9
<i>Amfetamina</i>	87.4
<i>Metamfetamina</i>	96.2
<i>MDMA</i>	80.6
<i>MDA</i>	83.3
<i>Buprenorfina</i>	93.4

Tabella 14: Percentuali di recupero calcolate in base al rapporto tra le rette di taratura.

Dalla tabella si nota come i valori superino tutti il 75%, valore richiesto nelle Linee Guida della FDA,⁴¹ per cui la metodica è utilizzabile per la quantificazione di campioni urinari risultati positivi agli screening.

Ottimi risultati sono stato ottenuti per la benzoilecgonina, cocaetilene e morfina, per i quali è stato raggiunto il 100% di recupero.

12. Validazione delle tecniche di screening

Gli esperimenti per la validazione dei test di screening sono stati condotti in due fasi: una prima fase in cui sono stati validati il DDS-UR e l'AxSYM e una seconda fase in cui è stato validato il DSX ELISA.

Test di screening effettuati con DDS-UR

I risultati degli esperimenti di sensibilità, specificità e accuratezza, ottenuti con la metodica *on-site*, sono riportati in Tabella 15 per ogni sostanza di abuso.

Come si evince da quest'ultima, i valori mostrano una totale mancanza di **sensibilità** per molte delle sostanze in esame (oppiacei, cannabinoidi, AMP, MAMP, metadone, buprenorfina) alla concentrazione A pari al cut-off. La sensibilità per le restanti sostanze, invece, varia in un range compreso tra l'11.1% e il 33.3%. Anche per il secondo livello di concentrazione (B) la sensibilità non migliora di molto, infatti essa varia in un range tra l'11.1% e il 66.7% per tutte le sostanze ad eccezione dell'MDMA, per il quale si raggiunge una valore di sensibilità del 100%. Per la concentrazione pari a tre volte il cut-off (C) le percentuali raggiunte, per tutte le sostanze, superano il 50%, ad eccezione dei cannabinoidi.

I dati peggiori sono stati registrati proprio da questi ultimi, in quanto è stata ottenuta una sensibilità dello 0% per tutte le concentrazioni (50, 100, 150ng/mL).

I risultati ottenuti, oltre ad essere inaccettabili data la finalità degli accertamenti a cui si riferiscono, sono in forte disaccordo con i valori di sensibilità dichiarati dal costruttore⁴⁶ (Tabella 16), i quali variano in un range tra l'89.9% e il 100%.

In un primo momento le discrepanze tra i valori ottenuti e quelli riportati dal costruttore possono essere attribuite alla differente scelta di sostanze target utilizzate per lo screening immunochimico rispetto a quelle utilizzate dalla nostra ricerca. Il dispositivo esaminato, infatti, non sempre individua il metabolita più abbondante presente in urina, mentre nel presente studio gli analiti/metaboliti sono stati aggiunti in base alle percentuali di escrezione urinaria (Tabella 9).

Nello specifico, i test riconoscono la morfina e il THC-COOH al posto degli analoghi glucuronati, il metadone al posto dell'EDDP e la buprenorfina al posto della norbuprenorfina-3- β -glucuronide.

Anche per le amfetamine, la sostanza target scelta è discutibile, poiché l'immunoreazione si basa sul riconoscimento degli (+) enantiomeri, che sono le molecole farmacologicamente attive; tuttavia, bisogna considerare che le droghe d'abuso non vengono verosimilmente commercializzate come enantiomeri puri, inoltre gli (+) enantiomeri non sono gli unici metaboliti urinari.

L'unico caso per cui il target corrisponde al metabolita urinario più abbondante è rappresentato dalla cocaina, per la quale il test on-site reagisce con la BEG; nonostante questo, la sensibilità al cut-off e alla concentrazione due volte il cut-off è di circa l'11%.

Inoltre, è ben documentato che l'assunzione contemporanea di cocaina ed alcool porta alla formazione di un nuovo metabolita: il CocEth; quest'ultimo è escreto in urina per il 33%, contemporaneamente l'escrezione della BEG diminuisce al 48%.⁴⁴ In tal caso il test di screening potrebbe non riconoscere i campioni positivi, poiché, il CocEth è evidenziato dall'immunotest solo se presente in quantità superiori ai 700ng/mL.⁴⁶ A tal proposito la falsa negatività è causata da una diminuzione dell'escrezione del target e dalla comparsa di un

secondo metabolita, che viene rilevato solo ad alte concentrazioni.

Dallo studio delle specifiche rilasciate dal costruttore emerge, inoltre, che il dispositivo riconosce principalmente un solo target, corrispondente ad una sostanza o un suo metabolita (vedi Tabella 16). Pertanto, il costruttore ha inteso il limite definito dal cut-off in relazione ad un unico indicatore, mentre il cut-off dovrebbe fare presumibilmente riferimento alla somma della sostanza d'abuso e dei suoi principali metaboliti. Nel presente studio, infatti, i campioni sono stati preparati (Tabella 9) in modo che la somma degli analiti/metaboliti corrispondesse alle concentrazioni del cut-off e due, tre volte quest'ultimo.

Questa scelta è dettata dal fatto che i test di screening, a differenza delle analisi di conferma, sono specifici per classi di sostanze e non per un'unica molecola.

Le difformità riscontrate nei risultati di sensibilità sono attribuibili anche a quest'ultima motivazione.

Questa spiegazione è valida, tuttavia, solo per le differenze in sensibilità riscontrate per i risultati ottenuti alla concentrazione più bassa presa in esame, tuttavia le prestazioni del dispositivo sono insoddisfacenti anche per i campioni con le concentrazioni nominali più elevate.

Infatti, in alcuni campioni B (COC, AMP, MAMP) e C (MTD) non solo la somma, ma anche i singoli composti target sono al di sopra dei valori di cut-off. Nel caso degli oppiacei, inoltre, anche se il singolo composto target (morfina) è presente sotto il cut-off in tutti i livelli di concentrazione (A, B, C), i campioni B e C contengono, comunque, il principale metabolita (MOR-3 β -Glu) ad una concentrazione superiore a 325ng/mL,⁴⁶ che rappresenta la concentrazione di reattività dichiarata dal produttore. L'unico dato in linea con quello riportato nelle specifiche tecniche, è stato registrato per l'MDMA, per il quale è stata ottenuta una sensibilità del 100% per i campioni B e C.

Un'ultima osservazione è necessaria: le sensibilità dichiarate dal produttore, fanno riferimento all'analisi di campioni in GC/MS o cromatografia liquida/spettrometria di massa (LC/MS), provenienti da un Istituto di Medicina

del Lavoro e da un Centro di Riabilitazione per le Tossicodipendenze. Nessun riferimento, tuttavia, è fatto relativamente alle concentrazioni di tali campioni, le quali verosimilmente erano molto alte e superiori ai limite di legge, poiché le matrici urinarie analizzate erano appartenenti ad utilizzatori abituali e/o tossicodipendenti.

Un discorso a parte deve essere fatto per cannabinoidi e buprenorfina. Nella preparazione dei campioni contenenti queste sostanze non è stato possibile rispettare la reale escrezione urinaria a causa della mancanza in laboratorio degli standard specifici. Sono stati preparati, pertanto, campioni contenenti il solo THC-COOH per i cannabinoidi e la sola buprenorfina per la droga stessa. Se da un lato questa scelta ci permette di ottenere solo dati preliminari dall'altro, in teoria, dovrebbe produrre percentuali più elevate considerando che l'unica sostanza addizionata corrisponde sia qualitativamente che quantitativamente a quella utilizzata dal costruttore. In realtà, invece, i risultati ottenuti per la buprenorfina sono in linea con i risultati ottenuti per le altre sostanze stupefacenti. Abbiamo ottenuto, infatti, sensibilità pari a 0%, 44.4% e 100%, rispettivamente, per i livelli di concentrazione A, B e C.

I risultati ottenuti per i cannabinoidi sono stati del tutto inattesi. È stata ottenuta, infatti, una sensibilità pari allo 0% per tutti i livelli di concentrazione. Questo dato risulta anomalo per due motivi, il primo, già discusso, è che la sostanza utilizzata per la preparazione dei campioni è la stessa utilizzata dal costruttore come indicatore d'abuso. Il secondo deriva dall'osservazione dei risultati ottenuti all'interno del laboratorio, sulle analisi di campioni reali provenienti dalle campagne di monitoraggio dei lavoratori con mansioni a rischio.

Presumibilmente, la presenza di metaboliti secondari nei "campioni reali",⁵⁹ può influenzare il test immunologico;⁵⁹ tale ipotesi sembra essere confermata dai dati di letteratura⁶⁰ e dai risultati degli screening effettuati su campioni di consumatori di THC.

Infatti, campioni provenienti da utilizzatori di marijuana sono stati

quantificati mediante GC/MS-SIM e successivamente sono stati diluiti con urine a controllo negativo, in modo che la concentrazione di THC-COOH corrispondesse al cut-off (50ng/mL). I test di screening sui campioni diluiti hanno dato una sensibilità del 66.6%, contro la sensibilità dello 0% ottenuta per i campioni in cui il metabolita è stato aggiunto dall'operatore. A tal proposito la reazione crociata con metaboliti secondari potrebbe spiegare una migliore prestazione del dispositivo per i campioni reali rispetto a quella ottenuta nel presente studio di validazione.

La **specificità**, del DDS-UR ha dato risultati migliori rispetto a quelli ottenuti per la sensibilità. I valori riportati in Tabella 15, infatti, evidenziano una specificità nell'intervallo del 98.1% (MAMP) e 100% (oppiacei, cocaina, cocaina+alcool, cannabinoidi, MDMA e metadone), che riflette quella affermata dal costruttore (Tabella 16), che varia tra il 92% (oppiacei e AMP) e il 100% (MAMP/MDMA).⁴⁶

La specificità, come spiegato precedentemente, è un indice diretto della possibilità che molecole più o meno simili a quella in esame possano dar luogo a reattività crociate e quindi all'insorgere di risultati falsi positivi.

In particolare, nel presente studio, sono stati registrati 8 casi di falsa positività: 4 campioni falsi positivi alla MAMP, un falso positivo all'AMP e 3 falsi positivi alla BUP.

I falsi positivi ottenuti per AMP e MAMP sono stati ottenuti durante l'analisi di campioni ai quali era stata aggiunto MDMA, per cui la falsa positività è riconducibile ad una cross-reattività dovuta ad una analogia strutturale.

Diversamente, i falsi positivi ottenuti per la buprenorfina non sembrano essere correlabili alle sostanze presenti in urina. Nel corso di questo studio, infatti, sono stati rilevati risultati falsamente positivi per la presenza di buprenorfina in campioni contenenti MTD, MDMA e MAMP, molecole non strutturalmente relazionabili tra loro o con la buprenorfina stessa. È opportuno precisare, a tale proposito, che durante l'analisi di campioni non relativi al presente studio è stata registrata un'alta percentuale di falsi positivi alla

buprenorfina, anche in campioni negativi per la presenza di sostanze stupefacenti. Tale fenomeno sembra legato al volume di urina addizionato al dispositivo piuttosto che alle sostanze contenute nella stessa.

Per quanto riguarda l'**accuratezza**, i dati ottenuti (Tabella 15) variano tra l'88.8% (cannabinoidi) e il 97.1% (MDMA); tali valori sono leggermente inferiori a quelli affermati dal costruttore, i quali oscillano, infatti, tra il 93.7% (AMP) e il 99.5% (MAMP/MDMA) (Tabella 16).

Si sottolinea, inoltre, che nella Tabella 16 non è stata inserita la buprenorfina, in quanto le specifiche tecniche non sono state fornite dal produttore.

		<i>DDS-UR screening test</i>		
<i>Droghe d'abuso</i>	<i>Concentrazione nominale (ng/mL)</i>	<i>sens%</i>	<i>spec%</i>	<i>acc%</i>
<i>Oppiacei</i>			100.0	93.4
	A = 300.0	0.0		
	B = 600.0	66.7		
	C = 900.0	55.6		
<i>Cocaina</i>	A = 300.0	11.1	100.0	92.1
	B = 600.0	11.1		
	C = 900.0	66.7		
<i>Cocaina + alcool</i>	A = 300.0	33.3	100.0	93.4
	B = 600.0	11.1		
	C = 900.0	77.8		
<i>Cannabinoidi</i>	A = 50.0	0.0	100.0	88.8
	B = 100.0	0.0		
	C = 150.0	0.0		
<i>AMP</i>	A = 500.0	0.0	99.5	93.8
	B = 1000.0	44.4		
	C = 1500.0	100.0		
<i>MAMP</i>	A = 500.0	0.0	98.1	92.6
	B = 1000.0	66.7		
	C = 1500.0	77.8		
<i>MDMA</i>	A = 500.0	22.2	100.0	97.1
	B = 1000.0	100.0		
	C = 1500.0	100.0		
<i>Metadone</i>	A = 300.0	0.0	100.0	93.0
	B = 600.0	25.0		
	C = 900.0	77.8		
<i>Buprenorfina</i>	A = 5.0	0.0	98.6	93.0
	B = 10.0	44.4		
	C = 15.0	100.0		

Tabella 15: Sensibilità, specificità e accuratezza del Cozart DDS-UR, calcolati per i tre livelli di concentrazione.

DDS-UR screening test					
Droghe d'abuso^a	Target	Cut-off	sens%	spec%	acc%
Oppiacei	MOR	300.0	100.0	92.3	95.7
Cocaina	BEG	300.0	95.8	99.1	97.6
Cannabinoidi	Δ^9 -THCCOOH	50.0	89.9	96.8	94.1
AMP	(+)AMP	500.0	96.6	92.5	93.7
MAMP/ MDMA	(+)MAMP	500.0	99.0	100.0	99.5
Metadone	MTD	300.0	100.0	94.1	96.7

Tabella 16: Sostanze target, cut-off, sensibilità, specificità e accuratezza del Cozart DDS-UR dichiarati dal produttore.

^aLe specifiche tecniche della Buprenorfina non sono stati fornite dal produttore.

Test di screening effettuati con AxSYM

I risultati di **sensibilità** ottenuti con il sistema AxSYM sono riportati in Tabella 17.

I dati mostrano percentuali di sensibilità pari a zero per oppiacei e cocaina alla concentrazione A e per le concentrazioni A e B per l'accoppiamento cocaina+alcool, mentre le sensibilità raggiungono il 100% per le altre concentrazioni.

Risultati pessimi sono stati ottenuti per i cannabinoidi: la sensibilità è solo del 33.3% per le concentrazioni B e C e dello 0% per A.

Nel caso del metadone sono state ottenute sensibilità dello 0% al cut-off e il 22.2% alla concentrazione B, invece è stata raggiunta una sensibilità del 77.8% alla concentrazione C.

Ottime risposte (100%) sono state ottenute per MAMP e MDMA alle concentrazioni B e C e per tutti e tre i livelli di concentrazione per l'AMP.

Anche in questo caso è possibile spiegare tali esiti con la scelta di utilizzare la somma delle concentrazioni dei principali metaboliti come cut-off, a differenza delle ditte costruttrici che intendono il cut-off come la concentrazione di un unico indicatore. È stata ottenuta, infatti, una sensibilità dello 0% per oppiacei, cocaina, cocaina e alcool e metadone, per le quali la concentrazione del principale metabolita nelle urine del punto A è nettamente inferiore al valore di cut-off. Mentre MDMA e metamfetamina, il cui principale metabolita è escreto rispettivamente per il 90.3 e 87.7%, mostrano i primi risultati positivi già al punto A con una sensibilità per entrambi del 33.3%. Il dato è confermato dal risultato ottenuto per l'AMP escreta in forma immodificata nelle urine, per la quale si è ottenuta una sensibilità del 100% al punto A. Il discorso non può essere esteso ai cannabinoidi, per i quali, come già detto, non era disponibile il metabolita glucuronato. Per tale sostanza, quindi, sarà necessario effettuare ulteriori indagini, prima di poter discutere i risultati.

Non sono riportati in tabella i risultati per la buprenorfina, per la quale non esiste in commercio il kit per lo screening con la metodica utilizzata.

<i>Droghe d'abuso^a</i>	<i>Conc. nominale (ng/ml)</i>	<i>AxSYM sens%</i>
<i>Oppiacei</i>	A = 300.0	0.0
	B = 600.0	100.0
	C = 900.0	100.0
<i>Cocaina</i>	A = 300.0	0.0
	B = 600.0	100.0
	C = 900.0	100.0
<i>Cocaina + alcool</i>	A = 300.0	0.0
	B = 600.0	0.0
	C = 900.0	100.0
<i>Cannabinoidi</i>	A = 50.0	0.0
	B = 100.0	33.3
	C = 150.0	33.3
<i>AMP</i>	A = 500.0	100.0
	B = 1000.0	100.0
	C = 1500.0	100.0
<i>MAMP</i>	A = 500.0	33.3
	B = 1000.0	100.0
	C = 1500.0	100.0
<i>MDMA</i>	A = 500.0	33.3
	B = 1000.0	100.0
	C = 1500.0	100.0
<i>Metadone</i>	A = 300.0	0.0
	B = 600.0	22.2
	C = 900.0	77.8

Tabella 17: Sensibilità ottenuta dall'AxSYM.

^aPer la buprenorfina non esiste un kit specifico.

Per la determinazione dell'**accuratezza** dell'AxSYM sono state paragonate le concentrazioni di analiti misurate mediante FPIA e quelle quantificate mediante analisi GC/MS-SIM (Tabella 18); da tale confronto è emerso una tendenza della metodica FPIA a sottostimare la concentrazione di analiti presenti nel campione, ad eccezione di AMP e MDMA, per le quali le concentrazioni sono state sovrastimate, rispettivamente, fino al 64% e 83% (Tabella 18). Ne risulta che per concentrazioni uguali o prossime al cut-off si ottiene un risultato falsamente negativo.

I dati peggiori, anche nel caso dell'accuratezza, sono stati quelli registrati per i cannabinoidi, dove le concentrazioni sono state quantificate fino al 60% in meno rispetto a quelle ottenute in GC/MS-SIM.

In generale, possiamo affermare che l'accuratezza strumentale, migliora all'aumentare della concentrazione, sebbene non in modo significativo e proporzionale, tranne che nel caso della MAMP, per la quale abbiamo avuto valori di accuratezza alla concentrazione A, sebbene pessimi, ma superiori rispetto a quelli di B e C.

La tendenza a sottostimare il dato spiega la scarsa sensibilità ottenuta con questa metodica al cut-off. Questa ipotesi è confermata dal fatto che per l'AMP, per la quale si nota una tendenza a sovrastimare il dato quantitativo, si è ottenuta una sensibilità del 100% già alla concentrazione più bassa considerata.

Bisogna precisare, inoltre, che estendendo l'esperimento ad un numero maggiore di campioni, sarebbe possibile calcolare l'errore relativo alla misura in maniera più precisa ed applicare questo dato alla determinazione di positivi e negativi. Vale a dire che, ad esempio, per un errore pari al 10% ed un cut-off pari a 300ng/mL, si potranno considerare positivi campioni la cui quantificazione parte da 270ng/mL. In questo modo si potrebbe ottenere un notevole aumento della sensibilità della metodica.

Si evidenzia che l'AxSYM adoperato è uno strumento dell'Unità di Farmacologia Clinica della nostra Università per cui non è stato possibile calcolare la **specificità**, analizzando eventualmente campioni contenenti

determinate sostanze con i kit di altre classi di analiti o comunque campioni negativi.

		GC/MS-SIM				
Droghe d'abuso	Livelli conc.	Conc. \pm SD (ng/mL)			Conc. calcolata \pm SD (ng/mL)	acc%^a
Oppiacei		MOR				
	A	311.1 \pm 2.0			249.8 \pm 21.2	-19.7
	B	606.1 \pm 3.2			409.5 \pm 32.6	-32.4
	C	905.2 \pm 4.2			578.1 \pm 26.3	-36.1
Cocaina		BEG	EME	COC		
	A	189.2 \pm 1.2	116.7 \pm 0.9	10.6 \pm 0.2	239.3 \pm 23.6	-24.4
	B	348.3 \pm 8.9	228.9 \pm 4.8	20.4 \pm 0.3	396.7 \pm 30.2	-33.6
	C	523.4 \pm 8.8	329.1 \pm 4.6	29.5 \pm 0.7	239.3 \pm 23.6	-35.7
Cocaina + alcool		BEG	CocEth	COC		
	A	140.9 \pm 7.8	103.1 \pm 2.3	57.6 \pm 2.6	162.2 \pm 19.5	-48.7
	B	269.3 \pm 12.6	204.8 \pm 2.1	113.5 \pm 7.1	261.1 \pm 8.6	-55.6
	C	427.8 \pm 7.0	304.2 \pm 3.6	174.7 \pm 7.7	424.8 \pm 14.8	-53.1
Cannabinoidi		Δ^9 -THCCOOH				
	A	50.7 \pm 1.0			25.6 \pm 12.5	-49.5
	B	100.5 \pm 4.9			40.0 \pm 22.5	-60.2
	C	146.0 \pm 2.7			73.5 \pm 52.9	-49.6
AMP		AMP				
	A	511.7 \pm 1.1			665.3 \pm 148.3	30.0
	B	1005.6 \pm 11.8			1308.7 \pm 333.3	30.1
	C	1500.2 \pm 35.0			2461.3 \pm 703.2	64.1
MAMP		MAMP	AMP			
	A	455.8 \pm 7.6	63.6 \pm 0.6		447.4 \pm 87.1	-13.9
	B	967.1 \pm 16.6	130.5 \pm 1.7		1006.7 \pm 120.3	-8.3
	C	1434.6 \pm 30.6	193.0 \pm 1.7		1624.6 \pm 183.5	-0.2
MDMA		MDMA	MDA			
	A	445.8 \pm 1.2	55.5 \pm 0.9		564.0 \pm 144.6	12.5
	B	879.6 \pm 22.3	108.2 \pm 0.1		1387.6 \pm 380.2	40.5
	C	1311.6 \pm 35.6	166.1 \pm 8.4		2698.6 \pm 774.1	82.6
Metadone		MTD	EDDP			
	A	133.7 \pm 3.6	169.5 \pm 2.1		179.7 \pm 7.4	-40.7
	B	263.6 \pm 2.1	341.6 \pm 2.6		336.1 \pm 35.4	-44.4
	C	391.9 \pm 3.8	512.5 \pm 3.3		426.4 \pm 25.6	-52.8

Tabella 18: Concentrazioni degli analiti e metaboliti riscontrate con la quantificazione in GC/MS-SIM confrontati con i risultati ottenuti con l'AxSYM e rispettive accuratezze.

^aacc% calcolata rapportando le concentrazioni per classe di sostanze ottenute con l'AxSYM e la somma delle concentrazioni dei diversi analiti/metaboliti ottenute con la GC/MS.

Test di screening con DSX ELISA

I risultati degli esperimenti di sensibilità, specificità e accuratezza del DSX sono riportati in Tabella 19.

Si deduce da quest'ultima che la **sensibilità** alle concentrazioni sia A che B è dello 0% per oppiacei, metadone e MDMA. Quest'ultimo, inoltre, mostra una sensibilità dello 0% anche sulla concentrazione più alta C, mentre oppiacei e metadone hanno dato, a questa concentrazione, risultati pari al 100% e al 66.7%. Le altre sostanze presentano, per tutte le concentrazioni, sensibilità superiori al 50%, ad eccezione della concentrazione B della MAMP (33.3%). I risultati peggiori sono stati registrati dall'MDMA, poiché è stata conseguita una sensibilità dello 0% per tutti i campioni (500, 1'000, 1'500ng/mL), mentre, ottimi risultati sono stati ottenuti per cannabinoidi e cocaina+alcool, per i quali la sensibilità determinata è stata del 100% su tutti e tre i livelli di concentrazione.

Dai dati emerge che le sensibilità, soprattutto ai livelli di cut-off, sono inaccettabili, per circa la metà delle sostanze. Ciò potrebbe derivare, anche in questo caso, dalla differenza tra le sostanze target riconosciute dallo screening immunochimico rispetto a quelle utilizzate dalla nostra ricerca. Infatti, nel caso degli oppiacei il target è rappresentato, anche in questo caso, dalla morfina libera, escreta come tale solo per il 15%. In base alle specifiche del produttore,⁵⁶ la morfina-3 β -glucuronide, che rappresenta il metabolita principale, fornisce a 300ng/mL un risultato di circa 50ng/mL per la presenza di morfina (morfina apparente), mentre la 6-MAM ad una concentrazione di 1'000ng/mL fornisce un esito di 198ng/mL per la presenza di morfina; questo potrebbe spiegare una sensibilità dello 0% ai livelli A e B.

Un discorso analogo si può fare per campioni A e B inerenti al metadone, mentre, per quest'ultimo, il 66.7% di sensibilità sulla concentrazione più alta è giustificato dal fatto che C, rispetto ad A e B, contiene quantità del solo metadone (e non di EDDP+MTD) appena superiori a 300ng/mL (vedi Tabella 9), che rappresenta il cut-off strumentale, mentre il metabolita principale EDDP

(escreto al 56.6%) è letto a ben 100'000ng/mL come 1.4ng/mL di metadone apparente.⁵³

I pessimi valori ottenuti per l'MDMA, invece, non trovano spiegazione; tale analita, infatti, è analizzato con lo stesso kit della MAMP, ed è addirittura sovrastimato secondo le dichiarazioni del produttore; nello specifico 500ng/mL di MDMA dovrebbero essere letti come 1'019ng/mL di MAMP apparente.⁵⁴

La buona sensibilità di cocaina, cannabinoidi e buprenorfina deriva dalla corrispondenza tra i target dei test e la percentuale di sostanze aggiunte ai campioni per le presenti prove sperimentali.

Come si nota dalla Tabella 19, mancano i risultati per l'amfetamina a causa della mancata disponibilità di un numero sufficiente di test per svolgere tutte le analisi necessarie alla validazione; si sottolinea però, che campioni di amfetamina sono stati preparati analogamente alle altre sostanze e questi, analizzati con i kit specifici per altri analiti, sono stati usati per la valutazione della specificità delle altre classi di sostanze.

Per la **specificità** del DSX, al contrario, abbiamo ottenuto valori del 100% per tutte i campioni e per tutte le sostanze (Tabella 19). La specificità è stata calcolata analizzando i campioni contenenti un determinato gruppo di sostanze/metaboliti con i kit specifici di altre classi, al fine evidenziare un'eventuale reattività crociata; i risultati mettono in luce la totale assenza di falsi positivi e di qualsiasi reattività crociata tra i diversi analiti.

<i>Droghe d'abuso^a</i>	<i>Conc. nominale totale^a (ng/ml)</i>	<i>DSX ELISA</i>	
		<i>sens%</i>	<i>spec%</i>
<i>Oppiacei</i>	A = 300.0	0	100
	B = 600.0	0	100
	C = 900.0	100	100
<i>Cocaina</i>	A = 300.0	66.7	100
	B = 600.0	100	100
	C = 900.0	100	100
<i>Cocaina + alcool</i>	A = 300.0	100	100
	B = 600.0	100	100
	C = 900.0	100	100
<i>Cannabinoidi</i>	A = 50.0	100	100
	B = 100.0	100	100
	C = 150.0	100	100
<i>AMP</i>	A = 500.0	--	100
	B = 1000.0	--	100
	C = 1500.0	--	100
<i>MAMP</i>	A = 500.0	66.7	100
	B = 1000.0	33.3	100
	C = 1500.0	100	100
<i>MDMA</i>	A = 500.0	0	100
	B = 1000.0	0	100
	C = 1500.0	0	100
<i>Metadone</i>	A = 300.0	0	100
	B = 600.0	0	100
	C = 900.0	66.7	100
<i>Buprenorfina</i>	A = 5.0	33.3	100
	B = 10.0	100	100
	C = 15.0	100	100

Tabella 19: Sensibilità e specificità del DSX ELISA, calcolati per i tre livelli di concentrazione.

Per la determinazione dell'**accuratezza** del DSX sono state paragonate le concentrazioni di analiti misurate mediante tecnica ELISA e quelle quantificate mediante analisi GC/MS-SIM; anche da tale confronto, come nel caso dell'AxSYM, è emerso che le prime sono generalmente molto inferiori alle seconde, ad eccezione di cocaina+alcool e cannabinoidi, per i quali le concentrazioni sono state sovrastimate più del 100% al cut-off (Tabella 20) e tra il 23% e il 70% alle altre concentrazioni, mentre la cocaina presenta una piccola sovrastima alle due concentrazioni più alte.

La sottostima evidenziata supera quasi sempre il 50%, ma comunque non è mai inferiore al 30%. In generale, quindi, abbiamo ottenuto risultati non ottimali per le finalità di tali analisi, fanno eccezione la buprenorfina al cut-off e la cocaina a tutte le concentrazioni, per le quali emerge un'accuratezza strumentale accettabile.

Inoltre, possiamo affermare che il discostamento dai valori ottenuti in GC/MS aumenta in maniera non significativa all'aumentare della concentrazione, tranne che nel caso di cocaina, cocaina+alcool e cannabinoidi.

Una particolare riflessione è stata fatta sui valori della cocaina+alcool; è noto che quando c'è una contestuale assunzione di cocaina e alcool, come già discusso per l'AxSYM, diminuiscono le percentuali di escrezione della BEG e compare il CocEth (escreto al 33.4%), quest'ultimo, però, è sottostimato in base alle specifiche tecniche⁵² (500ng/mL di CocEth sono letti come circa 120ng/mL di BEG apparente) e ciò potrebbe rendere inspiegabili le sovrastime ottenute.

In realtà osservando le percentuali di escrezione in Tabella 9, notiamo come la concentrazione di cocaina, escreta come tale, aumenta dal 3.5% della semplice assunzione al 18.7% dell'assunzione simultanea con alcool. A tal proposito i campioni preparati per simulare la co-assunzione (cocaina +alcool) contengono una quantità maggiore di cocaina; quest'ultima, secondo le specifiche strumentali,⁵² è letta quasi al pari della BEG, soprattutto a basse concentrazioni; questo potrebbe essere il motivo per cui otteniamo concentrazioni molto sovrastimate rispetto a quelle dei campioni preparati per

mimare la sola assunzione di cocaina.

Anche per l'ELISA possiamo estendere il discorso già fatto per l'AxSYM, ovvero ampliando l'esperimento ad un numero maggiore di campioni, sarebbe possibile calcolare l'errore relativo alla misura in maniera più precisa ed applicare questo dato alla determinazione di positivi e negativi.

<i>Droge d'abuso</i>	<i>Livelli conc.</i>	<i>GC/MS-SIM</i>			<i>DSX ELISA</i>	
		<i>Conc. ± SD (ng/mL)</i>			<i>Conc. calcolata ± SD (ng/mL)</i>	<i>acc%^a</i>
<i>Oppiacei</i>		MOR				
	A	350.2±6.9			199.7±16.1	-43.0
	B	632.3±7.9			264.2±8.3	-58.2
	C	915.4±9.9			342.7±34.2	-62.5
<i>Cocaina</i>		BEG	EME	COC		
	A	179.9±1.4	135.4±1.2	10.8±0.8	353.6±100.0	8.4
	B	383.0±9.2	224.4±5.1	20.9±0.9	644.0±37.4	2.5
	C	488.3±8.9	329.0±4.6	31.0±1.1	846.7±137.7	-0.2
<i>Cocaina + alcool</i>		BEG	CocEth	COC		
	A	154.5±7.8	104.0±2.8	58.7±2.4	714.6±99.2	125.3
	B	289.6±12.1	189.2±2.3	121.9±7.3	1'020.4±54.2	69.9
	C	416.5±7.2	284.1±3.5	169.8±8.0	1'079.5±30.4	24.0
<i>Cannabinoidi</i>		Δ ⁹ -THCCOOH				
	A	51.6±1.8			101.0±20.7	102.1
	B	104.2±5.0			159.4±6.1	59.4
	C	169.2±1.5			184.1±3.5	22.7
<i>MAMP</i>		MAMP		AMP		
	A	449.3±9.6		60.5±3.6	344.3±59.0	-32.5
	B	875.8±3.4		127.8±4.9	500.3±55.0	-50.0
	C	1'272.1±7.7		186.3±4.1	699.2±65.1	-52.1
<i>MDMA</i>		MDMA		MDA		
	A	494.6		54.2±1.2	301.2±48.3	-45.1
	B	950.1		108.4±0.3	415.5±10.1	-60.7
	C	1'387.1		166.5±7.9	484.6±7.2	-68.8
<i>Metadone</i>		MTD		EDDP		
	A	142.5±2.4		179.6±9.1	210.4±7.6	-34.7
	B	262.0±13.4		352.0±9.5	258.6±9.5	-57.9
	C	393.0±8.9		494.3±29.5	327.0±32.8	-63.1
<i>Buprenorfina</i>		BUP				
	A	4.6±0.05			4.4±0.4	-4.3
	B	9.3±0.01			5.3±0.2	-43.4
	C	14.3±0.4			5.7±0.06	-60.4

Tabella 20: Concentrazioni degli analiti e metaboliti riscontrate con la quantificazione in GC/MS-SIM confrontati con i risultati ottenuti con il DSX e rispettive accuratezze.

^aacc% calcolata rapportando le concentrazioni per classe di sostanze ottenute con il DSX e la somma delle concentrazioni dei diversi analiti/metaboliti ottenute con la GC/MS.

CONCLUSIONI

I risultati conseguiti nel corso dei tre anni di ricerca hanno consentito di ottenere una metodica analitica di conferma con elevati requisiti di linearità, specificità, sensibilità, accuratezza e precisione, fattori che garantiscono la corrispondenza delle metodiche alle prerogative di legge, nonché alle esigenze di attendibilità imposte dall'importanza delle analisi.

Allo stesso tempo, invece, la valutazione dei parametri di validazione dei test di screening esaminati ha messo in luce molte carenze di questi ultimi. In particolare, l'analisi statistica condotta sui dati ottenuti ha evidenziato una percentuale di falsi negativi (confermati, invece, in GC/MS), che costituiscono il principale dato di inadeguatezza, ai fini forensi, di tutti gli strumenti indagati, nonostante questi si basassero su tecniche analitiche diverse.

L'indice di falsi negativi, fornito dai dati di sensibilità, mostra l'effettiva inidoneità anche per concentrazioni alte di analiti.

Il motivo di queste insufficienze è spesso da attribuire al riconoscimento, da parte dei dispositivi testati, di una sola molecola target, tra l'altro non sempre corrispondente al metabolita principale, mentre un test ideale dovrebbe avere una reattività adeguata per più metaboliti urinari ed in relazione alle loro reali percentuali di escrezione.

Considerando che la legislazione italiana utilizza i test di screening come strumento di indagine per determinare l'uso/abuso di sostanze stupefacenti, soprattutto nei casi in cui è necessario valutare l'integrità psico-fisica di un soggetto, gli esiti ottenuti risultano molto critici per la sicurezza sociale.

La criticità di tali dati è dettata dal fatto che un esito negativo è generalmente accettato come valido, al contrario di qualunque positività allo screening che è obbligatoriamente sottoposta a conferma.

A tale riguardo non è sufficiente verificare che il metodo di screening sia in grado di minimizzare il numero di risultati falsi negativi, ma come prescritto nelle Linee Guida dei Tossicologi Forensi 2012,³⁸ deve essere accertata (o documentata dalla ditta) la capacità del metodo a *non produrre falsi negativi*.

ABBREVIAZIONI

- acc%:** deviazione percentuale dalle concentrazioni nominali
- AMP:** amfetamina
- AVT:** area ventrale del tegmento
- BEG:** benzoilecgonina
- BUP:** buprenorfina
- BSTFA:** N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide
- COC:** cocaina
- CocEth:** coca etilene
- conc.:** concentrazione
- COD:** codeina
- CV%:** coefficiente di variazione percentuale
- EDDP:** 2-etilidene-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina perclorato
- EI:** ionizzazione elettronica
- ELISA:** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
(Saggio Immuno-Assorbente legato ad un Enzima)
- EMCDDA:** European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction
- EME:** ecgoninametilestere
- FDA:** Food and Drug Administration
- FN:** falso negativo
- FPIA:** Fluorescence Polarization Immunoassay
(Saggio di Immunofluorescenza Polarizzata)
- FP:** falso positivo
- GC:** gas cromatografia
- HFBA:** anidride eptafluorobutirrica
- IS:** standard interno
- LLOQ:** Lower Limit of Quantification
(limite di quantificazione)
- LOD:** Limit of Detection
(limite di rivelabilità)

6-MAM: 6-monoacetilmorfina
MAMP: metamfetamina
MAO: monoamminossidasi
MDA: 3,4-metilendiossiamfetamina
MDMA: 3,4-metilendiossimetilamfetamina
min.: minuti
MOR: morfina
MOR-3 β -Glu: morfina-3 β -glucuronide
MOR-6 β -Glu: morfina-6 β -glucuronide
MS: spettrometria di massa
MTD: metadone
QC: Quality Control
R²: coefficiente di correlazione
rec%: recupero percentuale medio
RT: tempo di ritenzione
SD: deviazione standard
sens%: sensibilità percentuale
SIM: scansione di ioni selezionati
S.N.C.: Sistema Nervoso Centrale
SPE: estrazione in fase solida
spec%: specificità percentuale
 Δ^9 -THC: Δ^9 -tetraidrocannabinolo
THC-COOH: 11-nor-9-carbossi-delta-9-tetraidrocannabinolo
VN: veri negativi
VP: veri positivi

BIBLIOGRAFIA

1. O. Mariotti. *Droghe e lavoro*. G Ital Med Erg 2004; 26:3, 1-21.
2. C. Baccini. *Le droghe d'abuso*. MEDICAL SYSTEM s.p.a.
3. D.P.R. n. 309 del 9.10.1990 Testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza (*Suppl. Ord. n. 67 alla G.U. n. 255/1990*).
4. Goodman & Gilman. *Le basi farmacologiche della terapia*. IX edizione (2000) Mc Graw-Hill Libri Italia s.r.l.
5. E. Bertol, F. Mari, F. Lodi, E. Marozzi. *Trattato di tossicologia forense*. II edizione (2000), CEDAM.
6. S. Bivaschi. *Vera storia della droga*.
www.amiciziacristiana.it/verastoriadelladroga.doc
7. A. Magnone. *Droghe e problematiche correlate*. Scienza e coscienza.
www.web.tiscali.it/scienzaecoscienza/droghe.html
8. M. Faccio, G. Serpelloni. *Clinica dei disturbi psichici correlati al consumo di cocaina e criteri diagnostici*.
<http://www.dronet.org/pdf/4.1%20Cocaina.pdf>
9. G. Quaglio, F. Lugoboni, B. Pajusco, A. Fornasiero, P. Mezzelani, A. Lechi. *Manifestazioni cliniche associate all'uso di cocaina*. Ann Ital Med Int 2004; 19:291-303.
10. F. Grotenhermen. *Cannabinoidi e Sistema Endocannabinoide*. Cannabinoids-Vol 1, N° 1-17 Settembre 2006.
11. G.U. n. 98 del 28 Aprile 2007.
12. O. Mariotti. *Droghe e lavoro*. G Ital Med Lav Erg 2004; 26:3, 1-21
13. G. L. Colombo, G. Faillace, M. Ferdico. *Analisi dei costi di buprenorfina vs metadone nella terapia dei soggetti con dipendenza da oppiacei*. Farmeconomia e percorsi terapeutici 2003; 4 (4).
14. S. Canali. *Le chiavi del dolore. Storia della neurofarmacologia del Dolore*. Sapere, 2003; 69:2.

15. G. L. Colombo, G. Faillace, M. Ferdico. *Analisi dei costi di buprenorfina vs metadone nella terapia dei soggetti con dipendenza da oppiacei*. *Farmeconomia e percorsi terapeutici* 2003; 4 (4).
16. Herbert D. Kleber, MD. *Pharmacologic treatments for opioid dependence: detoxification and maintenance options*. *Dialogues in Clinical Neuroscience* – Vol. 9, N° 4, 2007.
17. J. B. Bernard, M. S. Opdal, R. Karinen, J. Morland, H. Z. Khiabani. Relationship between methadone and EDDP (2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine) in urine samples from Norwegian prisons. *Eur J Clin Pharmacol* (2007) 63:777–782.
18. Osservatorio europeo delle droghe e delle tossicodipendenze. *Relazione annuale 2012: Evoluzione del fenomeno della droga in europa*. ISSN 1609- 6169.
<http://www.emcdda.europa.eu/publications/annual-report/2012>.
19. *Relazione Annuale Al Parlamento 2011 sull'uso di Sostanze stupefacenti e sullo Stato delle Tossicodipendenze In Italia. Relazione 2011 (Dati 2010 E Primo Semestre 2011)*
<http://www.iss.it/binary/drog/cont/sintesi>.
20. *Relazione Annuale Al Parlamento 2012 sull'uso di Sostanze stupefacenti e sullo Stato delle Tossicodipendenze In Italia. Relazione 2011 (Dati 2011 E Primo Semestre 2012)*
http://www.politicheantidroga.it/media/569861/file%20cumulativo_light.pdf
21. *Piano di Azione Nazionale Antidroga 2010-2013*. <http://www.politicheantidroga.it>.
22. D.M. del 24.01.2007 *Revisione della lista dei farmaci, delle sostanze biologicamente o farmacologicamente attive e delle pratiche mediche, il cui impiego è considerato doping, ai sensi della legge 14 dicembre 2000, n. 376. (Suppl. ord. n. 52 alla G.U. n. 50 del 01.03.2007 - Serie generale)*
23. L. n. 376 del 14.12.2000 *Disciplina della tutela sanitaria delle attività sportive e della lotta contro il doping (G.U. n. 294 del 18.12.2000)*.
24. R.D. n. 1398 del 19.10.1930 *Codice Penale Libro I Titolo IV Del reo e della persona offesa dal reato (G.U. n. 253 del 28.10.1930)*.
25. D.lgs n.230 del 22.06.1999 *Riordino della medicina penitenziaria a norma dell'articolo 5, della legge legge 30 novembre 1998, n. 419 (Suppl. ord. n. 132 alla G.U. n. 165 del 16.07.1999)*.
26. L. n. 54 del 8.02.2006 *Disposizioni in materia di separazione dei genitori e affidamento dei figli (G.U. n. 50 del 01.03.2006)*.

27. L. n. 149 del 28.03.2001 Modifiche alla legge 4 maggio 1983, n. 184, recante «Disciplina dell'adozione e dell'affidamento dei minori», nonché al titolo VIII del libro primo del codice civile" (*G.U. n. 96 del 26.04.2001*).
28. D.lgs n. 285 del 30.04.1992 Nuovo codice della strada (*Suppl. ord. alla G.U. n. 114 del 18.05.1992*).
29. D.L. 3 n. 117 del 03.08.2007 Disposizioni urgenti modificative del codice della strada per incrementare i livelli di sicurezza nella circolazione (*G.U. n. 180 del 4.08.2007*).
30. L. n. 160 del 02.10.2007 Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 3 agosto 2007, n. 117, recante disposizioni urgenti modificative del codice della strada per incrementare i livelli di sicurezza nella circolazione (*G.U. n. 230 del 3.10.2007*).
31. D.L. n. 92 23 maggio 2008, Misure urgenti in materia di sicurezza pubblica (*G.U. n. 122 del 26.05.2008*).
32. Protocollo operativo per gli accertamenti richiesti all'art 187 del D.lgs del 30.4.1992 n. 285 e successive modificazioni sui conducenti che si presume siano in stato di alterazione psico-fisica conseguente all' uso di sostanze stupefacenti o psicotrope (Versione 2.2 – febbraio 2005).
33. D.P.R. n. 496 del 28.05.1964 Approvazione dell'elenco delle imperfezioni e delle infermità che sono causa di non idoneità al servizio militare (*G.U. n. 166 del 9.07.1964*).
34. Decreto legislativo n. 81 del 09.04.2008 Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro (*Suppl. ord. n. 108 alla G.U. n. 101 del 30.04.2008*).
35. Provvedimento n. 99/cu del 30.10.2007 Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131, in materia di accertamento di assenza di tossicodipendenza (*G.U. n. 266 del 15.11.2007*).
36. Provvedimento n. 178/csr del 18.09.2008 Accordo, ai sensi dell'articolo 8, comma 2 dell'Intesa in materia di accertamento di assenza di tossicodipendenza, perfezionata nella seduta della Conferenza Unificata del 30 ottobre 2007 (*G.U. n. 236 dell'8.10.2008*).
37. Deliberazione n. 1448 del 11.9.2009 Recepimento Protocollo operativo per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi ai sensi dell'intesa Stato/Regioni (provvedimento n. 99/CU del 30.10.2007) e dell'Accordo Stato/Regioni (rep. atti n. 178 del 18.9.2008). (*Bollettino Ufficiale della Regione Campania n. 58 del 28.09.2009*).

38. Linee guida per le Strutture dotate di Laboratori per gli accertamenti di Sostanze d'Abuso con finalità Tossicologico-Forensi e Medico-Legali su campioni biologici prelevati da vivente. (*Revisione n. 4 del 6 dicembre 2012 dell'Associazione Scientifica GTFI*).
39. R. Pacifici, A. Lopez, M. Pellegrini, P. Zuccaro. *Il ruolo del laboratorio nella clinica delle tossicodipendenze*. Ann. Ist. Super. Sanità 2000; 36(1), 9-16.
40. M. Filocamo. *Metodi immunochimici rapidi (on site) per lo screening tossicologico delle urine*. Ligand Assay 2009;14(4), 325-327.
41. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>
42. G. Cooper, L. Wilson, C. Reid, D. Baldwin, C. Hand, V. Spiehler. *Validation of the Cozart microplate ELISA for detection of opiates in hair*. J. Anal. Toxicol. 2003 Nov-Dec; 27(8):581-586.
43. Jatlow, M. D. P. Yale J. Biol. Med. 1988, 61, 105-113.
44. Huang, W.; Moody, D. E.; McCance-Katz, E. F. *Ther. Drug Monit.* 2006, 28(2), 245-251.
45. Moffat, A. C.; Osselton, M. D.; Widdop, B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Pharmaceutical Press 2004, Vol. 2.*
46. Package insert. Cozart® DDSUR901 for the analysis of amphetamine, cocaine, marijuana, methadone, methamphetamine, opiates and buprenorphine. Concateno plc Global Drug Testing Services, Oxfordshire, UK, 2011.
47. Package insert AxSYM system. Opiates. Abbot, Wiesbaden, DE, 2010.
48. Package insert AxSYM system. Cocaine metabolite. Abbot, Wiesbaden, DE, 2010.
49. Package insert AxSYM system. Cannabinoids. Abbot, Wiesbaden, DE, 2010.
50. Package insert AxSYM system. Amphetamine/Methamphetamine II. Abbot, Wiesbaden, DE, 2010.
51. Package insert AxSYM system. Methadone. Abbot, Wiesbaden, DE, 2010.
52. Kit Cocaine Metabolite Microplate EIA Urine Application. Cozart, (Oxfordshire, UK), Sep 2000.
53. Kit Methadone Microplate EIA Urine Application. Cozart, (Oxfordshire, UK), Jul 2001.

54. Kit Methamphetamine Microplate EIA Urine Application. Cozart, (Oxfordshire, UK), Feb 2001.
55. Kit Amphetamine Specific Microplate EIA Urine Application. Cozart, (Oxfordshire, UK), Sep 2009.
56. EIA Opiates Urine Kit. Cozart, (Oxfordshire, UK), Feb 2005.
57. EIA Cannabinoids Urine Kit. Cozart, (Oxfordshire, UK), Feb 2005.
58. EIA Buprenorphine Urine Kit. Cozart, (Oxfordshire, UK), Aug 2005.
59. Felli, M.; Martello, S.; Chiarotti, M. *Forensic Sci. Inter.* 2011, 204, 67-73.
60. United Nations International Drug Control Programme “Recommended methods for the detection and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, methamphetamine and ring-substituted amphetamine derivatives”. United Nations, NY, 2005