Multitest rapidi utilizzati dall'Unità Operativa di Diagnosi Clinica-Tossicologica

Giovanni Serpelloni[1], Diana Candio[2], Claudia Rimondo[2], Sara Malesan[3]
[1] Direttore Dipartimento delle Dipendenze Azienda ULSS 20
Direttore Programma Regionale sulle Dipendenze - Regione del Veneto
[2] Consulenti Programma Regionale sulle Dipendenze - Regione del Veneto
[3] Tecnico di Laboratorio, Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Ospedale di San Bonifacio, Azienda ULSS 20

Esami di laboratorio

Tre livelli

Gli esami di laboratorio che vengono eseguiti per comporre la diagnosi di positività per la guida in stato-psicofisico alterato sono strutturati su tre livelli.
Al primo livello si trovano i multitest rapidi su saliva e su urina, detti anche test di screening. Il risultato che questi test consegnano, come verrà di seguito descritto, è di tipo qualitativo. Ciò significa che questi test indicano solo la presenza o assenza di sostanze stupefacenti nell'organismo della persona in esame, e non la quantità di sostanza assunta o ancora in circolo al momento dell'accertamento.
Al secondo livello si trova l'esame in laboratorio. Questo tipo di esame restituisce un risultato quali-quantitativo, cioè, è in grado di indicare la quantità di una sostanza presente nell'organismo della persona esaminata e di definire la positività in riferimento ad un valore soglia (cut-off).
Infine, al terzo livello si eseguono esami di conferma con test cromatografici quali gas-cromatografia (GC) e cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). La gas-cromatografia può essere associata ad uno spettrometro di massa (GC/MS) che rende il metodo estremamente affidabile. Questi esami costituiscono il livello di conferma più alto che si possa ottenere, a valenza medico-legale. Il risultato che si ottiene è di tipo quantitativo, poiché indica la quantità di metaboliti di una certa sostanza presenti nel campione biologico in esame.
Nel presente capitolo vengono illustrate le tipologie di test rapidi di primo livello utilizzate durante le procedure degli accertamenti tossicologici condotti dall'Unità di Diagnosi Clinica-Tossicologica.

Test di screening

Negli anni, i controlli su strada per l'identificazione di soggetti che hanno usato sostanze stupefacenti e si sono poi messi alla guida hanno incontrato delle obiettive difficoltà analitiche e procedurali, legate all'ottenimento e alla gestione del campione biologico di sangue, che si caratterizzano per l'alta invasività. Di qui la necessità di rendere il controllo più praticabile, utilizzando procedure meno invasive rispetto alla pratica richiesta per il prelievo del sangue.
I test di screening rappresentano degli strumenti non invasivi che permettono una raccolta dei campioni biologici di saliva e urina in un tempo relativamente breve,

in maniera economica, efficace e standardizzata. Essi permettono di escludere i campioni che risultano negativi, ossia quei campioni che non contengono sostanze stupefacenti o loro metaboliti, oppure quelli in cui la concentrazione di tali sostanze o metaboliti è al di sotto di un valore soglia detto cut-off. Il cut-off è un valore di riferimento, espresso in concentrazione (ng/ml), al di sopra del quale il risultato di un test analitico è giudicato positivo e al di sotto del quale è giudicato negativo (Borriello 2002, DHHS 2004, DHHS 2007).

Tabella 1: Livelli di cut-off per sostanza o classi di sostanze nella matrice urinaria e nel fluido orale secondo le linee guida.

Sostanze d’abuso	Cut-off (ng/ml) matrice urinaria	Cut-off (ng/ml) fluido orale
OPPIOIDI (metaboliti)	300	40
COCAINA (metaboliti)	300	20
CANNABINOIDI (metaboliti)	50	4
AMFETAMINE	1000	50

Le metodiche utilizzate per i test di screening sono generalmente di natura immunochimica. Le principali sono: EIA (Enzime Immunoassay, immunoenzimatica), FIA (Fluorescence Immunoassay, in fluorescenza), LIA (Luminescence immunoassay, in luminescenza), KIMS (Kinetic Interaction Microparticles in Solution, interazione cinetica di microparticelle in soluzione). Per ognuna di queste tecniche, esistono in commercio diversi kit che possono differire per la scelta dell’anticorpo utilizzato per la ricerca della sostanza nel campione biologico, per la metodologia di esecuzione del test, per sensibilità e specificità.
In molti Paesi, soprattutto negli Stati Uniti, sono stati introdotti i “ *test on-site* “ o test rapidi. Si tratta di test fondati su principi di interazione immunochimica utilizzati per la determinazione di una o più sostanze d’abuso (o loro metaboliti) senza l’utilizzo di strumentazioni particolari ed “in tempo reale” (Ferrara 2006). Sfruttando un principio immunocromatografico, permettono di effettuare un’analisi di tipo qualitativo su matrici quali urina, saliva e sudore. Essi forniscono dati analitici qualitativi preliminari e necessitano, quindi, di ulteriori analisi di conferma in caso di positività.
Per lo studio sono stati utilizzati due diversi dispositivi rapidi per la determinazione di diverse classi di sostanze d’abuso nella matrice urinaria e in quella salivare.

Test rapido di screening su urina

Il Syva RapidTest d.a.u. 4 è un test immunocromatografico per la determinazione qualitativa delle classi di droghe relative a cannabinoidi, oppiacei, cocaina e metamfetamina nell’urina umana. Il dispositivo utilizza una tecnologia di immunodosaggio rapido a fase solida, individuando la presenza di sostanze stupefacenti e i rispettivi metaboliti in riferimento a specifiche concentrazioni soglia (cut-off).
Il dispositivo è composto di una striscia di membrana con bande sensibili alle droghe, un pozzetto nel quale viene dispensata l’urina, una banda di controllo che conferma se la procedura di analisi è stata eseguita correttamente. La procedura di analisi impiega dai 5 ai 10 minuti.

La lettura del test implica la visualizzazione di una riga di controllo di colore rosso-violaceo e di una riga in corrispondenza del nome della droga se il *risultato è negativo*; ciò significa che non è stata individuata alcuna concentrazione di droga superiore al livello soglia. La visualizzazione solo di una riga di controllo di colore rosso-violaceo e di nessuna riga accanto al nome della droga indica, invece, che il *risultato* del test è *positivo* per quella specifica sostanza.

Tabella 2: Concentrazioni soglia (cut-off) applicate nel dispositivo Syva RapidTest.

Classe della sostanza	Sostanza ricercata	CUT-OFF (ng/ml)
THC	11-nor-Δ9-THC-9-COOH	50
OPPIACEI	morfina	300
COCAINA	benzoilecgonina	300
METAMFETAMINE	d-Metamfetamina	1000

Vantaggi

I vantaggi che offre questo precursore:
- richiede una quantità di urina minima (3 gocce);
- buona visualizzazione dei risultati (positività a scomparsa);
- tempi di lettura molto rapidi (3 minuti);
- le linee di lettura permangono immodificate per oltre 30 giorni.

Svantaggi

Lo svantaggio principale riguarda la possibilità di adulterazione del campione di urina, come di seguito illustrato.

Le adulterazioni dei test su matrice urinaria

I tentativi di adulterazione dei drug-test riguardano soprattutto la matrice urinaria, più frequentemente utilizzata nello screening delle droghe d'abuso e di più facile manipolazione (Macchia 2007). Le possibili modificazioni del campione di urina riguardano l'alterazione, la diluizione e la sostituzione.
L'alterazione consiste nell'addizionare al campione di urina alcune sostanze chimiche che possono interferire con le procedure di analisi. Le sostanze normalmente utilizzate sono: acqua di rubinetto, detergenti, soluzioni saline, tintura di iodio, vino, sbiancanti e saponi. Da qualche anno, sono disponibili in commercio (soprattutto in Internet) alcune soluzioni adulteranti a base di nitriti ("Klear, Whizzies"), acidi ("THC-free"), glutaraldeide e ossidanti ("Stealth, Clear Choice, Urine Luck") (Dall'Olio 2004). Questi, una volta inseriti nell'urina, sono in grado di interferire con i test immunologici utilizzati nei laboratori per il test iniziale di screening producendo in tal modo esiti "falsi negativi".
La diluizione è un metodo di adulterazione che avviene in vivo; consiste nel consumare enormi quantità di acqua o ingerire sostanze con proprietà diuretiche prima della raccolta del campione, in modo da diluire le urine e ridurre la concentrazione delle droghe e dei relativi metaboliti eliminati.
Infine, un metodo comune di adulterazione consiste nella sostituzione del campione di urina con l'urina di un'altra persona o con sostanze liquide simili.

Metodi contro l’adulterazione

Il personale di laboratorio deve continuamente operare delle verifiche per escludere una sofisticazione o sostituzione delle urine e valutare, quindi, l’integrità dei campioni. Le “armi” attualmente disponibili per smascherare un’eventuale adulterazione sono:

- osservazione diretta della raccolta del campione urinario;
- misura della temperatura;
- determinazione della creatinina;
- misura del pH;
- aspetto e colore del campione;
- peso specifico;
- determinazione dei nitriti e ossidanti.

Una nuova frontiera nella lotta contro le adulterazioni è rappresentata dall’utilizzo di matrici alternative quali la saliva, infatti, le possibilità di adulterazione del fluido orale sono pressoché nulle.

Test rapido di screening su saliva

Il test rapido su saliva On-Site OraLab è un test diagnostico per uso professionale destinato alla raccolta di campioni di saliva e al rilevamento di cocaina, oppioidi, amfetamine, metamfetamine, fenciclidina e THC.
Con questo dispositivo è possibile identificare l’uso recente (fino ad un massimo di 24 h) delle principali sostanze psicotrope e, in parte, può sostituire il prelievo di sangue vista la forte corrispondenza tra le due matrici. Il dispositivo permette di rilevare le droghe e i rispettivi metaboliti in riferimento ad opportune concentrazioni soglia (cut-off).

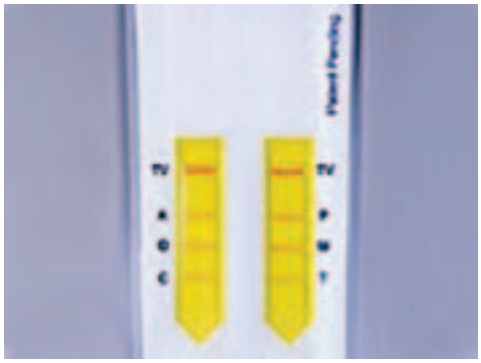
Tabella 3: Concentrazioni soglia (cut-off) applicate nel dispositivo On-Site OraLab.

Classe della sostanza	CUT-OFF (ng/ml)
CANNABINOIDI THC	50
OPPIACEI	40
COCAINA	20
METAMFETAMINE	50
AMFETAMINE	50
FENCICLIDINA	10

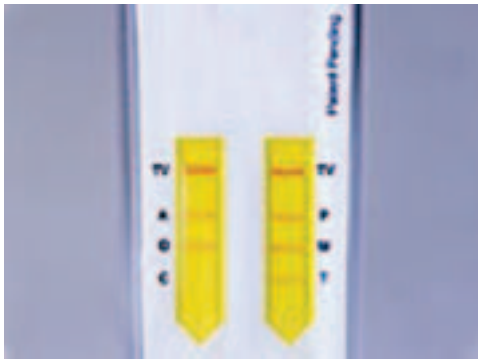
Il dispositivo è composto di una striscia reattiva per la reazione analitica, un contenitore di plastica munito di tappo a vite per la raccolta e la conservazione della matrice salivare e un tampone assorbente per il prelievo della saliva nella cavità orale. La procedura di raccolta del campione prevede che la persona sottoposta ad analisi non fumi e non assuma cibi, bevande o gomme da masticare 10 minuti prima del prelievo. È necessario inoltre far bere un bicchiere d’acqua prima del test, per stimolare la salivazione. Il tampone deve essere tenuto nella cavità orale dai tre ai cinque minuti, pertanto richiede la piena collaborazione da parte del soggetto interessato.

Figura 1: Esempio di visualizzazione di un risultato negativo e di un risultato positivo per la cocaina con il dispositivo On-Site OraLab.

Risultato NEGATIVO



Risultato POSITIVO



La corretta esecuzione del test implica la visualizzazione di una banda di colore rosa/rosso in corrispondenza della scritta TV (Test Valid). Un risultato negativo è indicato dalla presenza di una banda rosa/rossa nella camera di lettura dei risultati del test, in corrispondenza del nome della rispettiva droga. Un risultato positivo è invece indicato dall'assenza della striscia rosa/rosso nella camera di lettura, in corrispondenza della droga in questione.

Vantaggi

I vantaggi che offre questo precursore sono:

- raccolta del campione biologico in 3 minuti;
- metodica di prelievo della matrice salivare maneggevole e sicura;
- determinazione di ben 6 classi di droghe con un unico dispositivo;
- test non invasivo che permette di identificare l'uso recente di droghe, assunte nelle 12-24 ore precedenti il test;
- le possibilità di adulterazione sono pressoché nulle;
- facile modalità di lettura (positività a scomparsa);
- possibilità di conservazione del campione in frigorifero per ulteriori analisi per 3/5 giorni;
- le linee di lettura permangono immodificate per oltre 30 giorni;
- tempo di lettura di 5-10 minuti.

Svantaggi

I punti deboli relativi all'utilizzo di questo dispositivo sono di carattere tecnico, una linea di lettura relativa al THC debole, e riguardano le modalità di somministrazione. Infatti, nei casi di scarsa salivazione da parte del soggetto occorre un tempo più lungo (circa 5 minuti) per la raccolta del campione.

Test diagnostici sull'assunzione di alcol

Etilometro

La misura dell'alcol nell'area alveolare è alla base del test dell'etilometro che, in base al regolamento applicativo del Codice della Strada, è l'unico mezzo legale per la misura dell'alcolemia.
I risultati ottenuti con l'etilometro correlano con quelli gas-cromatografici ottenuti

con l’esame del sangue. Infatti, dopo 15 minuti dall’assunzione l’etanolo dell’area alveolare è in equilibrio con quello ematico. Il principio analitico usato è basato su un rilevatore posto all’interno dello strumento, che può essere elettrochimico, all’infrarosso, a semiconduttore o amperometrico. La misurazione fatta sull’aria espirata fornisce il valore dell’alcolemia.

Alcolemia

L’alcolemia è il test diagnostico che stabilisce se una persona è sobria o meno. Il riferimento temporale rispetto al momento in cui il test viene eseguito è necessario a causa della veloce eliminazione dell’alcol etilico dall’organismo. L’unico metodo analitico utilizzabile è quello Gas-cromatografico con la tecnica dello spazio di testa. Tale tecnica consente di dosare separatamente l’etanolo e qualsiasi altro alcol volatile presenta (metanolo, propanolo). Purtroppo però la scarsa praticabilità ha limitato la diffusione di questa tecnica su larga scala. Nella maggior parte dei laboratori, infatti, l’alcol viene misurato con un metodo enzimatico.

Abuso cronico

Il consumo continuativo di grosse quantità di bevande alcoliche può comportare danni molto seri, anche senza episodi significativi di intossicazione acuta. Gli organi maggiormente colpiti sono fegato e pancreas, senza entrare nel dettaglio dei danni a scapito del sistema nervoso su cui il laboratorio non può dare, ad oggi, informazioni di rilievo.
Il laboratorio mette a disposizione dell’operatore sanitario vari esami utili a prendere decisioni in merito a problemi diagnostici e prognostici, quali individuare con certezza i forti bevitori, controllare se un alcolista in terapia si mantiene astemio, riconoscere le epatopatie di origine alcolica (ALD) dalle altre (NALD), valutare lo stadio della malattia in corso di epatopatia alcolica.
I marcatori più utilizzati sono:

- alcoluria: l’etanolo urinario non rappresenta un buon indicatore per valutare lo stato di ebbrezza a causa della variabilità della concentrazione a parità di assunzione. Tuttavia la maggiore permanenza dell’etanolo nelle urine rispetto al sangue, lo rende utile per monitorare l’astinenza;
- marcatori di recente introduzione: il metanolo (normalmente presente nei liquidi biologici a concentrazioni minori di 0,05 mmoli/L), il 5-idrossi-triptofolo (5 HTOL) urinario (metabolita intermedio della serotonina, di solito eliminata come acido 5-idrossi-indolacetico), la concentrazione ematica degli esteri etilici degli acidi grassi (restando questa elevata anche 24 ore dopo una forte assunzione di etanolo);
- gamma-glutamil-transpeptidasi: un enzima di membrana presente in moltissimi organi (rene, pancreas, ghiandole mammaria, ecc.) che catalizza il trasporto del gruppo g-glutamile da un g-glutamil-peptide ad un altro peptide o ad un amminoacido;
- volume corpuscolare medio: la dieta degli alcolisti cronici, basata soprattutto sull’alcol e carente di alimenti freschi, porta molto spesso ad uno stato di avitaminosi e la mancanza di folati fa aumentare il volume corpuscolare medio;
- transaminasi: questi due enzimi, asparato amimo transferasi (AST) e alanino amino transferasi (ALT), catalizzano il trasporto di un gruppo amminico da un amminoacido ad un chetoacido. L’aumento di questi enzimi è sempre legato alla rottura della membrana cellulare e quindi sono correlabili al danno epatico;
- glutammato-deidrogenasi (GLDH): è localizzata soprattutto nel fegato. Poiché si localizza nei mitocondri, l’aumento di attività serica della GLDH è correlabile ad un danno cellulare oppure ad un processo che la coinvolge;

- acetaldeide e suoi addotti: è il primo prodotto dell'ossidazione dell'etanolo, ma la sua emivita è troppo breve per essere utile come marcatore del consumo di alcol. Tuttavia, l'acetaldeide è capace di formare degli addotti con alcune proteine del sangue, quali emoglobina, albumina, lipoproteine. Questi prodotti sono presenti nei consumatori di alcol, ma non negli astemi;
- disulfiram: farmaco impiegato per combattere l'alcolismo. Il suo dosaggio, se non immediatamente eseguito, richiede metodi di prelievo e stoccaggio particolari che ne impediscono la diffusione;
- transferrina desialata (cdt): marcatore di consumo cronico di recente introduzione i cui livelli serici risultano aumentati in caso di elevato consumo di alcol.