



Le informazioni contenute nel sito possono generare situazioni di pericolo e danni.

I dati presenti hanno un fine illustrativo e in nessun caso esortano né spingono ad atti avversi alla salute psicofisica del lettore.

### **SCHEDA COMPLETA**

- tecnologie e matrici per testare le sostanze d'abuso
- metodi per testare le sostanze in campioni di urine
- le principali sostanze determinabili
- esame tossicologico dell'alcol
- falsi negativi
- falsi positivi
- comuni metodi di adulterazione
- campioni alternativi: capelli, saliva
- riferimenti bibliografici

---

#### **Tecnologie e matrici per testare le sostanze d'abuso**

I fattori che influenzano la scelta di un campione biologico per analizzare una sostanza, comprendono la facilità di raccolta, una serie di considerazioni di carattere analitico e l'interpretazione dei risultati. Attualmente, l'urina è il più comunemente ed ampiamente usato fra i vari metodi.

Sebbene tecnologie alternative che usano altri campioni biologici siano estremamente specifiche, non ci sono sufficienti informazioni per quanto riguarda i falsi positivi e i risultati negativi, includendo anche le interferenze e la cross-reattività.

*I tempi di rilevabilità relativa di queste sostanze nei campioni biologici vanno da poche ore, a giorni, a settimane o addirittura ad anni.*

*In particolare:*

- *capelli e unghie hanno il tempo più lungo (anni);*
- *nel sudore la rilevabilità è nell'ordine di mesi;*
- *nelle urine è di giorni o qualche settimana;*
- *per la saliva ed il sangue si tratta di ore.*

Saliva: i vantaggi di un test salivare includono la facilità di raccolta, la minima invasività sulla persona e ancor più una limitata manipolazione pre-analitica. Comunque, poiché le sostanze ed i loro metaboliti nella saliva sono generalmente proporzionali a quelli del plasma, sono normalmente presi in considerazione soltanto per interventi da compiersi entro periodi di tempo più precoci e per concentrazioni più basse se confrontate con l'urina.

**Capelli:** l'analisi del capello fornisce una misura retrospettiva e a lungo termine dell'uso della sostanza la quale è direttamente da porre in riferimento alla lunghezza stessa del capello. Testare il capello può estendere la finestra di rilevabilità per settimane, mesi o addirittura anni. C'è da dire però che capelli con pigmentazione scura hanno una maggiore capacità di legare la sostanza rispetto ai capelli chiari o grigi, con ciò concludendosi che il colore del capello può avere un'importanza fondamentale nella fattibilità del test. Altri svantaggi dell'analisi del capello sono la crescita irregolare, una preparazione molto laboriosa del campione da sottoporre all'analisi ed il costo eccessivo.

**Sudore:** la raccolta del sudore è una tecnica non invasiva e da una misura cumulativa dell'uso della sostanza a coprire un periodo che va da qualche giorno fino a varie settimane. Gli svantaggi sono la variabilità della produzione del sudore ed il rischio di rimozione accidentale o contaminazione del dispositivo per la raccolta.

**Sangue:** il sangue è in genere non consigliabile per test di routine poiché i campioni di sangue non sono indicati per procedure di rapido screening, hanno anche la capacità di misurare concentrazioni basse di sostanza che compensa un po' la loro limitata finestra di rilevabilità. Comunque richiedono metodi invasivi per la raccolta del campione.

### **Metodi per testare le sostanze in campioni di urine**

Ci sono fondamentalmente due tipi di test nelle urine. Questi approcci se usati in combinazione appropriata, possono ridurre i costi, assicurare l'accuratezza ed aumentare l'efficacia. Sebbene il numero di tecnologie disponibili sia ampio, variando da dispositivi per uso singolo fino a piattaforme da laboratorio totalmente automatizzate, i due principali tipi di metodologia sono:

1. testare le sostanze mediante saggio immunologico, sia basato su metodologie da laboratorio sia basato su metodologie più semplificate quali quelle che si fondono su uno "stick";
2. l'identificazione della sostanza specifica fondata su tecniche analitiche di laboratorio, ed in questo caso l'approccio specifico si fonda su due metodologie particolarmente sofisticate quali la gas-cromatografia accoppiata ad uno spettrometro di massa (GC/MS) oppure la cosiddetta cromatografia liquida ad alta performance (HPLC).

Il metodo scelto per individuare una particolare sostanza, dipenderà dalle motivazioni che hanno fatto sì che il test sia stato richiesto. I test basati sul saggio immunologico sono la metodologia più comune.

Tali test sono specificamente designati per classificare sostanze sia che siano presenti o assenti in base ad una soglia predeterminata di cut-off.

In alcuni casi, è assolutamente necessaria una specifica identificazione della sostanza usando tecniche molto più sofisticate quali la GC/MS. Tali tecniche combinate consentono di identificare in modo accurato una specifica sostanza e i suoi metaboliti.

### **Immunoassay**

Il saggio immunologico, che è fondato sul principio del binding competitivo, utilizza anticorpi per scoprire la presenza di una particolare sostanza o metabolita in un campione di urina. Una determinata quantità di anticorpo è la sostanza o il metabolita che è stato marcato con un enzima, vengono aggiunti al campione di urina. La sostanza o il metabolita nel campione competiranno con la sostanza marcata o il metabolita di essa per legare l'anticorpo e quindi formare il complesso antigene-anticorpo. La quantità di enzima-marcato antigene che lega con l'anticorpo è inversamente proporzionale alla quantità di sostanza presente nel campione.

### **GC/MS**

La gascromatografia combinata con uno spettrometro di massa che funge da detector estremamente sofisticato, consente il riconoscimento univoco di qualunque sostanza d'abuso anche presente in tracce minime. Questa tecnica non può essere assolutamente contestata poiché lo spettro di massa risultante alla fine di tale procedimento è come una impronta digitale, ossia assolutamente unico. Naturalmente tale tipo di indagine viene solitamente riservata a quei casi, normalmente forensi in cui si deve con assoluta certezza individuare precise responsabilità conseguenti all'assunzione di sostanze stupefacenti.

### Le principali sostanze determinabili

Le principali sostanze d'abuso che vengono normalmente o più frequentemente analizzate sono:

- la cocaina
- le amfetamine e la metamfetamina
- l'MDMA (ecstasy)
- i vari tipi di oppiacei (eroina, metadone)
- i cannabinoidi (marijuana)
- la ketamina
- il GHB
- le benzodiazepine.

Queste sono le sostanze che ruotinariamente e con metodiche semplificate, molto spesso semplicemente qualitative e non quantitative, vengono più comunemente impiegate per stabilire la loro presenza o assenza. Naturalmente però è possibile individuare sostanze in modo più specifico e semiquantitativo o quantitativo con l'impiego di altre metodiche già descritte.

Questo avviene per esempio qualora volessimo riconoscere in un campione di urine la presenza di codeina, morfina, idrocodone, idrormorfone, oxicodone, fentanyl e buprenorfina.

E' importante sottolineare quali sono i tempi di riscontrabilità nelle urine di alcune di queste sostanze considerando, in ogni caso, che tali **tempi sono approssimativi** (in forma di stima) e dipendenti da numerosi fattori quali:

- la via di somministrazione (di assunzione);
- purezza della sostanze;
- la frequenza d'uso;
- variabilità individuali che influenzano la frazione assorbita, la frazione metabolizzata, la distribuzione nell'organismo, la frazione eliminata;
- la quantità assunta (maggiore è la dose più lungo è il periodo di rilevabilità nelle urine);
- consumo di liquidi
- la sensibilità e i limiti del metodo utilizzato.

Quindi può accadere che, in alcuni casi, quanto riportato nella tabella sottostante possa essere contraddetto.

Tabella 1: **Tempi approssimativi di rilevabilità nelle urine delle più comuni sostanze psicoattive**

Amfetamine (metaboliti delle metamfetamine)	2-3 giorni
Metamfetamine (singolo uso)	1-3 giorni
Metamfetamine (uso ripetuto)	3-5 giorni
MDMA (ecstasy)	2-4 giorni
Eroina	minuti
Morfina (metabolita dell'eroina)	2 giorni
Metadone	7-9 giorni (in regime di mantenimento)
Cocaina (immodificata)	poche ore
Benzoilecgonina (metabolita della cocaina)	da 2 a 3 giorni e per dosi elevate fino ad una settimana
Cannabinoidi (singolo uso)	da 2 a 4 giorni
Cannabinoidi (uso moderato es. 4 volte la settimana)	4 giorni
Cannabinoidi (uso "pesante" e cronico)	3 settimane o anche più

Ketamina	2-4 giorni
PCP	8 giorni approssimativamente
GHB	12 ore
Benzodiazepine (ansiolitici)	da 12 ore a 7 giorni (dipende dalla semivita dell'ansiolitico)

### Esame tossicologico dell'alcol

L'alcol si ricerca normalmente nell'area alveolare (test al palloncino) o nel sangue e permane nell'organismo per poche ore.

L'alcol viene:

- per oltre il 90% ossidato dal fegato;
- il 5-10%, viene escreto invariato nell'aria espirata, nelle urine e nella saliva.

Il rapporto tra la concentrazione di etanolo nel sangue e aria alveolare, dopo 15 minuti, è **costante** e ad es., 80mg/100 ml di etanolo nel sangue producono 35 ng/100 ml di etanolo nell'aria espirata (alla fine di una profonda espirazione).

Questo spiega *l'attendibilità della correlazione tra alcol presente nel sangue e alcol rilevato nell'espriato*, la validità dell'etilometro e in ultima analisi la validità della misura dello stato di ebbrezza di una persona con il "test al palloncino".

Nei controlli stradali è necessario procedere a 2 misurazioni a distanza di almeno 5 minuti per evitare che la presenza di alcol nel cavo orale non influisca sul risultato di una sola misura, mentre deve essere concorde per entrambe.

Le urine, al contrario, raggiungono la massima concentrazione di alcol in tempi diversi da quelli ematici, circa 2 ore dopo.

L'alcol così presente nelle urine, *l'alcoluria*, è modificato dalla diuresi e da altri liquidi che fortemente incidono nel valore della sua concentrazione e quindi *fornisce un valore meno accurato della eventuale concentrazione ematica*.

La maggior parte dei farmaci, come altre sostanze esogene, vengono eliminati dall'organismo ad una velocità che dipende dalla quantità presente di questi. Per l'alcol ciò avviene solo a concentrazioni molto basse e clinicamente non significative, cioè pari a 0,2 grammi/litro.

Quando al contrario la concentrazione di etanolo è più elevata, il processo di ossidazione epatica **si satura** e allora la velocità di eliminazione diviene costante e indipendente dalla concentrazione.

Un adulto può metabolizzare **7-10 g di alcol in 1 ora** e ciò equivale, circa:

- a **meno** di una bevuta di una lattina di 330 ml di birra
- a **meno** di un bicchiere di 125 ml di vino di 12°
- a **meno** di un distillato alcolico di circa 40ml.

Si ricorda che:

1 bicchiere di vino, 125 ml, di 12 ° (o al 12% di alcol), contiene 12 grammi di alcol.

### **Falsi negativi**

Nell'interpretazione dei risultati sono possibili talune combinazioni di positività o negatività al test in relazione al fatto che il soggetto abbia o no assunto sostanze d'abuso.

Un risultato positivo o negativo è inoltre fortemente dipendente dalla sensibilità del metodo di rilevabilità della sostanza.

Un falso negativo avviene quando:

- la sostanza è presente ma non è trovata poiché il limite di rilevabilità del metodo è troppo "alto"
- la quantità assoluta della sostanza nel campione è troppo bassa.

Grosse quantità di liquidi consumate prima di ottenere un campione per l'analisi possono influenzare la rilevabilità della sostanza nei campioni di urine. In condizioni di diluizione, sebbene la quantità assoluta di sostanza o metabolita escreti può essere uguale in un periodo di tempo, la concentrazione finale per ml ne risulterà ridotta e può dar luogo a falsi negativi.

I livelli di acidità nell'urina possono anche influenzare l'escrezione della sostanza nelle urine.

In alcuni casi, l'eliminazione è aumentata; in altri la sostanza viene riassorbita ed è meno presente nelle urine.

Alcune misure possono essere prese per diminuire il numero di falsi negativi. In primo luogo, la sensibilità del metodo può essere aumentata analizzando i metaboliti della sostanza in questione o anche aumentando il volume del campione utilizzato per l'analisi o trattandolo con opportune sostanze chimiche. In questo modo l'efficacia analitica può giungere al che la stessa dose può essere rivelata persino a distanza di 20 giorni.

### **Falsi positivi**

Un falso positivo avviene se i risultati mostrano che la sostanza è presente quando in realtà non lo è.

Test falsamente positivi vengono ottenuti se una sostanza interferente è presente nel liquido biologico ed ha una cross-reattività con i reattivi. Un accertamento positivo confermato implica soltanto che il campione di urina contiene la sostanza individuata e nulla di più.

Qualche volta falsi positivi sono attribuibili a sostanze ingerite come avviene nel trattamento farmacologico dell'asma o delle allergie. Alcune sostanze naturali come i tè alle erbe possono dare risposte positive; possono essere analiticamente veri positivi, ma hanno bisogno di essere distinti da quelli dovuti ad uso illegale di sostanze.

Per esempio, per quanto riguarda gli oppiacei, la presenza di morfina in quei soggetti ai quali non è stata prescritta, viene spesso considerata come indicativa dell'uso di eroina. Comunque un test positivo alla morfina può anche essere al contrario il risultato di codeina presente in certi alimenti. In altri casi un soggetto può risultare positivo a causa di farmaci prescritti da un medico, per esempio la codeina che viene metabolizzata a morfina.

Per quanto riguarda la cocaina, che non ha similarità strutturali con altri anestetici topici che finiscono in "caina" (per esempio procaina, lidocaina), comporta il fatto che un risultato positivo ai metaboliti di questa, in assenza di una chiara spiegazione medica, deve essere interpretato come un suo uso deliberato.

L'interpretazione clinica di positività all'amfetamina è una grossa sfida a causa della somiglianza strutturale di molti farmaci normalmente prescritti compresi dimagranti o anoressizzanti, decongestionanti e addirittura in taluni farmaci impiegati comunemente nella terapia del morbo di Parkinson quali la selegilina.

In qualche caso addirittura, i falsi positivi sono stati il risultato di errori o sabotaggio nella catena di custodia dei campioni urinari.

### **Comuni metodi di adulterazione**

Sostituire campioni urinari “puliti” o comunque senza sostanze al posto di urine contenenti le sostanze, è il metodo più comune per ingannare il sistema di rilevamento della sostanza.

E’ possibile attraverso internet acquistare campioni di urine “pulite” liofilizzate oppure “semplicemente” nascondere urine “pulite” in profilattici o all’interno della vagina.

Alcuni tentano di sostituire il succo di mela o thè al posto del campione urinario, altri nascondono sotto le unghie sostanze mascheranti poi immesse nel campione urinario. Altre volte vengono aggiunti ai campioni di urine vari prodotti per la casa ad esempio del sapone liquido o anche sale da cucina, aceto, succo di limone, gocce per gli occhi o quanto altro di fantasioso nella speranza di mascherare l’uso di droghe.

Il sapone liquido e prodotti fortemente alcalini contenenti idrossido di sodio possono essere scoperti controllando i livelli elevati di pH delle urine.

Poiché l’aggiunta di sale da cucina ai campioni di urina è una pratica comune, i laboratori fanno routinariamente test per individuare sodio e cloro.

In *vivo* l’alcalinizzazione o l’acidificazione del pH urinario può anche cambiare l’escrezione di alcune sostanze comprese le amfetamine, i barbiturici, il PCP e il metadone.

Il carico idrico (il bere grosse quantità di acqua prima del controllo) pone una sfida interessante ai laboratori. E’ stato impiegato un misuratore di peso specifico per scoprire le diluizioni; comunque, il range di misurazione è limitato. I livelli di creatinina nei campioni urinari sono stati studiati quali possibili metodi di rivelazione del carico idrico, ma senza molto successo.

A titolo di esempio si riporta una breve comunicazione (da parte di un gruppo fiorentino del servizio per le tossicodipendenze) nel quale si dimostra come per ridurre i falsi negativi urinari, a causa di eccessiva diluizione, è sufficiente concentrare mediante evaporazione i campioni urinari fino a che la quantità di creatinina si approssimava ai valori normali; in tal modo, i valori negativi presenti in un numero elevato di soggetti, e come tali considerati senza l’accorgimento della concentrazione delle urine, divenivano positivi.

Per ridurre l’opportunità da parte di alcuni soggetti della contaminazione, in molti laboratori si fa in modo che del personale venga impiegato nella supervisione diretta della raccolta del campione urinario; attualmente, è più frequente l’impiego di telecamere, della cui presenza è avvertito il paziente.

Un altro modo per scoprire adulterazione dei campioni è prendere la temperatura del campione.

Quando la temperatura del campione viene presa entro un minuto il range cade fra 36.5 gradi e 34 gradi.

E’ difficile raggiungere questo stretto range di temperature nascondendo un profilattico riempito con l’urina o aggiungendo acqua nel campione urinario.

La temperatura del campione deve essere misurata immediatamente giacché essa si riduce subito.

### **Il futuro**

Le prospettive future auspicabili verso le quali l’ambiente del laboratorio si muove, sono focalizzate all’incremento della miniaturizzazione della strumentazione per i test. Questo porterà alla possibilità di testare un maggior numero di sostanze evitando che i campioni debbano essere spediti a laboratori specialistici. Le nanotecnologie potrebbero portare a detectors di dimensioni estremamente piccole per la rivelazione di centinaia di sostanze.

---

L’uso di questi test nelle urine deve essere consensuale e finalizzato ad assistere il professionista sanitario nel conseguimento del suo obiettivo strategico e umano ovvero la migliore condotta terapeutica nell’interesse precipuo del paziente.

E. Gallardo e J.A. Queiroz, *The role of alternative specimens in toxicological analysis*, Biomedical Chromatography, 2008, 22, 795-821.

## Campioni alternativi o non convenzionali

### Capelli

#### Natura dei capelli

I capelli sono costituiti da:

- proteine, principalmente cheratina (65-95%),
- acqua (15-35%),
- lipidi (1-9%)
- minerali (0,25-0,95%) ( Harkley e Henderson, 1989).

Un ricco sistema capillare, che provvede alla crescita dei capelli con il necessario materiale metabolico, circonda il follicolo dei capelli (Pragst e Balikova, 2006).

Si stima che il numero totale dei follicoli piliferi negli adulti è di circa 5 milioni.

I capelli crescono ad un tasso di 0,6-1,4 cm per mese, a seconda del tipo di capelli e del “sito” anatomico (Saitoh et al., 1969).

Il ciclo di crescita dei capelli è suddiviso in 3 fasi:

- anagen (di crescita attiva),
- catagen (di transizione),
- telogen (di riposo).

Le proporzioni di capelli in anagen/telogen variano con la regione anatomica e questa caratteristica, insieme con un variabile tasso di crescita, rappresenta la ragione delle **differenze osservate nelle concentrazioni del farmaco nei capelli o nei peli raccolti da diverse altre regioni**.

In realtà, in caso non siano disponibili i capelli della testa (del cranio), per il rilievo di droghe possono essere utilizzati anche peli pubici, delle braccia o delle gambe o anche i peli ascellari.

Tuttavia, quando si interpretano le concentrazioni dei farmaci in questi campioni, si deve prestare molta attenzione dal momento che diversi studi hanno trovato differenze tra i peli pubici o ascellari e i capelli del capo (Balabanova e Wolf, 1989; Offidani et al., 1993; Han et al., 2005) spiegabili non solo dal diverso rapporto anagen /telogen o dal differente tasso di crescita ma anche da una migliore circolazione del sangue e da un maggior numero di ghiandole apocrine (Pragst et al., 1998; Mangin e Kintz, 1993).

Anche i peli della barba sono un campione adatto per l'analisi. Questo tipo di peli crescono di circa 0,27 millimetri al giorno, e pertanto possono essere raccolti su base giornaliera con un rasoio elettrico.

#### Meccanismi di incorporazione delle sostanze nel fusto del capello

L'analisi dei capelli è utile solo se le sostanze e metaboliti misurati siano il risultato di una assunzione (orale, endovena o altro)– ovvero abbiano una provenienza “endogena”, interna all’organismo - piuttosto che la loro provenienza sia da altre fonti.

E' generalmente accettato che i farmaci possono **entrare nei capelli** da 3 fonti:

1. dal flusso sanguigno durante la crescita dei capelli,
2. dal sudore e dal sebo che bagnano i capelli (di solito dopo la fuoriuscita dei capelli dalla pelle),
3. dall'esposizione passiva dei capelli al farmaco (ad esempio dal fumo o da mani sporche, dopo la dissoluzione della sostanza in questione nel sudore libero da sostanze (drug-free).



E' praticamente impossibile distinguere, quale sia l'origine della presenza della droga, tra questi ultimi due meccanismi e il primo che testimonia il consumo effettivo; ciò si spiega dal fatto che i farmaci sono in un ambiente acquoso che aumenta la loro "cattura" ed incorporazione.

Questo è anche il motivo per cui l'esposizione ambientale è talvolta definita come il blocco che inciampa il test dei capelli (Kidwell e Blank, 1996).

L'incorporazione delle droghe è influenzata dal contenuto di melanina dei capelli, dalla lipofilia delle sostanze e dalla loro maggiore o minore basicità.

Per esempio, l'effetto del contenuto di melanina nei capelli sull'incorporazione delle droghe, è stato studiato in individui con capelli grigi, ove si osserva che la concentrazione di farmaci *basici* nei capelli pigmentati può essere di circa 10 volte superiore a quello dei capelli non pigmentati (Pragst e Balikova, 2006).

I farmaci si legano quindi alla melanina per cui le concentrazioni più elevate sono normalmente presenti nei capelli più scuri (Rollins et al., 2003; Mieczkowski e Kruger, 2007).

## Raccolta

I campioni di **capelli sono raccolti** nel modo migliore dalla porzione nucale alta della testa, nel cosiddetto vertice posteriore.

In effetti, questa è il regione in cui i capelli crescono con più omogeneità ed è anche dove il rapporto anagen/telogen è più elevato, ovvero maggiore è il numero di capelli in crescita attiva.

Le droghe sono generalmente stabili **in capelli trattati normalmente** (che non abbiano avuto l'azione di cosmetici aggressivi come ossidanti per tinture, decolorazioni o permanenti) tanto che le sostanze possono essere rilevabili nei capelli per almeno 1 anno dopo l'assunzione *se non tagliati ovviamente* (Pragst e Balikova, 2006).

I capelli sono anche esposti a diversi agenti che possono mettere in pericolo l'analisi, come shampoo (soprattutto se molto aggressivi), polvere, luce solare e pioggia.

In realtà, ci sono diversi studi sugli effetti dei **trattamenti cosmetici** sulla stabilità della droga nei capelli; per esempio, Martins et al. (2007) hanno trovato che, in capelli decolorati, le concentrazioni di stimolanti di tipo amfetaminico diminuiscono rispetto ai capelli non decolorati, così come si riduce, ugualmente, la concentrazione di altri farmaci (Pötsch e Skoop, 1996; Yegles et al., 2000).

Anche altri interventi cosmetici possono produrre interferenze analitiche che ostacolano il rilevamento di droghe, come è il caso del minoxidil (farmaco usato contro la caduta dei capelli) i cui derivati impediscono il rilievo di cocaina e metaboliti (Zucchela et al., 2007).

Inoltre la raccolta:

- è quasi del tutto non-invasiva e facile da eseguire;
- può essere ottenuta sotto stretta vigilanza impedendo l'adulterazione del campione (diluendolo con acqua ad es. come può avvenire nell'esame delle urine) o la sua sostituzione;
- nel caso in cui vi siano dei dubbi (scambio del campione, problemi nella catena di custodia, ecc), è possibile ottenere un campione identico dal soggetto. Ovviamente, ciò è di grande importanza nel campo della tossicologia forense;
- infine, nonostante i problemi analitici che le tecniche utili per questo tipo di analisi possono presentare, queste ultime sono provviste di elevata sensibilità che è cruciale se si tiene conto della scarsa quantità di campione di solito disponibile in queste situazioni. Attuali progressi consentono l'individuazione di farmaci e loro metaboliti a concentrazioni molto basse, impensabili sino pochi anni fa.



## Vantaggi

Il **principale vantaggio** del test dei capelli - oltre a quelli prima riportati nella procedura della raccolta - è quello di offrire una **maggiore finestra di rilevazione temporale**, da settimane a mesi, a seconda della lunghezza del fusto del capello, contro i 2- 4 giorni per la maggior parte delle sostanze analizzate nelle urine o nel sangue.

Tuttavia, non è consigliabile contare solo sull'analisi dei capelli, dato che ci sono questioni per le quali essa non può fornire risultati adeguati, come ad esempio le informazioni a breve termine sul consumo di droga di un individuo, per le quali il sangue e /o le urine sono campioni migliori. D'altra parte, è vero che storie a lungo termine temporale sono accessibili solo attraverso l'analisi dei capelli. Pertanto, si può dire che questi tests si completano a vicenda.

La valutazione dell'esposizione cronica alla droga si è ottiene mediante **l'analisi segmentale** dei capelli. In effetti, i capelli crescono a circa 1 cm al mese ed è possibile associare la distribuzione della droga nei segmenti analizzati con un periodo di tempo passato, tenendo conto sia della variabilità dei tassi di crescita dei capelli e sia delle differenze intra e interindividuali. I farmaci sono molto stabili all'interno della matrice per capelli lunghi periodi di tempo purchè i campioni siano conservati alla luce e protetti dall'umidità.

I capelli dovrebbero essere **tagliati il più vicino possibile al cuoio capelluto** con l'aiuto di forbici, e, se deve essere eseguita l'analisi segmentale, la zona prossimale (cioè la zona che è più vicino alla radice) deve essere chiaramente indicata (per differenziare l'apice, zona più "vecchia", dalla radice, zona più recente).

Il campione deve quindi essere conservato a temperatura ambiente e protetto dall'umidità temperatura e dalla luce, per esempio, può essere avvolto in una carta stagnola.

## Svantaggi

L'analisi dei capelli ha diversi inconvenienti che a volte sono molto difficili da gestire.

Il problema principale in questo tipo di analisi è la possibilità di dichiarare falsi positivi a causa della **contaminazione ambientale** dei capelli che può verificarsi a qualsiasi livello.

**Il fatto che un farmaco venga rilevato in un campione di capelli non significa necessariamente che sia stato attivamente consumato.**

Pertanto, i campioni dei capelli, prima dell'analisi devono essere decontaminati (puliti) e successivamente devono essere ricercati specifici metaboliti delle droghe.

Questo ultimo può essere un problema, perché normalmente i metaboliti sono farmaci più polari e hanno meno affinità per i costituenti della matrice dei capelli; è il caso, ad esempio, per THC-COOH, il metabolita del THC (componente principale della cannabis), che si trova nei capelli a concentrazioni estremamente basse, di solito nei valori inferiori del range dei psicogrammi; per rilevare così basse concentrazioni, le tecniche di spettrometria di massa sono obbligatorie, utilizzando sia la gas-cromatografia o la cromatografia liquida.

Una delle insidie più importanti nell'analisi dei capelli, come prima detto, è la **contaminazione ambientale**; se non vengono prese misure adeguate, aumenta il **rischio di segnalare falsi risultati positivi**, il che è inaccettabile, soprattutto se ci sono implicazioni legali per il consumo del farmaco.

Pertanto, per ridurre questo effetto si raccomanda vivamente che le procedure di analisi del capello comprendano una fase di lavaggio (o di decontaminazione) anche se si pensa che la totale eliminazione della eventuale deposizione di farmaco (per contaminazione ambientale) non si raggiunge, anche dopo laboriose procedure di lavaggio.

D'altra parte, la decontaminazione dei capelli prima dell'analisi non è l'unico modo per trattare con l'esposizione ambientale.

La *Society of Hair Testing* raccomanda infatti l'individuazione dei metaboliti dei farmaci in analisi e l'uso del rapporto metabolita/farmaco parente per segnalare i risultati positivi (Società Test di Hair, 2004). In realtà, giacchè l'inquinamento ambientale non può essere completamente rimosso, anche utilizzando laboriose tecniche di lavaggio, **solo la rilevazione dei metaboliti della sostanza** garantisce che il farmaco che viene misurato è stato attivamente consumato.

In sostanza si deve **procedere dal metabolismo endogeno** e ciò è di evidente importanza nel caso di farmaci che a causa del modo in cui vengono consumati potrebbero essere nell'ambiente, come la cannabis (per la quale è il THC-COOH che dovrebbe essere rilevato) o come la cocaina, della quale dovrebbe essere rilevato almeno un metabolita, con un rapporto di concentrazione rispetto alla sostanza di origine superiore a 0,05). Giacchè il capello è una matrice piuttosto 'sporca', i suoi stessi elementi costitutivi possono interferire con l'analisi cromatografica e quindi un passaggio di pulitura del campione è normalmente richiesto.

Nello sviluppo di nuovi metodi di rilevazione di droghe nei capelli, si dovrebbe prestare particolare attenzione all'effetto matrice, soprattutto quando si utilizzano metodi di cromatografia liquida, perché questi sono molto sensibili agli effetti di soppressione/ potenziamento ionico.

### **Applicazioni**

Dal primo rapporto nel 1970, l'analisi dei capelli ha aiutato i tossicologi in diversi campi, come:

- nella storia e nell'archeologia (Nakahara et al., 1997; Báez et al., 2000)
- nella valutazione dei profili di consumo di droghe ed alcol nella popolazione generale (Jurado et al., 1996; Hartwig et al., 2003; Tsanaclis e Stoppini, 2007b) o studentesca (Kidwell et al., 1997; Quintela et al., 2000.)
- nei rinnovi della patente di guida (Ricozza et al., 2000)
- nella valutazione dell'esposizione intrauterina di droghe (Chiarotti et al., 1996; Ursitti et al., 1997; Koren et al., 2002; Garcia-Bournissen et al., 2007),
- nella valutazione di conformità alla terapia farmacologica sostitutiva (Moeller et al., 1993; Kintz et al., 1998; Lucas et al., 2000; Sabzevari et al., 2004),
- nei luoghi di lavoro e nel pre-impiego (Cairns et al., 2004),
- nella tossicologia post-mortem (Kintz, 2004).

Un'altra importante applicazione dell'analisi dei capelli è nel caso di crimini dovuti a farmaci o droghe, in cui gli analiti devono essere individuati dopo una singola esposizione, e ciò è stato realizzato grazie alla sensibilità elevata delle odierne tecniche analitiche.

(Negrusz e Gaensslen, 2003; Kintz, 2007).

## Sostanze rilevabili

Diverse classi di farmaci possono essere individuati nel capello, marker biologico dell'eventuale consumo di:

- alcol
- cocaina e metaboliti,
- oppiacei
- cannabinoidi
- amfetamine e altre designer drugs
- GHB
- benzodiazepine e ipnotici, antipsicotici, antidepressivi, anestetici,
- steroidi
- antiparkinsoniani
- alcaloidi.

L'analisi dei capelli di solito inizia con uno screening generale attraverso test immunologici, seguita poi da una conferma tramite tecniche cromatografiche.

La gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa è di gran lunga lo strumento più diffuso per la determinazione della droga nei campioni di capelli. Tuttavia, la cromatografia liquida-spettrometria di massa sono metodi sempre più importanti in questo campo, per via della loro sensibilità migliore per composti termolabili perché si ottengono limiti di rilevabilità e di quantificazione più bassi, e per il fatto, che, in termini di tempo, la procedura di derivatizzazione non è necessaria alla realizzazione delle analisi.

Prima dell'analisi cromatografica, gli analiti devono essere:

- estratti dall'interno della matrice (dove sono legati ai componenti dei capelli),
- concentrati in un solvente compatibile con gli strumenti analitici.

Non vi è alcun metodo universale per estrarre gli analiti dalla matrice dei capelli, e dipende dalla natura chimica e dalla stabilità del particolare composto da analizzare.

## Saliva

La saliva è il prodotto che origina dalla escrezione:

- da tre coppie di ghiandole salivari maggiori (parotide, sottomandibolare e sublinguale),
- da un gran numero di ghiandole salivari minori,
- dalla mucosa orale e dalle fessure gengivali.

*Poiché questo prodotto è in realtà una miscela fluida, 'fluido orale' è il termine che sembrerebbe più appropriato, invece di 'saliva' o 'saliva per intero' (Malamud, 1993).*

L'acqua (99%) è il principale costituente della saliva, e sono presenti anche altri componenti come le proteine (muco ed enzimi digestivi) e i sali minerali.

Il suo pH è 6,8 in condizioni di riposo ma un aumento del flusso salivare lo trasforma in un fluido più basico (avvicinandosi al pH del plasma) come risultato di una maggiore osmolarità (Kintz e Samyn, 2000).

Tutte queste caratteristiche sono influenzate da una varietà di fattori, come il ritmo circadiano, il tipo di stimolo alla salivazione, cambiamenti ormonali, stress e farmaci. (Aps e Martens, 2005).

Il volume totale di saliva prodotto da un adulto può essere:

- di 1000 ml / al giorno,
- con tipici flussi di 0,05 ml / min durante il sonno,
- di 0,5 ml al minuto mentre si sputa
- di 1-3 ml al minuto o più durante la masticazione (Crouch, 2005).

### **Meccanismi di trasporto**

Diversi sono i meccanismi di trasporto delle sostanze che si pensa si verificano, come:

- la diffusione passiva attraverso la membrana,
- processi attivi contro un gradiente di concentrazione,
- filtrazione attraverso i pori della membrana,
- la pinocitosi (Spihler, 2004).

La maggior parte dei farmaci entrano nel fluido orale attraverso un meccanismo di diffusione passiva, che dipende dalle particolari proprietà fisico-chimiche del composto o della classe di composti, come:

- il peso molecolare (un peso molecolare inferiore a 500 favorisce la diffusione ),
- la liposolubilità,
- il pH e il pKa,
- il legame con le proteine,
- lo stato di ionizzazione (Paxton, 1979; Aps e martens, 2005).

### **Le concentrazioni di droghe nella saliva rappresentano la frazione libera non-ionizzata presente nel plasma.**

La frazione di farmaco legata alla saliva e alle proteine plasmatiche sono in funzione del pH e pKa e può essere prevista mediante l'equazione di Henderson-Hasselbach (Spihler, 2004).

La **raccolta** della saliva (Navazesh, 1993) può avvenire con lo sputo, la filtrazione, l'aspirazione o la raccolta sui vari tipi di tamponi assorbenti.

Molte tecniche possono essere utilizzate per **stimolare la produzione** di saliva.

Il più semplice consiste nei movimenti della lingua, guancia o delle labbra senza alcuno stimolo esterno (Mucklow et al. 1978).

Masticare cera di paraffina, Parafilm, teflon, strisce di gomma e gomme da masticare sono metodi meccanici per stimolare la produzione di saliva. Allo stesso modo, una goccia di succo di limone o di acido citrico possono essere messi in bocca e forniscono uno stimolo gustativo per la produzione di saliva (Crouch et al., 2004).

Tuttavia, la stimolazione della produzione di saliva può presentare diversi problemi che possono compromettere l'accuratezza dell'analisi.

Per esempio, è stato dimostrato che alcuni farmaci e/o i loro metaboliti possono essere assorbiti dal Parafilm così come la stimolazione della saliva con l'acido citrico può determinare cambiamenti di pH e alterare le concentrazioni di droga.

D'altra parte, è stato visto che l'acido citrico e il cotone alterano i risultati delle analisi se queste vengono eseguite con metodi immunologici (Crouch, 2005).

Sono disponibili differenti **dispositivi di raccolta commerciali** che favoriscono una raccolta facile, veloce e riproducibile.

In generale, questi apparecchi sono costituiti da un materiale assorbente che diventa saturo nella bocca del donatore, e dopo la sua rimozione, il fluido orale viene recuperato applicando la pressione o per centrifugazione.

## Vantaggi

Uno dei vantaggi di test della saliva è che il campione viene raccolto sotto la diretta supervisione senza invasione della privacy.

Di conseguenza, i rischi di avere un campione invalido o adulterato del campione e / o sostituito (circostanze che possono verificarsi in analisi urinarie) sono molto ridotti. Inoltre, il monitoraggio della saliva può essere particolarmente vantaggioso quando sono necessari campioni multipli o quando viene richiesta la misurazione di concentrazioni di un farmaco nei bambini (Kim et al., 2002).

In linea generale, si considera che **le concentrazioni di farmaco nella saliva sono correlate alle concentrazioni plasmatiche di farmaco libero e alla sua azione farmacologica** e questo è certamente un vantaggio del campione.

## Svantaggi

1. Le droghe che vengono ingerite per via orale così come quelli “fumate” **potrebbero** essere rilevate nella saliva **in alte concentrazioni** -falsamente- immediatamente dopo un uso recente, perché quantità residue del farmaco rimangono nella cavità orale; in questo caso e per queste sostanze, i risultati potrebbero non essere precisi e le concentrazioni di farmaco rilevate nella saliva potrebbero non riflettere le vere concentrazioni della droga nel sangue.
2. Un altro svantaggio di studiare fluido orale è che a volte le persone non sono in grado di produrre sufficiente quantità di materiale per l'analisi.
3. Se, inoltre, con analisi delle urine vi è l'accuratezza del test (per le sostanze d'abuso) in campioni freschi, sfortunatamente, questa non è l'attuale situazione con l'esame della saliva (Grönholm e Lillsunde, 2001; Kintz et al., 2005a).
4. I dispositivi di raccolta presentano taluni problemi per cui i risultati ottenibili “sul posto” devono essere, attualmente, confermati in laboratorio.
5. Inoltre:
  - la saliva contiene diverse macromolecole (mucopolisaccaridi e mucoproteine), che la rendono meno facilmente “pipettabile” che le urine per esempio;
  - non tutti gli individui, in ogni momento, potrebbero essere disponibili poiché vi sono droghe che possono inibire secrezione di saliva e causare secchezza delle fauci;
  - giacché la concentrazione di droga nella saliva dipende dalle sue concentrazioni plasmatiche, le droghe o i farmaci che hanno un breve emivita plasmatica, sono rapidamente eliminati dal corpo e sono rilevabili nella saliva per un breve periodo; questo è chiaramente un potenziale svantaggio rispetto ai capelli, sudore o alle urine. In effetti, sia la saliva che il sangue hanno un più breve periodo di rilevamento (Spihler, 2004).
  - il volume del campione può presentare un serio problema se devono essere effettuate diverse analisi, se pure con l'uso di GC-MS o LC-MS compresi spettrometria di massa in tandem (MS-MS), possono essere raggiunti bassi limiti analitici anche utilizzando volumi fino a 0,1 ml.

## Applicazioni

Non vi è dubbio che una delle applicazioni più rilevanti del test sulla saliva è nella **valutazione della guida** se questa è stata eventualmente alterata dall'ingestione di droghe, ma anche dalla sua procedura di raccolta semplice e non invasiva.

La buona correlazione tra i livelli salivari (della droga) e ematici permette che appunto la saliva possa essere usata per valutare il grado di alterazione del guidatore.

Con l'esame della saliva possono essere individuati

- oppiacei,
- cannabinoidi,
- amfetamine,
- cocaina,
- GHB
- Ketamina
- di altre sostanze benzodiazepine, analgesici, cianuri ed altri prodotti del tabacco; o anche antibiotici o il sildenafil.

Le droghe sono in realtà le sostanze più frequentemente rilevate nei campioni di saliva, date loro implicazioni **nella medicina del lavoro** e nella guida di veicoli e un test iniziale, della saliva può essere effettuato sul posto per mezzo di dispositivi di raccolta.

Il principale vantaggio di questi dispositivi è che essi forniscono un **risultato preliminare delle presenza o meno di droghe** in pochi minuti e senza la necessità di sofisticate attrezzature di screening di laboratorio.

Tuttavia, al momento, **i risultati forniti da questi dispositivi devono essere confermati in laboratorio** perché presentano numerosi limiti:

- il problema principale risiede nella natura dei dispositivi di campionamento. Infatti questi sistemi contengono conservanti e stabilizzanti vari che possono compromettere la precisione e l'accuratezza delle analisi. Diversi lavori che affrontano tale questione sono stati pubblicati (Dams et al, 2003;. Annesley, 2003).
- un altro motivo di preoccupazione nel test orale è il recupero della droga dal dispositivo di raccolta, che può avere un effetto indesiderato sulla precisione del dosaggio. Di fatto, se gli analiti non sono pienamente recuperati dal dispositivo, le concentrazioni della droga nel campione possono essere sottostimate, con conseguenze per il rapporto saliva-plasma. Si deve quindi prestare attenzione quando si utilizzano questi dispositivi, in quanto è possibile che si verifichi sia un **carente recupero** delle sostanze dalla saliva nella parte assorbente quanto **un assorbimento delle sostanze sui componenti del dispositivo** (la sostanza rimane intrappolata in questi componenti (Lenander-Lumikari et al, 1995; O'Neal et al, 2000; Samyn et al, 2007).

## Riferimenti bibliografici

Kapur B.M., Bulletin on narcotics, Drug testing in the workplace, volume XLV, n° 2, 1993, pag. 115-154.

Fuceri F. et al., Reducing False-negative tests in urinary drug of abuse screening, Journal of Analytical Toxicology, Letter to the Editor, 1997,21, pag. 244.

Nida, Research monograph series, Drug testing for drugs of abuse, 1987

Cowan D. et al., Drug testing, Foresight Brain Science, Addiction and drug project, 2005.

E. Gallardo e J.A. Queiroz, The role of alternative specimens in toxicological analysis, Biomedical Chromatography, 2008, 22, 795-821.