

Congresso Nazionale COCAINA

Verona, 5-6 giugno 2006

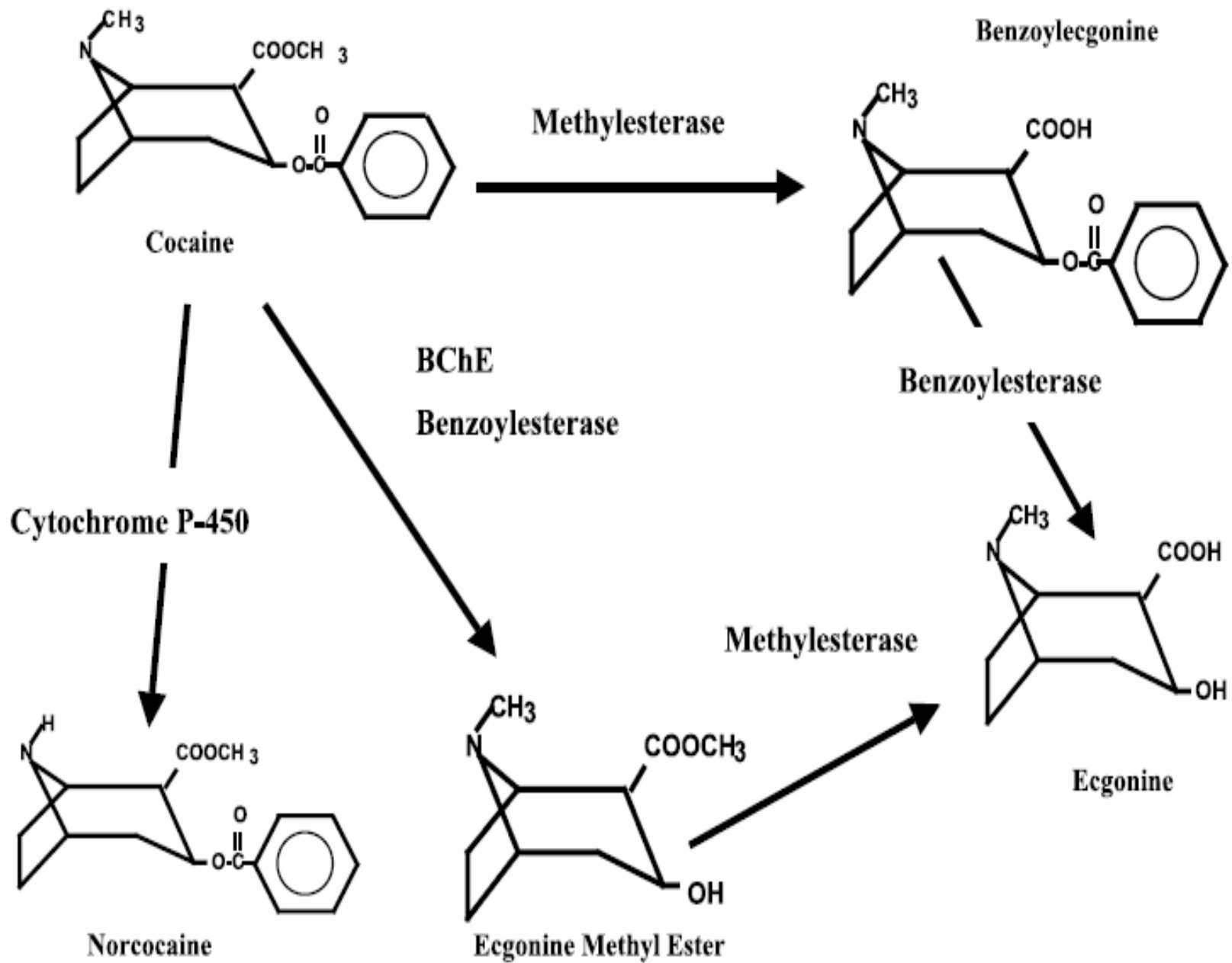
LA DIAGNOSI DI LABORATORIO: ASPETTI TECNICI

Teodora Macchia, Stefano Gentili

Dip.to del Farmaco- Istituto Superiore di Sanità

Conoscenze opportune su:

- **Metabolismo**
- **Farmacocinetica della sostanza**
- **Possibili interazioni di più sostanze tra loro**
- ----



Metabolismo della cocaina (da Bowman et al. 1999)

Altri Metaboliti - Markers Biologici

- **COCAETILENE** (BZE metil estere): per transesterificazione della cocaina nel fegato in presenza di alcol. Biologicamente attiva sui neuroni dopaminergici come la cocaina. Marker di assunzione combinata COC-EtOH.
- **METILECGONIDINA ed ECGONIDINA** (metabolita per esterasi): si rilevano a seguito di assunzione di cocaina base-crack per fumo. Il Markers differenzia l'uso di cocaina per fumo rispetto alle altre vie
- **ANIDROECGONINA**: presente in tracce nelle urine dopo assunzione per fumo
- **NORCOCAINA** (attiva nella epatotossicità cocaina-mediata): presente nel sangue per associazione COC-EtOH. In questo caso si ha <<<BZE ed >>>Norcocaina
- -----

Conoscenze opportune su:

- **Metabolismo**
- **Farmacocinetica della sostanza**
- **Possibili interazioni di più sostanze tra loro**
- **Influenza esercitata dall'abitudine assuntiva e dalla via di assunzione su concentrazioni e tempi di permanenza**
- **Caratteristiche delle varie matrici biologiche anche in base alle finalità dell'indagine**
- ----

Conoscenze opportune su:

- **Metabolismo**
- **Farmacocinetica della sostanza**
- **Possibili interazioni di più sostanze tra loro**
- **Influenza esercitata dall'abitudine assuntiva e dalla via di assunzione su concentrazioni e tempi di permanenza**
- **Caratteristiche delle diverse matrici biologiche**
- **Conoscenza delle sostanze circolanti nello specifico territorio**
- ----

Effetto della **PREVALENZA sul Valore Predittivo di un test quando sensibilità e specificità sono uguali al 99%**

Prevalenza, %

**Valore Predittivo
di un test positivo, %**

0.1

9.0

1.0

50.0

2.0

66.9

5.0

83.9

50.0

99.0

Alcuni aspetti tecnici significativi

- Preparazione del campione
- Scelta della matrice biologica
- Esito del test e interpretazione del risultato
- Individuazione e gestione dei falsi negativi
- Adulterazione del campione
- Stabilità degli analiti
- Cut off

PREPARAZIONE

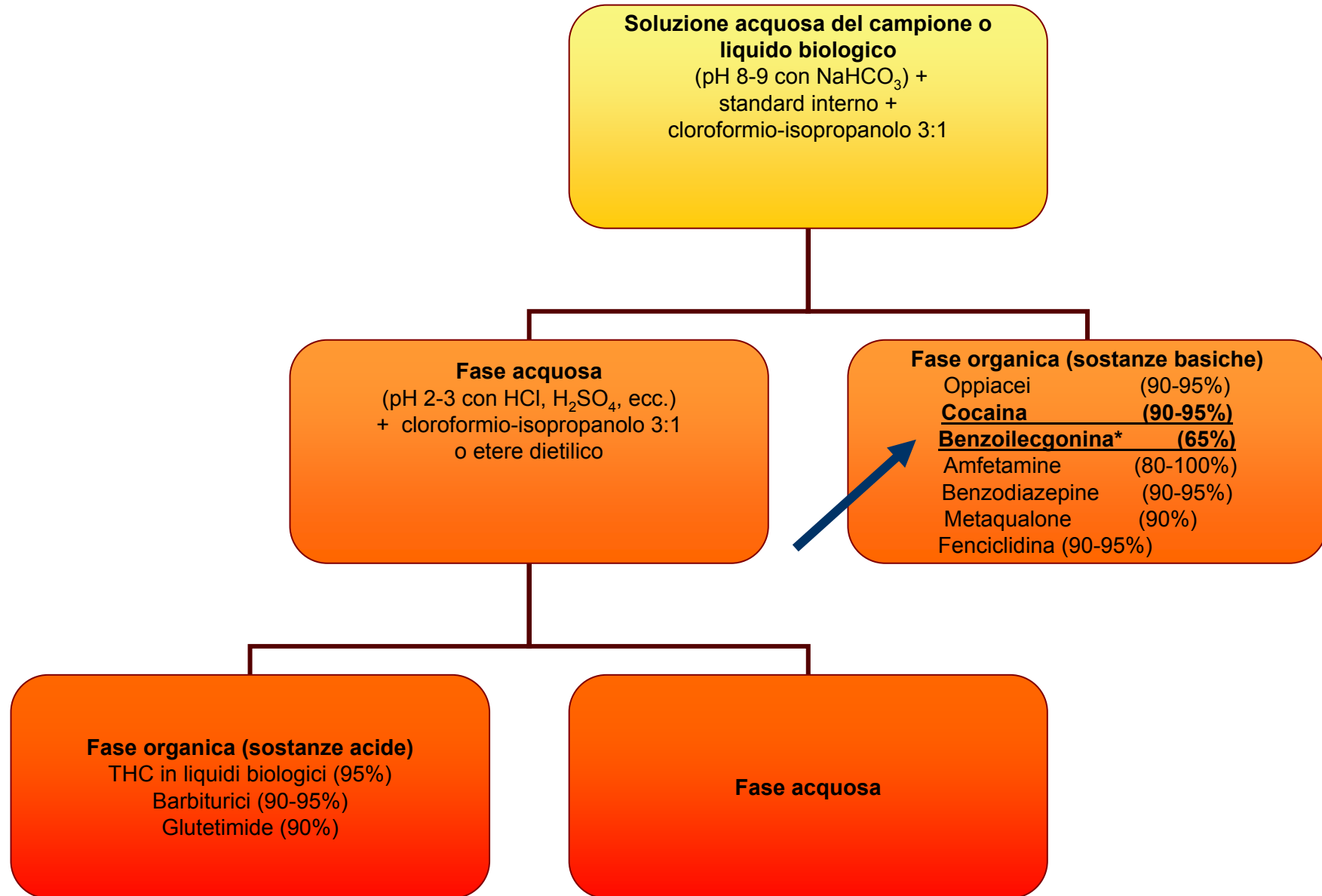
DEL

CAMPIONE

L'analisi strumentale in matrici biologiche, in gran parte dei casi, richiede di isolare la cocaina ed i suoi metaboliti dalla matrice.

Generalmente si procede ad una estrazione per la quale possono essere adoperate diverse tecniche.

Linee orientative per un'estrazione liquido / liquido



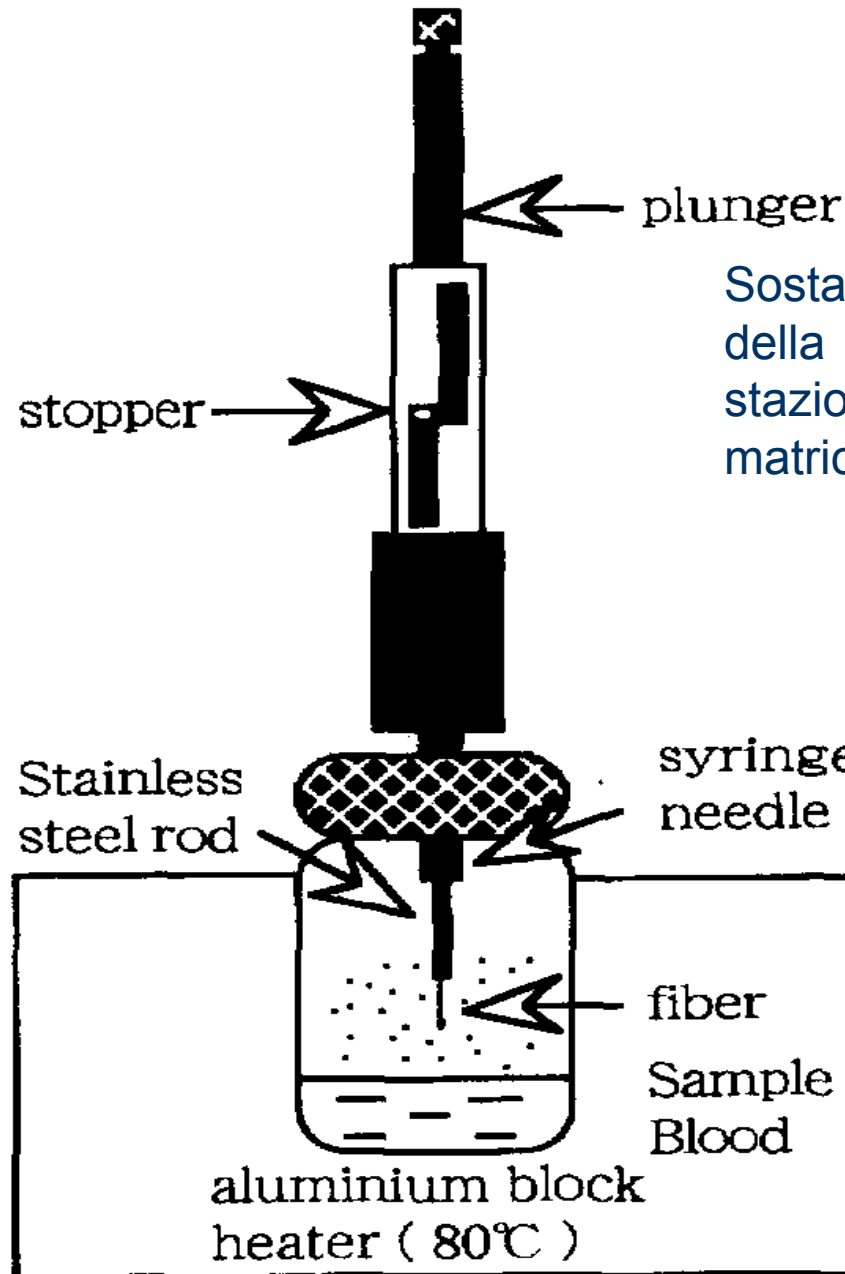
*La Benzoilecgonina per il suo carattere anfotero si estrae con difficoltà in queste condizioni. Risultano più efficaci i sistemi solido/liquido.

Estrazione in fase solida

SPE

(solido-liquido)

SPMIE



Sostanze adsorbite in funzione della loro affinità con la fase stazionaria sino all'equilibrio con la matrice del campione

MATRICI BIOLOGICHE

Convenzionali e Alternative

(vantaggi e limiti)

Confronto tra urine, saliva, sudore e capelli

• Caratteristiche	urine	saliva	sudore	capelli
• Finestra rilevazione	2-3 giorni	poche ore	1 settimana	anni
• Tecnica analitica pr.	immunochim. + GC/MS	GC/MS + immunochim.	GC/MS	GC/MS
• Durata analisi	+ 0 +++	+++	+++	++++
• Costo	+ 0 +++	+++	+++	++++
• Tipo di misura	incremento	incremento	cumulativo	cumulativo
• Adulterazione	possibile	difficile	difficile	+ difficile
• Conservazione	- 20 °C	- 20 °C	- 20 °C	T. amb.
• Prelievo	invasivo	non-invasivo	non-invasivo	non-invasivo
• Analiti principali	metaboliti	sost. madre	sost. madre	sost. madre
• Conc.nella matrice	elevata	bassa	bassa	bassa

ANALISI

complementari

CAPELLI

URINE

Stabilire l'uso di droga

Informazioni a lungo termine
su gravità e pattern d'uso

Uso negli ultimi giorni.

Il dato QUANTITATIVO urinario è influenzato da una serie di variabili oltre che dalla dose di COCAINA assunta, es:

- **Via di assunzione** (BZE rappresenta il 39%, 30% e 16% della dose assunta per via i.v., intranasale, fumo)
- **Abitudine assuntiva** (la quantità di metaboliti escretati aumenta anche del 50% nell'assunzione cronica)
- **Differenze di assorbimento** (es. COC+THC)
- **Escrezione** (COC pH dipendente, non così BZE anfotera)

Esito ed interpretazioni risultato di un test in campioni biologici

Esito Test

Significato “chimico”

Significato clinico

Positivo

Il composto è presente nel liquido biologico

Il composto è stato assunto, ma non si conoscono le modalità

Negativo

Il composto non è presente

Il composto non è stato assunto:
-mai
-in dose e/o frequenza sufficiente
-in un periodo di tempo sufficiente prima del prelievo

Falso positivo

Risultato positivo in un liquido biologico che non contiene la sostanza

Il risultato è positivo per:
-cut off troppo basso
-errore nella procedura analitica

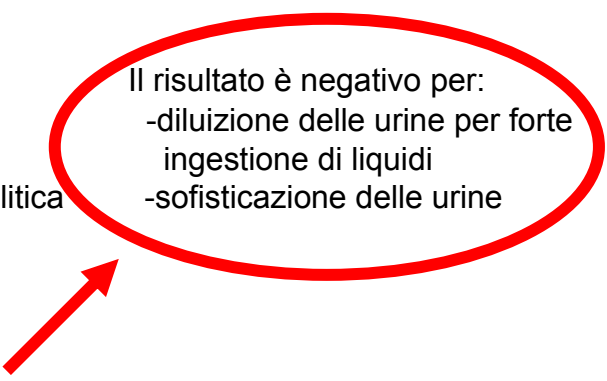
Il risultato positivo può essere attribuibile:
-fisiologicamente a sostanze presenti nell'organismo
-farmacologicamente alla presenza di un'altra sostanza più o meno analoga

Falso negativo

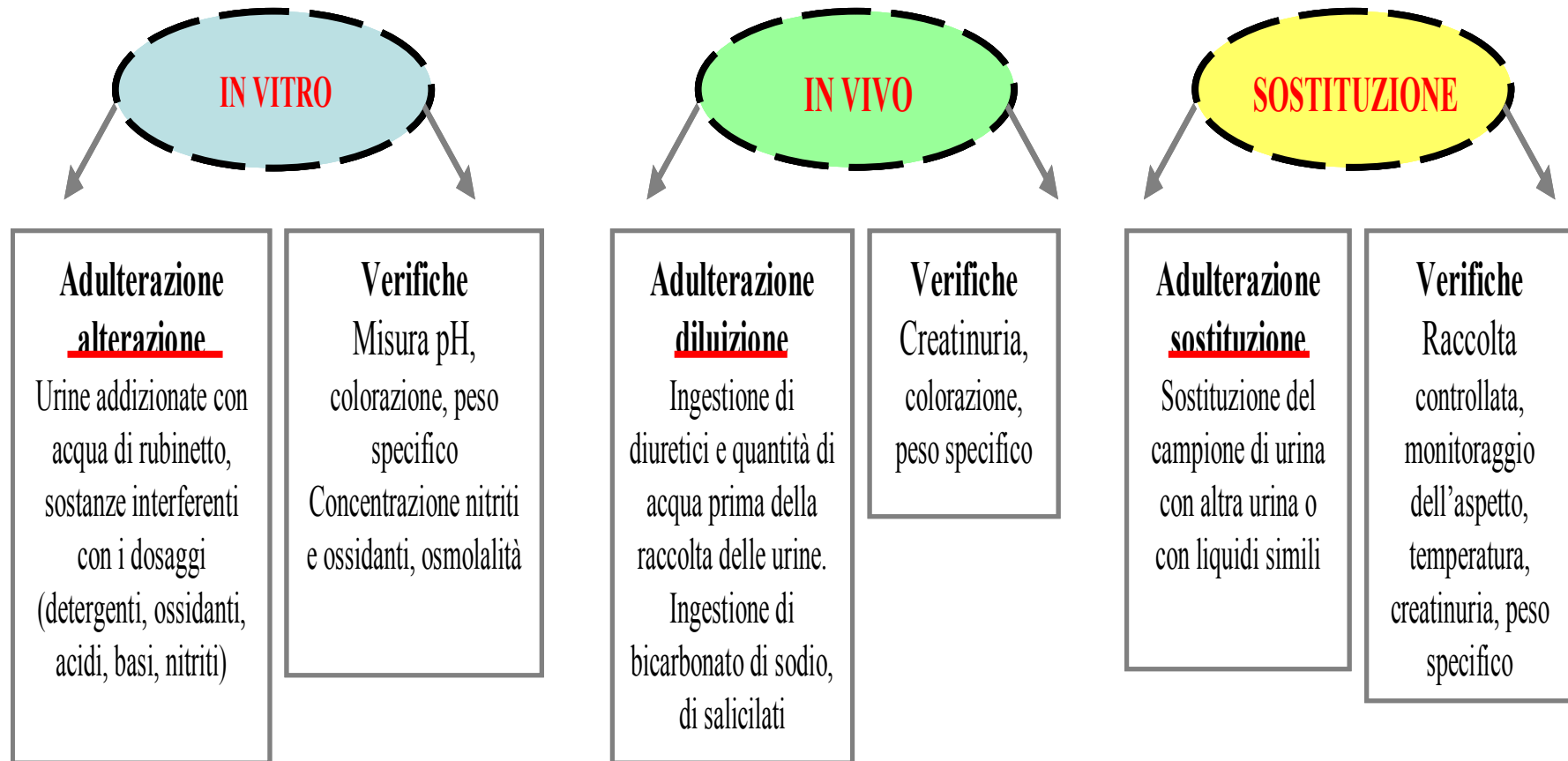
Risultato negativo in un liquido biologico che contiene la sostanza

Il risultato è negativo per:
-cut off troppo alto
-sensibilità non sufficiente
-errore nella procedura analitica

Il risultato è negativo per:
-diluizione delle urine per forte ingestione di liquidi
-sostituzione delle urine



Adulterazione del campione urinario



Un campione di urina è da considerare:

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

Fonte: Substance Abuse and Mental Health Services Agency (SAMHSA)-HHS. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs. General Register 70 (15) January, 255, 2005

FINESTRA DI RILEVABILITA'

Importante

Perché nella diagnosi d'uso di cocaina tramite analisi urinaria, molti casi vengono persi per la breve emivita delle molecole ricercate e per la velocità con cui risultano sotto soglia.

Proposte: -normalizzare il risultato per la creatinina
(300ng/mg creatinina)
- abbassare i cutoff

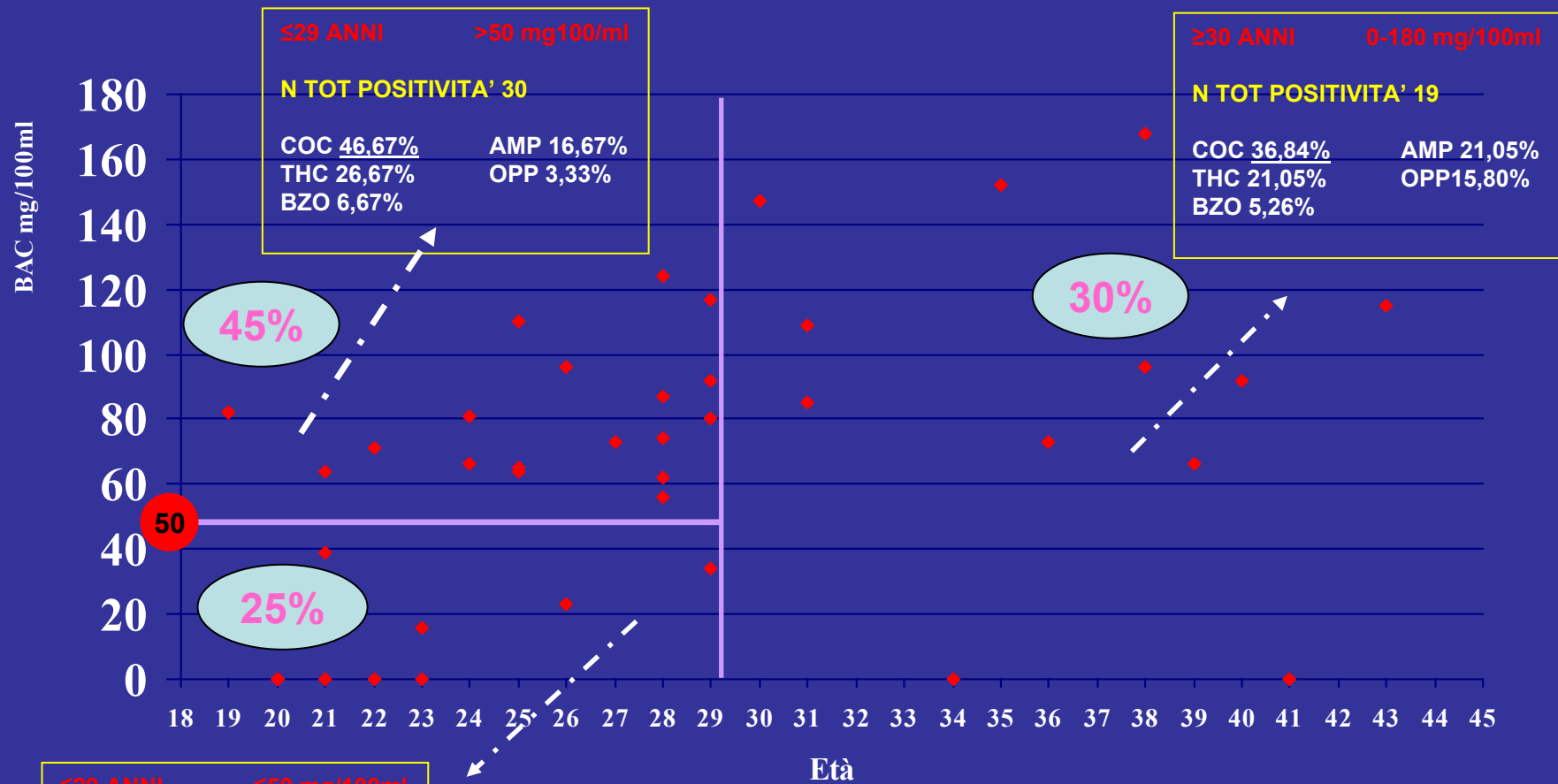
Finestra di rilevabilità e Finalità dell'accertamento

Utilità di passare dall'urina al capello (marker di esposizione quantitativa e temporale)

SALIVA E SUDORE

Dispositivi ON-SITE

Età dei soggetti positivi ad una o più sostanze per fascia di alcolemia.



N.B. 60% alcolemie = 0

CUT OFF cocaina e metaboliti

Matrice	Positivi screening iniziale	Positivi conferma	Rilevabilità tempo in media
Urina (ng/mL)	300¹ , 150²	150¹ , 100²	6-8 ore 2-4 giorni BZE < 8 giorni ass.pes.
Saliva (ng/mL)	20²	8²	4-12 ore 12-24 ore BZE
Sudore (ng/cerotto)	25³	25³	dipende dalla modalità raccolta

1. DHHS Guidelines Federal Workplace Drug Testing Programs (urine); last revised Nov. 13, 1998 (63 FR 63483)

2. Cutoff proposed by DHHS for urine and oral fluid: F.R., April 13, 69 (71):19644-19732, Approval pending 2004

3. US Department of Health and Human Services. éProposed revision to mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs. Federal Register 69: 19673-732, 2004

STABILITA'
Cocaina e metaboliti
(post-prelievo, conservazione)

Sangue intero e plasma:

Usando Vacutainer commerciali con ossalato di potassio (anticoagulante) e fluoruro di potassio (inibitore colinesterasi plasmatica) si rallenta il catabolismo della cocaina per un limitato periodo di tempo. Il sistema è controproducente per la BZE. Nei campioni stabilizzati, la conc. di COC risulta **anche doppia** rispetto alle rispettive frazioni non stabilizzate. **L'ecgonina** è la sola frazione stabile a temperatura ambiente.

Urine:

le condizioni ottimali di conservazione per COC e metaboliti sembrano essere -15°C a pH 5,0 ottenuto preferibilmente con acido ascorbico. In queste condizioni, si previene la degradazione della COC e metaboliti per almeno 110 giorni.

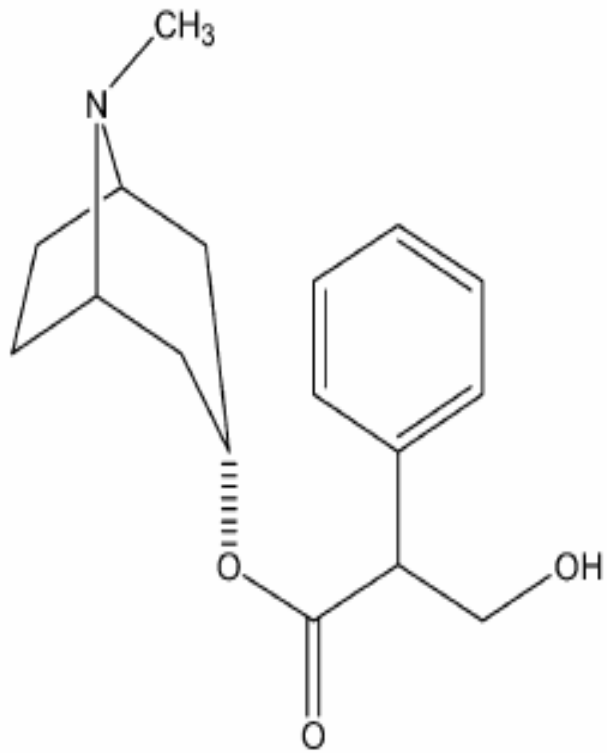
IN CONCLUSIONE

-I risultati analitici debbono essere interpretati ed utilizzati con cautela perché siano di reale utilità diagnostica, soprattutto dove ci siano discordanze apparenti con il quadro clinico (utilità siero)

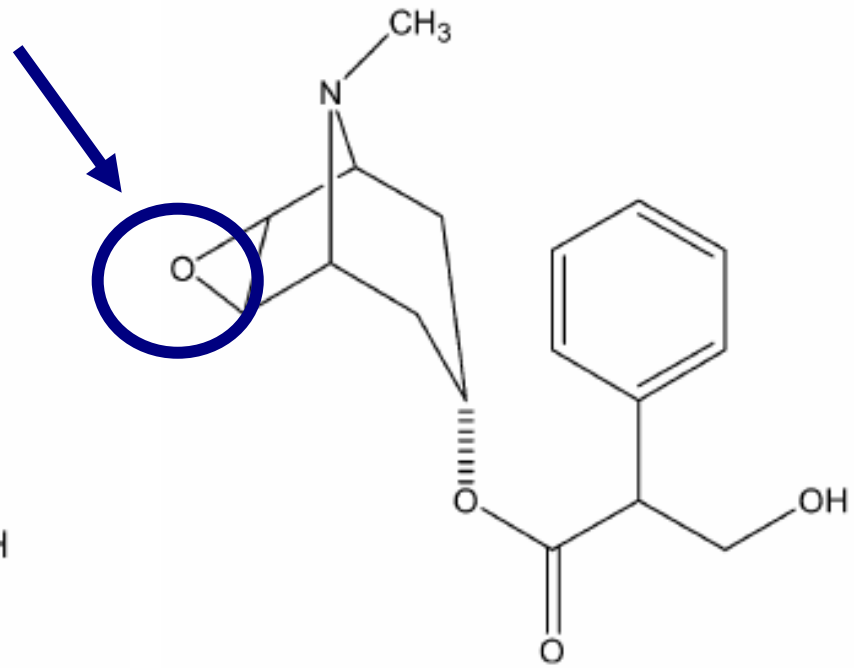
-E' opportuno un raccordo tra laboratorio e territorio per tenersi al corrente circa le sostanze utilizzate. Questo al fine di adottare le procedure analitiche più idonee dati i limiti delle tecniche di screening più diffusamente utilizzate.

- Esemplicativo al riguardo il caso cocaina-atropina.

COCAINA-ATROPINA



Atropina



Scopolamina

Struttura di Atropina e Scopolamina

COCAINA-ATROPINA

Più di 90 casi di intossicazioni gravi registrati in diversi paesi europei nel corso del 2004 (concentrati negli ultimi due mesi) e nel 2005

con:

- Ricoveri in Pronto Soccorso**
- Interventi di Rianimazione**
- Decessi**

- Numerosi interventi sanitari per intossicazioni meno gravi che non hanno richiesto ricovero.

sintomi:

eccitazione, irrequietezza, sintomi psicotici, allucinazioni, convulsioni (2 casi), ridotto stato di coscienza, tachicardia, ipertensione, problemi respiratori, secchezza delle fauci, marcata midriasi.

GRAZIE

PER L'ATTENZIONE

GRAZIE

PER L'ATTENZIONE

SUDORE

- **Milioni di ghiandole sudoripare** (molto concentrate sul palmo delle mani, pianta dei piedi e sulla fronte)
Sudore e traspirato: soluzione acquosa ipotonica derivante dal plasma ematico per filtrazione passiva. 99% di acqua ed elettroliti (specie sodio e cloro) ed acido lattico.
- **Il pH** varia tra 3.8 e 6.5 in relazione all'acido lattico escretato. Piccole quantità di lipidi e di proteine nel sudore della zona ad es. ascellare.
- **Quantità prodotta variabile**
1-3 litri/giorno con attività fisica intensa.

SALIVA

- Flusso totale di saliva

500-1500 ml/giorno

- Provenienza della secrezione ghiandolare:

submaxillari (65%), parotidi (23%), sublinguali (4%)

La saliva si forma alla base dei dotti di escrezione delle principali ghiandole salivari. Mano a mano che scende diventa sempre più ipotonica.

Il fluido orale è composto per il 99% di acqua, contiene Sali minerali, proteine (lipoproteine che agiscono da lubrificanti) ed enzimi che aiutano la digestione. La concentrazione salivare è un riflesso della concentrazione plasmatica di molecole. Nel caso di molecole debolmente alcaline, la concentrazione salivare dipende anche dal pH della saliva modificando il rapporto teorico S/P

(5% sodium fluoride)

- pH salivare finale = 6.8

Principle of Headspace SPME in Hair Analysis

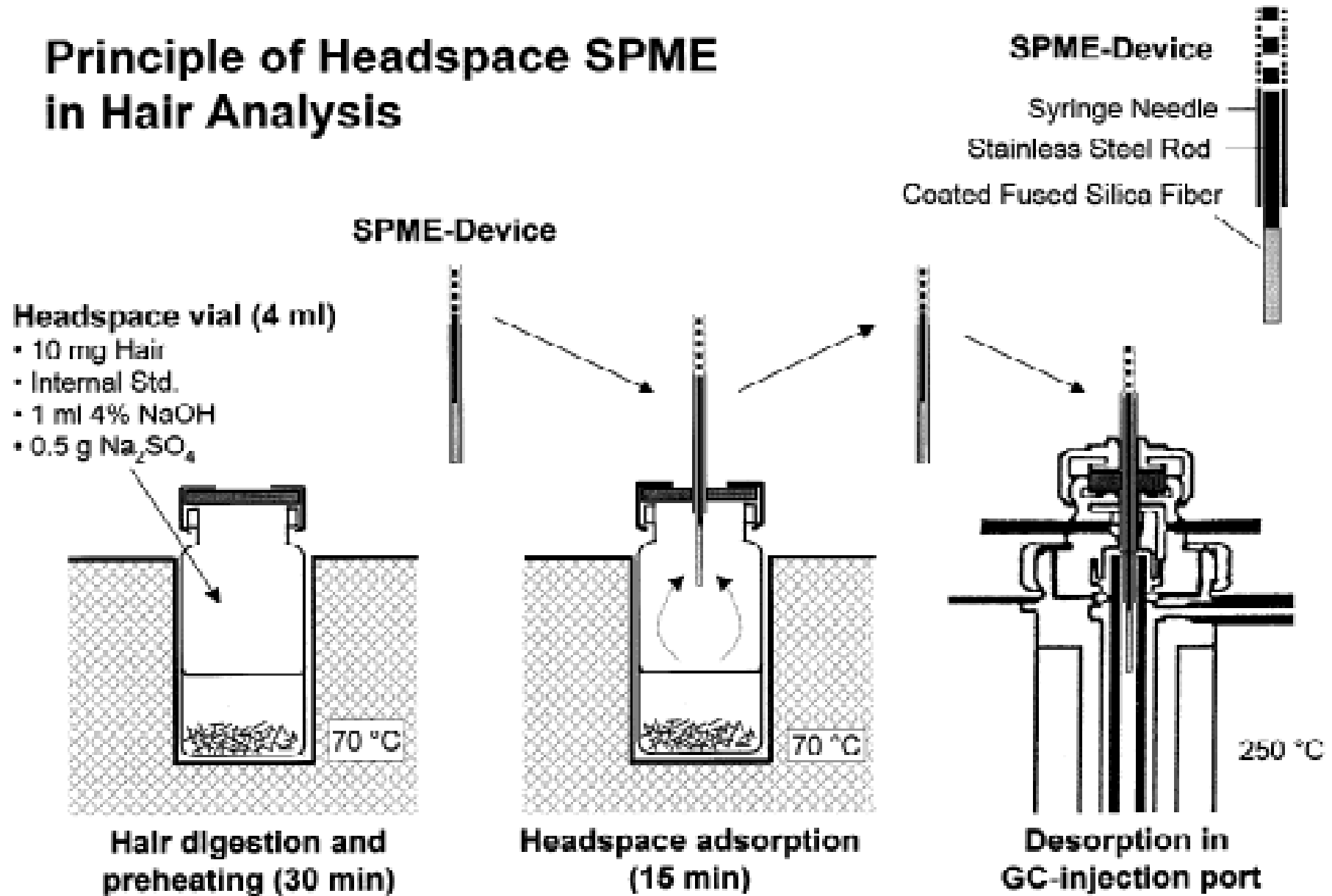


Fig. 1. Principle of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis.