

Il laboratorio di tossicologia e il medico competente

- Quali esami ? (DGR 332 08.05.2009)
- Metodologie ? (screening iniziale e test di II Livello)
- Comunicazione dei risultati (al MC)



- **Recepimento dell' intesa n 99/CU del 30.09.2007 sancita in conferenza unificata e dell' accordo stato-regioni rep atti n 178 del 18.09.2008 e approvazione delle procedure adottate dalla Regione Lazio 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 »**
- **DGR 332 DEL 08.05.2009**

Droge principali

- OPPIACEI
- FARMACI STIMOLANTI
- COCAINA
- AMFETAMINE.
- METAMFETAMINA
- PSICHEDELICI E ALLUCINOGENI
- CANNABINOIDI (THC)
- INALANTI

Tipologia e tempi di esecuzione

- **Test speditivi(on site) : 10-15 min**
- **Test immunochimici**
- **di laboratorio: 1 h**
- **GC/MS- LC/ MS : CIRCA 3 h**

CLASSIFICAZIONE DEI LABORATORI

- **Laboratorio di base nell'ambito della Biochimica Tossicologica**
LABORATORIO DI 1° LIVELLO CHE ESEGUE SOLO TEST INIZIALI (o di screening)
- **Laboratorio SPECIALIZZATO nell'ambito della Biochimica Tossicologica**
LABORATORI DI II° LIVELLO CHE ESEGUE SIA LE ANALISI INIZIALI CHE DI CONFERMA

MATRICI BIOLOGICHE : URINE

MATRICE BIOLOGICA DI PRIMA SCELTA

NELL'ANALISI DELLE SOSTANZE D'ABUSO

VANTAGGI:

- **- PRELIEVO NON INVASIVO DEL CAMPIONE**
- **- POSSIBILITA' DI CAMPIONARE GRANDI VOLUMI**
- **- POSSIBILITA' DI ANALIZZARE SIA LE SOSTANZE CHE I LORO METABOLITI DOPO DIVERSI GIORNI.**

SVANTAGGI:

- **- SCARSA RILEVANZA CLINICA DELL'ANALISI QUANTITATIVA POICHE' LE CONCENTRAZIONI DEGLI ANALITI VARIANO CON:**
 - **- DOSE**
 - **- VIA DI SOMMINISTRAZIONE**
 - **- TEMPO DI LATENZA TRA L'ASSUNZIONE E L'ANALISI**
 - **- STATO FISIOLOGICO DELL'INDIVIDUO**
 - **- AGGIUNTA DI SOSTANZE ADULTERANTI**

MATRICI NON CONVENZIONALI PER L'ANALISI DELLE SOSTANZE D'ABUSO

- ***SALIVA***
- ***SUDORE***
- ***CAPELLI***
- ***PELI PUBICI***
- ***PELI ASCELLARI***
- ***UNGHIE***

PERCHE' UTILIZZARE MATRICI CONVENZIONALI NELLE ANALISI FARMACOLOGICHE?

- **PER INCREMENTARE IL TEMPO DI DETERMINAZIONE**
- **Dopo somministrazione ed in funzione delle caratteristiche farmacocinetiche una droga e/o i suoi metaboliti possono essere rilevati:**

- **Sangue**
- **Saliva**
- **Urina**
- **Capelli**

h
h
giorni
mesi

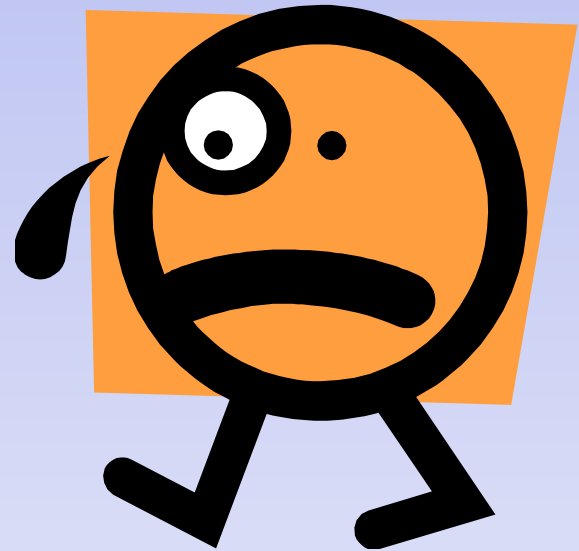
■ ***CATENA DI CUSTODIA***
matrici biologiche
urina
sangue
saliva
sudore
liquido gastrico
capelli
meconio

la validita' dei risultati di laboratorio non dipende solo dall'adeguatezza del processo analitico ma anche dalla prova dell'integrità del campione dal momento in cui e' stato raccolto fino a quando l'analisi viene completata

CATENA DI CUSTODIA

Documentazione che accompagna il campione e che riporta notizie sul prelievo, trasporto e conservazione.

- **Quando eseguire il test di conferma ?**



- **L' analisi di conferma servono a verificare che non ci siano falsi positivi a causa della non specificità dei test iniziali !!!!!.**
- **Il test di conferma o analisi di II livello può avere diverse valenze:**
- **Clinica**
- **Medico legale (incidenti stradali e perizie tossicologiche)**

- **Termine : riportato nelle linee guida GTFI (gruppo tossicologici forensi italiani).rev 5 29 MAGGIO 2017**
- **Seconda analisi da eseguirsi obbligatoriamente con un metodo dotato di maggiore specificità a quella impiegata per l' analisi di screening e comunque fondato su principi chimico-fisici diversi , su una differente aliquota del campione originale , al fine di identificare specificamente una sostanza e/o suoi metaboliti individuati in maniera presuntiva attraverso l' analisi di screening**

- **L' identificazione e la quantificazione degli analiti di interesse si ottiene utilizzando metodi separativi cromatografici accoppiati ad una tecnica identificativa specifica e sensibile quale la spettrometria di massa , ad esempio la gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) o la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS), e/o spettrometria di massa tandem**

RACCOMANDAZIONI

- **I laboratori devono garantire che le tecniche di conferma siano in grado di misurare con accuratezza e precisione concentrazioni nell'ordine dei pg-ng di sostanza .**
- **I metodi di conferma devono essere in grado di misurare sia la sostanza d'abuso parente che il /i metaboliti**

- **Tutto questo assicurando un limite di quantificazione che presenti adeguata accuratezza e precisione**
- **(e' consigliabile riportare il dato con l' incertezza di misura norma 17075 laboratori di prova)**

Sensibilità clinica di un test diagnostico

Probabilità del test di fornire risultati positivi nei soggetti malati (hanno assunto la sostanza), cioè la capacità che ha il test di riuscire a catturare tutti i malati (hanno assunto la sostanza) .

Sensibilità = VERI POSITIVI / VERI POSITIVI + FALSI NEGATIVI

Specificità clinica di un test diagnostico

Probabilità del test di fornire risultati negativi nei soggetti sani (non hanno assunto la sostanza), cioè la capacità che ha il test di riuscire a catturare solo i malati (hanno assunto la sostanza)

Specificità = VERI NEGATIVI / VERI NEGATIVI + FALSI POSITIVI

- **Il concetto che vogliamo ricordare , sempre utile in laboratorio e' il seguente :**

**LA PREVALENZA DI UNA
CONDIZIONE DETERMINA , DATA
LA SENSIBILITA' E LA
SPECIFICITA' DEL TEST , IL
VALORE PREDITTIVO**

cut off

- **E' un valore di riferimento espresso in concentrazione , al di sopra del quale il risultato di un test analitico è giudicato positivo e al disotto del quale il test è giudicato negativo.**

Molecole testate per la conferma

- **Oppiacei :Codeina, Morfina, Mam**
- **Cocaina e benzoilecgonina**
- **Amfetamine e MA, MDA, MDMA,MDEA**
- **Derivati della Cannabis: acido 11-nor-d9-THC-9 COOH**
- **Alcol etilico**

GAS CROMATOGRAFIA

- **La cromatografia in fase gassosa (GC) è una tecnica ad alto potere risolutivo che consente la separazione delle sostanze in base a proprietà chimico-fisiche quali temperatura di ebollizione polarità e dimensioni delle molecole .**
- **L' analisi è condotta utilizzando una fase stazionaria solida o liquida**
- **(adsorbite su un supporto siliceo) e un gas inerte (elio o azoto) quale gas di trasporto .**

- **SPETTROMETRIA DI MASSA**
- **L' Analisi mediante tecniche di spettrometria di Massa consente di misurare il rapporto massa su carica (m/z) dell'analita e quindi di ricavare informazioni riguardanti la composizione elementare e di determinare la struttura della sostanza in esame o procedere ad una accurata analisi quantitativa**

RAPPORTO DI PROVA O REFERTO ANALITICO

RAPPORTO DI PROVA N XXXXX

Materiale esaminato : xx Identificativo campione: xx Richiedente : xx Campionamento : xx

Data arrivo campione: xx Data inizio analisi: xx Data termine analisi: xx

Metodo : IOP xx Rev. xx:xxx

Estrazione in fase solida ed analisi gascromatografica (GC/MS) con quadrupolo

Apparecchiatura:

GC 7890A e MSD 5975C Agilent Technologies.

Condizioni di analisi:

Colonna: capillare VF-5 ms (30m x 0.15 mm x 0.30µm 350°C max)

Programma di temperatura: 200°C÷320 °C,80°C/min Inlet: 260°C

Modo di acquisizione spettro: SCAN/SIM

Ioni monitorati: 82,240,361 (BEG-TMS)-85,243,364 (BEG-deu -TMS)

RISULTATI

SOSTANZA RICERCATA
BENZOILECGONINA

Concentrazione (ng/ml)

Incertezza

Metabolita della Cocaina

±-----

L'incertezza estesa è espressa con un fattore di copertura k=2 ad un livello di fiducia del 95%

Il recupero per l'analita è nell'intervallo 80÷120% e il calcolo della concentrazione non è quindi stato corretto per alcun fattore.

Limite di rilevabilità del metodo (LOD): 10 ng/ml

Limite di quantificazione del metodo (LOQ): 31 ng/ml

Cut-off di legge (DGR 332 08.05.2009): 100 ng/ml

In base quanto stabilito dalle Linee Guida GTFI rev 4 -2012 è da considerarsi positivo il valore che rimane superiore al valore di cut-off anche dopo aver sottratto ad esso il valore dell'incertezza di misura.

Data:

Il Responsabile del Settore
Tossicologia Clinica

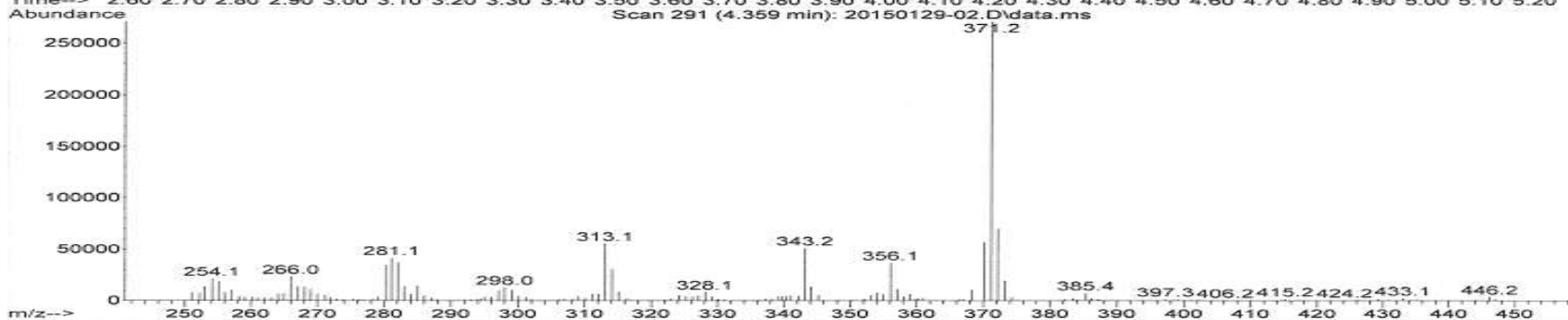
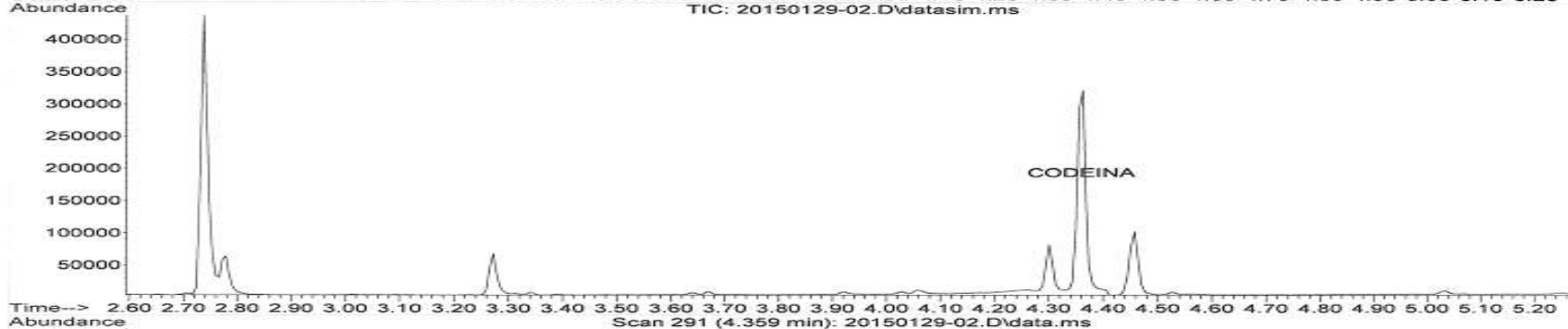
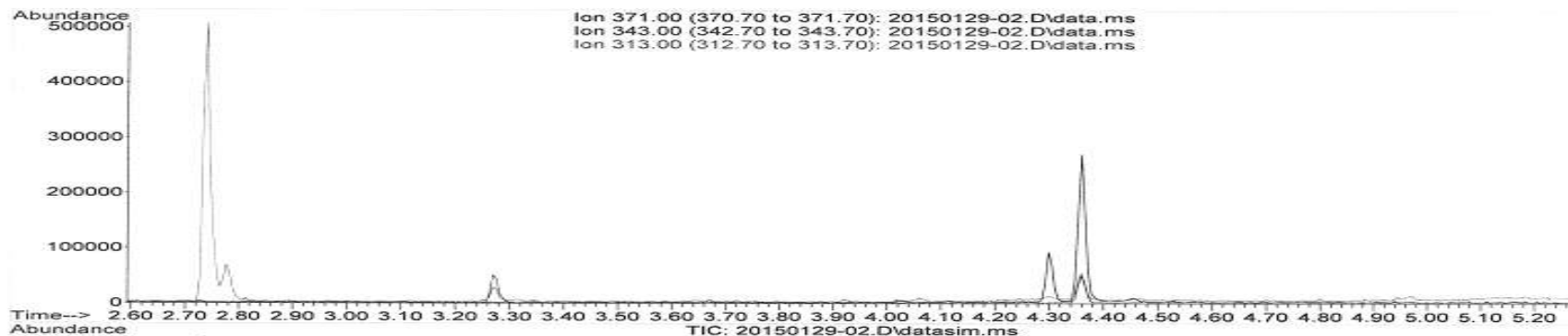
I risultati si riferiscono al solo campione testato.

Il presente Rapporto non può essere riprodotto parzialmente se non previa autorizzazione

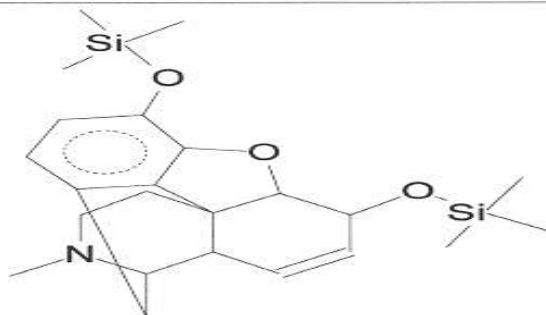
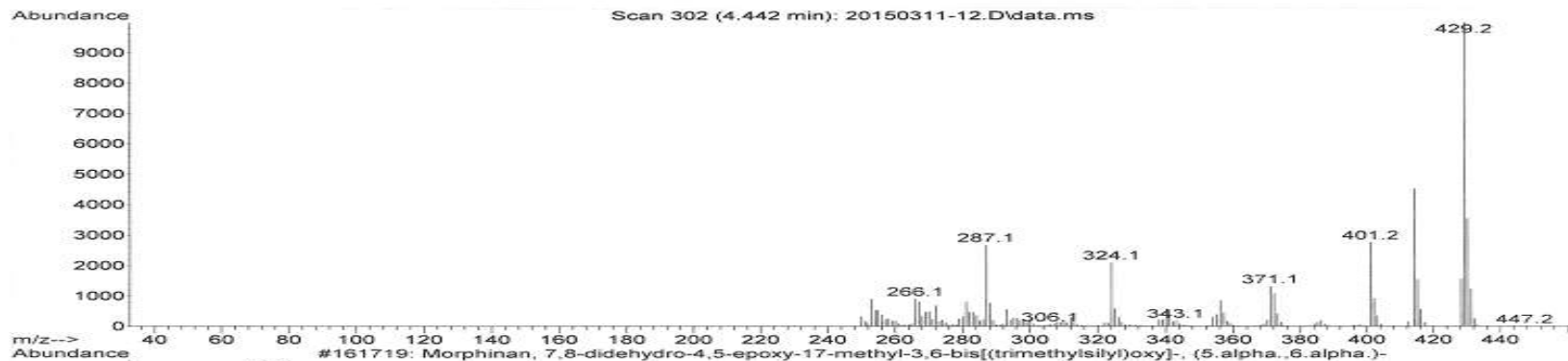
L'aliquota C del campione viene conservata a -20°C per 90 giorni dalla data di prelievo.

Le registrazioni relative alla prova sono conservate per 48 mesi dalla data di emissione del presente Rapporto

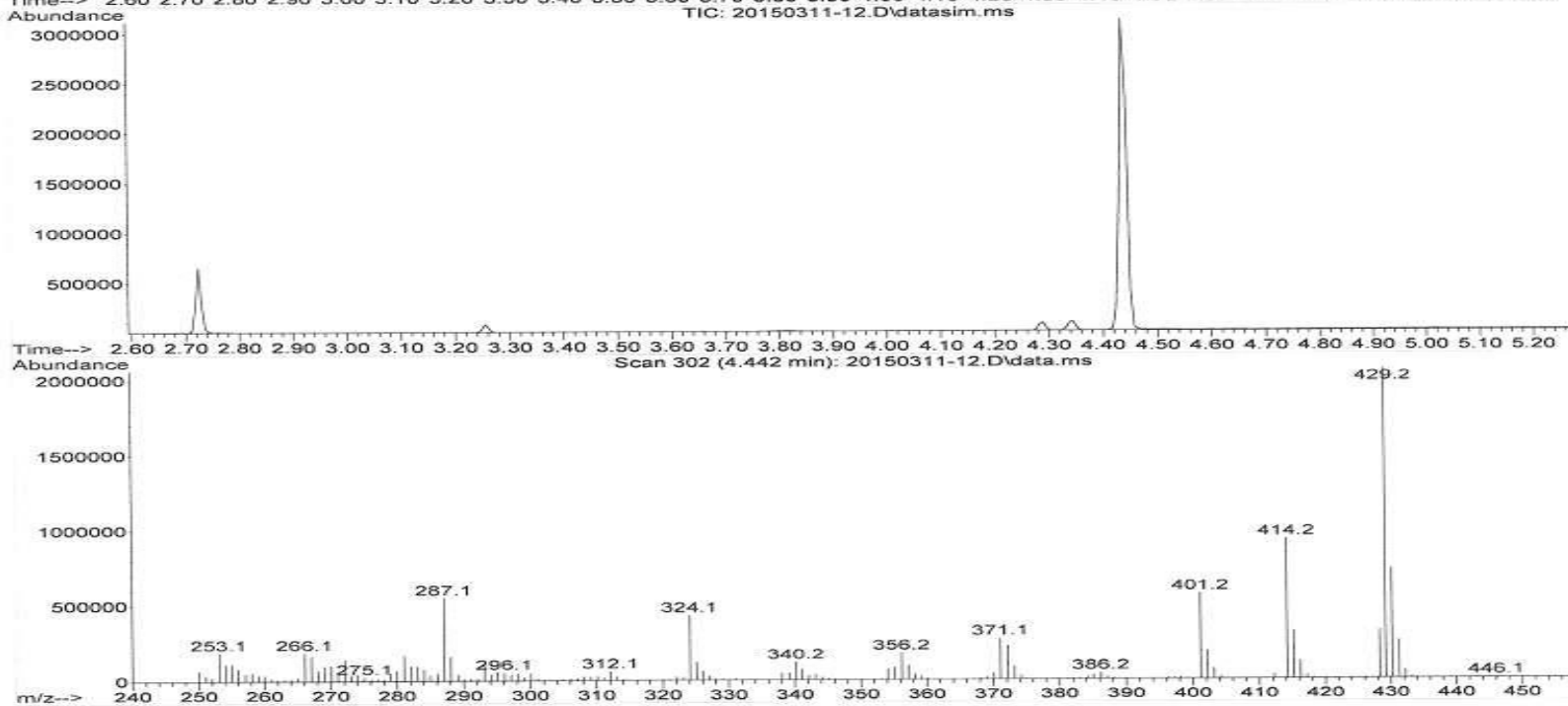
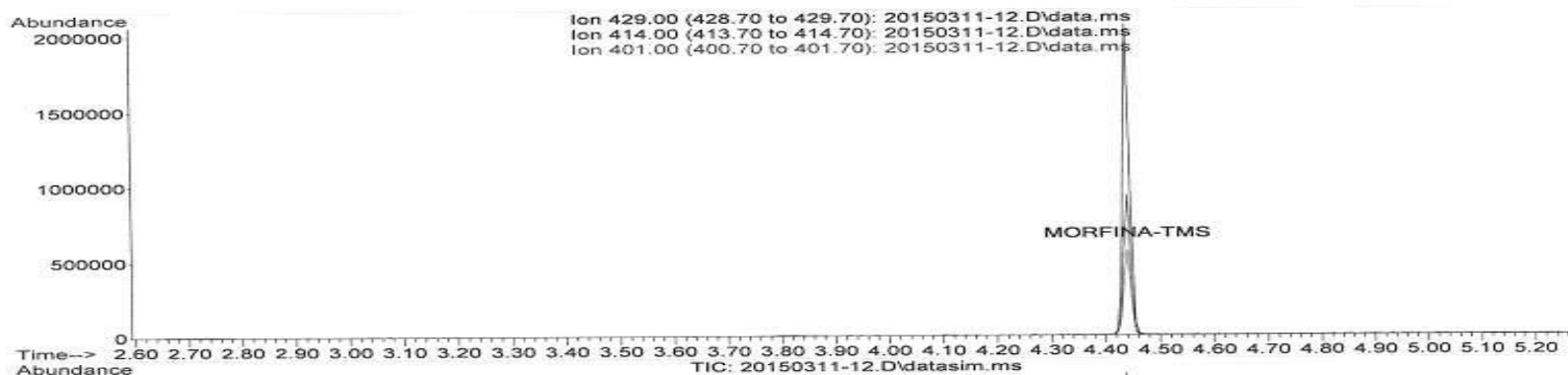
File : C:\msdchem\1\DATA\OPPI URI\GENNAIO 2015\20150129-02.D
Operator : ASCIONE
Acquired : 29 Jan 2015 9:00 using AcqMethod OPPI-URI-TMS-DEU-TAR-200214.M
Instrument : 5975 MSD
Sample Name :
Misc Info :
Vial Number: 1



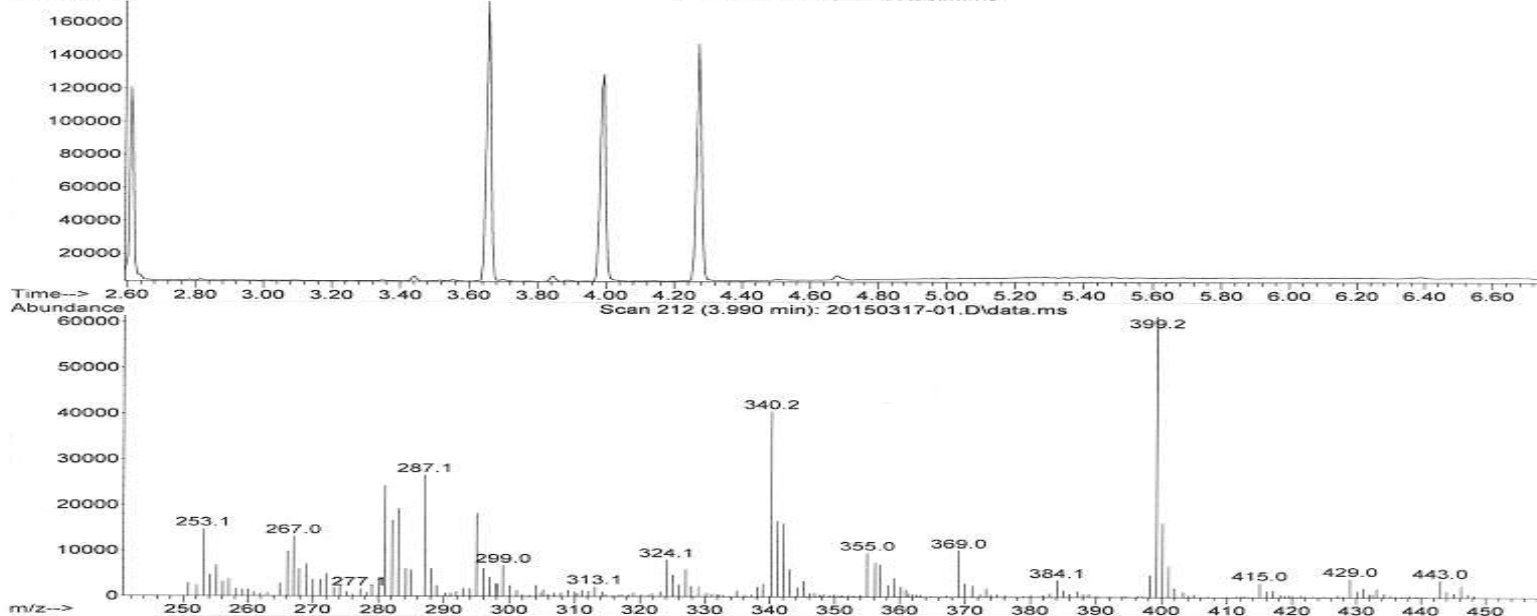
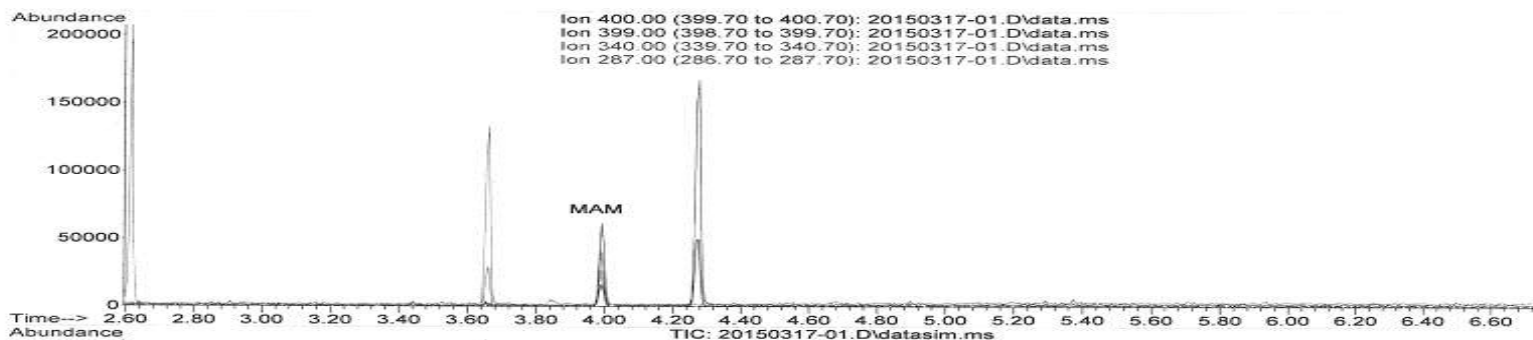
Library Searched : C:\Database\NIST02.L
Quality : 97
ID : Morphinan, 7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methyl-3,6-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, (5.alpha.,6.alpha.)-



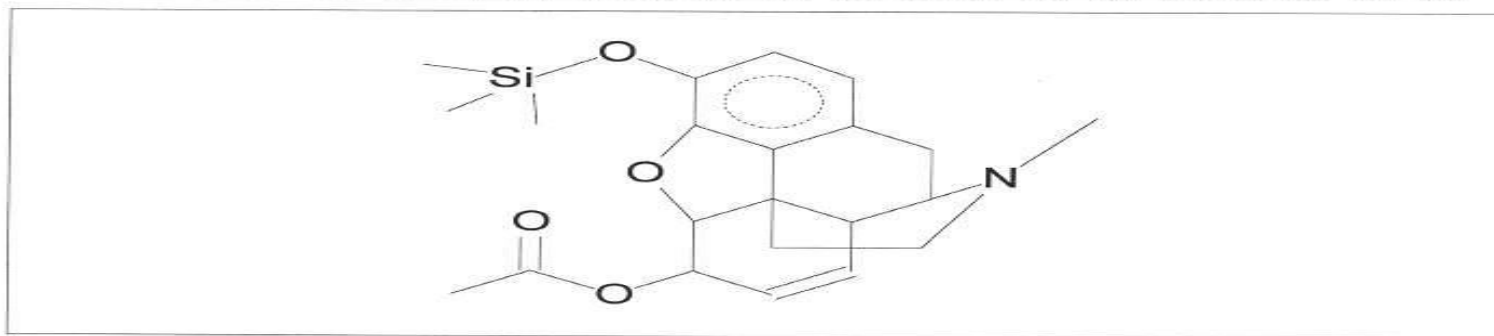
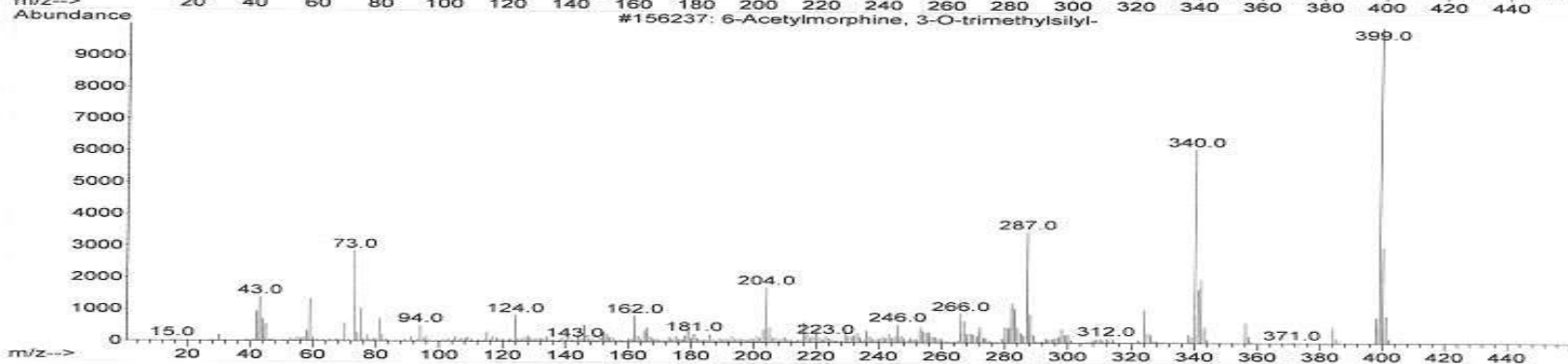
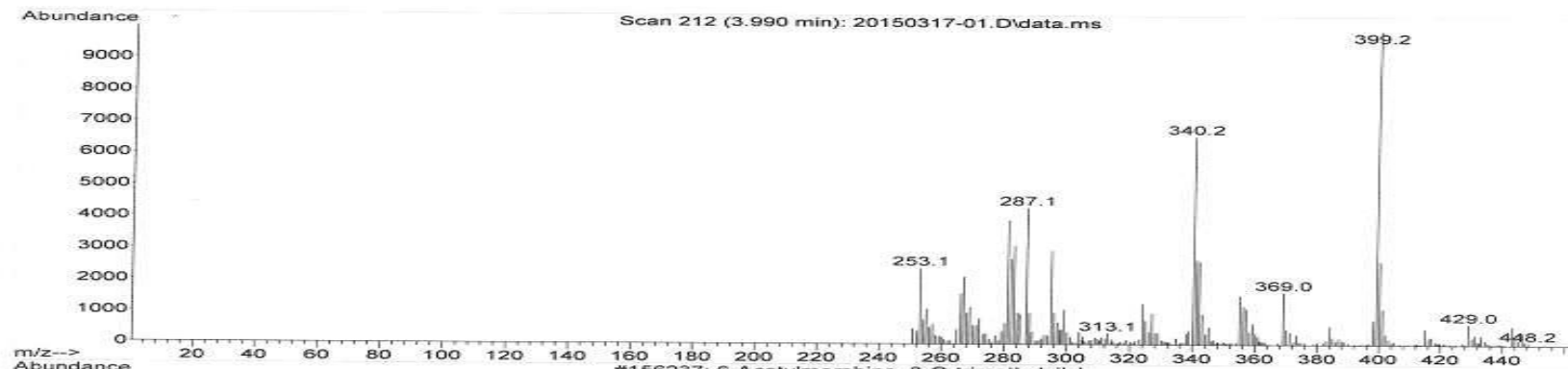
File : C:\msdchem\1\DATA\OPPI URI\MARZO 2015\20150311-12.D
Operator : ASCIONE
Acquired : 11 Mar 2015 15:35 using AcqMethod OPPI-URI-TMS-DEU-TAR-200214.M
Instrument : 5975 MSD
Sample Name :
Misc Info :
Vial Number: 1. RIC OPPIACEI NELLE URINE



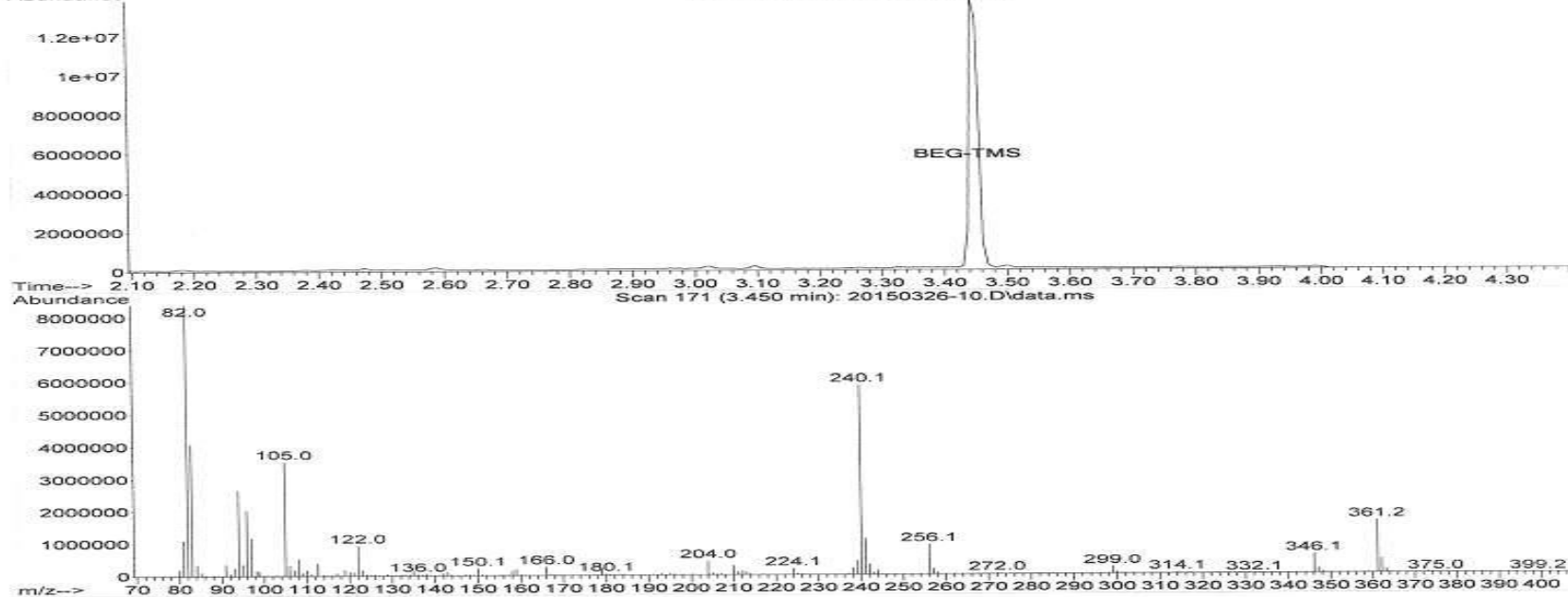
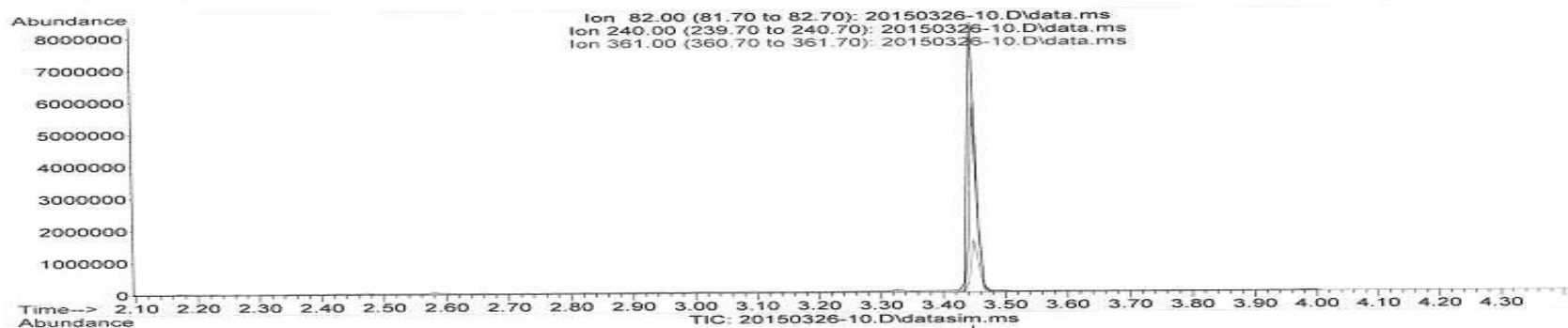
File : C:\msdchem\1\DATA\OPPI URI\MARZO 2015\20150317-01.D
Operator : ASCIONE
Acquired : 17 Mar 2015 9:57 using AcqMethod MAM-URINE.M
Instrument : 5975 MSD
Sample Name:
Misc Info:
Vial Number: 1



Library Searched : C:\Database\NIST02.L
Quality : 98
ID : 6-Acetylmorphine, 3-O-trimethylsilyl-



File : C:\msdchem\1\DATA\COCAINA\MARZO 2015\20150326-10.D
Operator : ASCIONE
Acquired : 26 Mar 2015 13:02 using AcqMethod BEG URINE 243- TAR 09022015.M
Instrument : 5975 MSD
Sample Name :
Misc Info :
Vial Number: 1

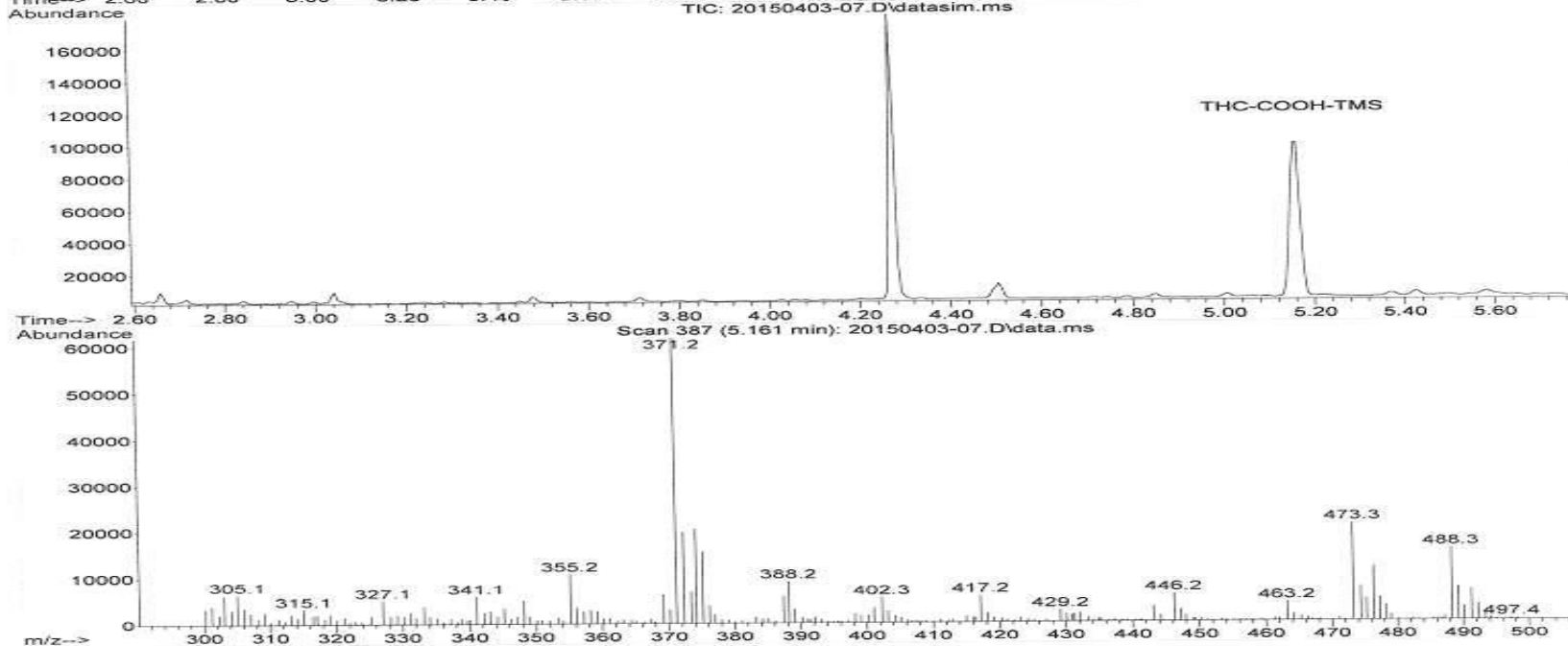
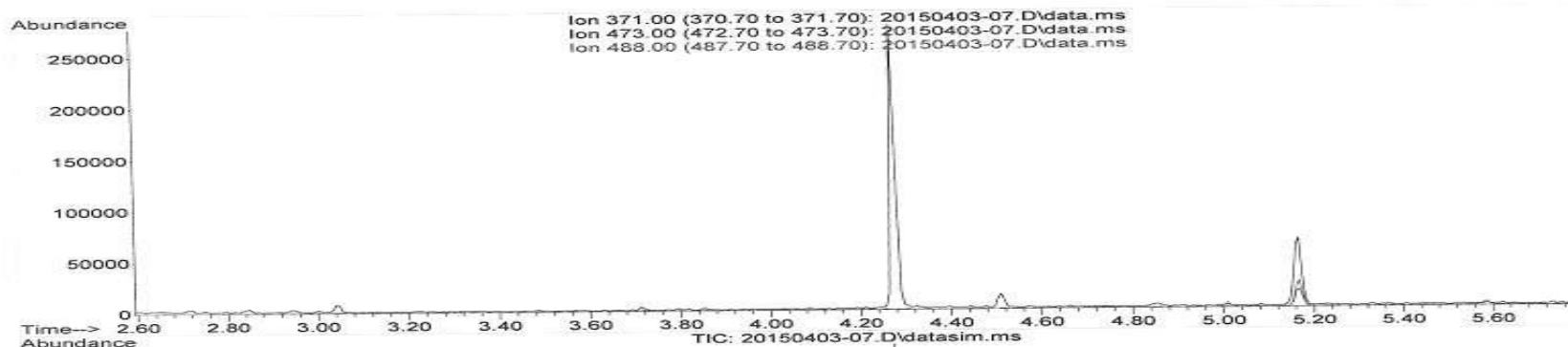


Metabolismo e trasformazione

- **La biotrasformazione trasforma il farmaco di origine in composti più polari per facilitarne l' escrezione del farmaco con le urine e con le feci.**
- **Nel caso della codeina (analgesico oppiaceo contenuto nell' oppio) esplica la sua azione antidolorifica dopo trasformazione nell' organismo in morfina ad opera del citocromo CYP2 D6 .**

- **QUINDI FARE MOLTA ATTENZIONE AL RAPPORTO**
- **CODEINA/ MORFINA nelle urine**
- **Maggiore di 1..... Assunzione di preparati a base di codeina ?**
- **Equivalente (a volte è possibile !!)**
- **Minore di 1 (indagare con la MAM)**
- **Solo morfina !!!! (indagare con la MAM)**

File : C:\msdchem\1\DATA\THC\APRILE 2015\20150403-07.D
Operator : ASCIONE
Acquired : 3 Apr 2015 13:05 using AcqMethod THCD-URINE TAR 2015-02-06.M
Instrument : 5975 MSD
Sample Name :
Misc Info :
Vial Number: 1



Falsi positivi ? Attenzione alle amfetamine e simili ..

Test	Risultato	Unita'	Valori Normali
Amfetamine	81	ng/ml	(0 - 1000)
Cocaina	1	ng/ml	(0 - 300)
Opiacei	4	ng/ml	(0 - 300)
Cannabinoidi	0	ng/ml	(0 - 50)
Metadone	0	ng/ml	(0 - 300)
Ecstasy	871*	ng/ml	(0 - 500)
CreatininaEU	88	mg/dl	(20 - 300)

Procedura

Estrazione in fase solida ed analisi gascromatografica(GC/MS) con quadrupolo con Apparecchiatura Agilent Technologies mod 7690A e 5975 C (massa).

Analisi cromatografica

Tecnica : GC/ MS con quadrupolo

Colonna: capillare VF -5 ms (20m x 0.15 mm x 0.30µm 350°C max)

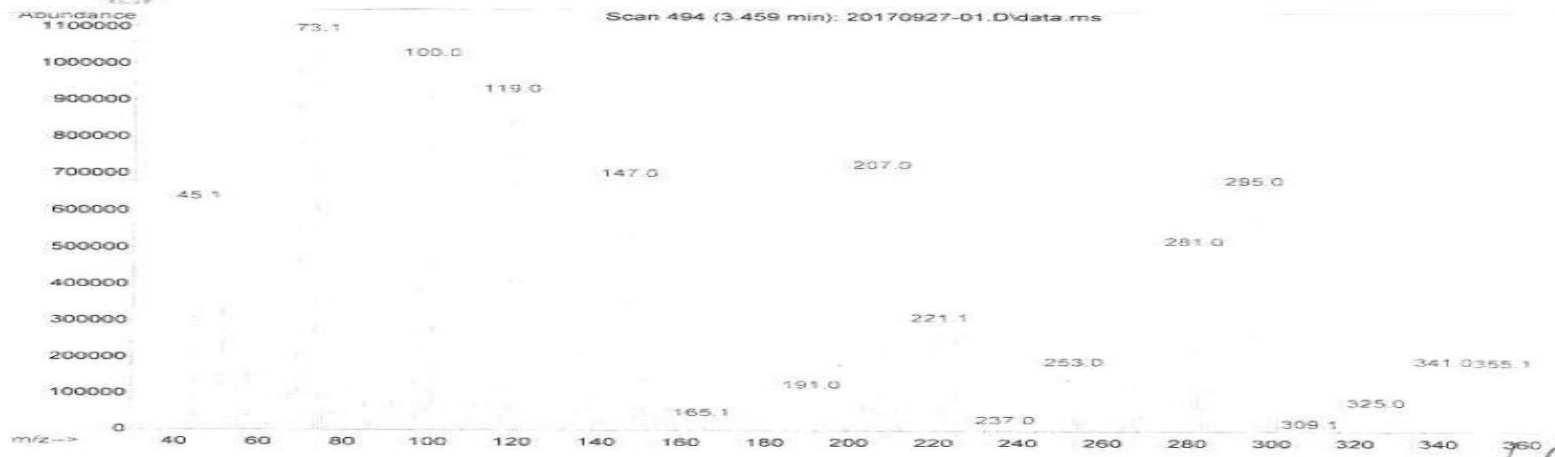
Programma di temperatura: programmata 200°C-320 °C.80°C /min Inlet: 260°C

Modo di acquisizione spettro : SCAN/SIM

Ioni monitorati: (104,118,190) ANF-PFP (118,160,204) MA-PFP (135,162,325)MDA-PFP (135,204,339) MDMA-PFP (135,162,353) MDE-PFP

RISULTATI

Non si evidenziano composti riconducibili ad amfetamine, metamfetamine e affini.





GRAZIE A TUTTI...