

Stato dell'arte delle analisi farmacotossicologiche nei laboratori di tossicologia italiani

Matteo Vidali¹, Fabio Evangelisti², Gianfranco Petriccioni², Isa Mavi Sbarbaro², Paolo Bucchioni²

¹Laboratorio Ricerche Chimico-Cliniche, Ospedale Maggiore della Carità e Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Novara

²Laboratorio di Farmacotossicologia, Ospedale S. Bartolomeo ASL 5 Liguria, Sarzana (SP)

ABSTRACT

State of the art of pharmacotoxicological analyses in Italian toxicology laboratories. Analyses for drug and substance abuse represent a considerable part of the daily workload of pharmacotoxicology laboratories (PL). Lacking specific rules, PL have developed their own analytical drug testing procedures and, in turn, personalized reports and interpretation. In 2013, the SIBioC Toxicology Study Group did a national survey to assess the situation of the Italian PL involved in drug testing. Here data from this survey are reported. The survey included two questionnaires aimed to clarify laboratory procedures used for workplace drug and drug and alcohol on the road, respectively. The variability of qualitative variables was evaluated by the Gini index of heterogeneity. Although a low response rate to the survey (<30 respondents), data clearly showed a high heterogeneity of laboratory procedures, including preanalytical (custody chain, methods of sample collection, sample volumes, sample adulteration check), analytical (instrumentations, methods, cut-offs) and post-analytical aspects (qualitative or quantitative reporting), in some cases even different from procedures required by Italian law, when available. To avoid subjective interpretation, which could lead to different treatments of citizens, an harmonization of analytical procedures used by the Italian PL is mandatory.

INTRODUZIONE

Sebbene la diffusione di nuove molecole psicoattive rappresenti un'importante e crescente sfida per i Laboratori di Tossicologia Clinica, in particolare dal punto di vista analitico, il maggior carico di lavoro per queste strutture rimane l'attività quotidiana di screening e conferma, in differenti matrici biologiche, della presenza di molecole ben conosciute sia da un punto di vista chimico-analitico che metabolico-fisiologico, come oppiacei, cocaina, cannabinoidi, amfetamine, metadone, buprenorfina ed etanolo. Il carico di lavoro analitico e organizzativo relativo a queste sostanze è ulteriormente aumentato a seguito dell'entrata in vigore del provvedimento del 18 settembre 2008 con il quale lo Stato Italiano individua le procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza e di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope nei laboratori che svolgono mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi (1, 2). Pur con alcune limitazioni, tale provvedimento, stabilendo specifiche modalità operative nella raccolta, analisi e

refertazione dei campioni, ha rappresentato un momento importante per il raggiungimento di un'uniformità di procedure, presupposto indispensabile per garantire una standardizzazione procedurale nei vari laboratori. Al contrario, specifiche istruzioni operative non sono ancora disponibili per le analisi volte ad accertare violazioni dell'art. 186 ("Guida sotto l'influenza dell'alcol"), 186-bis ("Guida sotto l'influenza dell'alcol per conducenti di età inferiore a 21 anni, per i neo-patentati e per chi esercita professionalmente l'attività di trasporto di persone o di cose") e 187 del Codice della Strada (CdS) ("Guida in stato di alterazione psico-fisica per uso di sostanze stupefacenti") (3). Tale vuoto legislativo ha portato nel tempo alla realizzazione da parte di società scientifiche o di enti pubblici di linee guida operative sulla base delle attuali conoscenze scientifiche (4-7), che tuttavia non hanno impedito al singolo laboratorio di adottare modalità operative personalizzate ed estremamente eterogenee.

Il Gruppo di Studio (GdS) SIBioC - Medicina di Laboratorio Farmacotossicologia clinica e doping ha preparato, all'inizio del 2013, due questionari diretti ai laboratori italiani che svolgono analisi tossicologiche

Corrispondenza a: Matteo Vidali, Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Via Solaroli 17, 28100 Novara. Tel. 0321660650, Fax 0321620421. E-mail vidali@med.unipmn.it.

Ricevuto: 19.03.2014

Revisionato: 16.04.2014

Accettato: 29.04.2014

nell'ambito della Medicina del Lavoro e dell'accertamento delle violazioni degli art. 186 e 187 del CdS. In particolare, i questionari contenevano domande inerenti le procedure preanalitiche, analitiche e post-analitiche adottate per le analisi di screening e di conferma della presenza di alcol e sostanze stupefacenti in sangue e urina. In questo articolo, vengono presentati i dati raccolti nell'indagine, unitamente ad alcune considerazioni sui risultati ottenuti.

MATERIALI E METODI

Preparazione e diffusione dei questionari

Il primo questionario aveva come oggetto di indagine l'attività di screening e di conferma in matrice urinaria della presenza di sostanze stupefacenti nell'ambito della Medicina del Lavoro, in accordo con le procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza e di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope nei lavoratori che svolgono mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi. Il questionario, redatto su piattaforma Microsoft Office Excel, era organizzato in tre sezioni: 1) dati generali (scheda anagrafica, modalità relative alla raccolta dei campioni, catena di custodia, valutazione di idoneità dei campioni, gestione di CQI e VEQ); 2) attività di screening: per ogni classe di sostanze stupefacenti (oppiacei, cocaina, amfetamine, metadone, cannabinoidi e buprenorfina) l'utilizzatore doveva specificare metodo analitico, strumento, cut-off, unità di misura, tipo di refertazione (quali- o quantitativa), uso di CQI ed eventuale adesione a programmi di VEQ; 3) attività di conferma: per ogni molecola ricercata [morfina, monoacetilmorfina, codeina, cocaina, benzoilecgonina, amfetamina, metamfetamina, 3,4-metilendiossiamfetamina (MDA), 3,4-metilendiossietilamfetamina (MDEA), N-metil-3,4-metilendiossifenil-2-butanamina (MBDB), 3,4-metilendiossimetilamfetamina (MDMA), metadone, 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP), acido 11-nor-delta-9-tetraidrocannabinolo-9-carbossilico (THC-COOH), delta-9-tetraidrocannabinolo (THC), buprenorfina e norbuprenorfina] l'utilizzatore doveva indicare le stesse informazioni richieste al punto precedente.

Il secondo questionario, strutturato come il primo, aveva come oggetto di indagine l'attività di screening e di conferma in matrice urinaria ed ematica della presenza di sostanze stupefacenti nell'ambito degli accertamenti richiesti dalle Forze dell'Ordine per la violazione degli art. 186 e 187 del CdS.

A febbraio 2013 un invito scritto a compilare i questionari è stato inviato tramite posta elettronica a tutti i soci SIBioC.

Analisi dei dati

I questionari compilati sono stati raccolti nell'arco temporale di 6 mesi e la loro analisi, dopo aver reso anonimi i dati, è stata condotta utilizzando il software

statistico SPSS (SPSS Inc.). Le variabili qualitative sono state descritte tramite frequenze assolute e/o percentuali. La variabilità (mutabilità) statistica delle variabili qualitative è stata valutata utilizzando l'indice di eterogeneità di Gini, calcolato come: $I=1-\sum f_i^2$, dove f_i^2 rappresenta le frequenze relative delle k , modalità della variabile qualitativa considerata (8). L'indice I è stato quindi normalizzato per il suo valore massimo pari a $(k-1)/k$ (8). In presenza di minima eterogeneità (massima omogeneità) l'indice I normalizzato assume valore pari a 0 (cioè i dati sono tutti distribuiti su una modalità che ha frequenza pari al 100%), mentre in presenza di massima eterogeneità (minima omogeneità) l'indice I normalizzato assume valore pari a 1 (cioè tutte le modalità della variabile qualitativa hanno uguale frequenza) (8).

RISULTATI

Questionario "Medicina del Lavoro"

Al questionario relativo alla Medicina del Lavoro hanno risposto 24 laboratori pubblici e 4 privati. La distribuzione dei laboratori per regione è riportata nella Tabella 1. In considerazione della bassa adesione, e quindi della limitata rappresentatività, dei laboratori privati, la successiva analisi ha riguardato unicamente i laboratori pubblici.

Dei 24 laboratori pubblici, 23 hanno dichiarato di effettuare analisi di screening, mentre 12 anche analisi di conferma (un laboratorio non ha fornito risposta a questa domanda).

Per la catena di custodia, 16 laboratori pubblici hanno indicato il fornitore (9 fornitori differenti, $I=0,90$), 22 laboratori hanno riportato l'utilizzo, rispettivamente, di 2 ($n=1$), 3 ($n=20$) e 6 ($n=1$) aliquote ($I=0,25$), con un volume di campione per aliquota pari a 8 mL ($n=1$), 10 mL ($n=10$), 20 mL ($n=9$), 30 mL ($n=1$) o 30-50 mL ($n=1$) ($I=0,77$). In totale, le risposte non date sono state 8 per la domanda relativa ai fornitori, due per il numero e due per il volume delle aliquote.

Relativamente alle modalità di raccolta, 4 laboratori utilizzavano un vetro a specchio, 5 una telecamera, mentre 18 raccoglievano il campione sotto osservazione diretta. 4 laboratori, che non osservavano direttamente il paziente durante la produzione del campione, hanno dichiarato di utilizzare la telecamera ($n=3$) o la combinazione telecamera e specchio ($n=1$). In totale, le risposte non date sono state 3 per la domanda relativa all'uso del vetro a specchio, due per la telecamera e due per l'osservazione diretta.

Tutti i 24 laboratori pubblici utilizzavano la concentrazione della creatinina urinaria per valutare l'idoneità del campione; inoltre, 11 utilizzavano il parametro temperatura, 6 il peso specifico (due risposte non date), 8 il pH (due risposte non date) e 4 la presenza di eventuali interferenti (3 risposte non date).

Le risposte relative all'uso di CQI (screening: $n=22$, conferma: $n=11$) e partecipazione a VEQ (screening: $n=22$, conferma: $n=13$) sono riportate nella Tabella 2. L'indice I evidenzia un'elevata eterogeneità per il

Tabella 1

Distribuzione regionale dei laboratori pubblici e privati che hanno risposto al questionario relativo alle analisi di screening e conferma in matrice urinaria per la Medicina del Lavoro

Frequenza	Laboratori pubblici (n=24)	Laboratori privati (n=4)
4	Piemonte	-
3	Liguria, Veneto	-
2	Toscana	Toscana
1	Abruzzo, Calabria, Campania, Emilia Romagna, Lazio, Lombardia, Marche, Sardegna, Sicilia, Trentino Alto Adige, Umbria, Valle d'Aosta	Lombardia, Marche

Tabella 2

Risposte dei laboratori pubblici relative all'utilizzo di CQI e partecipazione a VEQ per le analisi di screening e di conferma in matrice urinaria relative alla Medicina del Lavoro

	CQI screening	VEQ screening
Fornitori	22 risposte (8 fornitori differenti) (I=0,81) Bio-Rad (11/22) 2 risposte non date	22 risposte (7 fornitori differenti) (I=0,67) Careggi (14/22) 2 risposte non date
Livelli	1 (n=2), 2 (n=17), 3 (n=3) (I=0,56) 2 risposte non date	1 (n=13), 2 (n=1), 3 (n=5), 5 (n=1) (I=0,68) 2 risposte non date
Cadenza	"A seduta" (n=8), "quotidiana" (n=12), "2/giorno" (n=1), "ogni 8 ore" (n=1) (I=0,75) 2 risposte non date	"Mensile" (n=11), "2 mesi" (n=1), "3 mesi" (n=8), "4 mesi" (n=1), "6 mesi" (n=1) (I=0,76) 2 risposte non date
	CQI conferma	VEQ conferma
Fornitori	11 risposte (6 fornitori differenti) (I=0,93) 13 risposte non date	13 risposte (6 fornitori differenti) (I=0,80) Careggi (7/13) 11 risposte non date
Livelli	1 (n=6), 2 (n=2), 3 (n=2) (I=0,84) 14 risposte non date	1 (n=7), 2 (n=1), 3 (n=3) (I=0,77) 13 risposte non date
Cadenza	"A seduta" (n=9), "quotidiana" (n=2) (I=0,60) 13 risposte non date	"Mensile" (n=6), "3 mesi" (n=5), "6 mesi" (n=1) (I=0,85) 12 risposte non date

fornitore, la cadenza e i livelli dei controlli utilizzati sia per le analisi di screening che di conferma. Tuttavia, la maggior parte dei laboratori intervistati si avvale dello stesso fornitore per CQI (Bio-Rad Laboratories, Liquichek Urine Toxicology) e per VEQ (Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze, VEQ Droghe, S.O.D. Sicurezza e Qualità).

Per le analisi di screening i laboratori intervistati utilizzano 7 metodi analitici differenti (I=0,92), tra cui immunodosaggio con donatore di enzima clonato ["cloned enzyme donor immunoassay" (CEDIA)] (n=3), saggio con interazione cinetica di microparticelle in soluzione ["kinetic interaction of microparticles in solution" (KIMS)] (n=5), immunodosaggio in chemiluminescenza ["chemiluminescence immunoassay" (CLIA)] (n=1), immunodosaggio con fluorescenza a luce polarizzata ["fluorescence polarization immunoassay", (FPIA)] (n=1), immunodosaggio dell'enzima moltiplicato ["enzyme multiplied immunoassay technique" (EMIT)] (n=8) e altri saggi immunoenzimatici non meglio specificati (EIA) (n=2), implementati su 17 strumentazioni differenti. Per lo screening della buprenorfina vengono inoltre utilizzati il

metodo Diagnostic Reagents Inc. (n=2) e kit su micropiastra (n=1).

Per le analisi di conferma, i laboratori utilizzano metodi sviluppati in proprio in gas cromatografia accoppiata a un rivelatore di massa (GC-MS) o in cromatografia liquida accoppiata a un rivelatore di massa (LC-MS/MS).

Sia per le analisi di screening che per quelle di conferma si è rilevata inoltre un'elevata eterogeneità di cut-off e modalità di refertazione (qualitativo/quantitativo) utilizzati (Tabella 3).

Questionario "Art. 186 e 187 CdS"

Al questionario relativo alle violazioni degli art. 186 e 187 del CdS hanno risposto 21 laboratori pubblici e un laboratorio privato per le analisi in matrice urinaria (sostanze stupefacenti) e 12 laboratori pubblici e un laboratorio privato per le analisi in matrice ematica (sostanze stupefacenti ed etanolo). La distribuzione dei laboratori per regione è riportata nella Tabella 4. In considerazione della bassa adesione, e quindi della limitata rappresentatività, dei laboratori privati, l'analisi ha riguardato unicamente i laboratori pubblici.

Per le analisi in matrice urinaria, tutti i 21 laboratori pubblici hanno dichiarato di effettuare analisi di screening, mentre solo 11 effettuavano analisi di conferma.

I dati relativi alla catena di custodia (fornitori e aliquote), all'idoneità della raccolta (osservazione del paziente), all'idoneità del campione (creatinina urinaria e adulteranti) e ai metodi analitici (screening e conferma) sono risultati sostanzialmente sovrapponibili a quelli raccolti nel questionario della Medicina del Lavoro, confermando un'elevata eterogeneità di procedure dei laboratori. Similmente, anche i dati relativi al CQI e alla partecipazione a VEQ non differivano significativamente dai precedenti, evidenziando, nonostante l'elevata eterogeneità, una preferenza dei laboratori intervistati per Bio-Rad (9/21 per CQI uso screening) e Careggi (12/21 e 6/11 per VEQ, rispettivamente, uso screening e conferma).

Come in precedenza, sia per le analisi di screening che per quelle di conferma in matrice urinaria si è rilevata

un'elevata eterogeneità di cut-off e modalità di refertazione (qualitativo/quantitativo) utilizzati (Tabella 5).

Per le analisi (solo conferma) in matrice ematica per le violazioni del CdS art. 187 (sostanze stupefacenti), i laboratori hanno riferito di utilizzare metodi sviluppati in proprio su strumentazioni GC-MS e LC-MS/MS. Circa un terzo (per alcuni analiti la metà) dei 12 laboratori che effettuano analisi di conferma con questa finalità non ha risposto alla domanda relativa al metodo/strumentazione utilizzati. La Tabella 6 riporta cut-off e modalità di refertazione per i singoli analiti, con l'indicazione dell'effettuazione di CQI ed eventuale partecipazione a programmi di VEQ. Dalla tabella è evidente come circa la metà dei laboratori non ha risposto a queste domande specifiche.

Infine, la Tabella 7 riporta le risposte ottenute dai laboratori per le analisi (screening e conferma) in matrice ematica per le violazioni del CdS art. 186 (alcol).

Tabella 3

Risposte dei laboratori pubblici relative ai cut-off e alle modalità di refertazione impiegati per le analisi di screening e di conferma in matrice urinaria relative alla Medicina del Lavoro

Analita (cut-off normativa)	Cut-off*	Modalità di refertazione*
<i>Analisi di screening</i>		
Oppiacei (300 µg/L)	300 (24)	qual (19); quant (2); qual/quant (1)
Cocaina (300 µg/L)	300 (22); 1000 (1); 30 (1)	qual (20); quant (1); qual/quant (1)
Amfetamina (500 µg/L)	1000 (7); 500 (16); 250 (1)	qual (20); quant (1); qual/quant (1)
Metadone (300 µg/L)	300 (23); 50 (1)	qual (19); quant (2); qual/quant (1)
Cannabinoidi (50 µg/L)	50 (23); 300 (1)	qual (20); quant (1); qual/quant (1)
Buprenorfina (5 µg/L)	10 (5); 5 (9)	qual (11); qual/quant (1)
<i>Analisi di conferma</i>		
Morfina (100 µg/L)	100 (12); 50 (1)	qual (5); quant (8)
Monoacetilmorfina (100 µg/L)	100 (7); 200 (1); 50 (1); 10 (3)	qual (4); quant (8)
Codeina (100 µg/L)	100 (11); 200 (1); 50 (1)	qual (4); quant (9)
Cocaina (100 µg/L)	100 (4)	qual (1); quant (3)
Benzoilecgonina (100 µg/L)	100 (11); 50 (2)	qual (4); quant (9)
Amfetamina (250 µg/L)	250 (9); 200 (3); 50 (1)	qual (4); quant (9)
Metamfetamina (250 µg/L)	250 (9); 200 (3); 50 (1)	qual (4); quant (9)
MDA (250 µg/L)	250 (8); 200 (3); 50 (1)	qual (3); quant (9)
MDEA (250 µg/L)	250 (8); 200 (3)	qual (3); quant (8)
MBDB (250 µg/L)	250 (3); 200 (3)	qual (3); quant (3)
MDMA (250 µg/L)	250 (8); 200 (2); 100 (1); 50 (2)	qual (3); quant (9)
Metadone (100 µg/L)	100 (11); 50 (1)	qual (4); quant (9)
EDDP (100 µg/L)	100 (12); 50 (1)	qual (4); quant (9)
THC-COOH (50 µg/L)	15 (12); 11 (1)	qual (4); quant (9)
Buprenorfina (5 µg/L)	5 (8); 10 (1); 1 (1)	qual (3); quant (7)
Norbuprenorfina (5 µg/L)	5 (7); 10 (1)	qual (3); quant (5)

Per il significato delle abbreviazioni vedi "Materiali e metodi".

**Tra parentesi il numero dei laboratori.*

Tabella 4

Distribuzione regionale dei laboratori pubblici e privati che hanno risposto al questionario relativo alle analisi di screening e conferma in matrice urinaria ed ematica per le violazioni del Codice della Strada (art. 186 e 187)

Analisi in matrice urinaria (sostanze stupefacenti)		
Frequenza	Laboratori pubblici (n=21)	Laboratori privati (n=1)
4	Liguria, Piemonte	-
2	Campania, Toscana	-
1	Abruzzo, Calabria, Emilia Romagna, Lazio, Lombardia, Marche, Sardegna, Trentino Alto Adige, Valle d'Aosta	Toscana
Analisi in matrice ematica (sostanze stupefacenti e alcol)		
Frequenza	Laboratori pubblici (n=12)	Laboratori privati (n=1)
4	Liguria	-
2	Piemonte	-
1	Emilia Romagna, Lazio, Lombardia, Marche, Sardegna, Trentino Alto Adige	Toscana

Tabella 5

Risposte dei laboratori pubblici relative ai cut-off e alle modalità di refertazione impiegati per le analisi di screening e di conferma in matrice urinaria per le violazioni dell'art.187 del Codice della Strada

Analita (cut-off normativa)	Cut-off*	Modalità di refertazione*
<i>Analisi di screening</i>		
Oppiacei (300 µg/L)	300 (21)	qual (16); quant (2); qual/quant (1)
Cocaina (300 µg/L)	300 (20); 30 (1)	qual (17); quant (1); qual/quant (1)
Anfetamina (500 µg/L)	1000 (12); 500 (9)	qual (17); quant (1); qual/quant (1)
Metadone (300 µg/L)	300 (19); 250 (1); 100 (1)	qual (16); quant (2); qual/quant (1)
Cannabinoidi (50 µg/L)	50 (21)	qual (17); quant (1); qual/quant (1)
Buprenorfina (5 µg/L)	10 (3); 5 (13)	qual (12); quant (1); qual/quant (1)
<i>Analisi di conferma</i>		
Morfina (100 µg/L)	200 (3); 100 (5); 50 (2); 30 (1)	qual (5); quant (6)
Monoacetilmorfina (100µg/L)	200 (2); 100 (3); 50 (2); 20 (1); 10 (2); 8 (1)	qual (4); quant (7)
Codeina (100 µg/L)	200 (3); 100 (5); 50 (2); 30 (1)	qual (4); quant (7)
Cocaina (100 µg/L)	150 (1); 100 (2); 50 (2)	qual (1); quant (4)
Benzoilecgonina (100 µg/L)	150 (2); 100 (5); 50 (3); 30 (1)	qual (4); quant (7)
Amfetamina (250 µg/L)	250 (3); 200 (6); 150 (1); 50 (1)	qual (4); quant (7)
Metamfetamina (250 µg/L)	250 (3); 200 (4); 50 (3); 25 (1)	qual (4); quant (7)
MDA (250 µg/L)	250 (2); 200 (4); 50 (4)	qual (3); quant (7)
MDEA (250 µg/L)	250 (2); 200 (6); 50 (1)	qual (3); quant (6)
MBDB (250 µg/L)	200 (4)	qual (3); quant (1)
MDMA (250 µg/L)	250 (3); 200 (4); 150 (1); 50 (3)	qual (4); quant (7)
Metadone (100 µg/L)	100 (8); 50 (2); 20 (1)	qual (4); quant (7)
EDDP (100 µg/L)	100 (8); 50 (2); 30 (1)	qual (4); quant (7)
THC-COOH (15 µg/L)	15 (9); 11 (1); 3 (1)	qual (4); quant (7)
Buprenorfina (5 µg/L)	5 (7); 6 (1); 1 (1)	qual (4); quant (5)
Norbuprenorfina (5 µg/L)	5 (6)	qual (3); quant (3)

Per il significato delle abbreviazioni vedi "Materiali e metodi".

**Tra parentesi il numero dei laboratori.*

Tabella 6

Risposte dei laboratori pubblici relative alle analisi di conferma in matrice ematica per le violazioni dell'art. 187 del Codice della Strada

Analita	Cut-off* ($\mu\text{g/L}$)	Modalità di refertazione*	CQI*	VEQ*
Morfina	10 (5)	qual (3); quant (4)	Si (6)	Si (3); No (1)
Monoacetilmorfina	10 (6)	qual (3); quant (5)	Si (7)	Si (3); No (2)
Codeina	10 (6)	qual (3); quant (5)	Si (7)	Si (3); No (2)
Cocaina	10 (6)	qual (3); quant (5)	Si (7)	Si (3); No (2)
Benzoilecgonina	50 (1); 10 (3)	qual (3); quant (3)	Si (5)	Si (3); No (1)
Amfetamina	50 (1); 20 (2); 10 (2)	qual (3); quant (4)	Si (6)	Si (3); No (1)
Metamfetamina	50 (1); 20 (2); 10 (2)	qual (3); quant (4)	Si (6)	Si (3); No (1)
MDA	50 (1); 20 (3)	qual (3); quant (3)	Si (5)	Si (2); No (1)
MDEA	50 (1); 20 (3)	qual (3); quant (3)	Si (5)	Si (2); No (1)
MBDB	50 (1); 20 (2)	qual (3); quant (1)	Si (3)	Si (2)
MDMA	50 (1); 20 (3); 10 (1)	qual (3); quant (1)	Si (3)	Si (2)
Metadone	10 (5); 5 (1)	qual (3); quant (5)	Si (7)	Si (3); No (2)
EDDP	20 (1); 10 (2); 5 (1)	qual (3); quant (3)	Si (6)	Si (3); No (2)
THC	5 (1); 2 (5)	qual (3); quant (5)	Si (7)	Si (3); No (2)
THC-COOH	10 (1); 2 (2); 1 (1)	qual (3); quant (3)	Si (6)	Si (3); No (2)
Buprenorfina	10 (1); 5 (1)	qual (2)	Si (2)	Si (2)
Norbuprenorfina	20 (1); 5 (1)	qual (2)	Si (2)	Si (2)

Per il significato delle abbreviazioni vedi "Materiali e metodi".

*Tra parentesi il numero dei laboratori.

Tabella 7

Risposte dei laboratori pubblici relative alle analisi di screening e conferma in matrice ematica per le violazioni dell'art. 186 del Codice della Strada (alcol)

Metodo*	Cut-off* (g/L)	Refertazione*	CQI*	VEQ*
<i>Analisi di screening</i>				
Alcol deidrogenasi (5) "Dry chemistry" (1)	0,0 (1); 0,5 (5)	quant (7)	Si (7)	Si (6); No (1)
<i>Analisi di conferma</i>				
GC-MS o GC-FID con spazio di testa (9)	0,0 (1); 0,1 (1); 0,5 (6)	quant (8)	Si (9)	Si (9)

GC-MS, gas cromatografia-spettrometria di massa; GC-FID, gas cromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma.

*Tra parentesi il numero dei laboratori.

DISCUSSIONE

I dati raccolti attraverso i due questionari consentono di fare alcune considerazioni. Un primo elemento significativo è rappresentato dalla bassa partecipazione dei laboratori sia pubblici che privati. Ciò può dipendere da differenti ragioni: i questionari sono stati proposti da SIBioC unicamente ai propri soci, non raggiungendo quindi i restanti laboratori, con operatori non iscritti alla Società, che effettuano quotidianamente queste analisi. È possibile, inoltre, che alcuni abbiano preferito non rispondere, temendo un controllo da parte di terzi sulla propria attività, in un contesto estremamente critico come quello medico-legale oggetto dei questionari.

Sebbene la bassa adesione limiti la rappresentatività

del campione intervistato, emerge chiaramente un'elevata eterogeneità di comportamenti e procedure, suggerito anche dagli elevati valori dell'indice I. Se è comprensibile, in una logica di libero mercato, il ricorso a numerosi fornitori, non lo è ugualmente l'estrema variabilità nel numero di aliquote e nei volumi riportati dagli utilizzatori, particolarmente se si considera che le modalità di raccolta dei campioni ai fini del monitoraggio dei laboratori adibiti a mansioni a rischio sono rigidamente normate (volume totale ≥ 60 mL in 3 aliquote di almeno 20 mL) (1). Sebbene la quasi totalità dei laboratori intervistati ha dichiarato di raccogliere 3 aliquote, tuttavia meno della metà utilizza aliquote di almeno 20 mL.

Un dato sicuramente positivo è rappresentato dal

fatto che tutti i laboratori sorvegliano il soggetto durante la produzione del campione (osservazione diretta o altro dispositivo) e ugualmente valutano l'idoneità dello stesso, almeno mediante la valutazione della creatinina urinaria (la legge, pur sancendo la necessità di introdurre misure atte a evitare la manomissione del campione, non fornisce invero alcuna indicazione specifica). Parimente apprezzabile è l'osservazione che, sebbene con modalità differenti (cadenza e livelli), tutti i laboratori utilizzano CQI e partecipano a programmi di VEQ sia per l'attività di screening che di conferma. È interessante notare, anche in un campione così limitato, che la maggior parte dei laboratori utilizza lo stesso fornitore, rispettivamente Bio-Rad per CQI e Careggi per i programmi di VEQ.

L'elevato numero di metodi analitici e strumentazioni utilizzate per le analisi di screening di campioni urinari (ben 17 su 24 laboratori intervistati) può invece in parte spiegare le diverse frequenze di falsi positivi riportate in genere dai laboratori.

La maggiore criticità che emerge dal questionario relativo alla Medicina del Lavoro è l'utilizzo, sia per le analisi di screening che per quelle di conferma, di molteplici cut-off di positività, in totale discordanza con quanto espressamente sancito dalla legge (1). In alcuni casi, inoltre, i bassi valori di cut-off dichiarati dal laboratorio portano a ipotizzare un equivoco tra cut-off di positività e limite di quantificazione del metodo analitico e quindi a sospettare che il laboratorio utilizzi, per le analisi di conferma della Medicina del Lavoro, il proprio limite di quantificazione come soglia decisionale di positività al posto del valore stabilito dal legislatore.

Il questionario relativo alle violazioni degli art. 186 e 187 del CdS richiede alcune precisazioni. L'art. 187 del CdS non specifica la matrice biologica o le matrici biologiche che devono essere utilizzate per gli accertamenti (9). La letteratura scientifica indica nella saliva e nel sangue le sole matrici idonee ad accertare uno stato di alterazione psicofisica conseguente all'assunzione di sostanze stupefacenti, sottolineando che l'urina può permettere di constatare unicamente un consumo recente di tali sostanze (9). Tuttavia, l'assenza di specifiche indicazioni da parte del legislatore spiega almeno in parte l'utilizzo ancora diffuso dell'urina per questo tipo di accertamenti e il motivo per il quale anche il questionario proposto conteneva alcune domande relative a questo tipo di indagine.

Relativamente alle analisi di screening e di conferma in matrice urinaria ai fini dell'art. 187 del CdS, i dati sono risultati sostanzialmente sovrapponibili a quelli del questionario della Medicina del Lavoro, evidenziando, anche in questo caso, un'elevata eterogeneità. Questo non sorprende se si considera che la quasi totalità dei laboratori, che hanno dichiarato di effettuare analisi in matrice urinaria per la Medicina del Lavoro, effettua anche analisi in matrice urinaria per accertare violazioni all'art. 187 del CdS, sia per screening che per conferma. È ipotizzabile, infatti, che i laboratori utilizzino procedure simili anche se per accertamenti con finalità differenti.

Dei 12 laboratori che effettuano analisi in matrice

ematica per accertare violazioni all'art. 187 del CdS, un unico laboratorio ha dichiarato di eseguire anche analisi di screening. Questa discrepanza è giustificata dall'attuale ridotta disponibilità di test di screening in matrice ematica (siero, plasma o sangue intero) per droghe d'abuso. Per le analisi di conferma in matrice ematica, più della metà dei laboratori non ha indicato il cut-off, mentre i restanti hanno indicato cut-off differenti. Questa eterogeneità di comportamenti non sorprende: in assenza di indicazioni specifiche del legislatore, alcuni laboratori utilizzano come cut-off valori indicati in letteratura o suggeriti da associazioni scientifiche oppure il proprio limite di quantificazione. Tuttavia, l'utilizzo di differenti cut-off può avere importanti conseguenze, in particolare per quei laboratori che refertano i risultati solo qualitativamente. Un altro dato interessante è rappresentato dal basso numero di laboratori che partecipano a programmi di VEQ, confermando che, contrariamente ai programmi di VEQ per matrice urinaria, quelli per sostanze d'abuso in matrice ematica sono ancora poco diffusi, anche perché è necessario rivolgersi a organizzazioni internazionali.

Una maggiore omogeneità è stata rilevata per le analisi di screening e di conferma per accertare violazioni dell'art. 186 del CdS ("Guida sotto l'influenza dell'alcol"). La maggior parte dei laboratori che hanno risposto al questionario partecipano a programmi di VEQ, utilizzano gli stessi metodi di screening (enzimatico) e di conferma [GC-MS o gas cromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID) con spazio di testa], gli stessi cut-off e le stesse modalità di refertazione quantitativa. Minime discrepanze nei valori di cut-off (0,0 o 0,1 g/L rispetto al più indicato 0,5 g/L) possono essere spiegate ipotizzando che qualche utilizzatore ha indicato il valore teorico decisionale (0,0 g/L) riportato nell'art. 186 bis del CdS. Una limitazione del questionario proposto risiede nel non avere chiesto ai laboratori di specificare in dettaglio l'esatta natura della matrice ematica utilizzata per la valutazione del tasso alcolemico, dato che avrebbe potuto evidenziare una criticità importante in questo tipo di analisi; infatti, la letteratura scientifica è concorde nell'identificare nel sangue intero la matrice di elezione per la valutazione del tasso alcolemico, mentre plasma e siero potrebbero sovrastimare fino al 20% tale valore (9).

Una considerazione merita anche l'elevato numero di risposte mancanti rilevate in entrambi i questionari. Se da un lato è difficile fornire una spiegazione adeguata, soprattutto in considerazione del fatto che molte di queste domande prevedevano risposte binarie (si/no), dall'altro, certamente, l'elevato numero di dati mancanti complica l'analisi delle risposte e, unitamente alla scarsa adesione, limita ulteriormente la rappresentatività del campione.

In conclusione, questo primo censimento, pur evidenziando alcuni aspetti positivi (vigilanza del soggetto durante la produzione del campione, utilizzo condiviso della creatinina urinaria, uso dei controlli di qualità e diffusa partecipazione a programmi di VEQ), ha chiaramente mostrato alcune importanti criticità (numero

e volumi delle aliquote, cut-off), particolarmente nell'ambito delle analisi relative alla Medicina del Lavoro, dove invece esistono specifiche procedure sancite dal legislatore. Al contrario, l'elevata eterogeneità di comportamenti riscontrata per le analisi relative agli accertamenti per la violazione degli art. 186 e 187 del CdS risente certamente dell'attuale vuoto legislativo. In tale situazione, la conoscenza del diritto, la cultura del dato scientifico, la buona pratica di laboratorio e la continua condivisione di esperienze sono presupposti indispensabili per evitare l'anarchia analitica e interpretativa. Questo al fine di garantire equità e omogeneità di giudizio e di trattamento sanzionatorio da parte delle autorità competenti.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori desiderano ringraziare tutti i laboratori che hanno risposto ai questionari proposti. Un sentito ringraziamento va anche al GdS SIBioC - Medicina di Laboratorio Farmacotossicologia clinica e doping e, in particolare, al coordinatore Simona Pichini per il supporto organizzativo e scientifico.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Intesa Conferenza Unificata, seduta del 30 ottobre 2007, ai sensi dell'art. 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131. Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope nei lavoratori. http://www.ecospes.it/_upload/Conferenza_Unificata_30_10_2007_1.pdf
2. Palmi I, Pichini S, Pacifici R. Il decreto attuativo della normativa sulla gestione delle mansioni a rischio. *Ligand Assay* 2009;14:315-9.
3. Codice della Strada, Titolo V - Norme di comportamento (art. 186, 186 bis e 187): <http://www.altalex.com/index.php?idnot=34126#titolo>.
4. Associazione Scientifica "Gruppo Tossicologi Forensi Italiani" (GTFI). 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. *Rev. n. 4, 6/12/2012*. <http://www.droganews.it/pubdownload.php?id=3535&lg=11>.
5. Pichini S, Pacifici R. Reparto Farmacodipendenza, Tossicodipendenza e Doping, Osservatorio Fumo Alcol e Droga, Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità (ISS). Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nelle urine: http://www.iss.it/binary/drog4/cont/Linee_Guida_Urine_xweb.pdf.
6. Pichini S, Pacifici R. Reparto Farmacodipendenza, Tossicodipendenza e Doping, Osservatorio Fumo Alcol e Droga, Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità (ISS). Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella saliva: http://www.iss.it/binary/ofad4/cont/Linee_Guida_Saliva_xweb.pdf.
7. Pichini S, Pacifici R. Reparto Farmacodipendenza, Tossicodipendenza e Doping, Osservatorio Fumo Alcol e Droga, Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità (ISS). Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera: http://www.iss.it/binary/ofad4/cont/Linee_Guida_Capelli_xweb.pdf.
8. Indice di eterogeneità di Gini: http://it.wikipedia.org/wiki/Indice_di_eterogeneit%C3%A0_di_Gini.
9. Pacifici R, Gori P, Martucci L, et al. Considerazioni sulle matrici biologiche idonee alla valutazione dell'"attualità d'uso di sostanze illecite" ai fini degli articoli 186 e 187 del nuovo Codice della Strada. *Biochim Clin* 2014;38:27-31.