

XII CONGRESSO NAZIONALE



**L'INNOVAZIONE E LA PERSONALIZZAZIONE
DEGLI INTERVENTI NELLE DIPENDENZE**
La cultura della cura

BERGAMO | 25-26-27 ottobre 2023
Centro Congressi Giovanni XXIII



Il dialogo con il laboratorista tossicologo sulla valutazione e gestione dei casi border line

Dr. Lorenzo Cerutti
Direttore del Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia
Azienda Socio Sanitaria Territoriale di Lodi
mail: lorenzo.cerutti@asst-lodi.it



Ospedale Maggiore di Lodi
Distretti e Presidi Lodigiani



Le tossicodipendenze oggi

- Fenomeno meno visibile rispetto al passato
- Evolvono con le nuove generazioni
- Nuove Sostanze Psicoattive (NSP)
- Screening tossicologici inadeguati



Urgente necessità di cambiamento
nell'analisi tossicologica e nel
monitoraggio delle tossicodipendenze

Gestione del campione biologico

Matrici biologiche e finalità diagnostiche secondo GTFI*

Es. Accertamento di idoneità al lavoro (Medicina del Lavoro)

- **Urina** → consumo recente di SSP (ore - giorni)



Es. Monitoraggio settimanale di pazienti in cura (SerT, carcere, comunità di recupero)

- **Sangue** e **fluido orale** → attualità d'uso di SSP con sussistenza degli effetti



Es. Accertamento di guida sotto l'effetto di SSP

- **Capello** → stato di assuntore cronico o di uso/abuso pregresso (9 - 18 mesi)



Es. Diagnosi di tossicodipendenza

Gestione del campione biologico

Raccolta del campione

- Cadenza periodica
- **Ser.T.**
- Strutture convenzionate



Catena di Custodia

- **Autenticità** e **tracciabilità** del campione
- Sigillo intatto
- Documentazione corretta
- 2 provetta per l'analisi
- 1 provetta come controanalisi



Conservazione pre e post-analitica

- Conservazione durante il trasporto
- Analisi entro 24h → +2/+8°C
- Analisi dopo 24h e controanalisi → -18/-22°C
- Conservazione fino alla produzione del referto
- Conservazione per almeno un anno della controanalisi

-Sistema Socio Sanitario



Ospedale Maggiore di Lodi
Distretti e Presidi Lodigiani



Regione
Lombardia

ASST Lodi

IL DIALOGO CON IL LABORATORISTA TOSSICOLOGO SULLA VALUTAZIONE E GESTIONE DEI CASI BORDERLINE

Gestione del campione biologico

Campioni senza valenza medico-legale

 Catena di custodia

- **Solo** analisi di screening
- Risultato di tipo presuntivo (POS/NEG)

Campioni a valenza medico-legale

 Catena di custodia

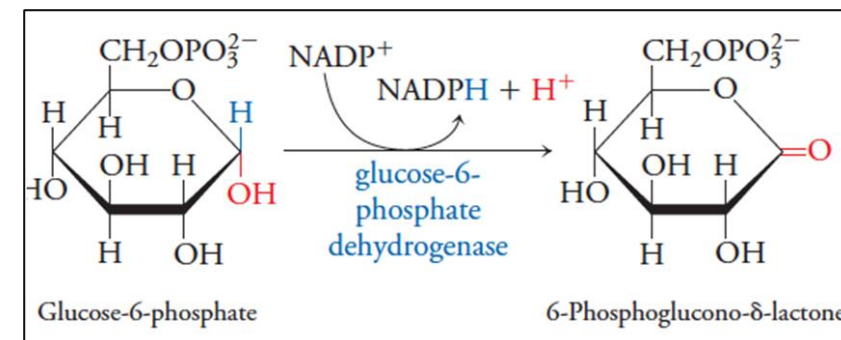
- Analisi di screening
- Se positivi → **necessariamente** analisi di conferma

1. Analisi di screening

- **Saggio immuno-enzimatico EMIT** (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique)
- Competizione tra il farmaco e l'antigene coniugato a G6PDH
- Misurazione indiretta della concentrazione di farmaco
- Attività enzimatica proporzionale alla concentrazione
- Risultato quantitativo **«presuntivo»** espresso in base al **cut-off** stabilito a livello normativo
- Importanza della **creatinina urinaria** (> 20 mg/dL)



Analita o classe di analiti	U.M.	Cut-off	Risultato
Amfetamine	ng/mL	500	< 500: neg; > 500 pos
Buprenorfina	ng/mL	5.0	< 5.0: neg; > 5.0 pos
Cannabinoidi	ng/mL	50	< 50: neg; > 50 pos
Cocaina	ng/mL	300	< 300: neg; > 300 pos
Metadone	ng/mL	300	< 300: neg; > 300 pos
Oppiacei	ng/mL	300	< 300: neg; > 300 pos



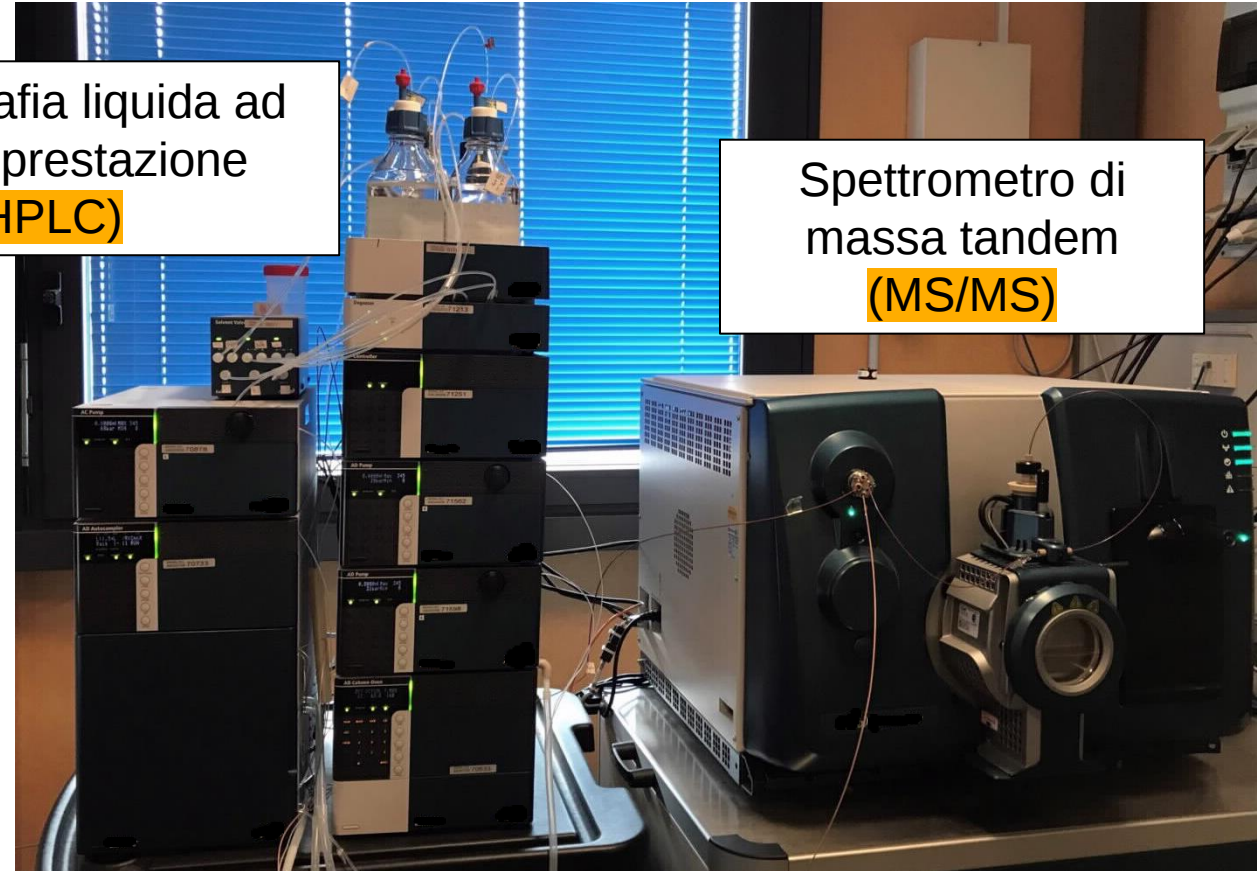
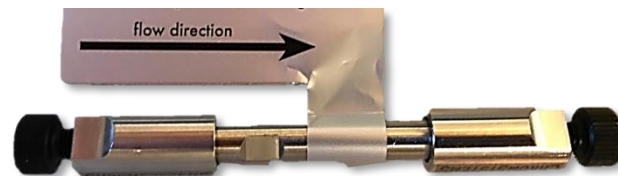
2. Analisi di conferma

- Sistema LC-MS/MS
- Selettività e sensibilità superiori
- Validità medico-legale

Cromatografia liquida ad
ultra alta prestazione
(UHPLC)

Spettrometro di
massa tandem
(MS/MS)

Colonna cromatografica



Ospedale Maggiore di Lodi
Distretti e Presidi Lodigiani



Regione
Lombardia
ASST Lodi

IL DIALOGO CON IL LABORATORISTA TOSSICOLOGO SULLA VALUTAZIONE E GESTIONE DEI CASI BORDERLINE

Analisi di conferma: procedura preparativa dei campioni

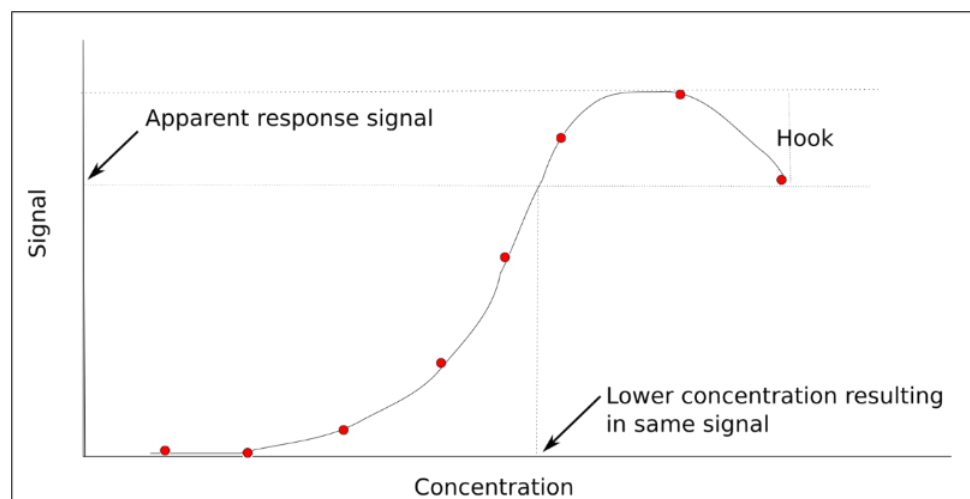
1. Aggiunta dello **standard interno**  a tutti i campioni, compresi i calibratori (S), i controlli (C) e il controllo di idrolisi.
2. **Idrolisi** degli analiti da parte dell'**enzima β -Glucoronidasi**  in un tempo di incubazione di 2 ore a 45°C.
3. Separazione delle sostanze di disturbo mediante **precipitazione** con il buffer di precipitazione.
4. **Diluizione** dei surnatanti con il buffer di diluizione.

Identificazione di 108
sostanze d'abuso in un'unica
corsa di 15 minuti



Effetto prozona nel dosaggio immunoenzimatico EMIT

- **Eccesso di farmaco** nel campione → risultato (falso) negativo
- Nell'analisi di conferma → risultato fortemente positivo



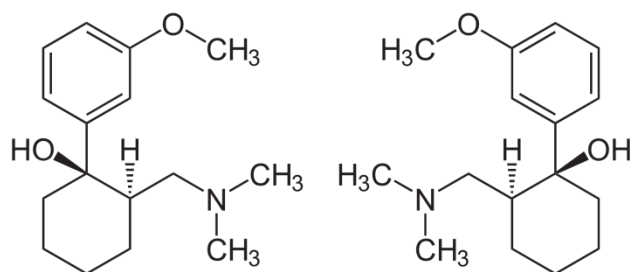
Il **rapporto stechiometrico tra antigeni e anticorpi** non è bilanciato e la formazione del “reticolo” di immuno-complessi è impedita (cross-linking)

La rilevazione del segnale
subisce un decremento



Tramadolo: la «droga del combattente»

- **Farmaco analgesico** con forte potere tossicomaniogeno
- Classe degli **oppiacei sintetici**
- **Due enantiomeri** gli conferiscono una peculiarità farmacodinamica:



1. [effetto antidolorifico](#) → enant. (+) lega i recettori μ di percezione del dolore
2. [effetto antidepressivo](#) → enant. (+) inibisce re-uptake di serotonina
3. [effetto «booster» di energia](#) → enant. (-) inibisce re-uptake di noradrenalina



Ospedale Maggiore di Lodi
Distretti e Presidi Lodigiani



Regione
Lombardia

ASST Lodi

IL DIALOGO CON IL LABORATORISTA TOSSICOLOGO SULLA VALUTAZIONE E GESTIONE DEI CASI BORDERLINE

Paziente H. A. età: 20 anni, in cura presso il Ser.D. di Lodi.

Il paziente **ha dichiarato** di aver assunto Tramadolo prima della raccolta delle urine.

Il Ser.D. richiede la **ricerca** e il **dosaggio del Tramadolo** per delineare un programma terapeutico.



1. Analisi di screening

Diluizione campione	Conc. Oppiacei (ng/mL)	Conc. Creatinina urinaria (mg/dL)
1:1	82	171.7

?

Il campione è risultato **negativo** per gli Oppiacei con una concentrazione rilevata inferiore al cut-off di 300 ng/mL...

2. Analisi di conferma

Diluizione campione	Conc. Tramadolo calcolata con il Quantifier (ng/mL)	Ion ratio
1:1	40189.77	0.9890

... ma ha mostrato una forte **positività** al Tramadolo nell'analisi di conferma, andando **fuori dalla linearità**...



Ospedale Maggiore di Lodi
Distretti e Presidi Lodigiani



Regione
Lombardia
ASST Lodi

IL DIALOGO CON IL LABORATORISTA TOSSICOLOGO SULLA VALUTAZIONE E GESTIONE DEI CASI BORDERLINE

Diluizioni seriali

Il campione di urina in esame è stato sottoposto a **diluizioni seriali con soluzione fisiologica.**



- Per diminuire la concentrazione del farmaco ed eliminare l'effetto prozona nello screening
- Per rientrare nella linearità nel test di conferma



Risultati dello screening

Campione n.1

Diluizione campione	Conc. Oppiacei (ng/mL)	Conc. Creatinina urinaria (mg/dL)
1:1	82	171.7
1:200	1832	156.4
1:500	4097	135.9

L'andamento delle concentrazioni di Oppiacei è crescente all'aumentare delle diluizioni.

Il farmaco è presente in elevate quantità (>4000 ng/mL) ma non viene correttamente rilevato dallo strumento a causa dell'effetto prozona.

Campione n.2 (raccolto dopo 1 settimana)

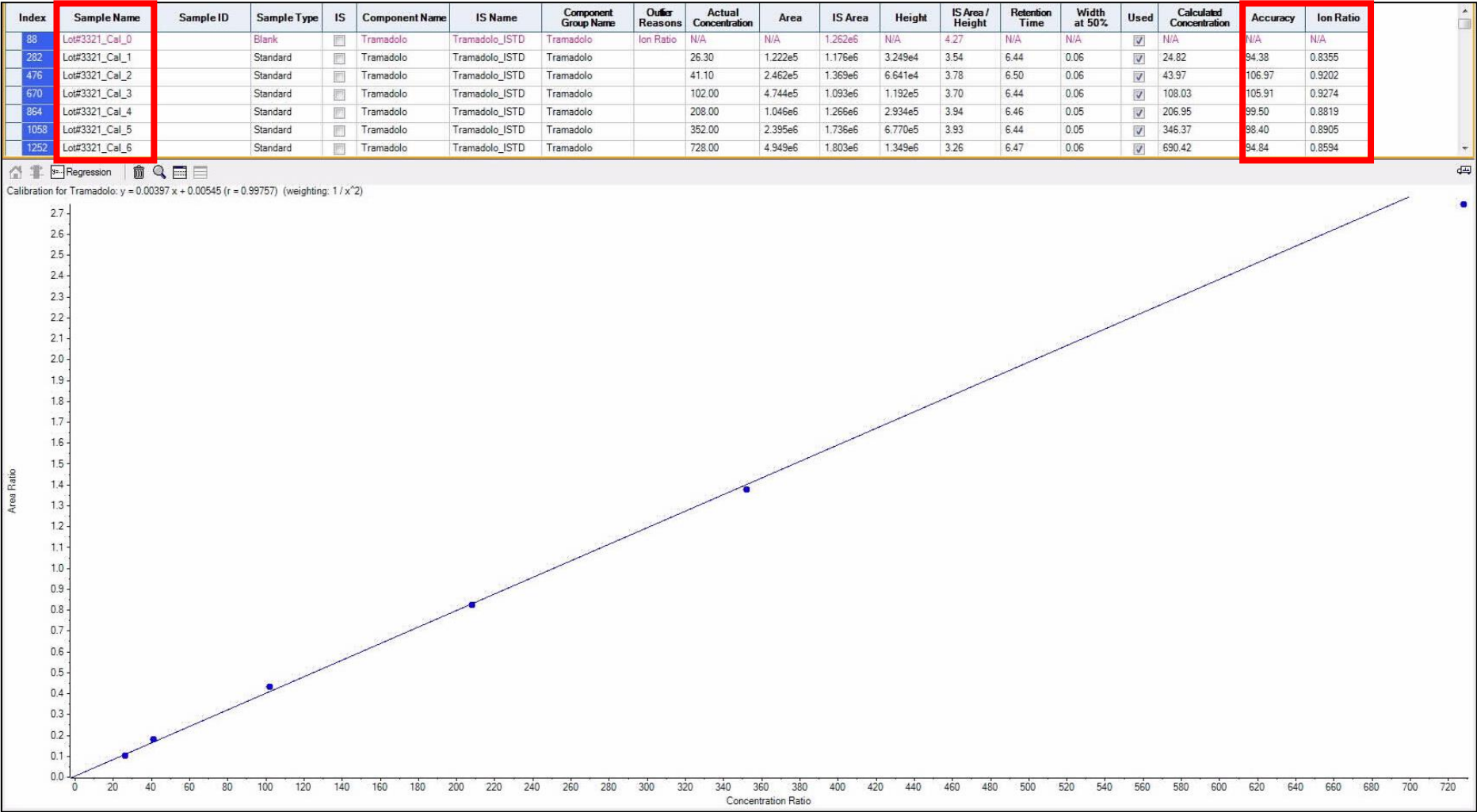
Diluizione campione	Conc. Oppiacei (ng/mL)	Conc. Creatinina urinaria (mg/dL)
1:1	-	23.6
1:10	-	20.1
1:50	-	17.4
1:100	253	17.8

Non è stato rilevato il farmaco nel campione intero e nelle diluizioni ad eccezione della diluizione 1:100 in cui è stata rilevata una concentrazione di Oppiacei inferiore al cut-off.



La costruzione di una **retta di calibrazione del Tramadolo** ha permesso la calibrazione dello strumento LC-MS/MS e ha dimostrato la **relazione lineare** che intercorre tra la concentrazione dell'analita (ng/mL) e l'area ottenuta dall'integrazione del picco cromatografico.

Coefficiente di correlazione lineare
 $r^2 = 0.99515$

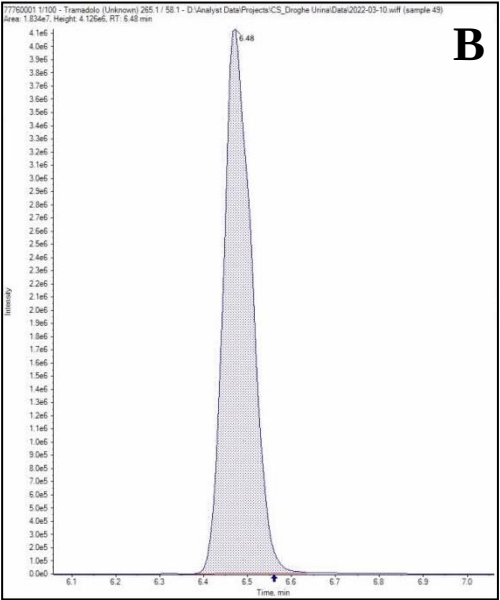
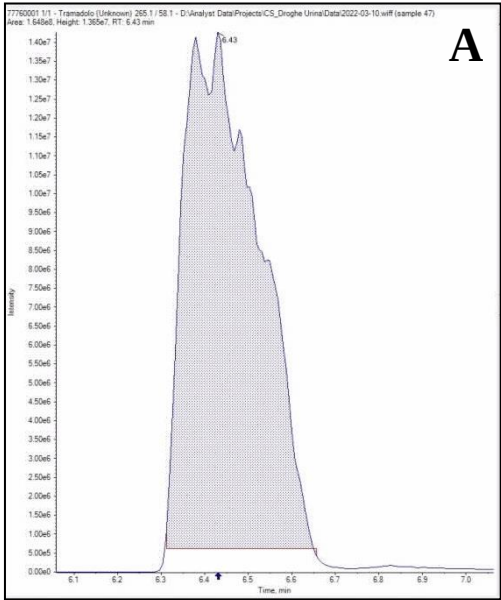


Risultati della conferma in LC-MS/MS

- I tempi di ritenzione e i valori di ion ratio sono pressoché costanti.
- L'elevata concentrazione di farmaco, nel campione n.1 intero e diluito, ricade fuori dalla linearità.
- I cromatogrammi mostrano picchi allargati per i campioni interi e via via picchi più vicini alla gaussiana per l'urina diluita.

Campione n.1

Diluizione campione	Conc. Tramadolo calcolata con il Quantifier (ng/mL)	Conc. Tramadolo applicando la diluizione (ng/mL)	Ion ratio
1:1	40'189.77	40'189.77	0.9890
1:50	4'067.53	203'376.50	0.8577
1:100	2'734.31	273'431.00	0.8655



Campione n.2

Diluizione campione	Conc. Tramadolo calcolata con il Quantifier (ng/mL)	Conc. Tramadolo applicando la diluizione (ng/mL)	Ion ratio
1:1	58.01	58.01	0.9171
1:50	5.12	256.00	0.8956
1:100	1.89	189.00	0.9177

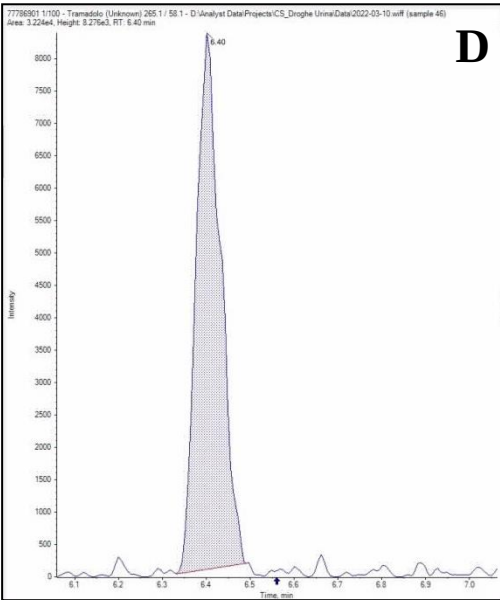
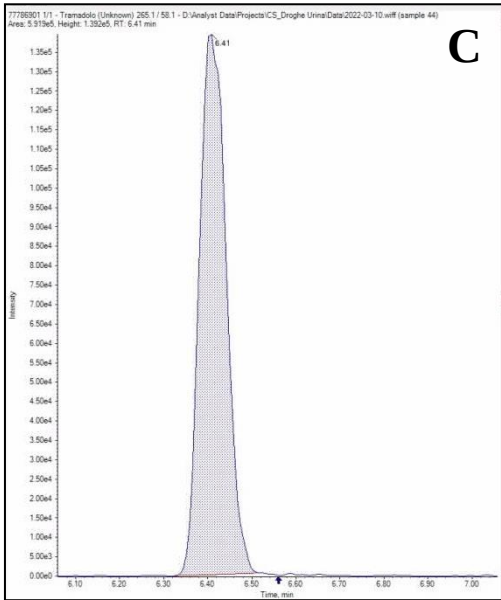


Fig. A e B campione n.1 intero e diluito 1:100;
Fig. C e D campione n.2 intero e diluito 1:100



Ospedale Maggiore di Lodi
Distretti e Presidi Lodigiani

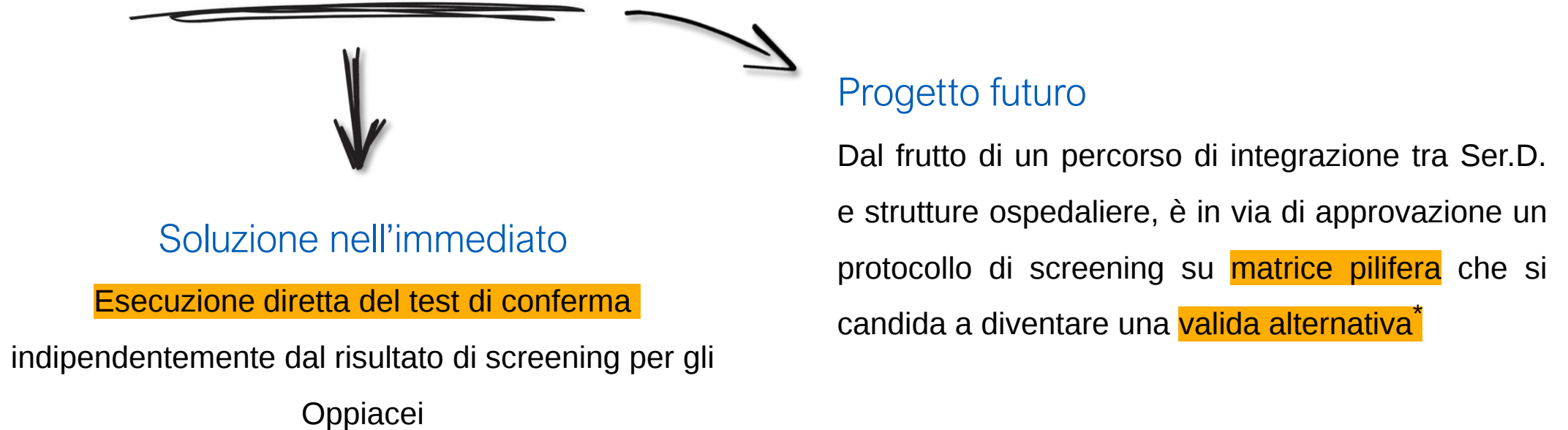


Regione
Lombardia
ASST Lodi

IL DIALOGO CON IL LABORATORISTA TOSSICOLOGO SULLA VALUTAZIONE E GESTIONE DEI CASI BORDERLINE

Conclusioni

- ✓ Il metodo delle **diluizioni** ha permesso di dimostrare la positività del campione al Tramadolo in presenza dell'**effetto prozona** con il saggio immuno-enzimatico.
- ✓ Applicando le diluizioni, i test di screening e di conferma hanno mostrato **risultati congruenti**.
- ✗ È emersa la **possibilità di ottenere risultati falsi negativi nei test di screening su urina**.



* Varango C, Cerutti L, Gavina M, *Un percorso di integrazione tra strutture ospedaliere e servizi territoriali*, Mission 58, Italian Journal of Addiction , Novembre 2022.