



ASPETTI LABORATORISTICI NELLA VALUTAZIONE DELL'OUTCOME DURANTE IL TRATTAMENTO

Teodora Macchia, Stefano Gentili, Gustavo Merola

Dipartimento del Farmaco-Istituto Superiore di Sanità, Roma

La elevata richiesta di trattamento per problemi legati all'abuso di droghe sottolinea con forza la necessità di oggettivare e documentare gli esiti dei trattamenti, durante, al termine e, possibilmente, a distanza di un appropriato periodo di tempo.

L'esito di un trattamento viene misurato attraverso i settori della dipendenza, del rischio di esposizione a infezioni virali, l'uso di droga, lo stato di salute, l'assetto psicologico e sociale. La valutazione dei cambiamenti prodotti dal trattamento è affidata principalmente a punteggi riportati in apposite scale di valutazione. La valutazione complessiva, anche in termini di uso di droghe, come emerge dalla letteratura internazionale è quasi sempre affidata alle dichiarazioni del soggetto (Ellingstad T.P., Sobell L.C., Sobell M.B., Planthara P., 2002. Drug treatment outcome methodology (1993-1997) Strengths, weaknesses, and a comparison to the alcohol field. *Addictive Behaviors*, 27: 319-330) anche in virtù della coerenza tra self-report e markers biochimici di laboratorio rilevata in alcuni lavori (Kilpatrick B., Howlett M., Sedgewick P., Ghodse A.H., 2000. Drug use, self-report and urinalysis. *Drug Alcohol Depend.* 58 (1-2), 111-116), (Darke S., 1998. Self-report among injecting drug users: a review. *Drug Alcohol Depend.* 51, 253-263). Nonostante ciò, altri lavori dimostrano differenze sistematiche tra le due modalità di misurare l'uso di sostanze (Landry M., Brochu S., Bergeron J., 2003. Validity and relevance of self-report data provided by criminalized addicted persons in treatment. *Addict. Res. Theory* 11, 415-426) (Buchan B.J., Dennis M.L., Tims F.M., Diamond G.S., 2002. Cannabis use: consistency and validity of self-report, on-site urine testing, and laboratory testing. *Addiction* 97, S98-S108) (Cook R.F., Bernstein A.D., Arrington T.L., Andrews C.M., Marshall G.A., 1995. Methods for assessing drug use prevalence in the workplace: a comparison of self-report, urinalysis, and hair analysis. *Int. J. Addict.* 30, 403-426); c'è chi conclude che anche nel caso delle terapie croniche con oppioidi (ad es. nelle terapie del dolore) il monitoraggio del solo comportamento riferito dal soggetto non consente un appropriato trattamento del paziente soprattutto in relazione a possibili problemi collaterali in grado di inficiarne l'esito e che solo un'analisi tossicologica di laboratorio è in grado di evidenziare (Katz N., Fanciullo G.J. 2002. Role of urine toxicology testing in the management of chronic opioid therapy. *Clin J Pain*, Jul-Aug, 18 (4 Suppl):76-82); c'è infine chi dimostra l'opportunità di una combinazione tra le due modalità, di acquisire cioè informazioni psicometriche e biometriche in una singola misura composita utilizzando lo strumento del self-report e le misure di laboratorio in campioni biologici (Lennox R., Dennis M.L., Scott C.K., Funk R., 2006. Combining psychometric and biometric measures of substance use.

Drug and Alcohol Dependence 83, 95-103). In sostanza, alla maggiore praticabilità e minor costo del self-report, si contrappone la concreta possibilità di bias legati alla inaccuratezza, voluta o meno, con cui il soggetto ricorda e riferisce l'uso di sostanze, la tipologia, la quantità, la frequenza; all'attendibilità ed efficacia del testing di laboratorio, si contrappone la minore praticabilità, il costo e la necessità di specifica competenza per un adeguato uso delle informazioni. È necessario infatti tener presente che da una valutazione puntuale non è possibile trarre conclusioni sul livello di consumo in un periodo di tempo più ampio di alcune ore (se il campione biologico utilizzato è il sangue e la saliva) o giorni (se si considerano le urine) e che esistono differenze inter e intra individuali nel metabolismo delle diverse sostanze. Il dibattito, in sostanza, rimane acceso.

Se la discussione è aperta sugli strumenti di monitoraggio, l'accordo è unanime sulla necessità di una attenta valutazione dell'outcome, o meglio degli outcome, nel corso di un trattamento, al suo termine ed a distanza di un tempo fissato in base alla praticabilità ed agli obiettivi dell'intervento stesso. Ed in questo processo il ruolo del laboratorio è, come vedremo, per molti aspetti insostituibile.

Centreremo nel seguito l'attenzione su alcuni aspetti, laboratoristici e ad essi connessi, cruciali nella pratica clinica per il monitoraggio e la valutazione degli esiti di un trattamento nel campo delle tossicodipendenze.

MONITORAGGIO

Il perdurare dell'uso di sostanze è un problema che ogni trattamento per le dipendenze deve opportunamente tenere sotto controllo per sostenere e calibrare il processo terapeutico, contenere cadute e ricadute, limitare il drop-out e favorire un buon esito dell'intervento. Per tali ragioni un monitoraggio delle sostanze d'abuso rappresenta una componente essenziale nell'accompagnamento-valutazione dell'intero percorso. L'accompagnamento del laboratorio rappresenta anche un elemento di "sicurezza" sia per chi gestisce il trattamento che per il paziente. A titolo di esempio, basti ricordare che molte sostanze illegali o prescritte o anche contenute in erbe, possono interferire con il metabolismo di farmaci come il metadone alterandone gli effetti e la farmacocinetica sino all'overdose (CSAT. Methadone-Associated Mortality: Report of a National Assessment. May 8-9, 2003, Rockville, MD: Center for Substance Abuse Treatment, Substance Abuse and Mental Health Services Administration; 2004. SAMHSA Pub No. 04-3904). Questo aspetto risulta particolarmente critico durante la fase di stabilizzazione del paziente che può richiedere tempi anche lunghi, nell'ordine dei mesi. Un monitoraggio periodico delle sostanze d'abuso in campioni biologici del paziente, inoltre, è utile a valutare la situazione clinica del soggetto, i progressi ottenuti con l'intervento, a calibrare e implementare la terapia, ad incoraggiare/mantenere cambiamenti positivi nel comportamento assuntivo del paziente.

Il contributo del laboratorio si esprime essenzialmente attraverso tre tipologie di approccio: il monitoring, lo screening ed il testing spesso erroneamente confusi tra loro e utilizzati come sinonimi. Il **monitoring** ha come obiettivo principale quello di seguire attraverso l'esame di campioni biologici del soggetto (prevalentemente urine) l'abitudine assuntiva della sostanza verso la quale si è instaurata la dipendenza e di altre utilizzate in concomitanza o in alternativa. È importante che il monitoraggio venga effettuato con una certa frequenza, in caso contrario non sarà possibile stabilire se il soggetto ha un problema acuto o cronico, cioè se la sostanza è stata assunta una sola volta, sporadicamente o sistematicamente. Lo **screening** – presenza o assenza di sostanze target e loro metaboliti- mira a rilevare o escludere in via preliminare l'assunzione di

sostanze diverse (concomitanti, alternative in un eventuale slittamento ad altra sostanza, poliasunzione anche di alcol, interferenti con la terapia). Un risultato positivo deve essere considerato con cautela e, nel caso in cui debba essere utilizzato per rivedere il piano terapeutico, deve necessariamente essere convalidato attraverso idonee procedure di conferma. Il **testing** è prevalentemente orientato a rilevare sostanze non evidenziabili con le usuali procedure di screening o alla quantificazione di molecole per documentare una progressiva riduzione, o meno, del loro consumo puntuale. Questo aspetto è di particolare rilevanza nella valutazione degli outcome intermedi soprattutto quando l'obiettivo finale non sia l'astinenza. Occorre tener presente che pur quantitativo il dato non contiene informazione circa la frequenza ed il pattern d'uso o circa la reale abitudine al consumo. Il testing utilizza tecniche sofisticate, strumentazione complessa di secondo livello e operatori specificamente formati. Per tali motivi è spesso necessario inviare i campioni da analizzare a laboratori specialistici con un conseguente slittamento nei tempi di risposta. Il testing è anche applicato nella valutazione della quota realmente disponibile del farmaco a fronte della dose somministrata nel caso di soggetti per i quali risulti particolarmente difficile l'individuazione di un dosaggio adeguato.

Si ritiene utile sottolineare che se il controllo delle sostanze d'abuso in corso di trattamento è utilizzato come strumento di tensione o punizione nei confronti del paziente, questa importante risorsa per il buon esito dell'intervento rischia di trasformarsi in un esercizio inutile e dispendioso.

MATRICE BIOLOGICA

La tecnologia è andata sviluppando sistemi sempre più accurati per l'identificazione delle sostanze d'abuso. L'analisi nelle urine continua ad essere la più diffusamente utilizzata, ma l'impiego di matrici alternative offre alcuni vantaggi e, nel tempo, ha consentito lo sviluppo di procedure a buon livello di performance e standardizzazione.

I limiti delle matrici alternative sono progressivamente ridotti dalla ricerca analitica e dalla tecnologia, il consenso su aspetti particolarmente delicati quali i cut-off, la costruzione e l'interpretazione dei risultati è in fase di consolidamento nella comunità scientifica internazionale e negli Organismi regolatori. Si propongono linee guida che procedono parallelamente a quelle per il drug testing nelle urine. Tra i problemi tecnici per una maggiore diffusione di queste matrici (utili a coprire diverse finestre temporali di rilevazione): -necessità di appositi materiali per il controllo di qualità; -standardizzazione delle procedure anche al fine di escludere contaminazioni passive; -cut-off idonei e condivisi; - programmi di formazione per chi deve interpretare i risultati in base alle conoscenze scientifiche esistenti sulla disposizione delle sostanze e le cinetiche nelle matrici alternative; - nuove tecniche analitiche per lo screening e le conferme; - biomarkers per la normalizzazione dei risultati del test (come la creatinina per le analisi in urine); - maggiori conoscenze sulla relazione tra concentrazioni e tempo-dose-frequenza dell'assunzione; -interpretazione dei risultati discordanti rispetto alle analisi in urine.

Il laboratorio quindi si avvale di diverse matrici biologiche che da sole, o in abbinamento tra loro, consentono di esprimere una diagnostica appropriata alle diverse finalità per le quali è richiesta. Ciascuna matrice biologica presenta vantaggi e limiti, la sua idoneità risponde a criteri di finalizzazione dell'indagine, alle caratteristiche di farmacocinetica delle sostanze, alle metodologie analitiche da adoperare, alla praticabilità del prelievo nel contesto operativo del momento.

Nella Tabella 1 vengono sintetizzate peculiarità e limiti delle matrici biologiche utilizzate per

il monitoraggio di un trattamento e per la valutazione dell'esito una volta che questo sia terminato o a distanza di tempo in un follow-up. La tabella non include il sangue che, pur essendo la matrice di elezione per rilevare l'attualità d'uso, per l'invasività del prelievo, le particolarità di preparazione/ conservazione del campione, la complessità delle tecniche necessarie all'analisi non è propriamente indicato alle applicazioni di cui stiamo trattando.

Tabella 1. Caratteristiche delle principali matrici biologiche utilizzate oltre al sangue.

• Caratteristiche	urine	saliva	sudore	capelli
• Finestra rilevazione	2-3 giorni	poche ore	1 settimana	mesi/anni
• Tecnica analitica pr.	immuno chim . + GC/MS	GC /MS + immun	GC /MS	GC /MS
• Durata analisi	+ o +++	+++	+++	++++
• Costo	+ o +++	+++	+++	++++
• 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

La corretta interpretazione del risultato analitico non può basarsi sulla sola “lettura”, sulla base della precisione e accuratezza del metodo e dell'esperienza dell'analista. Per l'analisi di liquidi biologici la situazione è leggermente più complessa. Infatti, prescindendo dalle condizioni individuali, molti sono i fattori che influenzano il risultato. Tra questi: la quantità e lo schema metabolico della sostanza assunta; la frequenza dell'uso; il tempo intercorso tra il prelievo e l'ultima assunzione; la sensibilità della metodica e la scelta del cutoff; il tipo di matrice biologica esaminata, la concomitante assunzione di più sostanze, la presenza di sostanze o condizioni interferenti.

Un risultato positivo implica solamente che il soggetto ha assunto la sostanza, ma non fornisce altre informazioni sulla dose, sul momento di assunzione, sulle modalità di uso o abuso. Un risultato negativo può dipendere dal fatto che il soggetto assume saltuariamente la sostanza e non l'ha assunta recentemente, che il metodo analitico utilizzato non è sufficientemente sensibile e/o il cutoff non è quello più idoneo, o, nel caso delle urine, che il campione è stato adulterato o sostituito.

Le **urine** rappresentano la matrice biologica di elezione per il monitoraggio di sostanze d'abuso durante il trattamento e per la valutazione dell'esito dello stesso.

La possibilità di ottenere più facilmente un campione di urina e in consistente quantità idonea per esami ripetuti, rende questa matrice ampiamente utilizzata nello screening per ogni finalità. La quasi totalità dei metodi di screening, inoltre, sono costruiti e calibrati sulle urine. In ambito clinico, la analisi tossicologica in urine riguarda l'identificazione della sostanza, preva-

lentemente dei metaboliti, più che la quantificazione la quale risente di notevole variabilità inter- ed intra-individuale.

A livello di screening, infatti, il valore quantitativo di per sé non è significativo al fine di determinare l'epoca di assunzione, la dose assunta, il grado di dipendenza e di performance del soggetto, l'intensità della cura necessaria, il rispetto del contratto terapeutico durante il trattamento.

L'interpretazione di un test urinario deve tener conto di vari fattori, non ultimi i tempi di rilevabilità della sostanza e dei suoi metaboliti. La finestra di rilevabilità rappresenta un limite dello screening urinario. Infatti, molti campioni positivi possono essere persi per la breve emivita delle sostanze e per la velocità con cui risultano sotto soglia rispetto ai cutoff utilizzati. A tale riguardo, per estendere il tempo medio di rilevabilità, è stato proposto il sistema di abbassare le concentrazioni di cutoff, cosa però che non sempre è corretta ed opportuna. Verso questa soluzione è orientato il DHHS (Department of Human and Health Services) che, implementando le regole indicate nelle "Mandatory Guidelines for Federal Register Workplace Drug Testing Program", nel Draft 4 di revisione delle linee guida, reso noto nel settembre 2001.

Nel caso in cui l'accertamento nelle urine tenda a verificare l'abitudine assuntiva del paziente, più che la assunzione attuale, è utile ricorrere all'utilizzo della matrice cheratinica, anche con metodo immunochimico. L'analisi del capello è altamente sensibile e specifica nell'identificarne l'uso pregresso; risulta utile in una situazione di sospetto, ma di risultato urinario negativo, o per confermare un self-report d'uso.

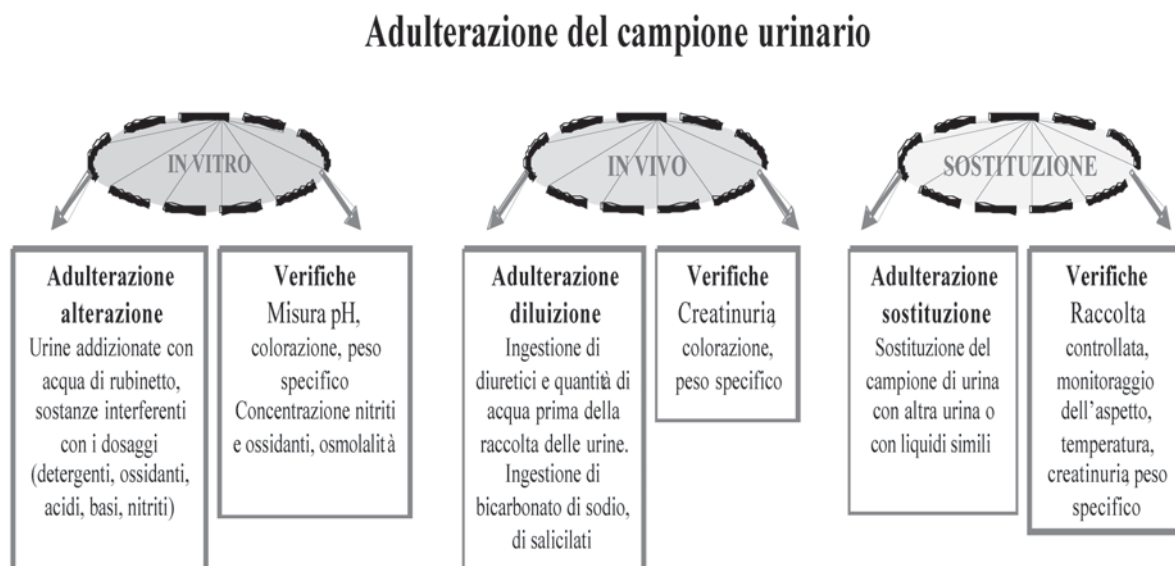
L'utilizzo di un test sulle urine deve anche basarsi sulla consapevolezza che il risultato analitico dipende anche dalle modalità e condizioni del prelievo del campione, dalle verifiche operate dal personale di laboratorio per escludere una sofisticazione o sostituzione delle urine. Esistono infatti diverse sostanze che aggiunte al campione possono renderlo negativo, soprattutto a un'analisi con metodi immunochimici: cloruro, bicarbonato, ipoclorito di sodio, succo di limone, detergenti liquidi, acqua ossigenata. È noto che alcune sostanze e farmaci possono interferire con i test immunochimici dando un esito falsamente positivo per la sostanza ricercata. Solo i metodi cromatografici metterebbero al riparo da questi inconvenienti. Per la facilità con cui tali "manomissioni" possono essere operate, non è superfluo sottolineare la necessità di un'adeguata catena di custodia che inizi già dal momento del prelievo.

L'individuazione in fase preanalitica di campioni alterati o contraffatti rappresenta un aspetto essenziale per l'attendibilità/utilità del risultato di laboratorio anche nella valutazione dell'outcome. Il personale di laboratorio ricorrerà a pratiche dettate dal buon senso (come la concentrazione per evaporazione naturale dei campioni sospetti), suggerite da linee guida (come la determinazione della creatinina urinaria), promosse da associazioni scientifiche e organismi regolatori internazionali (R.Borriello, M.Caligara, M.Chiarotti, S.D.Ferrara, R.Gagliano-Candela, F.Gigli, M.Licata, P.Procaccianti. Linee guida per i laboratori di analisi delle sostanze d'abuso in campioni biologici. Boll.Farmacodip. e Alcolis., XXV (1-2) 2002), (SAMHSA, HHS. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs. General Register 70 (15) January 255, 2005).

Secondo le indicazioni SAMHSA, un campione urinario è da considerare non idoneo sulla base delle seguenti caratteristiche:

- 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
	conc. Nitriti	> 500 µg/mL

La Figura 1 riporta le principali condizioni che alterano il campione urinario e le più diffuse verifiche per individuare un campione non idoneo.



CAPELLO

In linea generale, le sostanze vengono incorporate nella matrice cheratinica attraverso lo scambio tra il sangue circolante e le cellule del bulbo pilifero. Una volta fissate nella parte prossimale del capello, esse vengono rese rilevabili man mano che questo cresce superando il cuoio capelluto ad una velocità media di 1-1.5 cm/mese con una variabilità legata al singolo soggetto (ad esempio alla zona della testa), alla stagionalità ed altro. Attraverso la lunghezza del capello è possibile rilevare l'assunzione cronica o, su segmenti sempre più distali, "leggere" l'abitudine assuntiva del soggetto.

Le concentrazioni delle sostanze e loro metaboliti nei capelli sono di gran lunga inferiori a quelle rilevabili nelle urine; di conseguenza, l'analisi richiede una sensibilità dell'ordine dei nano-e picogrammi, una specificità per le sostanze lipofile e l'assenza di effetti matrice. Questi requisiti sono soddisfatti da metodi cromatografici quali la GC-MS, GC-MS-MS; LC-MS, LC-MS-MS.

A scopo di screening, potrebbero essere adoperati anche metodi immunochimici poco costosi, rapidi e più semplici da utilizzare, ma che presentano notevoli limiti di tipo analitico e di interpretazione. Tra i limiti analitici, la necessità che la “digestione” non denaturi le proteine che costituiscono gli anticorpi dei reagenti. In questi casi è quindi preferibile una “digestione” enzimatica ad una chimica. Una digestione fortemente acida o basica (richiesta per molte sostanze) deve essere ricondotta ad un pH neutro prima della analisi immunochimica che, nel caso dei capelli, richiede una calibrazione con standard di capelli “fortificati” e processati come il campione per correggere possibili effetti matrice. Una sufficiente sensibilità e specificità è soddisfatta da metodi radioimmunometrici quali-quantitativi ed ELISA (M. Cassani, V. Spiehler. *Analytical requirements, perspectives and limits of immunological methods for drugs in hair*. *Forens. Sci. Int.* 63 (1-3): 175-84, 1993), (J. Klein, T. Karaskov, G. Koren. *Clinical application of hair testing for drugs of abuse – the Canadian experience*. *Forens. Sci. Int.* 107: 281-288, 2000). La matrice cheratinica nella analisi di sostanze d'abuso offre l'indubbio vantaggio di una finestra temporale molto ampia, di diversi mesi. Essa comunque richiede tecniche analitiche articolate, abbastanza complesse, apparecchiature costose e personale specializzato. Per tali motivi, in corso di un trattamento per dipendenza, l'analisi del capello è utilizzata prevalentemente in pazienti stabilizzati o quando il farmaco viene dato in affidamento o nella valutazione dello outcome anche attraverso il follow-up. Il lasso di tempo necessario tra l'assunzione e la disponibilità al prelievo del segmento in cui la sostanza è fissata, rende questa analisi di limitato significato clinico nell'impostare e calibrare il trattamento.

SUDORE

Tra le matrici biologiche alternative, il sudore (traspirato) comincia ad essere utilizzato, se pur con le dovute cautele, per rilevare la presenza di sostanze d'abuso in medicina d'urgenza, nel trattamento, sui luoghi di lavoro, in ambito militare, in ambito giudiziario e nei controlli dei conducenti per la sicurezza stradale. Il metodo di prelievo è il meno invasivo fra quelli disponibili, sono remote le possibilità di adulterare il campione, c'è un'ampia finestra di rilevabilità. L'identificazione della sostanza madre e dei metaboliti, le basse concentrazioni degli analiti, il tempo di rilevazione, le relazioni tra dose e concentrazione rappresentano aspetti importanti per valutare l'analisi della cocaina nel sudore. Altro elemento rilevante è rappresentato dal cutoff sulla scelta del quale, la comunità scientifica ha a lungo discusso per trovare un accordo. Recentemente la Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) ha proposto un cutoff di 25 ng/cerotto per lo screening di cocaina/metabolita nel sudore e 25 ng/cerotto per la conferma di cocaina o benzoilecgonina (US Department of Health and Human Services. *Proposed revision to mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs*. *Fed. Regist.* 69: 19673-732, 2004). Fattori di variabilità sono rappresentati dalla diversa produzione di sudore, possibile contaminazione ambientale, perdita di sostanze per degradazione del dispositivo di raccolta o per riassorbimento attraverso la pelle, fattori legati all'escrezione delle sostanze e loro metaboliti nel sudore.

FLUIDO ORALE (SALIVA)

Nel fluido orale, più comunemente anche se riduttivamente identificato come “saliva”, le sostanze sono rilevabili per un periodo di tempo più breve rispetto alle urine, mediamente tra le

12 e le 24 ore dall'assunzione. Il fluido orale può essere raccolto nel rispetto della dignità della persona e sotto osservazione, le possibilità di adulterazione sono praticamente nulle. Uno svantaggio, in certi casi pregiudizievole, è che il volume raccolto è molto contenuto e, talvolta, insufficiente per l'analisi. La concentrazione degli analiti nella saliva è più bassa che nelle urine, e ciò richiede tecniche più sensibili per l'analisi. In virtù di questa esigenza, sono stati proposti a livello internazionale i cutoff, per le principali sostanze e classi di sostanze, al di sopra dei quali considerare positivi i campioni nei test di screening e di conferma. La tabella 2 riporta per le urine e per la saliva alcuni fattori critici per la performance di un test. In particolare i cutoff, cioè valori soglia per determinare un esito positivo o negativo ed il tempo di rilevabilità nel campione biologico della sostanza di interesse dopo l'uso.

Per quanto riguarda i cutoff, si fa riferimento a quanto stabilito o suggerito dal Department of Health and Human Services (DHHS)/Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) che ha sviluppato linee guida per i programmi di drug testing sul posto di lavoro.

Tabella 2: Livelli di cutoff e tempi di rilevabilità per sostanza o classi di sostanze in urine e fluido orale

Sostanze (analiti) o classi di farmaci	Positivo Screening iniziale Cutoff ng/ml Urine (fluido orale)	Positivo Test di conferma Cutoff ng/ml Urine (fluido orale)**	Tempo di rilevabilità Urine (fluido orale)**
Anfetamine (AMP) Anfetamina Metanfetamina (MA) MDMA (Ecstasy, XTC)	1000 ¹ 500 ² (50) ² 500 ^{1,2} (50) ²	500 ¹ 250 ² (50) ² 500 ¹ 250 ² (50) ² 250 ^{1,2} (50) ²	2-4 gg (20-50 h) 2 gg (>24 h) 1,5-2 gg
Barbiturici (BAR) ■ azione breve ■ azione intermedia ■ azione lunga	300 ³	200 ³	1 g 2-3 gg 7 + gg (fino a 30)
Benzodiazepine (BZD) ■ azione ultrabreve ^a ■ azione breve ^b ■ azione intermedia ^c ■ azione lunga ^d	300 ³	200 ³	12 h 1 g 2-3 gg 7 + gg (fino a 30)
Cannabinoidi (THC) ■ uso leggero ■ uso moderato (4xsett.) ■ uso pesante (giorn.) ■ uso cronico pesante	50 ^{1,2} (4) ²	15 ^{1,2} (2) ²	(4-10 h) 3 gg 4-5 gg 10 gg 20-28 gg (fino a 36)
Coaina (COC) Benzoilecgonina	300 ¹ 150 ² (20) ²	150 ¹ 100 ² (8) ²	6-8 h (4-12 h) 2-4 gg; fino a 8 gg in uso pesante (12-24h)
Metadone (MTD) Terapia a mantenimento	300 ^{3,4}	300 ^{3,4}	7-9 gg (>24 h)
Oppiacei (metadone escluso) 6-acetil morfina (MAM) Morfina/eroina ^e (MOR) Codeina (COD)	2000 ^{1,2} (40) ²	10 ^{1,2} (4) ² 2000 ^{1,2,4} (40) ² 2000 ^{1,2,4} (40) ²	1-3 gg 2-4 h (1-4 h) 2-3 gg (12-24 h) 2-3 gg (24-36 h)

^a emivita 2 h (midazolam); ^b emivita 2-6 h (triazolam); ^c emivita 6-24 h (temazepam); ^d emivita 24 h (diazepam);

^e l'eroina è rilevata come metabolita della morfina.

¹ Cutoff nelle linee guida DHHS per il Federal Workplace Drug Testing Program (urine) programmati nei posti di lavoro; ultima revisione 13 Novembre 1998 (63 FR 63483).

² Cutoff proposti da DHHS per urine e fluido orale; Federal Register, 2004 (April 13); 69(71);19644-19732.

³ Fonte; Cone E.J. New development in biological measures of drug prevalence: In: Harrison L. Hughes A. (Eds) The validity of Self-Reported Drug Use: Improving the accuracy of Survey Estimates. NIDA Res. Mon 167, Rockville, MD: National Institute on Drug Abuse ; 1997 ; 108-130.

Cone E.J. Pteston KL. Drug testing in support of drug-abuse treatment programs. AACC education article. The Drug Monit Toxicol 1999; 20(70): 175-184.

⁴ Il valore soglia per alcuni test di screening per il Metadone è 150 ng/ml, con cutoff per i test di conferma per il suo metabolita EDDP a 120 ng/ml o meno. Test clinico di conferma per Morfina e Codeina nelle urine è 300 ng/ml.

Secondo le indicazioni DHHS/SAMHSA le sostanze o classi citate in tabella rappresentano il "minimo" di quelle oggetto di screening in un trattamento a mantenimento. A questa lista vengono aggiunte altre sostanze in base alle caratteristiche dei consumi nello specifico territorio o in base alle indicazioni cliniche dello specifico paziente.

* Linee guida generali: L'interpretazione dei tempi di ritenzione deve considerare i valori di cutoff per il test e la variabilità dei campioni da testare, il metabolismo della sostanza e l'emivita, le condizioni fisiche del paziente, l'assunzione di liquidi, la via di assunzione, la frequenza e la durata dell'assunzione.

** I tempi di rilevabilità nel fluido orale sono determinati in GC-MS o RIA dopo l'assunzione di un dosaggio di sostanza contenuto e a livelli di cutoff più bassi di quelli indicati nelle linee guida DHHS.

METODI ANALITICI

I metodi utilizzati per lo screening, il testing e le conferme sono essenzialmente su base immuno-chimica (EIA. Enzyme immunoassay; EMIT. Enzyme- Multiplied immunoassay techniques; ELISA. – Enzyme-linked immunosorbent assay; PFIA-Fluorescent polarization immunoassay; RIA –Radioimmunoassay) e cromatografica (TLC-Thin-layer chromatography; HPTLC- High-performanceTLC; HPLC-High-performance liquid chromatography; GLC-Gas-liquid chromatography GC- Gas chromatography; GC/MS- Gas chromatography- mass spectrometry; LC/MS – Liquid chromatography-mass spectrometry) dove la GC-MS rappresenta il metodo di riferimento per gran parte delle sostanze di interesse nel campo delle dipendenze. Queste tecniche richiedono un laboratorio più o meno attrezzato e attrezzature/strumentazioni più o meno complesse. Sono però disponibili anche dispositivi che consentono una valutazione di tipo qualitativo **on-site**, al punto di raccolta, da utilizzare su urine, saliva e traspirato. Semplici da usare, rapidi, sono in grado di dare indicazioni su diverse sostanze nello stesso tempo visualizzando il risultato positivo o negativo attraverso la comparsa o meno (a seconda del dispositivo) di una banda colorata in 5-10 minuti. Tali dispositivi, che devono però essere utilizzati con le dovute accortezze, hanno una particolarità che li rende "unici" in un programma di trattamento quando non ci siano esigenze particolari: l'immediatezza della risposta.

Questa possibilità consente un feedback immediato per il paziente, annulla i tempi di attesa per la risposta da parte del laboratorio, può essere utilizzato da personale sanitario senza particolare competenza analitica e consente al clinico una valutazione immediata dell'andamento del percorso terapeutico.

Purtroppo il pannello di sostanze rilevabili è limitato alle classi di sostanze oggetto di screening tradizionali. La ricerca risulterebbe quindi vana per molte molecole di più recente introduzione nell'abuso.

La qualità dei dispositivi on-site è di molto migliorata negli ultimi anni, le accuratezze dei risultati positivi e negativi prodotti sono in accordo con quelli prodotti con tecniche di screening usate in gran parte dei laboratori.

Si è inoltre sviluppata l'applicazione su matrici biologiche diverse dalle urine, in particolare sulla saliva.

Questa possibilità riveste un certo interesse dal momento che l'analisi del fluido orale, o saliva, è riportata in alcuni lavori come più accurata rispetto alle urine nel rilevatore l'uso di droghe nell'ambito di un trattamento (Bennett G.A., Davies E., Thomas P. Is oral fluid analysis as accurate as urinalysis in detecting drug use in a treatment setting? *Drug Alcohol Depend* 72 (2003) 265-269). Confrontando l'accuratezza di metodi on-site su saliva e su urine con le analisi effettuate attraverso tecniche di laboratorio indipendenti su campioni di urine raccolte nella stessa occasione, è stato evidenziato che il test sulla saliva era accurato quanto l'analisi urinaria nel rilevare presenza di oppiacei e metadone come anche l'assenza di metadone e benzodiazepine. Questi risultati rendono idoneo l'utilizzo di dispositivi on-site su un campione biologico il cui prelievo non è invasivo ed è più gradito al paziente ampliando le praticabilità di un monitoraggio nel corso di un programma di trattamento dove è importante che il medico possa stabilire se il paziente prende o non prende il farmaco prescritto e se recentemente ha assunto o meno oppiacei o altre sostanze che possono complicare il quadro clinico e interferire con il trattamento influenzandone l'outcome. Gli esempi che seguono possono essere rappresentativi di tale influenza.

MONITORAGGIO ANALITICO DEL CONSUMO DI COCAINA NEL TRATTAMENTO DELLA DIPENDENZA DA EROINA.

Diversi lavori riportano evidenze circa l'effetto che l'uso concomitante di cocaina ha sul trattamento più tradizionale della dipendenza da eroina. (Williamson A., Darke S., Ross J., Teesson M., 2003. Cocaine use among the ATOS NSW sample: prevalence and related harms. National Drug and Alcohol Research Centre Technical Report No. 161. University of New South Wales, Sydney), (Williamson A., Darke S., Ross J., Teesson M., 2004. The effect of Cocaine use on short term outcomes for heroin dependence. National Drug and Alcohol Research Centre Technical Report No. 190. University of New South Wales, Sydney). È da considerare che la via iniettiva è la principale modalità di utilizzo della cocaina nei tossicodipendenti da eroina, il che espone i soggetti ad un rischio ancora più elevato di contrarre malattie infettive (Bux D.A., Lamb R. J., Iguchi N. Y. 1995 – Cocaine use and HIV risk behaviour in methadone maintenance patients. *Drug Alcohol Depend.* 37, 29-35). È infine dimostrato, da diversi lavori nella letteratura sul tema della terapia metadonica a mantenimento, che l'uso di cocaina riscontrato all'ingresso è predittore di una più breve ritenzione in trattamento e di uno scarso outcome (De Maria P.A., Sterling R., Weinstein S.P., 2000. The effect of stimulant and sedative use on treatment outcome of patients admitted to methadone maintenance treatment. *Am J Addict* 9, 145-153), (Bovasso G., Cacciola J., 2003. The long-term outcomes of drug use by methadone maintained patients. *J. Behav. Health Serv. Res.* 30, 290-303).

Da un lavoro di Downey (Downey K.K., Helmus T.C., Shuster C.R. 2000. Treatment of heroin-dependent poly-drug abusers with contingency management and buprenorphine maintenance. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 8, 176-184) emergono considerazioni simili a riguardo del trattamento con buprenorfina. È stato anche osservato che il policonsumo è un fattore di rischio per tentati suicidi ed overdose (Darke S., Ross J., Lynskey M., Teesson M., 2004. Attempted suicide

among entrants to three treatment modalities for heroin dependence in the Australian Treatment Outcome Study (ATOS): prevalence and risk factors. *Drug Alcohol Depend.* 73, 1-70) esponendo il soggetto ad un accresciuto rischio di morte prematura.

In sostanza, è dimostrata una forte relazione fra uso concomitante di cocaina all'ingresso in trattamento per dipendenza da eroina, persistenza dell'uso di cocaina ed una minore ritenzione in trattamento, comportamenti fortemente antisociali e criminali, ridotta prevalenza di astinenza rispetto al punto di partenza, esiti molto scarsi sia nel corso del trattamento che a un follow-up di 12 mesi (Williamson A., Darke S., Ross J., Teesson M., 2006. The effect of persistence of cocaine use on 12-month outcomes for the treatment of heroin dependence. *Drug Alcohol Depend.* 81, 293-300). Emerge chiaramente l'esigenza di monitorare periodicamente l'eventuale uso di cocaina sia in corso di trattamento sia nella corretta valutazione degli esiti a breve e media distanza.

Il ruolo del laboratorio diventa essenziale in quanto il medico ha bisogno di sapere se il paziente assume realmente quanto dice o non dice di assumere e solo l'analisi dei fluidi biologici è una fonte di informazioni oggettive al riguardo. Ma la scelta della matrice biologica è nella pratica condizionata dalla disponibilità di tecnologie per l'analisi e limitata dalla modalità con cui essa può essere ottenuta.

FREQUENZA DEGLI ACCERTAMENTI

L'FDA, autorità di normazione e responsabilità di monitoraggio dei programmi a mantenimento metadonico per gli Stati Uniti, ed il NIDA, nell'apposito regolamento richiedevano un esame tossicologico su un campione urinario al momento dell'ammissione al trattamento e la ricerca del metadone, ed altre sostanze d'abuso, su otto campioni random durante il primo anno di trattamento. Per gli anni successivi almeno un esame di laboratorio ogni 4 mesi, mensilmente per i pazienti con affidamento domiciliare del farmaco. Otto esami all'anno sono considerati sufficienti per soggetti che assumono giornalmente. Gli esami tossicologici dovevano servire principalmente a modificare, se necessario, l'approccio terapeutico. Nel caso di un paziente positivo a sostanze diverse dal metadone, l'esame tossicologico era previsto a cadenza settimanale. In aggiunta alla frequenza minima richiesta per gli accertamenti tossicologici, la cadenza era intensificata sulla base degli esiti nel corso del trattamento e nella parte iniziale del percorso terapeutico sino alla stabilizzazione del soggetto.

DOSAGGIO DEL FARMACO

Per un'adeguata terapia, soprattutto di mantenimento con metadone, è condivisa la necessità di tarare la dose alle esigenze individuali. I principali problemi in questo senso sono le caratteristiche del farmaco in termini di cinetiche di assorbimento e metabolismo che sono molto variabili tra gli individui, il che rende impossibile prevedere a priori la relazione tra dose, concentrazione nel sangue ed effetti clinici.

Il ruolo del laboratorio riguarda anche l'analisi della parte effettivamente biodisponibile del farmaco, la frazione libera per la quale uno dei fattori maggiormente limitanti la biodisponibilità effettiva è il legame alle proteine plasmatiche.

Nel caso del metadone, ad esempio, l'enantiomero R- è molto più attivo dell'S- perché lega meno le proteine plasmatiche, quindi, nonostante venga somministrata una miscela racemica,

l'attività è quasi esclusivamente svolta dall'enantiomero R- (Boulton DW, Arnaud P, DeVane CL. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methadone enantiomers after a single oral dose of racemate. *Clin Pharmacol Ther.* (2001) 70(1):48-57). Questa caratteristica si ripercuote, in termini di complessità, sull'aspetto analitico. In particolare sulla necessità di adoperare tecniche di livello adeguato a discriminare i due enantiomeri per consentire una valutazione appropriata della quantità di farmaco effettivamente biodisponibile. La letteratura più recente valuta come idonei il metodo stereoselettivo basato su cromatografia liquida / spettrometria di massa (Kelly T, Doble P, Dawson M. Chiral analysis of methadone and its major metabolites (EDDP and EMDP) by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* (2005) 814(2):315-23), la Cromatografia liquida / spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray (Quintela O, Lopez P, Bermejo AM, Lopez-Rivadulla M., Determination of methadone, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine and alprazolam in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry., *J Chromatogr B*, (2006) 834(1-2):188-94), la Gas cromatografia / spettrometria di massa (GC-MS) dopo microestrazione in fase solida (SPME) applicata alla matrice chratinica (Lucas AC, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernandez P, Strano-Rossi S., Use of solid-phase microextraction (SPME) for the determination of methadone and EDDP in human hair by GC-MS. *Forensic Sci Int.* (2000);107(1-3):225-32), (Sporkert F, Pragst F. Determination of methadone and its metabolites EDDP and EMDP in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* (2000);746(2):255-64).

Per quanto riguarda la buprenorfina, e metaboliti, la maggior parte dei lavori fa riferimento alla Gas-cromatografia/spettrometria di massa (GC-MS) (Gopal S, Tzeng TB, Cowan A. Development and validation of a sensitive analytical method for the simultaneous determination of buprenorphine and norbuprenorphine in human plasma. *Eur J Pharm Biopharm.* (2001) 51(2):147-51).

La valutazione della quota del farmaco effettivamente disponibile rappresenta quindi un passaggio importante per un'accorta gestione della terapia ed una conseguente adeguata valutazione degli outcome. È noto infatti che la biodisponibilità, al di là della dose, e quindi l'attività di un farmaco, può essere influenzata da diversi fattori che attengono alle caratteristiche del singolo soggetto, ma anche ad interferenze da parte di xenobiotici.

Il metadone assunto per os è soggetto ad un notevole effetto di primo passaggio ed è rilevabile nel sangue, per l'85% legato alle proteine plasmatiche, circa 30 minuti dopo l'assunzione, raggiungendo il picco alla 4^o ora.

La concentrazione nel sangue nel tempo segue una curva biesponenziale, con una fase ? rapida, che corrisponde al trasferimento del farmaco ai tessuti, e una fase ? lenta, che corrisponde alla sua eliminazione. Il metabolismo avviene quasi esclusivamente a livello epatico, in particolare vi è una N-demetilazione e ciclizzazione dalla quale si ottengono derivati pirrolidinici e pirrolinici.

Nel metabolismo del metadone è coinvolto il citocromo P450 e in particolare la sotto unità 3A4. Esistono sostanze che inibiscono questa sotto-unità, altre agiscono da induttori, altre non hanno effetto. Se si somministra un farmaco con attività induttrice della sotto unità 3A4, ci si potrebbe aspettare, dal punto di vista teorico, un aumento del metabolismo del metadone e viceversa.

Alcuni autori sostengono che l'induzione del metabolismo può essere responsabile della riduzione della concentrazione durante la terapia di mantenimento.

Secondo Verebely, dopo 30 giorni di trattamento alla dose di 40-80 mg/die, i livelli di metadone nel plasma si riducono da tre a otto volte, mentre l'eliminazione dei metaboliti aumenta dal 22.2 al 61.9%. Secondo Holmstrand, invece, la concentrazione di metadone decresce del 15-

25% dopo 5-12 mesi di trattamento con 60-80 mg/die e questo giustifica la necessità di aumentare la dose giornaliera per mantenere l'efficacia del trattamento.

Inoltre, numerose sostanze esogene possono influenzare il metabolismo del farmaco modificando l'azione degli enzimi del Citocromo P450. In particolare molecole quali le benzodiazepine, i calcio antagonisti, gli antibiotici macrolidici, e gli anticonvulsivanti. Vi è una ragionevole possibilità che tali sostanze vengano somministrate durante la terapia di mantenimento con metadone.

L'attività dell'enzima microsomiale CYP3A4, che è quello maggiormente responsabile della N-demetilazione del metadone, è anche fortemente inibita dal ketoconazolo, dalla fluoxitina e dal succo di pompelmo (Benmebarek M, Devaud C, Gex-Fabry M, Powell Golay K, Brogli C, Baumann P, Gravier B, Eap CB. Effects of grapefruit juice on the pharmacokinetics of the enantiomers of methadone. Clin Pharmacol Ther. (2004) 76(1):55-63)

Un'ulteriore importante interazione riguarda la rifampicina; la cura della tubercolosi con tale farmaco, che è un induttore del CYP3A4, determina sintomi da astinenza da oppiacei. In tali casi la dose di metadone deve essere addirittura raddoppiata affinché possa mantenere la sua efficacia (Shinderman M, Maxwell S, Brawand-Amey M, Golay KP, Baumann P, Eap CB. Cytochrome P4503A4 metabolic activity, methadone blood concentrations, and methadone doses. Drug Alcohol Depend. (2003) 69(2):205-11). È noto inoltre che durante il trattamento a mantenimento con metadone molti soggetti aumentano il consumo di alcool. Tale aspetto è di notevole importanza nei casi di abuso cronico, infatti l'etanolo induce l'attività del CYP3A4, in queste condizioni la concentrazione dei farmaci metabolizzati da tale enzima, in particolare il metadone, decresce (Ferrari A, Coccia CP, Bertolini A, Sternieri E., Methadone-metabolism, pharmacokinetics and interactions. Pharmacol Res. (2004) 50(6):551-9).

Alla luce di quanto detto appare ancora più evidente la necessità di un attento monitoraggio delle co-assunzioni di sostanze esogene da parte del paziente per adeguare le dosi di metadone da somministrare e non pregiudicare l'esito. In quest'ottica l'approccio analitico è di fondamentale importanza, e non può essere sostituito dal contributo conoscitivo di un self-report da parte del soggetto in trattamento.

CONCLUSIONI

Un programma di trattamento di dipendenza da sostanze d'abuso difficilmente può prescindere dal contributo del laboratorio. Tale contributo ha la sua rilevanza nel momento della valutazione del soggetto per l'ingresso in trattamento, nella valutazione degli esiti intermedi e finali dell'intervento terapeutico. È indispensabile per riconsiderare i dosaggi ed impostare ulteriori interventi in caso di persistente utilizzo di sostanze. Può ragionevolmente essere affiancato dall'utilizzo del self-report (per praticabilità ed economicità) ma non sostituito: il contributo informativo del laboratorio non è certo in grado di rilevare problemi psicologici, comportamentali che possono influire sull'esito. È importante stabilire in anticipo come i risultati di laboratorio saranno usati per sostenere il percorso terapeutico (non per punire o scoraggiare il soggetto, ma per fornire occasioni di incoraggiamento, di verifica a completamento delle sue dichiarazioni e di feedback sui risultati raggiunti, su cambiamenti di comportamento). È utile infine ricordare che un adeguato programma di monitoraggio analitico, anche in termini di frequenza dell'accertamento, è a vantaggio del paziente dal momento che un uso non rilevato di sostanze lecite e illecite, come detto, può interferire con il farmaco utilizzato nel trattamento e, nel caso del metadone, sino ad esiti letali.

