Istituto Studi
Fondazione Maugeri

GIORNALE ITALIANO DI MEDICINA DEL LAVORO ED ERGONOMIA

VOLUME XXX
SUPPLEMENTO 2 AL N. 3
LUGLIO-SETTEMBRE 2008

http://gimle.fsm.it

71° Congresso Nazionale SIMLII

Il lavoro, l'uomo, la salute: le prospettive della medicina del lavoro per un lavoro più sano

Palermo, 17-20 Novembre 2008

Editors:
Diego Picciotto, Francesco Allegri, Francesco Vegna, Giuseppe Tranchina, Maria Gabriella Verso, Eleonora Noto Laddeca

Lezione Magistrale
Relazioni (Integrazioni)
Comunicazioni & Poster

TIPOGRAFIA pime EDITRICE Srl
PAVIA - 2008

Il valore di riferimento della CDT è stato calcolato sui parametri della distribuzione di tutti gli 80 valori ed è risultato pari a 2%.

La precisione e l'accuratezza del metodo sono state valutate analizzando in ogni serie analitica 2 campioni di controllo a diversa concentrazione di CDT (ClinCheck Serum, Recipe, DE) (tabella I).

Tabella I. Valutazione della qualità del metodo di misura della CDT (%)

	Campione 1 (n. 11)	Campione 2 (n. 12)
Precisione tra serie:		
Media	1,65	3,33
Deviazione Standard	0,13	0,17
C.V.%	7,8	5,0
Accuratezza:		
Scarto medio dal valore riferimento	- 0,05	+ 0,03

DISCUSSIONE

I valori medi della CDT nella popolazione da noi studiata sono risultati simili a quelli riportati da altri autori (2, 3).

Il valore di riferimento per discriminare gli abusatori dai non abusatori di alcool è risultato pari al 2%, in analogia con quanto proposto da altri autori (2). Dalla distribuzione dei valori degli 80 soggetti esaminati (figura 1), 5 risultavano classificabili come possibili "outliers"; tuttavia non sono stati esclusi dal calcolo del valore di cut-off. in quanto dall'anamnesi non era possibile individuare una loro condizione di "abusatore cronico", infatti non presentavano alcuna alterazione significativa degli altri biomarcatori di abuso nè avevano dichiarato un consumo di alcol superiore a 38 g/die.

Lo studio ha dimostrato che il metodo di misurazione della CDT mediante HPLC permette la riproducibile separazione ed identificazione delle differenti isoforme della transferrina, delle varianti genetiche e delle isoforme atipiche, motivo di possibile errato dosaggio del CDT con i metodi immunochimici (4), e che può essere utilizzato anche in ambito della sorveglianza sanitaria per verificare "l'assenza di condizioni di alcol dipendenza" dei lavoratori, come previsto dalla normativa vigente (D.Lgs. 81/2008).

BIBLIOGRAFIA

1) Bernini M, Ruffini D, Marini M, Cretti L, De Ferrari F. Applicazione medico-legale dell'indice di CDT. Studio casistico sulla popolazione bresciana. RIMel / IJLaM 2006; 2: 236-243.
2) Crespi V, Andreotta U, Tettamanzi E, Ferrario MM. Un marcatore biologico per la diagnosi di abuso alcolico: CDT. Med Lav 2007; 98, 6: 466-474.
3) Helander A, Husa A, Jepsson JO. Improved HPLC Metod for Carbohydrate-deficient Transferrin in Serum. Clin Chem 2003; 49: 1881-1890.
4) Società di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare-Gruppo di Studio di Farmacotossicologia e Doping. Proposta di un documento di consenso per la determinazione della Transferrina Carboidrato Carente (CDT) in ambito clinico tossicologico e forense con particolare riguardo al codice della strada e alla sicurezza nei luoghi di lavoro (Workplace Testing). Rev.2-2007. www.sibioc.it.
5) Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. Clin Chem 1991; 37: 2029-2037.

P-09

TEST DIAGNOSTICI PER LA VERIFICA DELL'ASSUNZIONE DI SOSTANZE STUPEFACENTI NEI LUOGHI DI LAVORO

M. Pieri[1,2], P. Basilicata[2], N. Miraglia[1], F. Liotti[1], A. Acampora[2], N. Sannolo[1], E. Della Casa

[1] *Sezione di Medicina del Lavoro, Igiene e Tossicologia Industriale, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università degli Studi di Napoli, Via L. De Crecchio 7, 80138 Napoli*

[2] *Dipartimento di Medicina Pubblica e Sicurezza Sociale, Università degli Studi di Napoli "Federico II", II Policlinico, Ed. 20, Via S. Pansini 5, 80131 Napoli*

RIASSUNTO. Il Testo Unico in tema di tutela della salute e sicurezza nei luoghi di lavoro (D.Lgs. 81/08) fa esplicito riferimento alla necessità da parte del Medico Competente (MC) di prevedere nell'ambito della Sorveglianza Sanitaria accertamenti "*finalizzati alla verifica di assenza di condizioni di alcol dipendenza e di assunzione di sostanze stupefacenti*" (*art. 41, comma 4*).

Tale disposizione riconosce il ruolo cruciale del MC nel controllo dei lavoratori per l'incolumità verso terzi e propria, ma rende necessaria un'approfondita conoscenza dei principi della medicina forense.

In tale ambito, nel presente lavoro vengono discussi in dettaglio le caratteristiche delle procedure analitiche utilizzate per la verifica di assunzione di oppiacei, cocainici, cannabinoidi ed amfetaminici, focalizzandosi su sensibilità, specificità ed accuratezza dei metodi analitici. Inoltre, verranno trattati nel dettaglio i tempi di metabolizzazione/escrezione di dette sostanze, le eventuali possibili adulterazioni del campione biologico nonché la scelta del tipo di analisi più appropriate per una corretta interpretazione del dato analitico.

Parole chiave: assunzione stupefacenti, test di screening, analisi di conferma.

DIAGNOSTIC TESTS FOR THE DRUG CONSUMPTION ASCERTAINMENT IN THE WORKPLACES

ABSTRACT. *The Italian Legislative Decree 81/08 for health and safety protection at the workplaces contains an explicit mention to the need for the Occupational Physician Responsible (OPR) to integrate the Sanitary Surveillance with tests "aimed to verify the absence of alcohol dependence and drug assumption conditions" (article 41, comma 4).*

Such disposition highlights the crucial role played by the OPR in order to ensure the workers' and others' safety and, as a consequence, requires a deep knowledge of the forensic-medicine principles. To such purpose, the present paper is aimed to discuss in details the characteristics of the analytical procedures used for opiates, cocaine, cannabis and amfetamine consumption ascertainment, focusing on sensitivity, specificity and accuracy of analytical methods. Moreover the basics of drug metabolization/excretion will be discussed, as well as the possible adulterations of the biological samples and also the more appropriated analysis to be required for a correct data interpretation.

Key words: *drug assumption, screening tests, confirmation analyses.*

Corrispondenza: Dr.ssa Maria Pieri - Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Medicina del Lavoro, Igiene e Tossicologia Industriale, Seconda Università degli Studi di Napoli, Via De Crecchio, 7, 80138, Napoli, Italy - Phone +39 0817463470/71/72/74, Fax +39 081 5469185, E-mail: maria.pieri@unina2.it

INTRODUZIONE

Il Testo Unico in tema di tutela della salute e sicurezza nei luoghi di lavoro (D.Lgs. 81/08) (1) fa esplicito riferimento alla necessità da parte del Medico Competente (MC) di prevedere nell'ambito della Sorveglianza Sanitaria accertamenti "*finalizzati alla verifica di assenza di condizioni di alcol dipendenza e di assunzione di sostanze stupefacenti*" (art. 41, comma 4). Appare opportuno sottolineare che suddetti accertamenti non sono da intendersi come accertamenti "pre-assuntivi" ma come "visita medica preventiva", finalizzata a prevenire incidenti collegati allo svolgimento delle mansioni lavorative a rischio. L'Accordo Stato-Regioni del 30/10/2007 elenca le "*mansioni che comportano rischi per la sicurezza, l'incolumità di terzi e proprie, anche in riferimento ad un consumo solo occasionale di sostanze stupefacenti e psicotrope*" (2). Alla luce di quanto indicato nell'Accordo, un Gruppo di Lavoro del Ministero della Salute sta approntando un iter procedurale per la verifica di assunzione delle sostanze stupefacenti suddiviso in due livelli accertativi (3). Il documento, ancora in fase di perfezionamento, prevede un primo livello d'indagine in cui il MC, oltre alle indagini anamnestico-cliniche, esegua test di screening su un campione di urina, da suddividersi in tre aliquote (screening, analisi di conferma e contro-analisi). I suddetti test possono essere eseguiti presso laboratori accreditati dalla Regione o, ove possibile, *on-site "avvalendosi di test immunochimici con registrazione oggettiva a stampa dei risultati"* (3), escludendo *de facto* la possibilità da parte del MC di utilizzare i diversi kit colorimetrici commercialmente disponibili, a meno che essi non siano collegabili ad una stampante/registratore.

La positività del test di screening attiva il successivo livello di analisi (conferma), da effettuarsi presso la struttura sanitaria competente. In

esta fase, le indagini vanno eseguite mediante tecniche cromatografiche accoppiate a spettrometria di massa. Le analisi di conferma possono essere eseguite anche su matrice pilifera (capelli della regione nucale o peli pubici) (3), che consente di ampliare la finestra temporale di indagine fino a sei mesi per i capelli e un anno per i peli pubici. In tal caso, il campione va necessariamente analizzato mediante cromatografia/spettrometria di massa. Il lavoratore, entro 30 giorni, può richiedere l'esecuzione di contro-analisi in matrice sia urinaria che pilifera.

Al fine di fornire al MC tutte le informazioni indispensabili per una corretta esecuzione dell'accertamento di assunzione di sostanze d'abuso, verranno trattati nel dettaglio i tempi di metabolizzazione/escrezione di dette sostanze, le eventuali possibili adulterazioni del campione biologico nonché la scelta del tipo di analisi da eseguire/richiedere per una corretta interpretazione del dato: temi indispensabili per il perfezionamento dell'iter procedurale in fase di elaborazione.

METODO D'INDAGINE

Lo studio ha preso in considerazione le classi di sostanze stupefacenti maggiormente diffuse: oppiacei, cocainici, cannabinoidi, amfetaminici, evidenziandone le proprietà tossicocinetiche e i principali metodi di quantificazione su matrice urinaria e pilifera riportati in letteratura. Le metodiche analitiche sono state paragonate rispetto a specificità, accuratezza, sensibilità, precisione e riproducibilità del dato.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Metabolizzazione/escrezione (4)

I tempi di metabolizzazione/escrezione delle diverse sostanze stupefacenti dipendono dalla via di somministrazione, dalla dose, dal tempo trascorso dall'ultima assunzione nonché dal metabolismo individuale. L'*eroina*, ad esempio, viene rapidamente metabolizzata a morfina e 6-monoacetilmorfina, circa l'80% della dose assorbita è escreta nelle urine come coniugato glucuronico, il 5-7% come morfina libera. I metaboliti urinari possono essere rilevati nelle urine per 48-72 ore, in funzione della specificità e sensibilità del metodo analitico adoperato. Similmente, l'eliminazione urinaria della *cocaina* può ritenersi completa nelle 48 h e il 30% della dose di *amfetamina* assunta è escreta in 24 h (eliminazione completa in 3-4 gg). Nel caso dell'ecstasy (metilendiossimetamfetamina) e del *tetraidrocannabinolo* (THC), invece, la metabolizzazione è più lenta: il 65% della dose di ecstasy viene escreta in 3 gg e il THC continua ad essere escreto per circa 10-14gg, con conseguente aumento dell'intervallo temporale in cui poter eseguire l'indagine di avvenuta assunzione. Da quanto esposto, appare evidente che l'esito negativo di indagini condotte su campioni urinari non significa necessariamente che il soggetto indagato non assuma saltuariamente sostanze stupefacenti, rendendo indispensabile la programmazione di frequenti controlli "a campione". Le sostanze stupefacenti, incorporandosi nella matrice cheratinica, vengono *immobilizzate* permanendovi a lungo. L'analisi segmentale del capello, infatti, consente di verificare un'avvenuta assunzione fino ai sei mesi successivi, comportando, d'altra parte, un aumento dei costi analitici.

Adulterazione campione urinario

L'uso di sostanze adulteranti o la diluizione del campione, interferendo con i test di screening e/o degradando le droghe stesse, possono determinare falsi negativi. È possibile evidenziare un'adulterazione o diluizione controllando determinate caratteristiche urinarie, quali creatinina, pH e peso specifico e rilevando la presenza di glutaraldeide, nitriti e ossidanti (per evidenziare l'aggiunta di candeggina e acqua ossigenata). Il campione urinario è da ritenersi *diluito* se i livelli di creatinina sono inferiori a 20 mg/dL e la densità relativa inferiore a 1.003. Il campione urinario è definito *alterato* se: la concentrazione di nitriti è maggiore o uguale a 500 µg/mL; il pH è inferiore a 3 o maggiore o uguale a 11, contiene sostanze esogene o una concentrazione di sostanze endogene *maggiori rispetto alle normali condizioni fisiologiche* (4). Onde evitare costi aggiuntivi (es: creatinuria), e poiché risulta discutibile prevedere che *il soggetto non venga lasciato solo durante la raccolta, garantendo* allo stesso tempo *il rispetto della dignità della persona* (3), l'integrità del campione potrebbe essere verificata, misurandone temperatura e pH immediatamente dopo la minzione.

Test di screening immunoenzimatici

I test immunoenzimatici sono tra i metodi analitici maggiormente usati per rilevare la presenza di sostanze d'abuso in campioni biologici, in quanto assicurano uno screening contemporaneo delle principali classi di sostanze stupefacenti utilizzando pressoché tutte le matrici biologiche. Mentre i limiti di quantificazione (nell'ordine delle decine di ng/mL) risultano inferiori rispetto ai cut-off tabulati (3, 4), specificità e riproducibilità analitica rappresentano punti critici dei test immunoenzimatici. Infatti: anche nei kit di nuova generazione l'anticorpo può reagire con metaboliti e/o analoghi strutturali della sostanza stupefacente, generando falsi positivi; l'imprecisione intra-saggio e l'eventuale non-riproducibilità tra lotti differenti rende necessario richiedere analisi di conferma basate su tecniche cromatografiche. Appare utile consigliare ai MC di avvalersi per i test di screening di laboratori che usino kit certificati e partecipino a programmi di controllo interlaboratoriali nazionali o internazionali.

Analisi di conferma su matrice urinaria o pilifera

L'esatta identificazione e quantificazione delle sostanze d'abuso nei campioni positivi allo screening richiede un livello di analisi superiore, in cui è indispensabile avvalersi della spettrometria di massa, unica tecnica analitica in grado di fornire un risultato inconfutabile grazie al confronto degli spettri di massa di campione incognito e standard di riferimento; inoltre, l'accuratezza del dato quantitativo risulta assicurata dall'uso di standard interni deuterati. L'accoppiamento della spettrometria di massa con tecniche cromatografiche, nonché un iniziale purificazione/concentrazione dei campioni, consente di abbassare i limiti di quantificazione fino a 0.5-10 µg/L di urina e 0.05-0.1 µg/g di capelli (4). Tali performance richiedono personale esperto e qualificato, capace di gestire un'apparecchiatura sofisticata e fornire una corretta interpretazione dei dati analitici. Anche in questo caso appare utile sottolineare l'importanza dei programmi di controllo interlaboratoriali al fine di garantire il rispetto degli standard di qualità.

CONCLUSIONI

Considerata la delicatezza della materia e le conseguenze degli accertamenti tossicologici per i lavoratori appare imprescindibile una multidisciplinarietà di approccio, nell'ambito della quale il MC si avvalga, se necessario fin dalla fase di screening, dell'esperienza dei colleghi tossicologi forensi e di laboratori accreditati presso le Regioni o il Ministero della Salute.

L'UTILIZZO DELLA CDT NELLA DIAGNOSI DI ABUSO ALCOLICO CRONICO

N. Scifo[1], S. Tomasello[2], P.E. Santoro[3], M. Spataro[4], A. Giallongo[1], L. Proietti[1]

[1] *Università degli Studi di Catania, Dipartimento di Medicina Interna e Patologie Sistemiche Sezione Medicina del Lavoro*

[2] *Università degli Studi di Catania, Dip.to "G.F. Ingrassia", Laboratorio di Tossicologia Forense*

[3] *Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma, Istituto di Medicina del Lavoro*

[4] *L.U.M.S.A. Roma, Facoltà di Scienze della Formazione*

Parole chiave: abuso alcolico cronico, CDT, Legge 125/2001.

EMPLOYMENT OF CDT IN CHRONIC ALCOHOL ABUSES

ABSTRACT. *In western society alcoholism represents one of the most important medical and social problems with important consequences for the individual and the society. For objective diagnosis of alcohol abuses several markers have been proposed among which carbohydrate-deficient transferrin, known as CDT, because of its high diagnostic sensitivity and specificity is becoming one of the most used marker in both clinical and forensic environments. Transferrin is a plasma protein that carries iron through the bloodstream to the liver. Structurally, transferrin is a polypeptide with two N-linked polysaccharide chains. These polysaccharide chains are branched with sialic acid residues. Various forms of transferrin exist, with differing levels of sialylation. The most common form is tetrasialotransferrin, with four sialic acid chains. In persons who consume significant quantities of alcohol (usually more than 50-80 g a day for two weeks or more), the proportion*