

Ao6
154

Nadia De Giovanni
Nadia Fucci

**LE MATRICI BIOLOGICHE
NON CONVENZIONALI
IN TOSSICOLOGIA FORENSE**

DIAGNOSTICA MEDICO–LEGALE



Copyright © MMXI
ARACNE editrice S.r.l.

www.aracneeditrice.it
info@aracneeditrice.it

via Raffaele Garofalo, 133/A-B
00173 Roma
(06) 93781065

ISBN 978-88-548-3967-0

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,
di riproduzione e di adattamento anche parziale,
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

*Non sono assolutamente consentite le fotocopie
senza il permesso scritto dell'Editore.*

I edizione: aprile 2011

7 Introduzione

1. Matrici tradizionali – 2. Campioni biologici non convenzionali

15 Capitolo I

Matrici da vivente

1.1. Matrice cheratinica: capelli e peli corporei – 1.1.1. Anatomia e fisiologia del pelo – 1.1.2. Meccanismo di incorporazione di xenobiotici – 1.1.3. Linee guida – 1.1.4. Il prelievo – 1.1.5. Indagini chimico tossicologiche – 1.1.6. Cut-off – 1.1.7. Interpretazione dei risultati analitici – 1.1.8. Campi di applicazione – 1.1.9. Analisi dei capelli nella diagnosi di abuso alcolico – 1.2. Matrice cheratinica: le unghie – 1.3. Saliva – 1.3.1. Meccanismo di incorporazione di xenobiotici – 1.3.2. Linee guida e prelievo – 1.3.3. Indagini chimico tossicologiche e cut-off – 1.3.4. Interpretazione dei risultati analitici – 1.3.5. Campi di applicazione – 1.4. Sudore – 1.4.1. Meccanismo di incorporazione di xenobiotici – 1.4.2. Linee guida e prelievo – 1.4.3. Indagini chimico tossicologiche e cut-off – 1.4.4. Interpretazione dei risultati analitici – 1.4.5. Campi di applicazione – 1.5. Altri campioni da vivente

59 Capitolo II

Matrici da cadavere

2.1. Umor vitreo – 2.2. Denti – 2.3. Altri campioni biologici da cadavere – 2.4. Problematiche legate alla tipologia della matrice

6 Le matrici biologiche non convenzionali in tossicologia forense

69 Capitolo III

Matrici per la diagnosi perinatale

3.1. Campioni biologici ottenuti dalla madre – 3.2. Il compartimento materno-fetale – 3.3. Prelievi dal neonato

79 Capitolo IV

Conclusioni

81 *Bibliografia*

Introduzione

La tossicologia forense è una disciplina scientifica nata nell'ambito della medicina legale, che si occupa prevalentemente della diagnosi di intossicazione acuta da xenobiotici e della determinazione di uno stato di tossicodipendenza in diversi contesti sia legali che amministrativi, affrontando diverse problematiche riguardanti sia soggetti viventi che cadaveri (1, 2).

Tutti i settori che implicano ricadute importanti nella vita sociale e civile di un individuo, possono essere oggetto di studio da parte del tossicologo forense che viene ad esempio coinvolto nel monitoraggio del contratto terapeutico nei programmi di riabilitazione, nella certificazione di presenza/assenza di tossicodipendenza, nei controlli correlati alle performance di guida, nell'accertamento di intossicazioni acute e/o croniche (omicidiarie, suicidiarie, accidentali), nel controllo del personale a rischio nei luoghi di lavoro, in accertamenti di tipo assicurativo e di doping.

Nel laboratorio, il processo di investigazione inizia già dalla strategia utilizzata nella scelta del campione biologico, che deve essere basata su una profonda conoscenza di numerosi parametri, tra i quali spiccano la finalità dell'indagine, il tipo di sostanza da identificare, tempo, modo e tipologia dell'assunzione nonché la conoscenza della farmacocinetica e della farmacodinamica delle sostanze coinvolte.

Il sangue e le urine rappresentano storicamente le matrici biologiche più utilizzate per l'accertamento oggettivo di uso/abuso di sostanze stupefacenti sia per quanto riguarda il cadavere che per i soggetti viventi (1, 3).

Scopo di questo trattato è fornire alcune chiavi di lettura per coadiuvare il lavoro degli operatori nel settore medico legale e aggiornare le conoscenze di tutte quelle figure professionali che operano in campo forense. Potrà essere quindi di ausilio agli operatori sanitari che devono gestire delle situazioni in merito ai problemi alcol-droghe correlati quali ad esempio i medici legali, i medici del lavoro che devono emettere giudizi di idoneità per lavoratori con mansioni a rischio, gli operatori di Pronto Soccorso. Un'altra figura professionale che potrebbe giovare della lettura di queste pagine è costituita dagli operatori dei reparti di ostetricia e neonatologia che devono gestire anche pazienti tossicodipendenti e neonati con patologie riconducibili ad assunzione di xenobiotici durante la gravidanza.

Negli ultimi anni i tossicologi forensi hanno focalizzato la propria attenzione sull'utilizzo di campioni biologici alternativi (4, 5, 6, 7), con il duplice scopo di rendere meno invasivi i prelievi, e ottenere un maggior numero di informazioni relative all'uso/abuso di sostanze psicotrope. Lo studio approfondito di tali campioni ne ha evidenziato pregi e difetti sottolineando la loro utilità nell'affiancare le matrici biologiche tradizionali in ambito medico legale; tuttavia alcune problematiche non sono state completamente chiarite e sono tuttora oggetto di sperimentazione.

Il criterio di scelta del campione biologico deve essere strettamente correlato alle informazioni richieste, quindi verrà utilizzata una diversa matrice a seconda della finalità dell'indagine: ad esempio per l'attestazione di uno stato psico-fisico del soggetto al momento di un particolare evento si utilizzeranno campioni biologici diversi da quelli scelti per la determinazione dello stato di dipendenza da una determinata sostanza. Una importante differenza tra i vari campioni biologici consiste nella finestra temporale entro la quale la droga può essere identificata; il tempo di eliminazione dello "xenobiotico" varia infatti da poche ore per sangue e saliva, due-tre giorni per le urine, alcuni giorni per il sudore, alcuni mesi per le matrici cheratiniche.

Altre differenze da considerare riguardano la facilità del prelievo, la sua invasività, i costi delle analisi, la validità e riproducibilità dei risultati, la possibilità di interferenze, le difficoltà analitiche.

Nei paragrafi relativi a ciascuna matrice biologica verranno discussi tutti questi parametri e saranno evidenziate le peculiarità dei diversi campioni.

Matrici biologiche tradizionali

Il sangue e le urine rappresentano le matrici biologiche tradizionalmente utilizzate in ambito forense (1, 3). Il campione ematico può essere impiegato per la determinazione di una assunzione recente di droghe, mentre il campione di urine per verificare eventuali assunzioni pregresse anche se non lontane nel tempo.

Il *sangue* è il campione d'elezione per la ricerca di sostanze esogene grazie alle conoscenze di farmacocinetica e farmacodinamica di numerosi tossici, ed è l'unica matrice tradizionale in grado di fornire informazioni sullo stato di intossicazione di un soggetto al momento del prelievo, come necessario ad esempio nel caso di un incidente stradale. Un importante vantaggio del campione ematico è la relativa omogeneità della matrice che ha la caratteristica di mantenere pressoché inalterati i parametri fisiologici.

Purtroppo il prelievo ematico da vivente ha sempre creato numerosi problemi sia di carattere operativo che etico comportando inoltre una serie di problematiche relative alla sua invasività e al rischio biologico cui vengono esposti gli operatori sanitari.

Per quanto attiene al prelievo da cadavere è necessario fare anche altre considerazioni sia di carattere operativo che di tipo interpretativo. È infatti possibile effettuare il prelievo del sangue da diversi distretti corporei sia dalla cavità cardiaca che da sedi periferiche (femorale, giugulare. . .); la sede del prelievo oltre a caratterizzare l'operatività, offre anche diversi spunti di carattere interpretativo come di seguito riportati.

Il sangue cardiaco è generalmente disponibile in quantità superiore rispetto al sangue periferico ed il suo prelievo è di più semplice esecuzione; tuttavia la concentrazione delle sostanze esogene non rispecchia sempre la realtà e i livelli di droga nel sangue cardiaco sono generalmente più alti rispetto al sangue venoso femorale (1).

Inoltre è necessario tenere conto della redistribuzione delle sostanze, delle modifiche post-mortali, della possibilità di inquinamento esterno in sede autoptica e della possibilità di diffusione passiva di molecole di piccole dimensioni assunte per via orale (trasferimento dallo stomaco alla cavità cardiaca). Tale campione biologico dovrebbe essere quindi preferibilmente utilizzato nei test tossicologici preliminari, mentre nelle analisi di conferma è auspicabile l'impiego del sangue periferico considerato il campione che fornisce informazioni più vicine alla realtà. Nell'indagine tossicologica su cadavere si presentano quindi problematiche diverse e di maggior entità rispetto al vivente a causa dei processi post-mortali che rendono la manipolazione del campione più difficile e la lettura del risultato più elaborata (per l'interferenza di sostanze esogene co-estratte) con conseguenti ripercussioni sull'interpretazione del dato analitico.

Il sangue periferico quindi è il campione cui fare riferimento perché le analisi possano avere un valore di prova; purtroppo non è sempre disponibile una quantità di campione adeguata alle richieste analitiche ed il prelievo risulta di difficile esecuzione in quanto deve essere effettuato prima di iniziare l'autopsia, per scongiurare perdite ed inquinamento.

L'altra matrice biologica routinariamente utilizzata in ambito tossicologico forense, è rappresentata dal campione di *urine*, il più usato per l'analisi delle droghe d'abuso e i loro metaboliti in quanto la gran parte delle sostanze esogene vengono eliminate principalmente attraverso le vie urinarie. Alcune caratteristiche peculiari quali la facilità di prelievo, il volume che può essere raccolto (generalmente sufficiente all'espletamento di tutte le analisi — screening e conferma — ed eventuali ripetizioni), la relativa semplicità della matrice (che lo rende adattabile a numerose procedure analitiche), la conoscenza approfondita del metabolismo di gran parte delle sostanze tossiche e le elevate concentrazioni degli xenobiotici rendono questo fluido corporeo particolarmente idoneo alle diverse tipologie di indagine.

La finestra temporale (il periodo di presenza delle sostanze nel campione biologico) è superiore a quella del sangue; nelle urine infatti è possibile evidenziare metaboliti di xenobiotici in un arco di

tempo che va da 24 a 72 ore o più in relazione alla diversa tipologia di sostanza. Questa caratteristica è particolarmente rilevante quando si renda necessario un controllo pregresso di assunzione di sostanze stupefacenti.

Nonostante i numerosi vantaggi vi sono da considerare tuttavia alcune problematiche tipiche del campione urinario quali ad esempio la possibilità di adulterazione che può essere effettuata con varie modalità: mediante l'aggiunta di sostanze estranee in grado di alterare i risultati, attraverso l'assunzione di grandi quantità di liquidi associati o meno a diuretici, mediante sostituzione del campione (pratica diffusamente pubblicizzata anche attraverso siti internet). Tutte queste manipolazioni comportano in sede analitica risultati alterati che non sono sempre facilmente individuabili. Proprio per questi motivi quando l'accertamento ha finalità medico legale, diventa indispensabile il prelievo a vista delle urine sotto il controllo di operatori nonché la valutazione di alcuni parametri chimico-fisici quali il pH, la densità, la temperatura, il valore di creatinina.

Altri aspetti svantaggiosi che è necessario tenere nella dovuta considerazione sono costituiti principalmente dalla mancanza di correlazione delle concentrazioni delle droghe d'abuso rinvenute nel campione urinario con la dose assunta, nonché dall'impossibilità di determinare in modo esatto il tempo dell'assunzione della droga.

I campioni di sangue e di urine forniscono quindi informazioni diverse, utili per finalità diagnostiche nel contesto medico legale; da tali informazioni è possibile ottenere indicazioni riguardanti le circostanze in cui si è verificato l'evento, il tempo di assunzione, gli stati di cronicità o altro.

Campioni biologici non convenzionali

La ricerca scientifica in materia di tossicologia forense è riuscita nel corso degli anni a stabilire la possibilità di utilizzare altre matrici biologiche che possono affiancare quelle tradizionali apportando un contributo importante ai fini dell'interpretazione del dato analitico (8, 9, 10).

L'aumento degli studi relativi alle matrici non convenzionali è legato sia alla possibilità di ottenere informazioni temporali di maggiore durata sull'assunzione di xenobiotici, sia alla possibilità di effettuare prelievi meno invasivi del sangue.

Tra i problemi tecnici che limitano la maggiore diffusione di queste matrici vi è da sottolineare la carenza di idonei controlli di qualità, di standardizzazione delle procedure e di definiti valori di riferimento (cut-off), la scarsità di tecniche analitiche dedicate allo screening, nonché la conoscenza non esaustiva della relazione tra concentrazioni e tempo-dose-frequenza dell'assunzione.

Per quanto riguarda gli accertamenti su vivente le matrici cheratiniche, la saliva ed il sudore rappresentano i campioni biologici alternativi più ampiamente studiati negli ultimi decenni. In particolare la saliva è stata oggetto di grande attenzione principalmente dal punto di vista clinico soprattutto in ambito pediatrico, e in alternativa al campione ematico nelle indagini di paternità. Successivamente anche altre indagini forensi hanno dato massima evidenza dell'utilità di questo campione biologico per la determinazione di sostanze esogene quali ad esempio quelle effettuate nell'ambito dell'infortunistica stradale (Nuovo Codice della Strada, D. L. 30 aprile 1992 n. 285 e successivi aggiornamenti, Legge n. 120 del 29 luglio 2010).

Le matrici cheratiniche hanno suscitato interesse già nell'ottocento e da molti anni trovano ampio consenso scientifico nel loro utilizzo in ambito tossicologico forense come ampiamente discusso nei paragrafi successivi.

La letteratura scientifica internazionale più di recente ha sviluppato numerosi approcci analitici per la determinazione di tossici nel sudore; questa matrice ha come peculiarità quella di avere una finestra di rilevabilità a medio termine, fornendo informazioni diverse rispetto alle altre matrici biologiche.

Negli ultimi anni una particolare attenzione è stata rivolta alla diagnosi precoce di patologie correlate all'assunzione di sostanze tossiche in gravidanza attraverso lo studio di diversi materiali biologici quali il meconio ed il fluido amniotico.

Per quanto riguarda la diagnostica su cadavere numerose altre matrici si sono affiancate a quelle abitualmente utilizzate in ambito

tossicologico forense per contribuire ad una corretta valutazione dei dati ottenuti.

Di ciascuno di questi campioni alternativi saranno trattati alcuni aspetti di fisiologia, meccanismi di incorporazione delle droghe, metodi analitici per la loro identificazione, interpretazione dei risultati e possibili applicazioni in ambito medico-legale.