



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

Presidente Prof. Marcello Rattazzi

TESI DI LAUREA:

Studio di fattibilità dell'analisi point-of-care per la determinazione delle più comuni droghe d'abuso nel Pronto Soccorso dell'Azienda Ospedale-Università di Padova

Relatrice: Prof.ssa Daniela Basso

Correlatrice: Dott.ssa Foscarina Della Rocca
Dott.ssa Mariela Marinova

Laureando: Stefano Zanotto
Matricola: 1118775

ANNO ACCADEMICO 2021/2022



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

Presidente Prof. Marcello Rattazzi

TESI DI LAUREA:

Studio di fattibilità dell'analisi point-of-care per la determinazione delle più comuni droghe d'abuso nel Pronto Soccorso dell'Azienda Ospedale-Università di Padova

Relatrice: Prof.ssa Daniela Basso

Correlatrice: Dott.ssa Foscarina Della Rocca
Dott.ssa Mariela Marinova

Laureando: Stefano Zanotto
Matricola: 1118775

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	4
INTRODUZIONE	7
1.1 Le sostanze stupefacenti: cenni storici	7
1.1.1 Breve storia delle sostanze stupefacenti	7
1.1.2 Nuove tipologie di sostanze stupefacenti e “designer drugs”	9
1.2 Caratteristiche delle principali droghe d’abuso e cenni di trattamento	10
1.2.1 Neurofisiologia alla base degli effetti delle sostanze stupefacenti e dell’abuso di sostanze	10
1.2.2 Alcol etilico	12
1.2.3 Anfetamine	14
1.2.4 Metanfetamina	16
1.2.5 Metilenediossimetanfetamina (MDMA o Ecstasy)	19
1.2.6 THC e cannabinoidi	22
1.2.7 Cocaina	25
1.2.8 Benzodiazepine	31
1.2.9 Barbiturici	34
1.2.10 Oppioidi	36
1.2.11 Metadone	41
1.2.12 Buprenorfina	42
1.3 Approccio al paziente consumatore di droghe d’abuso	43
1.3.1 Le problematiche connesse all’utilizzo di sostanze stupefacenti in Pronto Soccorso	43
1.3.2 Trattamento del paziente con sospetta intossicazione	44
1.3.2.1 Decontaminazione	46
1.3.3 Eliminazione	48
1.4 Scopo degli accertamenti tossicologici e metodologie di analisi	49
1.4.1 Procedure e scopo degli accertamenti	49

1.4.2	Cenni di legislazione.....	49
1.4.3	Stato dell'arte delle analisi tossicologiche.....	50
1.4.4	Matrici disponibili per l'esecuzione di analisi tossicologiche.....	50
1.4.5	Cromatografia liquida	52
1.4.6	Spettrometria di massa	52
1.4.7	Test immunochimici.....	54
<i>OBIETTIVI DELLO STUDIO</i>		57
<i>MATERIALI E METODI</i>		58
3.1	Disegno dello studio	58
3.2	Metodiche analitiche utilizzate.....	59
3.2.1	Analisi di screening su matrice urinaria: strumentazione Point-Of-Care (POCT) "QUIDEL Triage TOX Drug Screen 964000"	59
3.2.2	Analisi di screening su matrice urinaria: strumentazione "ILab Taurus"	60
3.2.3	Analisi di conferma su matrice urinaria: strumentazione LC-HRMS.....	64
3.3	Dati analizzati.....	66
3.4	Analisi statistica.....	67
<i>RISULTATI</i>		68
4.1	Analisi tossicologica su matrice urinaria	72
4.2	Analisi statistica.....	73
4.3	Descrizione di casi clinici discussi durante la raccolta dati.....	75
La raccolta dei dati ha evidenziato un totale di 3 casi che hanno richiesto una più approfondita valutazione ed interpretazione del dato analitico:..		75
<i>DISCUSSIONE</i>		77
<i>CONCLUSIONI</i>		80
<i>BIBLIOGRAFIA</i>		81

RIASSUNTO

“Studio di fattibilità dell’analisi point-of-care per la determinazione in emergenza delle più comuni droghe d’abuso nel Pronto Soccorso dell’Azienda Ospedale-Università di Padova”

Background: La determinazione delle principali sostanze d’abuso nei pazienti che accedono al Pronto Soccorso (PS) può essere effettuata per scopi clinici o forensi. Nel primo caso contribuisce alla diagnosi differenziale nei pazienti con alterazioni del sensorio, convulsioni, agitazione psicomotoria, delirium e traumatismo grave. Nel secondo il Medico di PS viene incaricato dall’Autorità Giudiziaria (AG) di eseguire un prelievo di campioni di fluidi biologici per eseguire accertamenti tossicologici ex art 186-178 Codice della Strada (CdS), nei soggetti che forniscono un consenso valido. Attualmente nell’Azienda Ospedale-Università di Padova (AOUP) tutti gli accertamenti sia per finalità cliniche che forensi, vengono eseguiti presso il laboratorio della Medicina Legale dell’Università di Padova ma i risultati di tali analisi non sono disponibili in tempi compatibili con quelli dell’emergenza. Potrebbe essere utile disporre di un test di screening tossicologico a risposta rapida da utilizzare nell’ambito dell’emergenza, anche se ancor oggi è un argomento largamente dibattuto in letteratura. Il presente Progetto va nella direzione di un auspicato potenziamento degli strumenti diagnostici finalizzati a meglio intercettare in urgenza gli utenti con intossicazione da droghe d’abuso.

Obiettivi dello studio: questo studio ha l’obiettivo di valutare la fattibilità dell’analisi point-of-care (metodo immunoenzimatico QUIDEL Triage TOX Drug Screen 94600) per la determinazione in emergenza delle più comuni droghe d’abuso al PS AOUP realizzando un percorso condiviso fra PS e Medicina di Laboratorio per la determinazione delle principali sostanze d’abuso nelle urine. Questa analisi viene condotta in parallelo a quella eseguita in Medicina Legale con metodiche cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa che rappresentano in gold standard.

Materiali e metodi: Nel periodo compreso fra il 18 febbraio e 19 giugno 2022 abbiamo arruolato tutti i soggetti traumatizzati acceduti al PS con richiesta dell'AG di accertamenti tossicologici ex art 186-178 CdS. Dopo aver richiesto il consenso ai pazienti, oltre ai campioni di sangue e urine da inviare al laboratorio della Medicina Legale, abbiamo raccolto un'aliquota supplementare di urine da destinare al Laboratorio Urgenze per l'esecuzione del test Point of Care (POCT QUIDEL Triage TOX Drug Screen 96400). I risultati delle analisi sono stati raccolti in un database su foglio di excell dove i dati sono stati anonimizzati. Parallelamente dal sistema informatico in uso presso l'AOUP (Galileo) abbiamo ricavato i seguenti dati: quadro clinico, modalità di ingresso, codice del triage, terapia. Al fine di valutare l'affidabilità del metodo con il saggio immunometrico "QUIDEL Triage TOX Drug Screen, 94600" eseguito dalla Medicina di Laboratorio abbiamo confrontato i risultati di questo test con quelli delle analisi effettuate con tecnica HPLC-MS (High Performance liquid chromatography – Mass Spectrometry) sui campioni di urina inviati alla Medicina Legale.

Con entrambi i metodi abbiamo testato le seguenti sostanze psicoattive: THC (tetraidrocannabinoidi) e cannabinoidi, cocaina, anfetamine, metanfetamine ed MDMA (3,4 metilene diossimetamfetamina), cocaina, oppiacei, EDDP (metabolita del metadone), benzodiazepine, barbiturici.

Risultati: la popolazione studiata era composta di 100 pazienti, di cui soggetti di sesso femminile sono 16 e 84 di sesso maschile, principalmente di nazionalità italiana (80). La maggior parte dei pazienti (55) è arrivata in PS con ambulanza non medicalizzata, 35 con ambulanza con medico, 10 autonomamente o scortati dalle forze dell'ordine. Al triage a 18 pazienti (18 %) è stato assegnato il codice triage rosso, a 16 (16 %) il codice arancione, a 47 (47 %) con il codice giallo e 19 (19 %) con il codice bianco. La maggior parte dei pazienti (91 %) presentava una Glasgow Coma Scale di 15. 22 (22 %) pazienti non presentavano traumatismo, 21 (21 %) trauma cranico, 10 (10 %) un trauma del massiccio facciale, 17 (17 %) trauma alla colonna vertebrale, 31 (31 %) un trauma toracico, 7 (7 %) un trauma addominale, 8 (8 %) di bacino e 48 (48 %) trauma degli arti. 77 pazienti (77 %),

sono stati dimessi dal PS, 13 (23 %) sono stati ricoverati (2 Chirurgia, 6 Unità di Terapia Intensiva, 13 in reparti diversi). La prognosi assegnata ai pazienti è stata per 56 di essi <20 giorni, per 15 compresa tra 20 e 40 giorni, per 8 > 40 giorni e 8 prognosi riservata.

Dagli esami tossicologici effettuati con il test “QUIDEL triage TOX Drug Screen” sono state riscontrate 32 positività totali a sostanze stupefacenti, di queste 7 pazienti sono risultati positivi a multiple sostanze; 12 positivi a cannabinoidi (THC), 12 alla cocaina, 3 a oppiacei, 1 per EDDP (principale metabolita del metadone) e 13 a benzodiazepine. Dai risultati pervenuti dalla Medicina Legale si sono riscontrate 9 positività per cannabinoidi, 9 per cocaina, 3 per oppiacei e 9 per benzodiazepine.

Conclusioni: nei PS lo screening per le più comuni droghe d’abuso viene usato come test diagnostico perché fornisce risultati rapidi rispetto all’esame di routine sebbene con tutte le limitazioni legate al fatto che lo screening urine nasce come test di screening (eseguito su una popolazione per identificare malattie a livello subclinico) e non come test diagnostico (su un singolo individuo).

La conoscenza della specifica sostanza psicotropa da cui è intossicato un paziente critico non ne modifica la gestione in emergenza, ma può rivelarsi utile nella diagnosi differenziale e nella gestione successiva.

ABSTRACT

"Feasibility Study of Point-of-Care Analysis for Emergency Determination of the Most Common Drugs of Abuse in the Emergency Room of the Azienda Ospedale-Università of Padua"

Background: The determination of major substances of abuse in patients accessing the emergency department (ED) can be performed for clinical or forensic purposes. In the first case it contributes to the differential diagnosis in patients with sensory alterations, seizures, psychomotor agitation, delirium and severe trauma. In the second, the PS Physician is instructed by the Judicial Authority (AG) to sample biological fluids to perform toxicological investigations ex art 186-178 Highway Code (CdS), in subjects who provide valid consent. Currently in the Azienda Ospedale-Università of Padua (AOUP), all investigations for both clinical and forensic purposes are performed at the laboratory of the Forensic Medicine of the University of Padua, but the results of these tests are not available in times compatible with those of the emergency. It might be useful to have a rapid-response toxicology screening test for use in the emergency setting, although this is still a widely debated topic in the literature. The present Project goes in the direction of a desired enhancement of diagnostic tools aimed at better intercepting users with drug of abuse intoxication in emergencies.

Objectives of the Study: this study aims to evaluate the feasibility of point-of-care analysis (QUIDEL Triage TOX Drug Screen 94600 enzyme immunoassay method) for the emergency determination of the most common drugs of abuse at the PS AOUP by implementing a shared pathway between PS and Laboratory Medicine for the determination of the main drugs of abuse in urine. This analysis is conducted in parallel to that performed in Forensic Medicine with liquid chromatography coupled with mass spectrometry methods that represent in gold standard.

Materials and Methods: During the period between Feb. 18 and June 19, 2022, we enrolled all trauma subjects who accessed the PS with a request from the AG

for toxicological investigations ex art 186-178 CdS. After requesting consent from the patients, in addition to blood and urine samples to be sent to the Forensic Medicine laboratory, we collected an additional aliquot of urine to be sent to the Urgent Care Laboratory for Point of Care testing (POCT QUIDEL Triage TOX Drug Screen 96400). The test results were collected in an excell sheet database where the data were anonymized. In parallel, from the computer system in use at AOUP (Galileo) we obtained the following data: clinical picture, mode of admission, triage code, and therapy. To evaluate the reliability of the method with the immunoassay "QUIDEL Triage TOX Drug Screen, 94600" performed by the Laboratory Medicine, we compared the results of this test with those of the analysis performed with the HPLC-MS (High Performance liquid chromatography - Mass Spectrometry) technique on the urine samples sent to the Forensic Medicine.

Using both methods, we tested for the following psychoactive substances: THC (tetrahydrocannabinoids) and cannabinoids, cocaine, amphetamines, methamphetamines and MDMA (3,4-methylene dioxymethamphetamine), cocaine, opiates, EDDP (methadone metabolite), benzodiazepines, and barbiturates.

Results: The study population consisted of 100 patients, including 16 female subjects and 84 male subjects, mainly of Italian nationality (80). Most patients (55) arrived at the PS by non-medicated ambulance, 35 by ambulance with physician, 10 independently or escorted by law enforcement. At triage, 18 patients (18 %) were assigned triage code red, 16 (16 %) code orange, 47 (47 %) with code yellow and 19 (19 %) with code white. Most patients (91 %) had a Glasgow Coma Scale of 15. 22 (22 %) patients had no trauma, 21 (21 %) head trauma, 10 (10 %) a facial massif trauma, 17 (17 %) spine trauma, 31 (31 %) chest trauma, 7 (7 %) abdominal trauma, 8 (8 %) pelvis trauma and 48 (48 %) limb trauma. 77 patients (77 %) were discharged from the PS, 13 (23 %) were hospitalized (2 Surgery, 6 Intensive Care Unit, 13 in different wards). The prognosis assigned to the patients was for 56 of them <20 days, for 15 between 20 and 40 days, for 8 > 40 days, and 8 prognosis reserved.

From the toxicological examinations using the "QUIDEL Triage TOX Drug Screen 96400" test, 32 total drug positives were found, of these 7 patients tested positive

for multiple substances; 12 positive for cannabinoids (THC), 12 for cocaine, 3 for opiates, 1 for EDDP (main metabolite of methadone) and 13 for benzodiazepines. From the results received from Forensic Medicine, there were 9 positives for cannabinoids, 9 for cocaine, 3 for opiates, and 9 for benzodiazepines.

Conclusions: in PS, screening for the most common drugs of abuse is used as a diagnostic test because it provides rapid results compared with routine testing although with all the limitations associated with the fact that urine screening originates as a screening test (performed on a population to identify diseases at the subclinical level) and not as a diagnostic test (on an individual).

Knowledge of the specific psychotropic substance by which a critically ill patient is intoxicated does not alter his or her management in an emergency but may prove useful in differential diagnosis and subsequent management.

INTRODUZIONE

1.1 Le sostanze stupefacenti: cenni storici

1.1.1 Breve storia delle sostanze stupefacenti

Numerose fonti storiche testimoniano l'utilizzo fin dall'antichità di sostanze stupefacenti di derivazione vegetale a scopo curativo o ricreativo. Le proprietà curative dell'oppio estratto dal papavero (*Papaver somniferum*) sono note fin dai tempi dei sumeri, 5000 anni fa, e le testimonianze dell'impiego del prodotto dei papaveri da oppio in Mesopotamia ed in Cina risalgono al 2500 a. C ¹. Tra le popolazioni andine è ancor oggi comune l'utilizzo delle foglie di Coca, (*Erythroxylum Coca*) che contengono un alcaloide il cui effetto viene sfruttato per sopportare meglio la fatica o tollerare l'effetto della permanenza ad altitudini elevate ².

Diffuso era anche l'utilizzo a scopo religioso o divinatorio; presso numerose popolazioni l'assunzione rituale di sostanze con effetti psicotropi ed allucinogeni veniva utilizzata per entrare in contatto con il mondo spirituale. Ancora oggi alcune tribù del Centro e del Sud-America utilizzano durante i loro riti religiosi sostanze ad effetto enteogeno, come il decotto delle foglie dell'arbusto *Psychotria viridis* ³ detto Ayahuasca e il cactus peyote, che contiene diversi alcaloidi a potente effetto psicotropo, tra cui la mescalina ⁴.

In Europa nel corso dell'epoca medievale, in particolare durante l'alto medioevo, le sostanze psicotrope furono utilizzate sempre meno, ma dopo il 1300 famosi medici ed alchimisti, fra cui Paracelso, ripresero a studiare l'utilizzo dei derivati dell'oppio a scopo medico. A quest'epoca risale la scoperta del "Laudanum Paracelsi", una tintura di oppio che venne largamente usata anche nei secoli successivi ¹.

Più tardi, in particolare durante la seconda metà del XIX secolo, l'uso degli oppiacei a scopo medico divenne sistematico e su larga scala nell'ambito della medicina militare ¹. Parallelamente si diffuse l'assunzione a scopo ricreativo, con lo sviluppo di veri e propri fenomeni di tossicodipendenza di massa: nell'800 si stima che in Cina fossero presenti fino a 40 milioni di fumatori di oppio. ¹

Agli inizi del XX secolo le scoperte della chimica farmaceutica e lo sviluppo di nuove tecnologie hanno condotto alla produzione di molecole di sintesi spesso più potenti delle molecole analoghe derivate da estratti vegetali. Ad esempio, molti dei nuovi farmaci oppiacei sono derivati sintetici dotati di maggiore effetto dei principi attivi naturali. La diffusione su larga scala di farmaci o sostanze d'abuso sempre più potenti, favorita anche dalle due guerre mondiali, ha comportato un aumento dell'utilizzo inappropriato di farmaci, un maggiore utilizzo di sostanze d'abuso e quindi una maggiore diffusione delle tossicodipendenze.

Dal 1950 in poi il narcotraffico è andato progressivamente incontro ad un'enorme espansione su scala internazionale, elaborando strategie in grado di eludere le leggi che miravano a combatterlo. Fino all'inizio di questo secolo la produzione di droghe era concentrata soprattutto nei paesi del Centro e del Sud-America, nonché nei paesi dell'indopacifico, nell'Afghanistan, tutt'ora il primo paese al mondo per la coltivazione di papavero da oppio, e nell'Est-Europa, in particolare nei Balcani ⁵. Colombia e Bolivia ospitano vaste piantagioni di coca mentre il Messico è sede di raffinazione della cocaina e punto di passaggio delle rotte del narcotraffico verso il Nord-America e l'Europa. Nel corso degli ultimi 50 anni, per rispondere ad un costante aumento delle richieste del mercato internazionale, si sono diffuse molecole sempre nuove. Come ogni altro fenomeno sociale, l'abuso di sostanze è legato a mode e tendenze che cambiano a seconda del contesto e del periodo considerato: ad esempio durante gli eventi musicali un tempo venivano assunte soprattutto le anfetamine ma progressivamente il loro uso si è ridotto a favore dell'assunzione di ketamina ⁶.

Il consumo di droghe a scopo ricreativo è un fenomeno trasversale nella popolazione ed è indipendente dal livello di scolarizzazione e socioeconomico dei consumatori. La diffusione delle sostanze stupefacenti è cresciuta grazie all'aumento del potere di acquisto della popolazione, questo ha portato allo sviluppo di fenomeni di massa come l'esplosione del consumo di eroina negli anni '70 o la più recente "epidemia di oppioidi" negli USA ⁷.

L'avvento di internet ha rivoluzionato ogni aspetto del narcotraffico, dalla produzione alla distribuzione, fino alla lotta contro la proliferazione di queste sostanze. Oggi la capillare diffusione di internet e le sempre maggiori abilità

informatiche soprattutto della popolazione giovanile sono uno dei più importanti strumenti di diffusione delle sostanze illegali. L'utilizzo di piattaforme online non indicizzate dai principali motori di ricerca commerciali e l'utilizzo delle criptovalute consentono di acquistare e distribuire le sostanze d'abuso in modo semplice e difficilmente tracciabile.

Dall'inizio del 2020 in poi il mercato del narcotraffico è stato in grado di adattarsi velocemente alle restrizioni imposte ai viaggi e al commercio dalla pandemia da SARS-Cov2; tuttavia, il distanziamento sociale ed il lockdown hanno fortemente ridotto il consumo di queste sostanze, anche se non in tutte le categorie di utilizzatori. Infatti, durante la pandemia i consumatori occasionali hanno ridotto l'utilizzo di sostanze stupefacenti mentre i consumatori abituali lo hanno aumentato⁸. Con l'allentamento delle misure restrittive contro la pandemia i consumi sono gradualmente risaliti.

1.1.2 Nuove tipologie di sostanze stupefacenti e “designer drugs”

A livello mondiale le sostanze psicotrope illegali sono iscritte in 5 tabelle che vengono aggiornate ogniqualvolta si presenti la necessità di inserire nuove sostanze o modificarne la classificazione. In Italia le sostanze psicotrope sono indicizzate dalle tabelle del Ministero degli Interni⁹. La più recente evoluzione del mercato delle sostanze d'abuso è rappresentata dalle cosiddette Designer Drugs o Legal Highs, sostanze sempre nuove che vengono sintetizzate in laboratorio; data la impossibilità di indicizzare in tempo reale tutte le nuove sostanze stupefacenti immesse nel mercato, esse non vengono classificate tempestivamente come illegali il che consente di aggirare le norme che ne vietano la vendita. Queste molecole sono prevalentemente degli anfetamino-derivati, come i catinoni sostituiti mefedrone, metilone e metilenediossipirovalerone, spesso indicati come "sali da bagno", i cannabinoidi sintetici (SCs, ad esempio Spice) e allucinogeni sintetici (25I-NBOMe o N-bomb), facili da produrre in diversi formati e comode da trasportare¹⁰. Queste nuove droghe sono spesso prodotte in piccoli laboratori creati ad hoc, il loro numero è in continuo aumento e costituiscono una nuova e preoccupante minaccia per la salute della popolazione.

1.2 Caratteristiche delle principali droghe d'abuso e cenni di trattamento

Come già accennato, sempre nuove sostanze d'abuso vengono immesse sul mercato sono; tuttavia, la maggior parte derivano dalle sostanze "classiche" di cui spesso conservano i meccanismi d'azione ed in parte la farmacocinetica. È molto importante per questo valutare quali siano i meccanismi fisiologici generali alla base degli effetti e della dipendenza generati da queste molecole ¹⁰.

1.2.1 Neurofisiologia alla base degli effetti delle sostanze stupefacenti e dell'abuso di sostanze

Gli effetti provocati dalle droghe sono dovuti alla loro azione su diversi organi e apparati: il sistema nervoso centrale e periferico tramite la modulazione della quantità di neurotrasmettitori presenti negli spazi sinaptici o tramite l'interazione con recettori specifici; il sistema cardiovascolare, per le azioni sul sistema adrenergico e sui vasi sanguigni e l'apparato gastrointestinale, per le alterazioni della sua motilità e quindi della sua funzione.

A livello del sistema nervoso centrale e periferico le sostanze d'abuso agiscono principalmente sul sistema dopaminergico, serotonergico, sui recettori per gli oppioidi e sui recettori per i cannabinoidi. Ogni molecola in grado di alterare il funzionamento di questi sistemi può provocare degli effetti che, in quanto gradevoli, vengono ricercati dal consumatore che è spinto a ripeterne l'assunzione. Classicamente, si ritiene che l'abuso di certe sostanze sia dovuto alla loro capacità di dare gratificazione e di motivare il comportamento di autosomministrazione grazie alla stimolazione del sistema cortico-mesolimbico dopaminergico (Spanagel and Weiss, 1999). La dopamina è un neurotrasmettitore endogeno della famiglia delle catecolamine. Il sistema dopaminergico è costituito dalla substantia nigra encefalica che proietta terminazioni nervose ai nuclei della base, all'ippocampo ed al sistema limbico; si ritiene che la dopamina abbia effetto eccitatorio o inibitorio a seconda del nucleo su cui agisce. Il sistema dopaminergico svolge una funzione essenziale nel controllo motorio e nel sistema di reward (ricompensa). Tutti gli stimoli naturali o farmacologici dotati di potere motivazionale positivo aumentano

l'attività neuronale di un particolare fascio di fibre dopaminergiche (fascio A10) che originano nell'area ventrale tegmentale (VTA) e proiettano nella zona basale dello striato raggiungendo il Nucleo Accumbens (NAc) e numerose strutture fronto-corticali. Tutte le più importanti sostanze d'abuso, dagli analgesici narcotici agli psicostimolanti (anfetamina e cocaina) alla nicotina e all'alcool, ai barbiturici e al THC, principio attivo della cannabis, hanno in comune la proprietà di aumentare la concentrazione extracellulare di dopamina nel NAc ¹¹.

A seconda della sostanza, questo effetto può essere ottenuto con meccanismi diretti o indiretti. Ad esempio, gli psicostimolanti, come cocaina e anfetamina, agiscono direttamente sui sistemi della ricaptazione e del rilascio della dopamina (DA) a livello delle terminazioni neuronali dopaminergiche del NAc, favorendo un aumento dei livelli extra-sinaptici di neuro-trasmettitore. La nicotina attiva i suoi recettori nicotinici, che a livello della VTA facilitano la depolarizzazione delle fibre dopaminergiche cortico-meso-limbiche. I numerosi derivati dell'oppio (morfina, eroina e congeneri) facilitano la trasmissione dopaminergica per stimolazione dei recettori oppioidi localizzati a livello della VTA e dei recettori presenti a livello del NAc. Una robusta letteratura scientifica dimostra, inoltre, che con meccanismi indiretti, l'attività dopaminergica nel NAc è facilitata anche dall'etanolo, dai cannabinoidi e da altre sostanze di abuso ¹¹.

SOSTANZE	MECCANISMO DI AZIONE
Oppioidi	Stimolazione dei recettori oppioidi.
Psicostimolanti (cocaina e anfetaminici)	Per la cocaina blocco della ricaptazione di dopamina. Per l'anfetaminica facilitazione. del rilascio e blocco della ricaptazione della serotonina e delle catecolamine
Alcol etilico	L'alcol inibisce l'attività glutammatergica; facilita l'attività del recettore GABA A, e dei recettori oppioidi; ha numerose altre azioni.
Delta 9- tetraidrocannabinolo	Stimolazione dei recettori cannabinoidi CB1.
Barbiturici e benzodiazepine	Facilitazione della trasmissione GABAergica.
Fenciclidina e derivati	Blocco dei recettori glutammatergici ionotropici.
Psichedelici (LSD, mescalina, psilocibina)	Stimolazione dei recettori serotonergici.
Nicotina	Stimolazione dei recettori serotonergici.
Solventi organici	Inibizione della trasmissione glutammatergica; facilitazione di quella GABAergica.

Tabella 1-- Principali farmaci d'abuso e relativo meccanismo d'azione.

1.2.2 Alcol etilico

L'alcol è prodotto ed utilizzato da millenni in tutto il mondo come sostanza a scopo ricreativo. Si stima che circa il 10 % della popolazione statunitense abusi di questa sostanza, il cui utilizzo è collegato all'aumento dei crimini violenti e degli incidenti¹². È la sostanza d'abuso più utilizzata al mondo ed è quella responsabile del maggior danno sociale.

L'etanolo è una molecola idrosolubile che viene facilmente assorbita a livello intestinale, il suo assorbimento varia molto a seconda del riempimento dello stomaco al momento dell'assunzione, a stomaco vuoto il picco sierico di alcol viene

raggiunto in tempi nettamente minori¹³. Viene metabolizzato a livello epatico dalla alcol-deidrogenasi, questa via però è esauribile e può metabolizzare solamente una quota dell'alcol assunto; la quota di alcol residua viene metabolizzata dall'isoenzima CYP3A4 del citocromo P450. questa via è stimolata dall'assunzione cronica di etanolo e produce dei radicali liberi dell'ossigeno responsabili di danno epatico fino alla cirrosi. Poiché l'alcol è una sostanza legale e largamente diffusa, l'intossicazione da alcol etilico è molto frequente e causa numerosi accessi ai Pronto Soccorsi.

Un'unità alcolica è costituita da 12 grammi di alcool puro e corrisponde grossolanamente ad un bicchiere di vino. La tossicità acuta provocata dalla assunzione di numerose unità alcoliche in un breve lasso temporale, un fenomeno sociale detto binge drinking, si manifesta con alterazioni comportamentali: il paziente è spesso disinibito e presenta difficoltà di linguaggio e deambulazione. Può essere presente nistagmo e progressivo obnubilamento del sensorio fino al coma¹⁴. L'intossicazione etilica può essere lieve, moderata o grave; a seconda della entità della intossicazione i provvedimenti richiesti possono andare dalla semplice osservazione in Pronto Soccorso, ai trattamenti di supporto come l'idratazione, fino all'intubazione per proteggere le vie aeree e trattare la depressione respiratoria.

In un paziente intossicato da alcool vanno eseguiti esami ematochimici, corretta se necessario l'ipoglicemia, somministrata Tiamina o Complesso vitaminico B; va posta attenzione a ricercare segni di traumatismo, non sempre immediatamente evidenti, e va considerata la contemporanea intossicazione con altre sostanze. Se il paziente presenta uno stato mentale alterato o comportamenti violenti può rendersi necessaria la sedazione, in questi casi è indicato l'utilizzo di benzodiazepine ponendo particolare attenzione a non aggravare la depressione respiratoria provocata dall'etanolo¹⁵; in alternativa si può considerare l'utilizzo della ketamina¹⁶.

1.2.3 Anfetamine

Inizialmente prodotte come decongestionanti nasali, le anfetamine vennero impiegate durante la Seconda guerra mondiale come stimolante per le truppe e raggiunsero la massima popolarità come agenti anoressizzanti negli anni '50, il che ne promosse l'utilizzo anche come sostanze d'abuso.

Questa classe di sostanze è al secondo posto in Europa tra le sostanze d'abuso per diffusione. Secondo la relazione europea sulla droga del 2020 ⁵ la loro presenza viene rilevata nel 12% degli accessi ospedalieri per tossicità acuta connessa all'utilizzo di sostanze stupefacenti, e si stima che circa 1,4 milioni di persone comprese nella fascia di età tra i 15 ed i 30 anni ne abbia fatto uso. L'età media della prima consumazione è 21 anni, i consumatori sono soprattutto uomini (75%). Viene assunta prevalentemente per via nasale (65%), meno frequentemente per via orale (16%) o parenterale (11%) ⁵. L'assunzione di anfetamine è associata in circa l'80% dei casi all'utilizzo contemporaneo di altre sostanze, in particolare alcol, cocaina e cannabis ¹⁷.

I principali composti appartenenti alla famiglia delle anfetamine sono: DL-anfetamina, destroanfetamina, metanfetamina. Le anfetamine sono stimolanti del SNC e agiscono aumentando la concentrazione di noradrenalina e dopamina nelle terminazioni nervose con diversi meccanismi, in particolare inibendone il reuptake nel terminale sinaptico. Viene considerata tossica la dose di 1 mg/kg ¹⁸. I primi effetti delle anfetamine compaiono dopo circa 1 ora perché sono composti lipofili che attraversano agevolmente la barriera ematoencefalica. L'eliminazione avviene prevalentemente per via renale. L'utilizzo di anfetamine porta allo sviluppo di tolleranza.

Gli effetti principali di queste sostanze sono dovuti all'azione simpaticomimetica su diversi organi e apparati:

- Sistema cardiovascolare: i pazienti lamentano spesso palpitazioni e presentano tachicardia. L'aumento della frequenza cardiaca ed il conseguente aumento del post-carico possono causare insufficienza cardiaca ed ischemia miocardica, è possibile anche lo sviluppo di miocarditi

¹⁹.

- Sistema nervoso centrale: i pazienti sono agitati, soggetti ad allucinazioni, presentano paranoia, confusione, mioclono e possono manifestare un comportamento violento ^{18,20,21}. Il vasospasmo cerebrale può causare ictus.
- Apparato muscoloscheletrico: in caso di una overdose di anfetamine si possono sviluppare mioclono e tremori, raramente convulsioni, queste aumentano la probabilità di rabdomiolisi ^{18,20}.
- Tessuti molli: il sito di iniezione può infettarsi e provocare una cellulite o una fascite necrotizzante ²².
- Rene: in corso di intossicazione da anfetamine è possibile lo sviluppo di necrosi tubulare, dovuta a spasmo delle arteriole glomerulari, e conseguente insufficienza renale acuta. Il quadro renale può essere aggravato da una simultanea rabdomiolisi. Questi pazienti possono presentare anche diverse alterazioni elettrolitiche: iponatriemia, ipokaliemia ed ipermagnesiemia.

Il trattamento di scelta è rappresentato dalle benzodiazepine come lorazepam o diazepam, che riducono l'agitazione psicomotoria, prevengono o trattano le convulsioni e possono aiutare a controllare l'ipertermia, dagli antipertensivi quali il nitroprussiato, dagli antipsicotici come l'aloiperdolo e lo ziprasidone per trattare l'agitazione refrattaria alle benzodiazepine, ponendo attenzione alla durata dell'intervallo QT. La somministrazione di betabloccanti è controindicata in quanto può esacerbare il quadro ipertensivo: l'assunzione di sostanze simpaticomimetiche provoca una attivazione adrenergica generalizzata che coinvolge sia i recettori alfa che i recettori beta, pertanto, il blocco di questi ultimi, lasciando attiva solo la componente α -adrenergica porterebbe ad una vasocostrizione generalizzata. La causa di morte più frequente è lo sviluppo di aritmie, altre cause sono l'ipertermia e l'emorragia cerebrale ²³. L'utilizzo cronico di anfetamine, determinando una costante stimolazione simpatica, causa cardiomiopatia ²⁴, mentre l'utilizzo in cronico per via inalatoria può causare ipertensione polmonare ²⁵.

Test specifici per queste sostanze possono risultare positivi se il paziente è in terapia con farmaci quali pseudoefedrina, selegilina o bupropione.

1.2.4 Metanfetamina

La metanfetamina (N-metil-alfametilfenilettilammina) è un derivato sintetico dell'anfetamina ed appartiene alla classe delle fenilettilamine, insieme alle anfetamine e a numerose altre sostanze con cui condivide gli effetti e il profilo di tossicità. Rispetto alle anfetamine, la metanfetamina raggiunge più rapidamente il cervello, l'effetto stimolante è più intenso, provoca una forte ebbrezza ed ha un maggiore potenziale di dipendenza.

Nella pratica clinica viene utilizzata per il trattamento dei pazienti affetti da disturbo da deficit di attenzione (ADHD). È la seconda droga più utilizzata al mondo dopo la cannabis ²⁶ e si stima che circa il 5% della popolazione statunitense ne abbia fatto uso almeno una volta nella vita ²⁷. La diffusione molto ampia di queste sostanze è favorita dalla relativa facilità di sintesi, che avviene a partire da farmaci di larga diffusione come efedrina e pseudoefedrina. La produzione molto diffusa in piccoli laboratori aumenta la probabilità di errori nella produzione e quindi anche il rischio di eventuale esposizione dei consumatori a prodotti tossici ²⁸.

La metanfetamina si differenzia chimicamente dalle anfetamine in quanto presenta una seconda metilazione dell'anello fenilettilaminico, il che rende il composto più lipofilo e ne aumenta l'attività cerebrale. Viene facilmente assorbita a livello delle mucose e dell'epitelio polmonare e può essere somministrata anche per via intramuscolare o endovenosa ^{29,30}. Supera la barriera emato-encefalica molto velocemente ²³, e una volta raggiunto il SNC viene incorporata all'interno delle vescicole contenenti monoamine provocandone il rilascio e inibendone il reuptake; viene degradata dal sistema delle catecol-o-metiltransferasi o COMT, molto lento e facilmente saturabile. Se viene assunta per via iniettiva o se viene fumata ha effetto in pochi minuti, mentre se viene ingerita gli effetti si presentano dopo almeno 30 minuti ³¹. Essi possono durare anche per 24 ore.

Gli effetti interessano diversi organi e sistemi:

- Sistema cardiovascolare. Le metanfetamine, grazie alla loro azione simpaticomimetica, causano quasi sempre tachicardia ed ipertensione, a volte effetti molto più gravi quali ischemia cardiaca, infarto del miocardio, dissezioni aortiche in corso di gravi crisi ipertensive e, negli utilizzatori cronici, cardiomiopatie ^{32,33}. Nel 2014 negli USA è stato condotto uno

studio su 2781 pazienti che assumevano solamente metanfetamine: 30 di loro sono morti e 146 hanno rischiato la vita per eventi cardiovascolari ³⁴.

- Apparato respiratorio: in questi pazienti aumenta la frequenza respiratoria e si ha spesso iperventilazione. Le metanfetamine sono agenti irritanti e possono causare un danno diretto al tessuto polmonare, portando a edema polmonare, ipertensione polmonare e danni termici ³⁵. Sono state descritte alveoliti emorragiche simili a quelle che si presentano in pazienti che fanno uso abituale di crack ³⁶.
- Apparato gastrointestinale: le metanfetamine possono indurre vomito e diarrea. La rottura di ovuli contenenti metanfetamine ingeriti a scopo di occultamento e trasporto (body stuffers, body packers) può causare una ischemia intestinale ³⁷.
- Sistema nervoso: i pazienti intossicati possono sviluppare movimenti coreiformi a causa dello squilibrio dopaminergico provocato da queste sostanze. Sintomi focali sono invece provocati da eventi ischemici ³⁸. I principali sintomi psichiatrici sono l'agitazione e lo sviluppo di crisi psicotiche spesso accompagnate da paranoia; questi pazienti possono presentare anche ideazioni suicidaria o omicidiaria e manifestare comportamenti violenti ³⁹.
- Cute e mucose: possono svilupparsi infezioni, ad esempio nel sito di iniezione, o lesioni termiche a livello delle mani e del viso, dovute alle sostanze nocive che i produttori utilizzano durante la sintesi delle sostanze. Durante la produzione delle metanfetamine si può essere esposti a gas nocivi; per accorgersi di questi fenomeni è importante la valutazione HEENT (Head, Eyes, Ears, Nose and Throat) per rilevare i danni alle mucose, soprattutto orofaringee, e la presenza di midriasi ⁴⁰.

Di fronte al sospetto di intossicazione da metanfetamina, bisogna ricordare che i test specifici per individuare metanfetamine in circolo possono essere falsamente positivi nei pazienti in terapia con il bupropione e la selegilina,⁴¹ pertanto è importante escludere eventuali altre cause dei sintomi presentati dal paziente. Vanno eseguiti esami ematochimici per ricercare il danno d'organo: dosaggio degli elettroliti, livello dei lattati, CPK, enzimi epatici e uno studio della funzione renale

dato che può esservi necrosi tubulare e rabdomiolisi che portano a insufficienza renale acuta ⁴².

Per controllare l'agitazione psicomotoria è fondamentale una adeguata sedazione con benzodiazepine per via endovenosa, e se esse sono insufficienti si possono utilizzare neurolettici come l'aloiperidolo (5-10 mg endovena o intramuscolo) e lo ziprasidone (10 mg intramuscolo); questi nonostante siano considerati sicuri, sono da utilizzare con particolare attenzione per la possibile insorgenza di aritmie correlate all'allungamento del QT. Una sedazione troppo profonda può compromettere la dissipazione del calore corporeo e peggiorare l'ipertermia del paziente ⁴³.

Nelle intossicazioni molto severe possono rendersi necessarie la curarizzazione e l'intubazione; in questi casi è controindicato l'utilizzo della succinilcolina che aumenta il rischio di rabdomiolisi.

In caso di acidosi metabolica severa, con pH <7,1, è indicata la somministrazione di 50-150 mEq di bicarbonato di sodio; l'ipertensione può essere trattata con farmaci antipertensivi quali nitroprussiato sodico, nitroderivati e fentolamine. La tachicardia è generalmente ben controllata grazie alla somministrazione di benzodiazepine, nel caso si dimostrasse refrattaria si possono somministrare farmaci calcioantagonisti. L'idratazione è essenziale in particolare se il paziente presenta rabdomiolisi o elevati livelli di lattati ma i fluidi devono essere somministrati con cautela per il rischio di edema polmonare; è indicato l'utilizzo di soluzione isotoniche.

Va trattata l'ipertermia e con metodi di raffreddamento esocorporeo (bagni in acqua ghiacciata) e con liquidi freddi. La somministrazione di emulsioni lipidiche ha dimostrato di portare un miglioramento del quadro in queste situazioni ⁴⁴.

I pazienti intossicati da anfetamine sono a rischio di morte cardiaca improvvisa a causa della disidratazione, dell'acidosi metabolica, della iperkaliemia e della deplezione di neurotrasmettitori adrenergici, che porta a ipotensione ⁴⁵. È indicata in questi casi la somministrazione continua di norepinefrina.

1.2.5 Metilenediossimetanfetamina (MDMA o Ecstasy)

È una sostanza stupefacente largamente diffusa in tutta Europa. Negli anni '70 veniva utilizzata come farmaco durante la psicoterapia ^{46,47}, oggi si utilizza in ambito sperimentale per il trattamento di patologie psichiatriche come il disturbo da stress post-traumatico ⁴⁸. A scopo ricreativo è diffusa in particolare come “droga da ballo”, infatti la sua assunzione è comune nei club, nelle discoteche e durante i festival di musica elettronica in quanto provoca euforia, eccitazione, disinibizione, diminuzione del senso di fatica ⁴⁹. Nell'ambito dei festival di musica elettronica negli ultimi anni si sono riscontrate diverse morti correlate all'assunzione di MDMA ⁵⁰. L'ampio utilizzo è incentivato dall'idea diffusa che si tratti di una sostanza sicura, in realtà allo spettro di tossicità tipico delle anfetamine si associano altri peculiari effetti avversi.

La molecola di metanfetamina presenta analogie strutturali sia con la classe delle anfetamine sia con la mescalina; è una sostanza simpaticomimetica che provoca il rilascio delle catecolamine (noradrenalina e dopamina in particolare) e contemporaneamente ne blocca il reuptake a livello delle sinapsi; inoltre, poiché la struttura della molecola di MDMA è simile a quella della serotonina, ne mima gli effetti e ne inibisce il reuptake ⁵¹. Pertanto, l'intossicazione da MDMA provoca sia gli effetti tipici di una intossicazione da anfetamine sia una sindrome serotoninergica.

L'MDMA in pasticche è assunta per via orale, ma la presentazione in polvere può essere sniffata, inalata o iniettata, anche se quest'ultima modalità viene raramente riscontrata in ambito ricreativo. In seguito alla ingestione di una dose di 50-200 mg, gli effetti sopraggiungono dopo 1-2 ore e permangono per circa 4 ore ⁵¹. Dopo l'ingestione la maggior parte (75%) viene espulsa immutata nelle urine in forma libera mentre la quota rimanente viene metabolizzata dal citocromo epatico CYP2D6 ⁵².

Il consumatore di MDMA ricerca alcuni effetti: diminuzione della fatica, aumento del desiderio sessuale, euforia, aumento della vigilanza; possono sopraggiungere effetti collaterali comuni come il bruxismo, di entità tale da provocare sanguinamento gengivale, atassia, diaforesi, agitazione, nausea ed ipertensione;

generalmente queste reazioni avverse sono autolimitanti e scompaiono dopo poche ore.

Analogamente alle anfetamine e alle metanfetamine, l'MDMA ha effetti su diversi organi e apparati:

- Sistema Cardiovascolare: sono comuni ipertensione e tachicardia, che possono condurre nei casi più gravi a infarto miocardico acuto, dissezione aortica ed aritmie⁵³. Sono stati riportati in letteratura anche casi di emorragia cerebrale e di rottura di aneurismi dell'arteria cerebrale posteriore^{54,55}.
- Sistema nervoso: il paziente può presentare agitazione, iperattività, ansia e delirium; possono insorgere anche crisi epilettiche. L'associazione tra l'agitazione psicomotoria e l'ipertermia causare rabdomiolisi.
- Ipertermia: frequente, è dovuta sia all'effetto diretto della sostanza sul sistema nervoso centrale sia alle circostanze in cui viene assunta, ad esempio in ambienti caldi e in corso di prolungati sforzi fisici. L'effetto simpaticomimetico e l'eventuale insorgenza di una sindrome serotoninergica possono concorrere al peggioramento di questa condizione⁵⁶. Gli effetti neuromuscolari della sindrome serotoninergica e l'ipertermia possono indurre complicazioni secondarie quali ipossia, rabdomiolisi, acidosi metabolica, coagulazione intravascolare disseminata e insufficienza renale. Un aumento della temperatura corporea superiore a 40,5°C è indicativo di una condizione grave associata ad una elevata incidenza di complicazioni e mortalità, con tasso di mortalità fino al 12%.
- Iponatriemia: l'assunzione di MDMA causa iponatremia sia stimolando l'assunzione di fluidi che stimolando la produzione di vasopressina. In questi pazienti i valori di sodio sierico sono inferiori a 120 mmol/l. La riduzione del sodio sierico può provocare manifestazioni neurologiche quali: confusione, crisi comiziali, insorgenza di edema cerebrale, erniazione cerebrale e può portare alla morte il paziente.
- Tossicità epatica: si possono osservare epatiti, necrosi centrolobulare e fibrosi epatica provocate da MDMA. Il paziente si presenta quindi con dolore addominale e vomito, questi sintomi si associano ad un aumento di AST ed ALT e all'aumento della bilirubina in circolo⁵⁷.

- **Sindrome serotoninergica:** si manifesta con modificazioni cognitivo/comportamentali (confusione, disorientamento, agitazione, irritabilità, ansia, euforia, insonnia, letargia, allucinazioni, coma), disfunzioni del sistema nervoso autonomo (ipertermia, sudorazione profusa, tachicardia, ipertensione, midriasi, nausea, vomito, diarrea, crampi addominali, salivazione, aritmie) e modificazioni neuromuscolari (mioclono, iperriflessia, tremori, incoordinazione). L'ecstasy di per sé provoca un rilascio massivo di serotonina, ma il rischio di sviluppare la sindrome serotoninergica aumenta se il paziente è in terapia con inibitori selettivi del reuptake della serotonina (SSRI), inibitori delle monoaminossidasi (iMAO) o se assume farmaci che aumentino l'attività dei recettori serotoninergici 5HT1A ^{58,59}.

Gli effetti di una intossicazione provocata da MDMA vanno in diagnosi differenziale con quelli provocati dall'assunzione di altre sostanze stupefacenti come cocaina, anfetamina e mentanfetamina. La presenza di diaforesi e l'aumento della sudorazione consentono di fare diagnosi differenziale con la sindrome anticolinergica.

È utile l'esecuzione di alcune indagini di laboratorio: dosaggio della glicemia per escludere l'ipoglicemia come causa di sintomi neurologici, natriemia, CK ed eventuale mioglobinuria, creatinina sierica, AST/ALT, studio completo della coagulazione ⁵¹ e titolazione dei livelli sierici di paracetamolo e salicilati la cui assunzione è spesso concomitante.

La terapia dell'intossicazione da MDMA richiede il trattamento dell'agitazione psicomotoria, con l'utilizzo di benzodiazepine, mentre l'uso di antipsicotici è controindicato per il rischio di allungamento del QT e soprattutto per il rischio di peggiorare l'ipertermia. L'ipertermia va trattata con bagni ghiacciati. L'iponatremia se asintomatica può essere trattata con la restrizione idrica, altrimenti è indicata la somministrazione di soluzioni saline ipertoniche al 3% ponendo attenzione a non ripristinare troppo rapidamente la normale sodiemia, per non provocare una demielinizzazione osmotica e un danno neurologico irreversibile. Se si sospetta l'insorgenza di una sindrome serotoninergica è indicata la somministrazione di benzodiazepine in associazione o meno con la ciproheptadina ^{51,60}.

Se un paziente non presenta segni di compromissione d'organo può essere sufficiente una osservazione di 6-8 ore in Pronto Soccorso. Se il paziente presenta invece segni di compromissione neurologica, ipertermia, sindrome setotoninergica, crisi ipertensive o segni di cardiotoxicità va trasferito in una Unità di Terapia Intensiva.

1.2.6 THC e cannabinoidi

I cannabinoidi sono composti derivati dalle piante del genere cannabis (*C. sativa*, *C. indica* ecc.), e comprendono numerose molecole, molte delle quali presentano solo un lieve effetto psicoattivo. La principale molecola responsabile degli effetti psicoattivi è il delta-9-tetraidrocannabinolo (THC). Nel corso degli anni le diverse specie di cannabis sono state incrociate per ottenere ibridi i cui fiori, la parte della pianta utilizzata a scopo ricreativo, contenessero sempre maggiori concentrazioni di THC ⁶¹. I fiori di Cannabis che vengono normalmente consumati contengono un quantitativo medio di THC che varia dall'1 a 20% del loro peso totale. Si stima che nel mondo ci siano circa 200,4 milioni di persone che fanno uso di cannabis al mondo, circa il 4 % della popolazione compresa tra 15 e 64 anni, e di questi 22,1 milioni siano dipendenti dal loro utilizzo; nella sola Europa vi sono 22,2 milioni di consumatori, circa il 7.7 % della popolazione tra 15-64 anni ⁵. Il consumo è maggiore tra i maschi fra i 18 e i 35 anni ⁶².

A partire dalla metà degli anni 2000 si sono largamente diffuse molecole di sintesi dette cannabinoidi sintetici, che mimano l'effetto del THC ma sono molto più potenti; vengono commercializzate in composti mescolati ad erbe e piante in modo da eludere i controlli delle autorità. Questi composti sono un esempio di cosiddette "designer drugs" e vengono modificati ripetutamente per aumentarne l'attività psicotropa, il che ne aumenta anche la tossicità; con l'immissione sul mercato di una nuova sostanza si sviluppano tipicamente dei "focolai" di intossicazione ^{61,63}. In Europa su 620 nuove sostanze psicotrope rilevate circa 150 appartengono alla categoria dei cannabinoidi sintetici. Negli USA vengono riportati ogni anno più di 7000 casi di intossicazioni provocate da cannabinoidi sintetici ⁶⁴.

I cannabinoidi estrinsecano la loro funzione attraverso il legame con i recettori per i cannabinoidi endogeni CB1 e CB2. Il recettore principale responsabile degli effetti

psicotropi è il CB1⁶⁵. I cannabinoidi di origine naturale sono derivati vegetali che contengono una miscela di diverse molecole attive; dalla cannabis sativa si possono estrarre fino a 400 molecole psicoattive, fra cui terpeni, flavonoidi e fitocannabinoidi, la principale è il THC. I cannabinoidi sintetici sono molecole pure che mimano l'effetto dei cannabinoidi naturali perché possiedono un sito in grado di legare i recettori CB1 e CB2. I cannabinoidi sintetici inoltre si legano, con una potenza dalle 2 alle 800 volte maggiore rispetto al THC, al recettore per il neurotrasmettitore glutammato, detto recettore NMDA (n-metil-D-aspartato) di fondamentale importanza nei meccanismi di plasticità neuronale e di consolidamento della memoria a lungo termine⁶⁶.

La farmacocinetica e la farmacodinamica del THC sono diverse a seconda della via di assunzione: se il THC viene assunto per inalazione, la biodisponibilità è del 10-35%, l'effetto insorge molto rapidamente, raggiunge il picco dopo 20 minuti e regredisce in alcune ore; se viene assunto per via orale la biodisponibilità è del 5-20%, gli effetti si manifestano dopo alcune ore e persistono fino a 12 ore dopo l'assunzione. In circolo il THC è coniugato a proteine in quanto si tratta di una molecola liposolubile. È metabolizzato prevalentemente a livello epatico dai citocromi CYP2C9 e CYP3A4, dando luogo a due diversi metaboliti: 11-idrossi-THC, metabolita attivo, e il THC-carbossile, inattivo^{67,68}. I metaboliti finali vengono escreti per lo più attraverso le feci, in minor misura nelle urine, dove rimangono dosabili per lungo tempo in quanto parte del THC si deposita nel tessuto adiposo, dal quale viene gradualmente rilasciato⁶⁸. I cannabinoidi sintetici vengono metabolizzati quasi totalmente per ossidazione e glucuronidazione tramite la via del citocromo ossidasi ed escreti per via renale; alcune di queste sostanze hanno dei metaboliti attivi come il naftoil-indolo⁶⁹.

Il THC viene utilizzato per lo più a scopo ricreativo, ma attualmente i principi attivi contenuti nella Cannabis sativa vengono sempre più utilizzati a scopo terapeutico, per il trattamento del dolore cronico, della nausea in corso di chemioterapia e per il trattamento degli spasmi muscolari nella sclerosi multipla⁷⁰. Altri cannabinoidi come il cannabidiolo o CBD sono stati studiati per il trattamento di alcune forme di epilessia refrattaria alla terapia.

Il THC ad alte dosi (5-20 mg) e i cannabinoidi molto potenti, come quelli sintetici, causano numerosi effetti tossici, che variano anche a seconda della via di assunzione e dell'età del soggetto utilizzatore.

I sintomi che si presentano con maggior frequenza nel contesto di una intossicazione da cannabinoidi includono: tachicardia, aumento della pressione arteriosa e ipotensione ortostatica, aumento della frequenza respiratoria, iperemia congiuntivale, xerostomia, aumento dell'appetito o nausea, nistagmo, atassia, problemi di linguaggio. Gli effetti collaterali più importanti sono neurologici e psichiatrici:

- Effetti sull'umore e sulla percezione della realtà: l'assunzione di prodotti che contengono alti quantitativi di THC provoca inizialmente euforia, i colori vengono percepiti come più vividi, il consumatore prova sensazioni piacevoli; però se il consumatore è naïve o se è un individuo particolarmente ansioso può accusare ansia, agitazione e depressione, in alcuni casi veri e propri attacchi di panico ^{65,71}. Alte dosi di cannabinoidi o l'utilizzo di cannabinoidi sintetici possono portare allo sviluppo di vere e proprie crisi psicotiche ⁷¹.
- Effetti su capacità cognitive e performance: le capacità cognitive sono rallentate, in particolare vi è una compromissione parziale e temporanea della capacità di concentrazione, della memoria a breve termine e dell'attenzione; si riduce la capacità percepire il rischio e questo facilita comportamenti pericolosi ⁶⁵. La coordinazione motoria diminuisce compromettendo anche la capacità di guida ⁷². Questi effetti possono durare molto tempo a causa del progressivo rilascio di THC accumulatosi a livello del tessuto adiposo, e il paziente intossicato non se ne rende conto ⁷³.
- Depressione del Sistema Nervoso Centrale: la depressione respiratoria con apnea, la letargia e il coma ⁶⁵ si presentano quasi esclusivamente nella popolazione pediatrica. Il coma può durare in media due giorni e normalmente si risolve da solo, se questo non avviene bisogna sospettare altre cause scatenanti ⁷⁴.

La terapia della intossicazione da cannabinoidi è essenzialmente di supporto e dipende dalla gravità dei sintomi: in caso di intossicazione lieve, con ansia ed

agitazione, possono essere sufficienti la rassicurazione e eventualmente la somministrazione di benzodiazepine come il lorazepam; nei casi più gravi, dovuti soprattutto all'assunzione di cannabinoidi sintetici o alla assunzione concomitante di altre sostanze d'abuso, può svilupparsi un comportamento aggressivo che va trattato con sedazione tramite benzodiazepine o antipsicotici quali aloperidolo.

Nei bambini che presentano depressione del sistema nervoso centrale possono rendersi necessarie l'intubazione per proteggere le vie aeree e la ventilazione meccanica in caso di depressione respiratoria.

I casi di dolore toracico associato alla assunzione di cannabinoidi devono essere trattati a seconda della causa scatenante, che può essere una sindrome coronarica acuta, uno pneumotorace o una riacutizzazione di asma bronchiale.

L'intossicazione da cannabinoidi può portare alla cannabis hyperemesis syndrome (CHS), sindrome caratterizzata da dolore addominale, nausea e vomito, che può interessare sia i consumatori abituali sia quelli saltuari ^{75,76}. Frequentemente la sintomatologia è scatenata o peggiorata da bagni o docce con acqua calda; la terapia è principalmente di supporto con la somministrazione intravenosa di fluidi, di antiemetici quali metoclopramide o preferibilmente ondansetron, e benzodiazepine in particolare se non risponde alla terapia antiemetica ⁷⁷. Nei casi più severi, con dolore addominale di medio-alta intensità, o in caso di sintomatologia resistente alla terapia si può somministrare aloperidolo 0,05-0,1 mg/kg ⁷⁸. Anche l'applicazione di creme a base di capsaicina si è rivelata vantaggiosa in pazienti poco responsivi alla terapia con ondansetron o benzodiazepine ⁷⁶. Bisogna attendere diverse settimane perché questa sindrome si risolva, anche dopo la completa sospensione dell'assunzione di cannabinoidi.

1.2.7 Cocaina

La cocaina è un alcaloide che viene estratto dalle foglie di *Erythroxylon coca*, pianta molto diffusa nelle regioni andine ed utilizzata dalle popolazioni locali per il suo effetto defaticante. La cocaina venne isolata dalle foglie di coca nel 1859, e inizialmente fu utilizzata in corso di interventi oculistici o otorinolaringoiatrici per il suo effetto anestetico locale e per la sua azione di vasocostrizione, utile a controllare le emorragie. Il suo uso in campo anestesiologicalo nel tempo è stato

fortemente ridotto, a favore di derivati sintetici privi di effetti sistemici e psicotropi, come la novocaina.

Oggi la cocaina è la sostanza psicotropa illegale più utilizzata al mondo dopo la cannabis, e l'intossicazione da cocaina è la causa più comune di accesso ai Pronto Soccorsi negli Stati Uniti ⁷⁹. I suoi effetti sono molto ricercati per aumentare le performance psico-fisiche in contesti sia lavorativi sia ricreativi; è una sostanza molto pericolosa e causa numerose morti sia per effetto diretto per overdose, sia indirettamente per i comportamenti violenti che provoca ⁸⁰.

La cocaina agisce principalmente inibendo il reuptake delle monoamine, in quanto blocca le specifiche proteine di trasporto che fisiologicamente riportano le amine dallo spazio presinaptico all'interno del neurone; questo provoca un aumento della concentrazione delle monoamine, soprattutto dopamina ma anche serotonina e noradrenalina, a livello delle terminazioni sinaptiche cerebrali. In particolare, si ha un accumulo di dopamina nelle sinapsi dei neuroni dopaminergici del SNC, soprattutto fra le terminazioni dei neuroni che proiettano dall'area tegmentale ventrale e i neuroni del nucleo accumbens e della corteccia prefrontale mediale. La cocaina agisce inoltre su diversi recettori per le monoamine: è antagonista dei recettori serotoninergici 5-HT₃ e agonista dei recettori 5-HT₂ e a questo sembrano dovuti i suoi effetti di disinibizione motoria; è inoltre agonista dei recettori sigma oppioidi, dei recettori NMDA e dei recettori D₁ e D₂ della dopamina. La forte euforia derivante dall'assunzione di cocaina è provocata dalla inibizione del reuptake della serotonina a livello del sistema nervoso centrale. Le proprietà eccitanti sono date dall'aumento della concentrazione di glutammato ed aspartato (neurotrasmettitori eccitatori) a livello del nucleus accumbens ⁸¹. La cocaina è inoltre dotata di proprietà anestetiche perché agisce bloccando i canali del sodio nelle cellule nervose, questo comporta un rallentamento della corrente trans membrana del sodio e il rallentamento della conduzione dell'impulso. La cocaina blocca anche i canali del sodio delle cellule del sistema di conduzione del cuore, il che può provocare un allargamento del complesso QRS all'elettrocardiogramma e predisporre ad aritmie.

L'assorbimento della cocaina varia al variare della via di assunzione. È immediato nel caso della via endovenosa, richiede pochi secondi quando la cocaina viene

fumata perché essa viene rapidamente assorbita a livello dell'epitelio alveolare, richiede alcuni minuti nel caso dell'assunzione per inalazione ed è più lento in caso di ingestione. La cocaina a causa delle sue spiccate proprietà vasocostrittrici danneggia le mucose con cui viene in contatto. Essa si diffonde facilmente attraverso la barriera ematoencefalica e viene metabolizzata nel plasma e nel fegato da alcuni enzimi, le colinesterasi, che trasformano per idrolisi la cocaina nel suo principale metabolita, la benzoilecgonina (BE) e in altri metaboliti minoritari quali l'ecgonina-metil-estere (EME) e l'ecgonina. La conversione di cocaina a norcocaina, attraverso la metilazione dell'azoto della cocaina, costituisce solo una piccola frazione del metabolismo (2.6%-6.2%). La benzoilecgonina è un metabolita inattivo, si ritrova nelle urine e rappresenta da sola il 32-49% dei metaboliti della cocaina. Il tempo di dimezzamento varia notevolmente da individuo ad individuo a causa di possibili differenze nei livelli di colinesterasi; l'assunzione di cocaina ad alte dosi può causare tolleranza e saturazione delle vie metaboliche, causando variabilità della cinetica di eliminazione. La maggior parte della cocaina viene metabolizzata prima di essere escreta attraverso le urine, nelle quali infatti si ritrovano solo piccole quantità di cocaina non metabolizzata, in genere meno del 10%. Gli esami tossicologici si basano sulla ricerca nelle urine dei principali metaboliti, benzoilecgonina, ecgonina metil-estere e norcocaina ⁸² il cui picco di concentrazione viene raggiunto a 4-5 ore dall'assunzione. La benzoilecgonina, per esempio, è dosabile a partire da 4 ore dall'assunzione della cocaina rimanendo rilevabile nelle urine fino ad otto giorni. Quando la cocaina viene assunta assieme ad alcol può avvenire tra le due molecole una reazione di transesterificazione con formazione di cocaetilene, un metabolita dotato della stessa tossicità della cocaina (cardiotossicità, vasocostrizione, neurotossicità) ma ha una emivita più lunga ^{83,84}. Gli effetti della cocaina si esercitano su diversi organi e apparati:

- Sistema cardiovascolare: la cocaina causa ipertensione, tachicardia e vasocostrizione generalizzata, che può portare sia a maggior rischio di trombosi coronarica sia a infarto del miocardio ^{85,86}. L'effetto ionotropo negativo provocato dalla cocaina può condurre allo sviluppo di insufficienza cardiaca (in particolare insufficienza del ventricolo sinistro) e la sua azione a livello dei canali-Na⁺ è associata alla insorgenza di aritmie. In questi paziente vi è anche

un rischio aumentato di dissezione aortica. L'utilizzo cronico può provocare ipertrofia del ventricolo sinistro ed accelerare i processi di aterosclerosi ^{87,88}.

- Sistema nervoso centrale: la cocaina causa un ampio spettro di disturbi neurologici, sia generalizzati che focali. I sintomi generalizzati vanno dalla semplice cefalea, spesso concomitante a nausea e vomito, alle convulsioni fino al coma: le convulsioni, associate all'assunzione di alte dosi della sostanza, si sono manifestate nel 3-4% dei pazienti intossicati acceduti ai Pronto Soccorsi degli USA ^{89,90}. I sintomi neurologici focali possono essere causati da vasospasmo, dato il potente effetto vasocostrittore della cocaina, o da emorragie cerebrali ⁹¹⁻⁹³; è possibile anche se raro il vasospasmo dell'arteria vertebrale, che causa i sintomi dell'insufficienza vertebrobasilare quali nistagmo, instabilità alla marcia, cefalea nucale, tinnito e vertigini ⁹⁴. Ai sintomi neurologici si possono associare agitazione psicomotoria e sintomi psichiatrici come allucinazioni, paranoia e delirio. L'agitazione psicomotoria e il conseguente aumento della attività muscolare favoriscono lo sviluppo di ipertermia, che rappresenta un fattore prognostico sfavorevole: si stima che la mortalità per i pazienti in cui i sintomi neurologici sono accompagnati da ipertermia arrivi fino al 33 % ⁹⁵.
- Apparato respiratorio: l'effetto vasocostrittore della cocaina può provocare vasospasmo del circolo polmonare, con trombosi delle arterie polmonari e infarto polmonare, meno frequente è invece l'embolia polmonare ^{96,97}. L'assunzione di cocaina può portare alla esacerbazione di alcune patologie come l'asma bronchiale ⁹⁸. Il fumo di cristalli di coca espone a rischio di ustioni delle vie aeree superiori, dato che la cocaina per essere fumata deve raggiungere alte temperature; può inoltre causare angioedema e alveolite emorragica ⁹⁹. I consumatori che inalano cocaina attraverso le narici effettuano spesso una manovra di Valsalva per evitare che la cocaina venga espulsa nuovamente; l'aumento della pressione intratoracica può causare pneumotorace, pneumomediastino e pneumopericardio ^{99,100}.

- Lesioni mucose: le mucose esposte ad alte concentrazioni di questa sostanza possono sviluppare lesioni come erosioni e ulcere; la rottura di ovuli contenenti cocaina trasportati nel tratto gastrointestinale può comportare ulcere e perforazioni gastrointestinali.
- Apparato muscoloscheletrico: l'intossicazione da cocaina può causare dolori muscolari diffusi o localizzati, rabdomiolisi.
- Lesioni oftalmiche: il vasospasmo dei vasi retinici può provocare disturbi del visus mono o bilaterali ^{101,102}, il fumo della cocaina e il calore sviluppato dal fumo possono causare madarosi, cioè perdita delle ciglia e delle sopracciglia ¹⁰³.

L'aggiunta di altre sostanze alla cocaina per aumentarne il quantitativo e per coadiuvarne l'effetto è una pratica molto diffusa; generalmente le sostanze più utilizzate sono polveri minerali molto fini come il talco. Gli effetti provocati alcune delle sostanze adulteranti aggiunte alla cocaina possono essere molto gravi:

- Levamisolo: da analisi condotte nel 2009 è emerso che dal 69% al 73 % dei campioni di cocaina presenti sul mercato conteneva questo farmaco, in passato utilizzato nella terapia adiuvante per il cancro al colon-retto ed oggi impiegato nella medicina veterinaria come agente antiparassitario. L'intossicazione da levamisolo può causare agranulocitosi, leucoencefalopatia e vasculite cutanea¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.
- Clenbuterolo – è un agonista adrenergico e può quindi provocare agitazione tachicardia, palpitazioni, ipotensione, nausea, dolore toracico; provoca inoltre iperglicemia, ipokaliemia, aumento dei lattati ¹⁰⁷.
- Fentanyl – è un oppiaceo potente che si sta diffondendo sempre più come agente adulterante la cocaina; poiché anche il fentanyl causa dipendenza, il consumatore diviene dipendente sia dalla cocaina che dalla formulazione in cui è contenuta, fidelizzandosi in questo modo allo spacciatore. Può provocare gravi intossicazioni da oppiacei ¹⁰⁸.
- Il processo di estrazione della cocaina avviene tramite l'impiego di solventi chimici che possono contaminare il prodotto finale e provocare sintomi

simili all'avvelenamento da organofosfati, con ipersecrezione bronchiale, scialorrea, miosi, fascicolazioni muscolari broncospasmo. Palpitazioni, agitazione e tachicardia possono essere dovute anche alla presenza di alte quantità di caffeina nella cocaina. Infine, l'assunzione di cocaina si accompagna spesso all'assunzione di alcool e di altre sostanze psicotrope, che ne potenziano gli effetti dannosi.

In corso di intossicazione da cocaina possono manifestarsi sindromi caratteristiche:

- Cocaine-associated chest pain (CACP) – circa il 6% dei pazienti che si presentano in Pronto Soccorso dopo aver assunto cocaina presenta questa complicanza. La assunzione di cocaina può causare dolore toracico per diversi motivi: il vaso spasmo coronarico può portare a ischemia cardiaca, l'utilizzo di cocaina per via inalatoria o con il fumo può causare pneumotorace, oppure si può avere una dissezione aortica.
- Polmone da Crack – l'assunzione di cocaina tramite fumo (crack) può causare pneumotorace, polmonite eosinofila, pneumomediastino ed alveolite emorragica. I pazienti in questi casi sono dispnoici, presentano tosse ed emottisi; possono presentare anche febbre ed episodi di broncospasmo. In questi casi è essenziale garantire il supporto vitale tramite la ventilazione meccanica e la somministrazione di ossigeno

Nel paziente in cui si sospetta una intossicazione da cocaina oltre agli esami di routine può essere utile il dosaggio della benzoecgonina nelle urine. Il trattamento dell'intossicazione è come sempre sintomatico: l'effetto simpaticomimetico della cocaina, che causa agitazione ipertensione e tachicardia, può essere trattato con benzodiazepine ad alte dosi (diazepam 10 mg, ripetibili); l'ipertensione refrattaria può essere trattata con farmaci alfa-bloccanti, anche se essi possono causare un aumento della frequenza cardiaca ¹⁰⁹. In alternativa si possono utilizzare nitroderivati come nitroglicerina o nitroprusside (5-10 mg endovena). Il vasospasmo coronarico può causare ischemia cardiaca; l'utilizzo di beta-bloccanti non è indicato perché il blocco dei recettori beta-adrenergici comporta una aumentata e non più bilanciata attività alfa-adrenergica, e peggiora il vasospasmo ¹⁰⁹. Associazioni tra alfa-bloccanti e beta-bloccanti sono considerate più sicure ¹¹⁰.

Dosi molto elevate di cocaina possono causare blocco dei canali del sodio nelle cellule miocardiche, favorendo aritmie maggiori e ipotensione. In caso di ipotensione è indicata l'infusione di 2-3 l di soluzione salina isotonica eventualmente associata alla somministrazione di vasocostrittori come la noradrenalina. Il paziente va monitorato per riscontrare eventuali allargamenti del QRS. Se il paziente si presenta con ipertermia molto spiccata bisogna ridurre la temperatura con bagni ghiacciati. Se il paziente intossicato da cocaina deve essere intubato, è meglio evitare l'utilizzo della succinilcolina come agente paralizzante in quanto essa viene metabolizzata dalla colinesterasi plasmatica o PChE, lo stesso enzima che metabolizza la cocaina, e quindi ne può prolungare gli effetti; è da preferire l'utilizzo di altri curari, come il rocuronio.

1.2.8 Benzodiazepine

Le benzodiazepine (spesso abbreviate BZD o BDZ) sono una classe di molecole costituite dalla fusione di un anello benzenico e di un anello diazepinico. La prima benzodiazepina, ad essere scoperta casualmente nel 1955, ad opera di Sternbach, fu il clordiazepossido (Librium); nel corso della seconda metà del XX secolo ne sono state sintetizzate e commercializzate molte altre con diverse caratteristiche farmacodinamiche e farmacocinetiche. Le BZD hanno proprietà sedative, ipnotiche, ansiolitiche, anestetiche, anticonvulsivanti, miorilassanti, ad alte dosi possono causare amnesia anterograda e dissociazione; si utilizzano per il trattamento dell'insonnia, degli stati ansiosi, dell'agitazione psicomotoria, delle convulsioni, e spesso si usano insieme ad altri farmaci per effettuare procedure di sedazione. Nella pratica clinica hanno rimpiazzato diversi farmaci ipnotici e sedativi che presentavano un profilo di sicurezza minore come i barbiturici.

Le benzodiazepine possiedono una struttura primaria comune costituita da un anello aromatico benzenico e da un anello diazepinico formato da 7 atomi, 5 di carbonio e 2 di azoto; a questa struttura di base si legano diverse catene che determinano le caratteristiche farmacocinetiche delle diverse molecole, quali la potenza, la durata d'azione e l'emivita¹¹¹. Le BZD agiscono legandosi al recettore GABA-A, uno dei recettori per l'acido gamma-aminobutirrico (GABA), il principale neurotrasmettitore inibitorio del sistema nervoso centrale. Il recettore GABA-A è

formato da 5 subunità, 2 subunità alfa, 2 beta e una gamma, che circondano un canale per il cloro. Il GABA si lega all'interfaccia fra la subunità alfa e quella beta e causa l'apertura del canale per il cloro, che entra nella cellula nervosa depolarizzandola e causando quindi una riduzione dell'eccitabilità cellulare, ovvero un effetto inibitorio. Le benzodiazepine legano le subunità alfa e gamma del recettore bloccando il recettore stesso in una conformazione in cui ha la massima affinità per il GABA, aumentando quindi il flusso di cloro all'interno della cellula e riducendone l'eccitabilità ¹¹².

Le benzodiazepine possono essere classificate a seconda della loro emivita:

- Benzodiazepine a brevissima durata d'azione, con emivita minore di 6 ore: triazolam, brotizolam e midazolam. Il midazolam in particolare è caratterizzato dal rapidissimo on-set e dalla breve durata dei suoi effetti, per questo è molto utilizzato nelle procedure di sedazione. La somministrazione ripetuta può però provocare l'accumulo di metaboliti attivi che ne prolungano l'effetto ¹¹³.
- Benzodiazepine a breve durata d'azione con emivita fra 6 e 24 ore: lorazepam e oxazepam.
- Benzodiazepine a durata d'azione intermedia con emivita fra 24 e 48 ore come il clonazepam.
- Benzodiazepine a lunga durata d'azione con emivita oltre le 48 ore; l'attività nel tempo è garantita dalla presenza di metaboliti attivi che si accumulano nell'organismo. Ne fanno parte diazepam e clordiazepossido ^{114,115}.

Le BZD vengono somministrate soprattutto per via orale e rettale e vengono assorbite molto rapidamente nel tratto gastrointestinale, ma possono essere somministrate anche per via endovenosa e intramuscolare. Sono molecole molto liposolubili, che si distribuiscono bene in tutti i tessuti e passano facilmente la barriera ematoencefalica e la barriera placentare. Vengono secrete nel latte e nella saliva. Vengono metabolizzate a livello epatico dai citocromi CYP3A4 e CYP2C19; questo le rende soggette ad interazioni con altri farmaci che seguono la stessa via metabolica e che ne possono ridurre o prolungare la durata d'azione ¹¹⁵. Ad esempio, l'associazione con alcol e barbiturici ne aumenta il metabolismo, che

è invece rallentato nell'anziano. Le BZD vengono escrete per via urinaria (80%) e fecale.

L'intossicazione da BZD è frequente: esistono più di 50 tipi di BZD, e la loro prescrizione è estremamente diffusa il che comporta un largo utilizzo e un largo abuso di queste sostanze ¹¹².

I sintomi provocati dalla intossicazione di BZD consistono in una importante depressione del sistema nervoso centrale, ma raramente a questo si associa depressione respiratoria perché la densità di recettori GABAergici a livello del centro respiratorio nel tronco cerebrale è relativamente bassa ¹¹⁶. Il paziente intossicato solo da benzodiazepine in genere è assonnato fino alla letargia, può presentare atassia, disturbi del linguaggio, alterazioni dello status mentale, ma respira adeguatamente e presenta parametri vitali normali. Se compare depressione respiratoria va considerata la assunzione concomitante di un altro agente sedativo, spesso questi pazienti assumono in contemporanea alcol o oppiacei. I sintomi dell'intossicazione da BZD possono variare a seconda della dose assunta, della via di assunzione e delle caratteristiche intrinseche della molecola. La dose necessaria per provocare un avvelenamento varia da persona a persona e a seconda della via di somministrazione. L'assunzione per os raramente causa overdose ¹¹⁷, i casi di intossicazione più gravi sono provocati dall'assunzione per via endovenosa. Da alcuni studi si è osservato che il temazepam è la benzodiazepina potenzialmente più pericolosa, in grado di causare facilmente intossicazioni dato il suo rapido assorbimento.

Le formulazioni endovenose di BZD sono diluite con sostanze che se assunte ad alte dosi sono potenzialmente pericolose, la principale è il glicole propilenico, comune diluente delle formulazioni parenterali di diazepam e lorazepam. Esso può provocare una vasta gamma di effetti collaterali, dalla necrosi cutanea e dei tessuti molli in caso di stravasamento, a emolisi, aritmie, ipotensione, acidosi, convulsioni, coma, fino alla morte per multiorgan failure o MOF. La tossicità provocata da glicole propilenico non è un'evenienza frequente ma deve essere considerata in caso di ripetute infusioni di benzodiazepine. In un paziente intossicato da BZD somministrate per via endovenosa l'aumento dell'anion gap può essere un indicatore di tossicità da glicole propilenico ¹¹⁸.

Nei casi di intossicazione bisogna in primo luogo assicurare la pervietà delle vie aeree anche con l'intubazione se necessario. La curva capnografica è utile per monitorare pazienti che presentano un alto rischio di ipoventilazione. È importante monitorare attentamente anche l'attività cardiaca. In caso di avvelenamento da benzodiazepine è disponibile un antidoto, il flumazenil, un antagonista che compete con le BZD per il loro sito di legame al recettore GABA-A; viene comunemente utilizzato al termine delle procedure di sedazione o nei casi di overdose ¹¹⁹. La somministrazione di flumazenil può precipitare una sindrome da astinenza di BZD o causare convulsioni, specie nei pazienti che utilizzano in cronico queste sostanze e che hanno sviluppato tolleranza ¹²⁰. Il flumazenil inoltre non ha un effetto diretto nella risoluzione della depressione respiratoria dovuta ad overdose da benzodiazepine ¹²¹. Data la bassa morbilità e mortalità dell'avvelenamento da benzodiazepine spesso l'utilità della somministrazione del flumazenil consiste nella possibilità di evitare procedure invasive come l'intubazione.

Il flumazenil può essere somministrato alla dose di 0,2 mg ogni 2 minuti fino ad un massimo di 3 mg/h o fino alla risoluzione del quadro di intossicazione; la dose pediatrica è di 0,01 mg/kg. Se la terapia non ha prodotto gli effetti desiderati o se i sintomi si ripresentano dopo un intervallo di benessere, come può accadere in caso di benzodiazepine a lunga durata d'azione, si può ripetere la somministrazione del flumazenil. Nei pazienti in cui si è presente anche un quadro di insufficienza epatica esso può essere somministrato si può somministrato in infusione continua a 0,25 mg/h.

Se il paziente presenta anche i segni tipici di una overdose da oppioidi si può somministrare il naloxone, più sicuro del flumazenil in quanto gravato da un minor rischio di causare convulsioni ¹²².

1.2.9 Barbiturici

I barbiturici sono sostanze sintetiche; il composto originale, l'acido barbiturico, è stato sintetizzato per la prima volta nel 1864, ma il primo agente attivo a livello farmacologico, il barbital, non fu prodotto fino al 1881 e venne introdotto in medicina nel 1904. Il composto più largamente usato, il fenobarbital, fu sintetizzato nel 1911 ed usato a livello clinico l'anno successivo. Sebbene siano stati sintetizzati

circa 2.500 derivati, solo 50 circa di essi sono stati impiegati in ambito medico. Il loro effetto consiste in una potente azione di depressione dell'attività del sistema nervoso centrale. Come sedativi/ipnotici i barbiturici sono stati ampiamente sostituiti dalle benzodiazepine, meno pericolose. Alcuni barbiturici vengono ancora ampiamente utilizzati come antiepilettici e le molecole a lento rilascio sono utilizzate in anestesia. I barbiturici sono infine utilizzati per praticare l'eutanasia, dove legale e la pena capitale per iniezione letale, principalmente negli Stati Uniti. I barbiturici sono spesso impiegati per l'eutanasia nella medicina veterinaria. I barbiturici si legano al recettore GABA A e aumentando la conduttanza agli ioni cloruro del canale per il cloro del recettore stesso. L'aumento del passaggio di questi anioni provoca un'iperpolarizzazione post-sinaptica con depressione della attività neuronale. Oltre all'effetto sul GABA-A, i barbiturici bloccano anche i recettori AMPA e Kainato, che sono recettori per il glutammato, il principale neurotrasmettitore eccitatorio nel sistema nervoso centrale dei mammiferi. Nel loro insieme, l'effetto potenziante sui recettori GABA inibitori e inibitore sui recettori AMPA eccitatori spiegano gli effetti deprimenti dei barbiturici sul SNC, superiori rispetto agli effetti depressori delle BZD ¹²³.

Fanno parte di questa famiglia di farmaci:

- Amobarbital
- Butanbarbital
- Fenobarbital
- Pentobarbital
- Secobarbital
- Tiopentale

Nonostante l'ormai costante ed importante declino nell'utilizzo di queste sostanze si possono osservare ancora casi di intossicazione, questo è favorito dal loro ridotto costo.

I barbiturici vengono facilmente assorbiti a livello del tratto gastrointestinale e vengono metabolizzati prevalentemente dal fegato attraverso reazioni mediate dai citocromi, questo rende conto anche delle diverse risposte riscontrabili in individui che presentano diversi polimorfismi.

Il trattamento del paziente con intossicazione da barbiturici si basa sulla stabilizzazione emodinamica e soprattutto sul supporto alla ventilazione. La principale complicanza dei barbiturici è infatti la forte depressione respiratoria che può rendere necessaria l'intubazione e la ventilazione meccanica.

Può essere utile per l'eliminazione di barbiturici a breve durata d'azione sottoporre il paziente ad una emodialisi ad alti flussi ¹²⁴.

1.2.10 Oppioidi

Un oppioide è un qualsiasi composto chimico psicoattivo che produce effetti farmacologici simili a quelli della morfina. Tra le sostanze oppioidi distinguiamo gli alcaloidi naturali, i prodotti semisintetici e totalmente sintetici, e i peptidi oppioidi endogeni. Il termine oppioide viene anche usato in modo improprio per indicare gli oppiacei, cioè gli alcaloidi che possono essere ritrovati nell'oppio. L'oppio è una miscela di sostanze ricavata dal lattice del *Papaver somniferum* (papavero da oppio), utilizzato da millenni per scopi sia medicinali che ricreativi; oggi esistono diverse sostanze di sintesi che ne mimano la struttura e quindi anche l'effetto.

Gli oppioidi sono usati per alleviare il dolore, ma causano anche un forte senso di benessere ed euforia, se usati in dosi eccessive possono causare dipendenza e assuefazione. Hanno quindi un elevatissimo potenziale d'abuso. Attualmente il consumo massiccio di queste sostanze a scopo ricreativo è un problema mondiale, i report evidenziano un aumento negli ultimi decenni dei casi di overdose ¹²⁵. Si stima che in Europa circa 1 milione di adulti faccia uso di oppiacei a scopo ricreativo, fortunatamente però le domande per essere inseriti all'interno dei programmi di riabilitazione e di terapia sostitutiva sono in crescita ⁵.

Gli oppioidi si legano a specifici recettori presenti nel sistema nervoso centrale e periferico e in altri tessuti come il tratto gastroenterico. I tre principali tipi di recettori presenti nel SNC sono stati denominati μ (mu), κ (kappa) e δ (delta). A questi si aggiunge un quarto recettore denominato NOP, ovvero nociceptin receptor, di grande importanza clinica in quanto coinvolto nelle risposte del dolore. Tutti questi recettori appartengono alla superfamiglia dei recettori transmembrana

accoppiati a proteine G, che agiscono sulla neurotrasmissione GABAergica. L'interazione con i diversi tipi di recettore comporta effetti diversi: l'interazione con il recettore μ (mu) determina analgesia sovraspinale, depressione respiratoria, miosi, riduzione della motilità gastrointestinale, euforia, l'interazione con il recettore κ (kappa) determina analgesia spinale, miosi meno intensa rispetto all'interazione con μ , depressione respiratoria, disforia, effetti psicotomimetici come alterazioni del pensiero, delle percezioni, stati allucinatori, l'interazione con il recettore δ (delta) causa effetti antidepressivi ed anticonvulsivanti e dipendenza fisica. Ciascun oppioide ha diverse affinità di legame con i diversi recettori, e può comportarsi come agonista o agonista parziale dei recettori stessi; questo determina per ogni oppioide un diverso spettro di effetti.

Gli oppioidi vengono in genere facilmente assorbiti per via intramuscolare, sottocutanea, e attraverso le mucose dell'apparato gastroenterico e la mucosa nasale; sono molecole lipofile, che circolano nel torrente ematico legate a proteine plasmatiche ma lasciano rapidamente il circolo per concentrarsi nei parenchimi. Vengono metabolizzati attraverso due differenti sistemi: le trasformazioni di fase 1, ossidazione, riduzione, idrolisi, demetilazione, mediate dal sistema enzimatico del citocromo P450 e le reazioni di fase 2 di coniugazione, tra le quali la glucuronazione è il processo principale. Queste vie producono cataboliti più solubili nelle urine e nella bile, che vengono più facilmente eliminati. Relativamente ai farmaci oppioidi, tramadolo, fentanyl e metadone subiscono solo metabolizzazione di fase 1; tapentadolo, morfina e idromorfone solo di fase 2; codeina, buprenorfina e ossicodone entrambe le fasi ¹²⁶.

L'intossicazione da oppioidi è frequente; alcune categorie di persone, ad esempio soggetti appena usciti dal carcere, sono particolarmente prone all'overdose perché non più tolleranti nei confronti della sostanza. L'anamnesi accurata può aiutarci a capire sia quale oppiaceo è responsabile dell'overdose sia la eventuale assunzione concomitante di altre sostanze, ad esempio alcol e benzodiazepine vengono spesso assunte assieme ad oppioidi per scopi ricreativi ¹²⁷.

I segni "classici" di tossicità da oppioidi sono il sopore, l'ipoventilazione, la bradipnea, la diminuzione della attività intestinale e la miosi pupillare, anche se può esserci una dilatazione normale della pupilla in caso di assunzione di meperidina o

di assunzione concomitante di farmaci anticolinergici ¹²⁸. L'analgesia e l'ottundimento del sensorio, tipici degli oppiacei, possono mascherare una sintomatologia dovuta a traumi, che vanno pertanto ricercati con attenzione. I pazienti intossicati da oppiacei, a causa della sedazione e della incapacità di proteggersi adeguatamente dal freddo, possono facilmente essere ipotermici; se presentano ipertermia, bisogna sospettare un'infezione, frequenti sono le polmoniti ab ingestis, le endocarditi e le infezioni dei tessuti molli nel sito di iniezione. Benché il paziente intossicato da oppiacei sia in genere assopito, a volte può presentarsi ansioso, agitato e in caso di intossicazione da tapentadolo, tramadolo e meperidina possono manifestarsi convulsioni. Alcuni oppioidi possono provocare l'insorgenza di una sindrome da distress respiratorio acuto, (ARDS) con un meccanismo fisiopatologico non ancora chiaro ¹²⁹.

Esistono anche degli effetti tossici specifici che variano a seconda della sostanza utilizzata:

- Destrometorfano – farmaco utilizzato per le sue proprietà antitussigene può aumentare il rischio di intossicazione da serotonina (sindrome serotoninergica), soprattutto se assunto con altri agenti serotoninergici, come gli inibitori delle monoamino ossidasi (IMAO) o gli inibitori selettivi della ricaptazione di serotonina SSRI, come fluoxetina, paroxetina, sertralina. Ad alte dosi ha azione agonista sui recettori μ per gli oppioidi.
- Fentanyl – si tratta di un oppioide sintetico utilizzato frequentemente nell'ambito dell'anestesia e della terapia del dolore. È caratterizzato da una brevissima emivita ma da una potenza molto elevata, circa 80 volte maggiore della morfina, a causa della sua elevata lipofilia. Quando il fentanil viene utilizzato per l'anestesia, possono manifestarsi, anche diverse ore dopo l'intervento chirurgico, degli effetti ritardati a carico del sistema respiratorio, quali rigidità muscolare, rigidità della parete toracica, acidosi respiratoria, ipotensione. Questo fenomeno di tossicità ritardata sembra essere dovuto alla redistribuzione di fentanil nel plasma dai depositi nel tessuto adiposo, nei muscoli e nel tratto gastrointestinale, con un secondo picco di concentrazione plasmatica di fentanil. Il fenomeno si manifesta con maggiore probabilità durante la fase post-operatoria ¹³⁰.

- Loperamide, commercializzata in Italia come *Imodium*, *Lopemid*, *Dissenten* con numerosi generici disponibili, è un debole agonista oppioide. La loperamide si lega ai recettori oppioidi μ della parete intestinale, determinando un'inibizione del rilascio di acetilcolina e di prostaglandine. Ciò determina la riduzione della peristalsi propulsiva e aumenta il tempo di transito intestinale. La loperamide, inoltre, aumenta il tono dello sfintere anale, con conseguente riduzione dell'incontinenza e dello stimolo fecale. Ad altissime dosi pare avere effetti stupefacenti, capaci anche di calmare i sintomi d'astinenza da droghe illegali, per questo a volte viene assunta in grandi quantità dai tossicodipendenti per trattare la astinenza da eroina. Ad alte dosi la loperamide perde la sua capacità di agire specificatamente a livello del tratto gastrointestinale ed agisce sui canali del sodio a livello miocardico, quindi può causare QT lungo, torsione di punta, aritmie ventricolari, sincope e arresto cardiaco ^{131,132}. In questi casi è indicata la somministrazione di bicarbonato di sodio (1-2 mEq). La tossicità cardiaca non si risolve però nel breve tempo ed è necessario monitorare il paziente in regime di ricovero nei giorni successivi.
- Meperidina – può provocare convulsioni e sindromi serotoninergiche.
- Ossicodone – nelle formulazioni spesso è combinato con il paracetamolo, può dare alterazioni del tratto QT ¹³³.
- Tramadolo e tapentadolo – possono provocare l'insorgenza di crisi convulsive.

L'approccio al paziente con sospetta intossicazione da oppioidi si basa sul mantenimento della pervietà delle vie aeree, della ventilazione e degli scambi gassosi, quando necessario è indicata la ventilazione meccanica e l'impiego di ossigeno supplementare.

Per l'intossicazione da oppioidi esiste un antidoto specifico, il naloxone, una molecola che agisce come antagonista del recettore μ . L'assorbimento del naloxone è buono ma esso viene completamente metabolizzato dal fegato, per cui deve essere somministrato per via parenterale; 1 mg di naloxone ev antagonizza gli effetti di circa 25 ng di eroina. Il naloxone può essere somministrato anche attraverso il tubo endotracheale previa nebulizzazione, questa possibilità è molto

utile in caso non si riesca a ottenere un accesso venoso. Il naloxone risolve la depressione respiratoria in 1-2 minuti e la sua azione dura 1- 4 ore. Se un paziente si presenta con spiccata brachipnea o in arresto respiratorio, la dose terapeutica iniziale va da 0,2 a 1 mg ev, nelle intossicazioni più gravi si può iniziare con 2 mg; se la ventilazione non migliora dopo la somministrazione di 10 mg è opportuno riconsiderare l'ipotesi diagnostica.¹³⁴ Se il paziente presenta una ventilazione meno compromessa la dose iniziale necessaria è molto minore, tra 0,05 e 0,5 mg, ripetibile finché la frequenza respiratoria non raggiunge i 12 atti al minuto. I pazienti in terapia con naloxone devono ricevere ossigeno in maschera per ridurre il rischio di sviluppare ARDS, una possibile complicanza della somministrazione del farmaco¹³⁵. In caso di intossicazione da fentanyl, che ha una potenza 50-100 volte superiore a quella della morfina, sono necessarie dosi di naloxone maggiori. L'obiettivo della terapia con il naloxone non è la risoluzione completa della overdose ma il raggiungimento di una adeguata ventilazione¹³⁶. È importante interrompere la somministrazione nel caso il paziente presenti sintomi di astinenza. La decontaminazione gastrointestinale con l'utilizzo di carboni attivi è utile quando si sospetta che il paziente possa aver assunto altre sostanze che lo mettono a rischio di vita.

L'identificazione di ovuli nelle vie digerenti tramite l'imaging deve far sospettare una intossicazione massiva, in questi casi l'emodialisi è una opzione terapeutica utile.

È importante trattare anche gli effetti prodotti da agenti adulteranti che si trovano nei lotti di droga commercializzati illegalmente. Un esempio è dato dalla desomorfina (derivato della codeina) commercializzata diffusamente e illegalmente con il nome di "krokodil" nelle ex-repubbliche Sovietiche¹³⁷; all'interno di numerosi lotti di questa sostanza sono stati identificati solventi come la benzina ed altri idrocarburi che hanno provocato numerosissimi casi di necrosi della cute e dei tessuti molli.

Altri adulteranti molto utilizzati sono alcaloidi, come la quinina e la stricnina, queste sostanze sono state riscontrate in diversi decessi correlati all'assunzione di eroina¹³⁸.

1.2.11 Metadone

Il metadone è un oppioide completamente sintetico, la cui struttura chimica non è correlata alla morfina. Sintetizzato per la prima volta in Germania nel 1941, fu usato come sostituto della morfina durante la Seconda guerra mondiale. Attualmente è usato in medicina come analgesico nel dolore cronico e per ridurre l'assuefazione nella terapia sostitutiva della dipendenza da stupefacenti.

Il metadone ha una forma levogira e una destrogira, la forma L è 50 volte più potente della forma D. Ben assorbito per os, raggiunge il picco plasmatico dopo 4 ore e circola nel torrente ematico per il 90% legato a proteine plasmatiche; si accumula a livello dei tessuti e da qui viene lentamente rilasciato, per cui ha una emivita molto lunga, da 15 a 40 ore, ed è soggetto ad accumulo. Pertanto, la sua sospensione determina meno facilmente sindromi astinenziali rispetto ad altri oppioidi, quali la morfina. Anche il fenomeno della tolleranza si instaura più lentamente rispetto a quanto accade con la morfina. Tuttavia, anche il metadone causa dipendenza fisica e le eventuali sindromi astinenziali hanno durata protratta. Viene metabolizzato a livello epatico, principalmente dall'isoenzima CYP3A4 del citocromo P450 ed i metaboliti sono escreti nella bile e nelle urine. Poiché vi è una ampia variabilità individuale negli isoenzimi del citocromo P450 che metabolizzano il metadone, vi è una notevole variabilità anche nella risposta individuale al farmaco ¹³⁹.

Molti farmaci inoltre interferiscono con il metabolismo del metadone: rifampicina e feritoia ne accelerano il metabolismo, causando a volte lievi sindromi astinenziali, e alcuni farmaci antivirali come l'abacavir e l'amprnavir ne riducono la concentrazione plasmatica perché inducono il citocromo P450. Come gli altri oppioidi, il metadone agisce principalmente come agonista dei recettori mu, esercitando un effetto analgesico, ma si lega anche ai recettori NMDA per il glutammato, mediatore chimico eccitatorio; il blocco competitivo di questo recettore ha una azione anti-eccitatoria, che probabilmente media l'efficacia analgesica del metadone nel trattamento del dolore neuropatico.

Un pericoloso effetto collaterale del metadone dovuto alla sua interazione con i canali del potassio è l'allungamento dell'intervallo QT, che può causare aritmie maggiori; esso è da imputarsi solo all'enantiomero destrogiro del metadone, mentre

non si presenta con l'uso dell'L-metadone. In caso di aumento del QT è importante monitorare il paziente intossicato per almeno 24 ore e correggere eventuali disionie, quali ipomagnesiemia, ipokaliemia ed ipocalcemia.

Nei casi in cui si presenta una spiccata tossicità dovuta alla terapia con metadone è opportuno considerare la sostituzione di questo farmaco con la buprenorfina.

1.2.12 Buprenorfina

La buprenorfina è un oppioide di sintesi brevettato nel 1965. Similmente al metadone, viene usata per trattare il dolore acuto e cronico e la dipendenza da oppioidi. Può essere somministrata per via sublinguale, per iniezione o tramite cerotti transdermici. Rispetto ad altri oppioidi ha un minor potenziale d'abuso perché induce un minor grado di dipendenza ed è più facile sospenderne l'assunzione perché provoca una sindrome astinenziale più lieve. E' un composto altamente lipofilo, con un ampio volume di distribuzione, si localizza nel fegato, nella bile, nel tessuto adiposo e passa la barriera ematoencefalica distribuendosi nel cervello. Ha una emivita di 2-5 ore. La buprenorfina viene metabolizzata in norbuprenorfina a livello epatico dall'isoenzima CYP3A4 del citocromo P450, buprenorfina e norbuprenorfina vengono glucuroconjugate ed escrete attraverso la bile; poiché l'eliminazione è quasi esclusivamente epatica non vi è rischio di accumulo in pazienti con insufficienza renale. La buprenorfina si lega con alta affinità al recettore μ ma lo attiva solo parzialmente (agonista parziale) per cui ha un effetto analgesico minore rispetto alla morfina; essendo un agonista parziale a basse dosi esercita un effetto simile a quello degli altri oppioidi ma ad alte dosi li antagonizza, per cui la sua somministrazione a pazienti già tolleranti agli oppioidi provoca sintomi di astinenza. Essendo un antagonista dei recettori κ , la buprenorfina esercita un effetto protettivo sulla depressione respiratoria collegata alla stimolazione dei recettori μ ¹⁴⁰. La depressione respiratoria da buprenorfina può tuttavia verificarsi in caso di assunzione concomitante di alcool, BZD o in pazienti con malattie polmonari. Il trattamento in questi casi è sovrapponibile a quello delle intossicazioni da altre molecole oppioidi, ma poiché la buprenorfina ha una elevata affinità recettoriale la dose di naloxone richiesta per spiazzare la molecola dai recettori μ è maggiore (5-10 mg i.v.), e la somministrazione migliore è in

infusione continua. L'emivita elevata della buprenorfina rende necessaria un'osservazione prolungata.

1.3 Approccio al paziente consumatore di droghe d'abuso

1.3.1 Le problematiche connesse all'utilizzo di sostanze stupefacenti in Pronto Soccorso

Gli accessi in Pronto Soccorso di pazienti che abusano di sostanze sono molto frequenti; pertanto, le Unità Operative di Pronto Soccorso rappresentano un importante osservatorio sugli effetti dell'intossicazione tanto da sostanze "classiche" quanto da nuove sostanze da abuso.

La diagnosi di intossicazione si basa come sempre sui dati anamnestici, spesso difficili da reperire e poco attendibili, e sulla presentazione clinica dei pazienti ¹⁴¹.

I pazienti che giungono in Pronto Soccorso e che fanno uso di sostanze psicotrope possono appartenere a diverse categorie:

- Pazienti acutamente intossicati: a seconda della sostanza o della combinazione di sostanze assunta, possono presentare agitazione psicomotoria, fino a crisi psicotiche e dissociative ¹⁴², ipertermia, insufficienza respiratoria da overdose da oppioidi o per assunzione di dosi tossiche di farmaci quali benzodiazepine o barbiturici nel corso di tentativi suicidari. Frequente è l'utilizzo sincrono di più sostanze, che rende molto difficili l'inquadramento ed il trattamento del paziente; un esempio è la cosiddetta "speedball", cioè la contemporanea assunzione di eroina e cocaina. Particolarmente temibili sono le aritmie maligne che possono manifestarsi anche a distanza di tempo dalla assunzione della droga, un esempio sono le aritmie da allungamento del QT nei pazienti che assumono metadone ¹⁴³.
- Pazienti con sindrome da astinenza: frequente è l'accesso di pazienti con astinenza acuta da oppiacei. La sindrome da astinenza da oppiacei si manifesta inizialmente con stato d'ansia e desiderio impellente (craving) per la sostanza, a cui seguono un aumento della frequenza respiratoria a riposo, in genere accompagnata da diaforesi, sbadigli, lacrimazione, rinorrea,

midriasi e crampi allo stomaco. Successivamente possono svilupparsi piloerezione, tremori, contrazioni muscolari, tachicardia, ipertensione, febbre e brividi, anoressia, nausea, vomito e diarrea; gli episodi di vomito e diarrea possono essere molto numerosi, con conseguente grave disidratazione. L'astinenza da oppiacei non causa febbre, convulsioni o alterazione dello stato mentale. Nonostante dal punto di vista sintomatico possa essere drammatica, essa non è fatale.

- Pazienti che si presentano in Pronto Soccorso per una patologia acuta indipendente dalla assunzione di sostanze d'abuso, ma che assumono abitualmente sostanze stupefacenti. In questi pazienti il trattamento della patologia acuta è complicato dal fatto che possono esserci interazioni farmacologiche potenzialmente pericolose tra i farmaci necessari a trattare la patologia acuta e la sostanza d'abuso assunta cronicamente; per poter trattare in modo sicuro il paziente è quindi necessario identificare la sostanza d'abuso eventualmente presente in circolo
- Conducenti di veicoli fermati alla guida o coinvolti in incidenti stradali, feriti o meno, nei confronti dei quali devono essere effettuati prelievi di campioni di sangue e urine per ricercare eventuali sostanze d'abuso. Questi prelievi hanno uno scopo esclusivamente forense e vengono richiesti dall'Autorità Giudiziaria ex artt. 186 e 187 del codice della strada. I campioni una volta prelevati vengono portati al laboratorio di Medicina Legale e Tossicologia Forense; durante il trasporto deve essere strettamente rispettata la catena di custodia ¹⁴⁴.

1.3.2 Trattamento del paziente con sospetta intossicazione

Benché le intossicazioni siano una causa frequente di accesso in Pronto Soccorso, raramente sono mortali; la maggior parte dei pazienti necessiterà solo di monitoraggio dei parametri vitali e di terapia di supporto.

L'anamnesi è molto importante per raccogliere informazioni fondamentali quali il tipo di sostanza o di sostanze assunte, la loro quantità, il tempo trascorso dall'assunzione etc. Al tempo stesso l'anamnesi è frequentemente inattendibile,

inaffidabile, ingannevole. Sapere quale sostanza tossica è responsabile del quadro clinico nella maggior parte dei casi non modifica i provvedimenti terapeutici immediati, ma consente di utilizzare l'antidoto specifico, se esiste ed è disponibile. dal punto di vista clinico gli effetti della maggior parte delle sostanze tossiche o d'abuso possono essere ricondotte a 5 sindromi fondamentali: sindrome anticolinergica, colinergica, da oppioidi, simpaticomimetica e da sedativi ipnotici.

Sindrome	FC e PA	Respirazione	TC	Pupille	Suoni intestinali	Sudorazione
Anticolinergica (atropina, antistaminici)	Aumentate	Invariata	Ipertermia	Midriasi	Assenti	Inibita
Colinergica (pilocarpina, funghi, carbonati)	Invariate	Invariata	Invariata	Miosi	Presenti	Profusa
da oppioidi	Ridotte	Ridotta	Ridotta	Miosi	Assenti	Inibita
Simpatico mimetica (cocaina, MDMA, anfetamine e metanfetamine)	Aumentate	Aumentata	ipertermia	Midriasi	Presenti	Profusa
Da sedativi- ipnotici (barbiturici BZD)	Ridotte	Ridotta	Ridotta	Normali	Assenti	Inibita

Tabella II--Principali sindromi provocate dalle diverse categorie di sostanze e relativa presentazione clinica.

Come tutti i pazienti critici, anche nel paziente intossicato va seguita la sequenza di rianimazione ABCD:

- Airway: protezione delle vie aeree con mantenimento della loro pervietà.
- Breathing: ventilazione e mantenimento di adeguati scambi gassosi.
- Circulation: sostegno al circolo, controllo dell'ipotensione o dell'ipertensione, ripristino volemico.
- Disability: valutazione neurologica e controllo di eventuali stati di agitazione o di sopore.

Nel paziente intossicato può essere utile seguire l'acronimo DEAD.

- D: Decontamination

- E: Enhanced elimination
- A: Antidotes
- D: Disposition

1.3.2.1 Decontaminazione

In caso di ingestione di tossici un tempo veniva praticata l'induzione del vomito, oggi del tutto in disuso; attualmente le procedure utilizzate sono la gastrolusi, la somministrazione di carbone vegetale attivato ed il lavaggio intestinale. Le procedure di decontaminazione intestinale sono utili solo se non vi sono controindicazioni e se si ritiene che la sostanza non sia già stata interamente assorbita ¹⁴⁵.

- La gastrolusi, o lavanda gastrica, è una procedura basata sulla immissione e successiva aspirazione di una piccola quantità di liquido dallo stomaco, ripetuta più volte, attraverso una sonda naso o orogastrica; ha l'obiettivo di rimuovere tossici o frammenti di oggetti dallo stomaco. Viene praticata sempre meno, perché non è priva di rischi ed è inutile se la sostanza è già stata assorbita o non si trova più nello stomaco ¹⁴⁶. Va praticata entro 1-3 ore dall'ingestione ed è particolarmente appropriata se il tossico non è assorbibile dal carbone vegetale attivato, se non è disponibile un antidoto o se esso non è stato del tutto efficace. È controindicata in caso di depressione del livello di coscienza con incapacità a proteggere le vie aeree, in caso di ingestione di schiumogeni o sostanze caustiche o corrosive e se il paziente è a rischio di emorragia o perforazione per patologie preesistenti, come le varici esofagee, o per un intervento chirurgico recente. Può causare complicanze quali polmonite da aspirazione, anche in pazienti vigili, laringospasmo, desaturazione, pneumotorace, aritmie e molto raramente perforazioni esofagee ed emorragie gastriche.
- Terapia con carbone attivo: il carbone attivo è un granulato per sospensione orale, di colore scuro, insapore e inodore, costituito da un materiale vegetale, la cellulosa, attivato tramite l'esposizione a gas ossidanti ad alte temperature in modo da rendere la sua superficie molto porosa e da aumentarne la capacità adsorbente. Non è un antidoto, ma un adsorbente

aspecifico in grado di legare diversi gruppi chimici ed impedire l'assorbimento intestinale di sostanze tossiche, riducendone la biodisponibilità. La dose per adulti va da 25 a 100 mg, il rapporto ottimale tra carboni attivi e sostanza tossica è di 10:1. I benefici maggiori si ottengono se viene somministrato entro un'ora dalla assunzione della sostanza tossica e nelle intossicazioni gravi il trattamento va proseguito per alcuni giorni. Nei pazienti privi di coscienza va somministrato tramite sondino nasogastrico. Non va somministrato insieme con antidoti in quanto ne riduce l'efficacia.

- La somministrazione di carbone attivo non è indicata nelle ingestioni di sostanze caustiche o corrosive, nelle intossicazioni che richiedono un antidoto specifico e nelle intossicazioni da etanolo, litio, potassio, ferro, mercurio e arsenico, verso i quali ha un potere adsorbente nullo. Le complicanze del trattamento con carboni attivi coinvolgono il tratto gastrointestinale e consistono in costipazione, distensione dello stomaco, occlusione intestinale, diarrea; inoltre, si possono manifestare ipermagnesemia, acidosi metabolica, ipernatriemia; la distensione gastrica può portare a rigurgito, inalazione e polmonite ab ingestis¹⁴⁷, infine la sua presenza può ostacolare eventuali manovre endoscopiche successive.
- Whole bowel irrigation o lavaggio intestinale: consiste nella somministrazione tramite sondino nasogastrico di una soluzione contenente glicole polietilenico ed elettroliti o di prodotti per la pulizia intestinale quali Isocolan o Laevolac, al fine di indurre una diarrea osmotica; in genere vanno somministrati 1500 – 2000 ml/h di soluzione fino ad ottenere un effluente rettale limpido¹⁴⁵. Indicato soprattutto in casi particolari come body packers e nell'ingestione di ferro, potassio o piombo, è invece controindicato in caso di impossibilità a inserire un sondino, in caso di vomito incoercibile, di ostruzione intestinale, di elevato rischio di perdita di coscienza o di insorgenza di crisi epilettiche nelle ore successive. I maggiori effetti collaterali di questa procedura sono a carico del tratto gastrointestinale, con vomito, crampi e nausea¹⁴⁸.

In casi estremi, se il paziente ha ingerito grandi quantità di metalli pesanti o nei casi di narcotrafficienti che trasportano ovuli di sostanze stupefacenti, è in indicata l'esecuzione di manovre endoscopiche o chirurgiche; questa rappresenta l'unica alternativa in caso di fallimento della irrigazione intestinale ¹⁴⁹.

1.3.3 Eliminazione

Per favorire l'eliminazione di alcune sostanze tossiche si può ricorrere alla somministrazione di carbone attivo in multiple dosi e alla alcalinizzazione urinaria. Multiple dosi di carbone attivo favoriscono l'eliminazione delle sostanze tossiche attraverso due meccanismi: interrompono il ricircolo enteroepatico delle sostanze che sono escrete nella bile e riassorbite nell'ileo distale, perché ne prevengono il riassorbimento, e aumentano l'eliminazione delle sostanze che passano liberamente dal sangue all'intestino effettuando una sorta di dialisi. Si sono dimostrate particolarmente efficaci per varie sostanze, tra cui carbamazepina, fenobarbital, teofillina, amitriptilina, digitossina, dapsone, chinina, aspirina ¹⁴⁵. Le controindicazioni e le complicanze sono le stesse della somministrazione di una singola dose.

L'alcalinizzazione delle urine favorisce l'eliminazione renale di acidi deboli ed è particolarmente utile per promuovere l'eliminazione di salicilati, clorpropamide, fenobarbital, metotrexato. Si somministra un bolo ev di 1-2 mEq/Kg di bicarbonato di sodio e a seguire 150 mL di sodio bicarbonato in glucosata al 5% fino ad ottenere un pH urinario fra 7,5 e 8, somministrando contemporaneamente K⁺ per evitare l'ipokaliemia; in caso di ipokaliemia il tubulo renale riassorbirebbe ioni potassio in scambio con idrogenioni impedendo l'alcalinizzazione delle urine. Possibili complicanze sono il sovraccarico di liquidi, con rischio di edema cerebrale e polmonare, e l'ipokaliemia.

L'acidificazione delle urine non è raccomandata per l'eliminazione di basi deboli come le anfetamine a causa del pericolo di precipitazione della mioglobina a livello tubulare.

Somministrazione di antidoti

Un antidoto è un farmaco in grado di modificare la cinetica e la dinamica dell'agente tossico. Gli antidoti possono essere classificati in tre gruppi: antidoti

necessari immediatamente o entro 30 minuti, antidoti da somministrare entro 2 ore, antidoti da somministrare entro 6 ore. Va sottolineato che l'uso degli antidoti in Pronto Soccorso non è sostitutivo delle manovre rianimatorie di base; tuttavia, vi sono antidoti che permettono un rapido recupero delle funzioni vitali. Antidoti come Naloxone e Flumazenil devono essere utilizzati contemporaneamente alle manovre rianimatorie.

1.4 Scopo degli accertamenti tossicologici e metodologie di analisi

1.4.1 Procedure e scopo degli accertamenti

In ambito ospedaliero gli accertamenti tossicologici possono essere effettuati per scopi medici o forensi. In quest'ultimo caso i campioni una volta prelevati vengono portati al laboratorio di Medicina Legale e Tossicologia Forense; durante il trasporto deve essere strettamente rispettata la catena di custodia ¹⁴⁴. La sostanza presente nella matrice deve essere identificata e la sua concentrazione deve essere quantificata con precisione, dato che assume valenza di prova per l'Autorità Giudiziaria. L'esame, quindi, deve essere effettuato con particolare accuratezza e questo richiede tempistiche lunghe.

Nell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova presso l'Unità Operativa di Medicina di Laboratorio è possibile ricercare nelle urine diverse sostanze tramite cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa, anche questo processo però richiede tempi piuttosto lunghi incompatibili con l'urgenza. Il trattamento dell'evento acuto si deve quindi basare sulla diagnosi clinica.

1.4.2 Cenni di legislazione

Ad oggi la decisione di effettuare un test tossicologico rimane una prerogativa del medico che ha in carico il paziente, in particolare la decisione si basa sulle necessità cliniche ed il test non possiede alcuna valenza giuridica. Una eccezione a questo è quando al pronto soccorso perviene la richiesta da parte delle forze dell'ordine; all'interno del codice della strada (CdS) gli articoli 186 e 187 regolano quella la

casistica e le modalità dell'esecuzione di accertamenti medico-legali su conducenti qual ora vi sia stato un sinistro oppure il sospetto che questi abbiano assunto alcol o altre sostanze stupefacenti ¹⁵⁰.

I campioni raccolti con lo scopo di effettuare accertamenti medico-legali sono soggetti ad una stretta catena di custodia per evitare che possano venire adulterati, questa è essenziale per garantirne il valore giuridico. Gli esami vengono effettuati dalla U.O.C. di Medicina Legale e Tossicologia Forense che procederà a titolare secondo gli standard stabiliti dalla legge ¹⁵⁰.

1.4.3 Stato dell'arte delle analisi tossicologiche

Nel corso degli ultimi 40 anni sono state sviluppate molte nuove tecnologie applicate alle analisi di laboratorio; le tecniche oggi disponibili per l'identificazione e la quantificazione dell'analita all'interno della matrice sono numerose e sofisticate.

La principale tecnica utilizzata sia in ambito forense che clinico è la spettrometria di massa, necessariamente accoppiata a metodiche di separazione come la cromatografia liquida; richiede tempi lunghi che ne limitano l'impiego in emergenza.

Molto utilizzati sono anche test immunocromatografici, che identificano qualitativamente l'eventuale sostanza assunta dal paziente in modo molto rapido. Questi test purtroppo hanno sia bassa sensibilità che bassa specificità, perché possono esservi numerose cross-reazioni; questo inficia fortemente la validità della metodica.

Il recente sviluppo di metodiche basate sull'immunofluorescenza ha consentito la messa a punto di test potenzialmente impiegabili nell'ambito delle situazioni di emergenza, perché in grado di fornire una risposta rapida e sufficientemente affidabile.

1.4.4 Matrici disponibili per l'esecuzione di analisi tossicologiche

Prima dell'esecuzione dell'analisi è molto importante valutare attentamente quale matrice è bene utilizzare, esistono diverse metodiche utilizzabili su diverse matrici

che ci consentono di avere informazioni diverse a seconda dello scopo dell'analisi. Ciascuna matrice presenta vantaggi e svantaggi:

- Urine: è la matrice più utilizzata perché facile da raccogliere e per la possibilità di avere un grande volume di campione; tuttavia, presenta lo svantaggio di poter essere adulterata dal soggetto in fase di raccolta. I livelli di xenobiotici rilevabili nelle urine sono influenzati dalle caratteristiche del farmaco, in primis dalla farmacocinetica e dalla via di escrezione, da caratteristiche del paziente, come la sua funzionalità renale, dalle caratteristiche chimico-fisiche delle urine (una variazione di pH può incidere sui risultati delle analisi) e dal tempo tra la raccolta del campione e la sua analisi ¹⁵⁰.
- Sangue: il campione ematico può offrire informazioni riguardo la recente assunzione di una sostanza. L'utilizzo di questa matrice è però limitato dalla invasività della procedura di prelievo e dall'impossibilità di prelevare grandi quantità.
- Saliva: i tempi di comparsa delle sostanze stupefacenti nella saliva sono simili a quelli della matrice ematica e le modalità di raccolta del campione sono meno invasive. Le problematiche principali legate all'utilizzo di questa matrice sono date dalla difficile conservazione del campione e dal fatto che le sostanze stupefacenti contenute nella saliva non sempre si mantengono stabili. Inoltre, molte sostanze d'abuso causano xerostomia, il che impedisce la raccolta della matrice.
- Capelli: l'analisi della matrice cheratinica consente di diagnosticare un'assunzione cronica di stupefacenti, risalendo anche ad anni prima del momento della raccolta del campione. Non è obbligatoria la raccolta di un capello ma si può utilizzare qualsiasi tipo di matrice cheratinica. È un ausilio molto utile per i Servizi per le Tossicodipendenze. Un limite a questa metodica è posto però da eventuali trattamenti cosmetici messi in atto. Inoltre, utilizzando questa matrice è difficile identificare in modo specifico e sensibile una assunzione molto recente ¹⁵¹.

- Sudore: questa matrice è facilmente prelevabile tramite il tampone della superficie della fronte. Test applicabili a questa matrice sono ancora in fase di sviluppo.

La matrice più spesso impiegata è l'urina; il campione può essere analizzato con diverse metodiche: la più utilizzata è la spettrometria di massa accoppiata a cromatografia liquida ma esistono anche dei test più rapidi basati sulle tecniche di immunochimica. Le metodiche immunochimiche rappresentano una valida alternativa alla spettrometria perché necessitano di strumentazioni meno complesse e non richiedono personale appositamente addestrato. Poiché il paziente può facilmente adulterare il campione rendendo così inefficace l'esame, si rende necessaria la sorveglianza da parte del personale sanitario al momento della raccolta.

1.4.5 Cromatografia liquida

È una metodica di analisi che consente di separare e quantificare i componenti di una miscela liquida. Viene utilizzata in particolare la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Si sfruttano delle pompe che spingono il campione liquido attraverso una colonna contenente particelle estremamente fini che consentono la separazione delle componenti di una miscela e la sua successiva analisi. Viene spesso accoppiata alla spettrometria di massa.

1.4.6 Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica molto importante utilizzata per diverse tipologie di analisi nell'ambito della medicina di laboratorio, ad esempio per la titolazione di farmaci in circolo. La metodica consiste nella produzione di ioni che vengono poi separati in base al rapporto fra la loro massa e la loro carica (m/z). In passato la separazione richiedeva una matrice gassosa, oggi si può effettuare anche su una matrice allo stato liquido; in passato quindi la spettrometria di massa era accoppiata alla gas-cromatografia mentre oggi si accoppia alla cromatografia liquida¹⁵². Un rivelatore analizza gli ioni così separati consentendo di ottenere uno spettro di massa cioè una mappa dell'abbondanza relativa degli ioni prodotti in funzione del rapporto massa/carica (m/z).

Lo spettrometro di massa è schematicamente composto da 3 parti:

- Sorgente, in cui la matrice viene preparata e ionizzata prima dell'analisi.
- Analizzatore, consente la misurazione del rapporto tra la massa e la carica (m/z) delle molecole ionizzate dalla sorgente.
- Rilevatore, rileva e quantifica gli ioni provenienti dall'analizzatore.

La separazione degli ioni avviene tramite l'utilizzo di un campo magnetico accoppiato o meno ad un campo elettrico. Le modalità di separazione consentono di distinguere gli spettrometri di massa in:

- A settore magnetico.
- Time of flight, TOF (a tempo di volo), spesso utilizzata in associazione alla tecnologia di deassorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice (MALDI-MOF); utilizza un impulso laser per ionizzare e vaporizzare la matrice. Viene utilizzata per identificare in particolare composti termolabili e molecole biologiche di grandi dimensioni.
- A quadruplo; si tratta della tipologia più utilizzata, è composto da 4 barre di ceramica o metalliche parallele a cui si applica una corrente, la stessa si applica a delle barre poste diagonalmente; si sovrappone poi una tensione a radiofrequenza. Il campo elettrico generato da questo sistema impone agli ioni di procedere secondo una traiettoria oscillante che varia a seconda del rapporto tra massa e carica caratteristico di ogni molecola. Modulando il campo elettrico si possono selezionare gli ioni aventi m/z tale da superare il quadruplo e da consentire loro di raggiungere il rilevatore. Si possono utilizzare anche più quadrupli posti in serie tra loro per consentire diverse tipologie di analisi.
- A trappola ionica.
- Fourier transform-ion cyclotron resonance, FT-ICR.

Le diverse tipologie di separazione hanno un diverso potere risolutivo, diversa sensibilità e specificità. Inoltre, non tutte queste strumentazioni possono essere accoppiate alla cromatografia liquida, questo quindi ne limita l'utilizzo.

Nell'ambito della medicina di laboratorio la tecnologia della spettrometria di massa viene utilizzata molto frequentemente a vario scopo:

- Dosaggio del livello ematico dei farmaci: esistono diverse classi di farmaci il cui titolo deve rimanere all'interno di una finestra terapeutica ristretta, come alcuni antidepressivi, antipsicotici, immunosoppressori, antibiotici, antiblastici ¹⁵³. L'accurato dosaggio del farmaco circolante è essenziale per garantire la sicurezza del trattamento. La metodica è utile anche per rilevare la concentrazione del farmaco circolante in corso di intossicazione acuta.
- Analisi tossicologiche: la metodica permette di effettuare screening richiesti per ragioni cliniche, medico-legali o per le analisi antidoping su sportivi. Spesso questa metodica si utilizza per confermare una eventuale positività ai test immunologici comunemente utilizzati come indagini di primo livello in questi ambiti. Si esegue in genere su urina perché questa matrice consente l'analisi sia della sostanza principale che dei suoi metaboliti.
- Screening neonatali; la spettrometria di massa viene utilizzata come metodica di screening per individuare una vasta gamma di patologie neonatali, tra cui amminoacidopatie, acidurie organiche e difetti della beta-ossidazione, nell'ambito dei programmi di igiene pubblica e medicina preventiva. È presumibile che il numero delle patologie soggette a screening e rilevabili con questa metodica andrà via via crescendo.
- Studi di proteomica; la proteomica consiste nell'identificazione sistematica delle proteine espresse da una cellula e nella loro caratterizzazione rispetto a struttura, funzione, attività, quantità e interazioni molecolari.

1.4.7 Test immunochimici

Da alcuni anni si sono diffusi metodi notevolmente sensibili e precisi che sfruttano i principi delle reazioni immunitarie per il dosaggio di numerose sostanze. Il campione in esame, contenente la sostanza da dosare detta analita, che funge da antigene, viene fatto reagire con un anticorpo specifico. La concentrazione degli immunocomplessi così formati, in opportune condizioni di rapporto tra antigene e anticorpo, è proporzionale alla concentrazione della sostanza che si ricerca. Per dosare gli immunocomplessi si può ricorrere a varie tecniche. Nei metodi radioimmunologici l'anticorpo è legato a un isotopo radioattivo, solitamente lo iodio (¹²⁵I), che può essere misurato con opportune apparecchiature. Più

recentemente, per evitare di ricorrere alla radioattività, sono stati adottati i metodi immunoenzimatici, che sostituiscono il marcatore radioattivo con enzimi dei quali viene misurata la attività.¹⁵⁴

Un'altra tecnica sfrutta l'utilizzo di un antigene marcato che compete con l'analita per il legame con l'anticorpo; l'anticorpo lega sia l'analita che l'antigene marcato, ma più antigene è presente nella matrice meno antigene marcato sarà legato agli anticorpi e maggiore sarà la quantità di antigene marcato libero. Dosando la quantità di antigene marcato libero si risale alla concentrazione dell'analita nella matrice. I test immunochimici possono essere in fase eterogenea o omogenea. Nei test in fase eterogenea la quota di antigene libero viene separata fisicamente dall'antigene legato all'anticorpo tramite metodiche di lavaggio o centrifugazione. Questi test richiedono perciò passaggi ulteriori. Nei test in fase omogenea la componente libera e quella legata restano in soluzione entro la stessa cuvetta di incubazione, ma vengono distinti in base a specifiche differenze di comportamento introdotte dall'avvenuto legame. Ad esempio, nella tecnologia EMIT, impiegata negli anni '80 per dosaggio di farmaci, dopo il legame l'enzima si inattiva e non genera più segnale. Le tecnologie in fase omogenea per un verso sono più raffinate e costose, dall'altro consentono di usare la comune strumentazione automatica fotometrica di chimica clinica.

Sono largamente impiegate in quasi ogni ambito clinico in quanto garantiscono un risultato qualitativo molto rapido, e possono essere automatizzate aumentando la loro possibilità di impiego.

La tipologia di test più diffusa in ambito tossicologico sono gli "enzime multiple immunoassay tecniche" (EMIT), in questi test l'antigene marcato è coniugato ad un enzima; i più comuni enzimi utilizzati come marcatori sono: lisozima, glucosio-6-fosfato-deidrogenasi e la perossidasi. Quando l'antigene marcato è legato all'anticorpo l'enzima si trova in forma inattiva, quando avviene la reazione competitiva l'antigene marcato viene spiazzato dall'analita e l'enzima può attivarsi svolgere la sua funzione; l'attività dell'enzima sarà proporzionale all'entità della reazione competitiva, quindi ai livelli di analita presenti nella matrice¹⁵⁵.

I test EMIT risultano positivi quando il valore cut-off caratteristico del test viene superato. per ciascun analizza e ciascun test il valore di cut-off viene stabilito in

fase di progettazione sulla base ai dati forniti dal Gruppo Tossicologi Forensi Italiani e dal Substance Abuse and Mental Health Service Administration. Il cut-off ha sempre un valore superiore al limite di sensibilità strumentale ¹⁵⁶.

Alcuni test EMIT presentano problematiche relative alla loro bassa specificità, conseguenza delle possibili reazioni crociate provocate da sostanze con caratteristiche chimiche simili a quelle dell'analita stesso, che causano falsi positivi. Quando il risultato è positivo si impone, nell'ambito della tossicologia forense, un test di conferma altamente specifico da eseguire con metodiche a performance maggiori come la cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata a spettrometria di massa (HPLC/HRMS) ¹⁵⁷.

In questo studio ci si è soffermati quindi sulla valutazione di questa tipologia di esame; in particolare è stato utilizzato un test prodotto dalla azienda Quidel, il "QUIDEL Triage TOX Drug Screen, 94600". Questo esame è stato ideato per l'utilizzo nell'ambito delle UOC di Accettazione e Pronto Soccorso; si esegue tramite la raccolta di un campione di urine che viene depositato su di una "card" a sua volta inserita in una apparecchiatura che ne consente l'analisi. Le sostanze rilevante possono essere diverse, il test consente l'analisi per 10 tipologie di molecole che possono però essere modificate in base alle esigenze operative. Il risultato ottenuto è di tipo qualitativo e si ottiene in circa 5 minuti.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Questo studio ha l'obiettivo di valutare la fattibilità dell'analisi point-of-care (metodo immunoenzimatico QUIDEL Triage TOX Drug Screen 94600) per la determinazione in emergenza delle più comuni droghe d'abuso al PS AOUP realizzando un percorso condiviso fra PS e Medicina di Laboratorio per la determinazione delle principali sostanze d'abuso nelle urine. Questa analisi viene condotta in parallelo a quella eseguita in Medicina Legale con metodiche cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa che rappresenta il metodo di riferimento per l'analisi della presenza di sostanze esogene nelle matrici biologiche, in particolare a fine medico-legali.

MATERIALI E METODI

3.1 Disegno dello studio

Questo studio è il risultato della collaborazione fra le Unità Operative di Pronto Soccorso (PS) e Medicina di Laboratorio (ML) dell'Azienda Ospedale Università di Padova (AOUPD) ed ha l'obiettivo di valutare la fattibilità dell'analisi point-of-care (metodo immunoenzimatico QUIDEL Triage TOX Drug Screen 96400) per la determinazione in emergenza delle più comuni droghe d'abuso nelle urine. Questa analisi viene condotta in parallelo a quella eseguita in Medicina Legale con metodiche di cromatografia liquida-spettrometria di massa (HPLC/HRMS) che rappresentano lo standard di riferimento.

Si tratta di studio prospettico effettuato su campioni di urine e sangue di conducenti di veicoli coinvolti in incidenti stradali accompagnati in PS dalla Polizia Giudiziaria per accertamenti tossicologici ai sensi degli ex artt. 186 e 187 del Codice della Strada (CdS) nel periodo compreso fra il 18/02/2022 e il 15/06/2022. Tali soggetti avevano già manifestato un consenso valido per la raccolta dei campioni biologici e l'esecuzione delle analisi con finalità forense.

I campioni biologici sono stati analizzati presso la UOC Medicina di Laboratorio tramite l'utilizzo del test immunoenzimatico a fluorescenza "QUIDEL Triage TOX Drug Screen 94600" mediante dispositivo "QUIDEL Triage MeterPro". Tutti i risultati ottenuti con l'impiego di questa metodica sono stati confrontati con la metodica semiquantitativa di immunodosaggio enzimatico in uso in regime di routine presso il Laboratorio, mediante strumentazione automatizzata "ILab Taurus-Werfen". Il saggio utilizza specifici anticorpi monoclonali in grado di rilevare la sostanza d'abuso di cui si vuole determinare la concentrazione. Inoltre, i campioni sono stati tutti sottoposti ad analisi di conferma mediante cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata a spettrometria di massa (HPLC/HRMS), tecnica identificativa di riferimento per l'analisi di conferma effettuata presso la U.O.C. Medicina Legale e Tossicologia dell'Azienda Ospedale Università di Padova.

3.2 Metodi analitici utilizzati

3.2.1 Analisi di screening su matrice urinaria: strumentazione Point-Of-Care (POCT) “QUIDEL Triage TOX Drug Screen 964000”

QUIDEL Triage TOX Drug Screen, 94600 è un immunodosaggio a fluorescenza da utilizzare con QUIDEL Triage MeterPro per la determinazione qualitativa della presenza di sostanze stupefacenti e/o metaboliti nell'urina umana a un livello pari o superiore alle concentrazioni limite (cut-off) per un totale di 9 dosaggi tossicologici

Abbreviazione	Analita	Calibratore	Cut-off
AMP	Anfetamine	d-anfetamina	500 ng/ml
mAMP	Metanfetamine	d-metanfetamina	500 ng/ml
BAR	Barbiturici	Barbital	200 ng/ml
BNZ	Benzodiazepine	Temazepam	200 ng/ml
COC	Cocaina	Benzoilecgonina	150 ng/ml
EDDP	Metabolita del metadone	EDDP	100 ng/ml
OPI	Oppiacei	Morfina	50 ng/ml
THC	Cannabinoidi	11-nor-9-carbossi- Δ 9-THC	300 ng/ml
TCA	Antidepressivi Triciclici	Desipramina	1000 ng/ml

Tabella III—informazioni relative alle sostanze analizzate su strumentazione POCT “QUIDEL Triage TOX Drug Screen 964000”

La procedura di analisi comporta l'aggiunta di 250 μ l di urina al pozzetto dei campioni del dispositivo di analisi. Dopo l'aggiunta del campione, l'urina passa attraverso un filtro. Il campione reagisce con i coniugati anticorpali fluorescenti o con i coniugati fluorescenti della sostanza e scorre attraverso il dispositivo di analisi per effetto capillare. La presenza della sostanza stupefacente o di un suo metabolita nel campione di urina impedisce che i coniugati fluorescenti si leghino alla fase solida nella zona di rilevamento. L'urina in eccesso rimuove i coniugati fluorescenti non legati dal dotto di rilevamento, facendoli confluire in un serbatoio di raccolta rifiuti. La card di analisi viene inserita nell'analizzatore QUIDEL Triage MeterPro (di seguito detto analizzatore), programmato per eseguire l'analisi una volta che il campione ha reagito con i reagenti all'interno del dispositivo di analisi. L'analisi si basa sull'entità della fluorescenza rilevata dall'analizzatore all'interno di una zona

di misurazione del dispositivo di analisi. In condizioni tipiche, i risultati positivi o negativi vengono visualizzati sullo schermo dell'analizzatore circa 15 minuti dopo l'aggiunta del campione. Il dispositivo di analisi contiene tutti i reagenti necessari per la determinazione qualitativa delle sostanze stupefacenti e/o dei relativi metaboliti nell'urina umana:

- Anticorpi monoclonali murini contro i metaboliti delle sostanze
- Anticorpi marcati con sostanze fluorescenti
- Coniugati marcati con sostanze fluorescenti
- Fase solida
- Stabilizzanti

3.2.2 Analisi di screening su matrice urinaria: strumentazione “ILab Taurus”

Lo strumento utilizzato per l'analisi di screening delle sostanze d'abuso su matrice urinaria è l'analizzatore ILab Taurus (Instrumentation Laboratory, a Werfen company) le cui metodiche sono state validate e rilasciate anche per la determinazione di sostanze d'abuso su altre matrici biologiche come capelli, sangue e siero *Figura 1*.



Figura 1—dispositivo ILab Taurus

Lo strumento è costituito da un computer gestionale e da tre unità operative: sistema reagenti, sistema campionamento e sistema reazione, lettura e lavaggio cuvette. Il

sistema reagenti consta di un piatto refrigerato diviso in due anelli (esterno ed interno) e di due aghi di dispensazione per i reagenti. Gli aghi vengono lavati con soluzioni acide e alcaline, presenti nella parte esterna dello strumento e costituita da 5 boccette. Il caricamento dei reagenti può avvenire in continuo e in completa sicurezza senza apertura del coperchio principale dello strumento. Il sistema di campionamento comprende un carosello che può contenere un massimo di 50 campioni, nonché 10 rack. Il caricamento è continuo per un numero illimitato di campioni a bordo, grazie alla presenza di una stazione di scarico dei rack. Vi è un ago di dispensazione per i campioni, che viene opportunamente lavato, al termine del pipettamento, con soluzioni acide e alcaline. Il sistema di reazione, lettura e lavaggio cuvette è caratterizzato da un apposito vano con 81 cuvette in vetro Pyrex, contenute in un bagno termostato. Dopo che gli aghi di dispensazione hanno inserito la quantità prevista di reagente e campione nella cuvetta di reazione, lo strumento procede alla miscelazione e di seguito alla lettura mediante fotometro, la cui lampada ha una durata media di 4-5 mesi. Al termine della reazione le cuvette vengono sottoposte ad un'accurata procedura di lavaggio ad opera di una specifica stazione a più aghi, che aspira le soluzioni acida e alcalina da due taniche esterne e il "bath addictive" da una boccetta dedicata. Lo strumento può analizzare fino a 500 test fotometrici ogni ora. Per la determinazione delle sostanze d'abuso tale analizzatore applica la tecnologia dell'immunodosaggio enzimatico in fase omogenea (DRI[®], Diagnostic Reagent Inc.) per le Anfetamine, Ecstasy, Oppiacei, Cocaina, Metadone, Cannabinoidi, Benzodiazepine e la tecnologia CEDIA per la determinazione di Buprenorfina ed EDDP.

3.2.2.1 Principi del metodo

Immunodosaggio enzimatico in fase omogenea DRI[®] (Diagnostic Reagent Inc.): DRI[®] è un saggio immunoenzimatico in fase omogenea, liquido e pronto per l'uso. Il saggio utilizza specifici anticorpi monoclonali in grado di rilevare la sostanza d'abuso di cui si vuole misurare la concentrazione. Questo metodo si basa sulla competizione della sostanza stupefacente, marcata con l'enzima glucosio-6-

fosfato deidrogenasi, capace di trasformare il NAD in NADH, forma ridotta del NAD, in presenza di un cofattore, ossia glucosio-6-fosfato, con la sostanza d'abuso contenuta nel campione per un numero fisso di siti di legame anticorpali. In assenza di sostanza libera nel campione, l'anticorpo specifico si lega allo stupefacente marcato con l'enzima e l'attività enzimatica risulta inibita. Questo fenomeno crea una correlazione diretta tra la concentrazione di analita nel campione e l'attività dell'enzima G6PDH, che viene determinata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 340 nm, misurando la capacità di G6PDH di convertire NAD in NADH. In questo caso, appunto, l'enzima è inibito e la quantità di NADH è pressoché nulla *Figura 2*. Se, invece, la sostanza ricercata è presente nel campione, avviene che l'anticorpo specifico si lega soprattutto alla droga libera nel campione piuttosto che a quella coniugata con l'enzima G6PDH. Quest'ultimo può, quindi, svolgere la sua attività ossia convertire NAD in NADH in presenza del suo cofattore G6P *Figura 2*. L'attività enzimatica viene misurata spettrofotometricamente ed è direttamente proporzionale alla concentrazione di sostanza stupefacente nel campione¹⁵⁸.

Immunodosaggio enzimatico in fase omogenea CEDIA® (Cloned Enzyme Donor Immunoassay): Gli immunodosaggi CEDIA® utilizzano la tecnologia del DNA ricombinante per produrre un sistema di immunodosaggio (brevetto USA N° 4708929), in fase omogenea, altamente specifico. Il metodo si basa sul frazionamento dell'enzima batterico β -galattosidasi, in due frammenti inattivi chiamati Enzima Accettore (EA) ed Enzima Donatore (ED). I due frammenti (enzima accettore ed enzima donatore) si riassociano spontaneamente per formare un enzima attivo in grado di scindere un substrato, dando così luogo ad una reazione colorimetrica misurabile spettrofotometricamente¹⁵⁹. Pertanto, tale metodo opera attraverso il controllo dell'assemblaggio spontaneo degli ED con gli EA con una

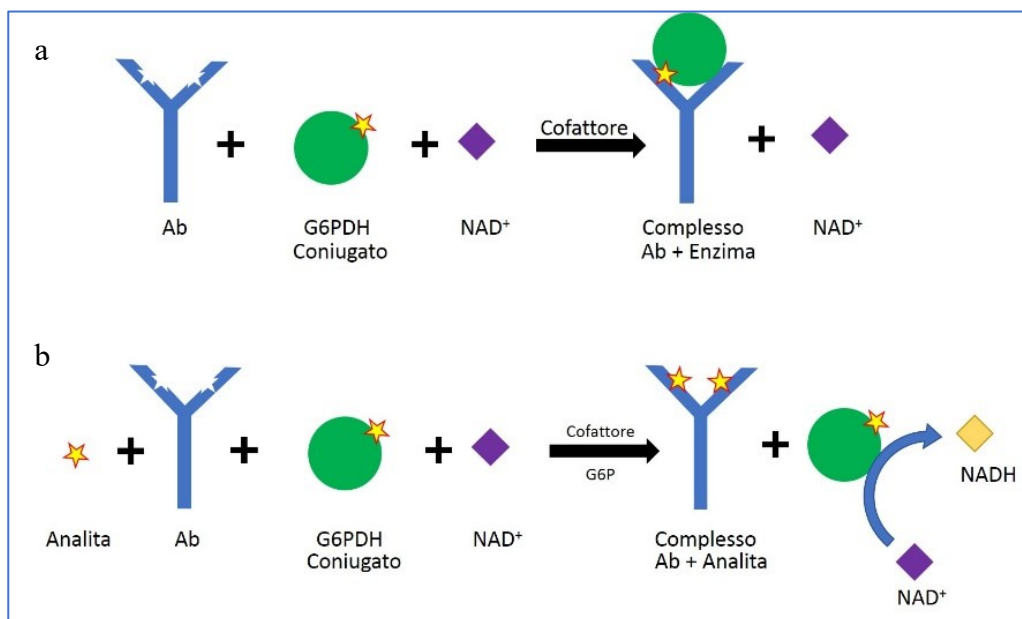
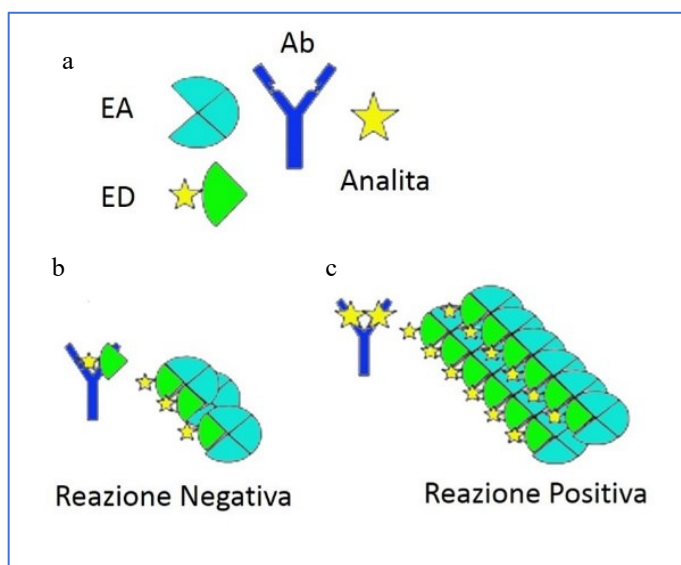


Figura 2-- Schema metodica DRI[®]: (a) assenza di sostanza; (b) presenza di sostanza.

reazione antigene-anticorpo. L'aptene (analita) è legato covalentemente all'ED in modo da non interferire nella formazione dell'enzima β -galattosidasi attivo, quando l'ED coniugato viene posto in soluzione con EA. La riassociazione spontanea dell'enzima sarà inibita aggiungendo al sistema un anticorpo specifico per l'aptene *Figura 3*. Ponendo tale sistema in competizione con l'analita da testare, si avrà che se l'analita è presente nel campione, questo si legherà all'anticorpo, facendo sì che i frammenti inattivi formino l'enzima attivo. La quantità di enzima attivo che si

Figura 3-- Schema metodologia CEDIA[®]: (a) schema di utilizzo, (b) assenza di sostanza e (c) presenza di sostanza.



formerà sarà direttamente proporzionale alla quota libera dell'analita. Se invece l'analita non è presente nel campione, l'anticorpo si legherà all'aptene coniugato sul frammento inattivo dell'enzima, inibendo la riassociazione dei frammenti inattivi di β -galattosidasi e quindi la formazione dell'enzima attivo *Figura 3*. La quantità di enzima formato è determinata attraverso l'idrolisi di un substrato specifico per la β -galattosidasi (o-nitrofenil- β -D-galactopiranoside) misurabile spettrofotometricamente a 570 nm, con conseguente riduzione delle possibili interferenze dovute a torbidità del campione urinario¹⁶⁰.

3.2.3 Analisi di conferma su matrice urinaria: strumentazione HPLC-HRMS

Le analisi di conferma sono state ottenute attraverso la strumentazione HPLC-HRMS composta da due diversi dispositivi: lo spettrometro di massa "LTQ-Orbitrap mass spectrometry system" accoppiato al cromatografo liquido "Finnigan Surveyor LC"¹⁶¹.

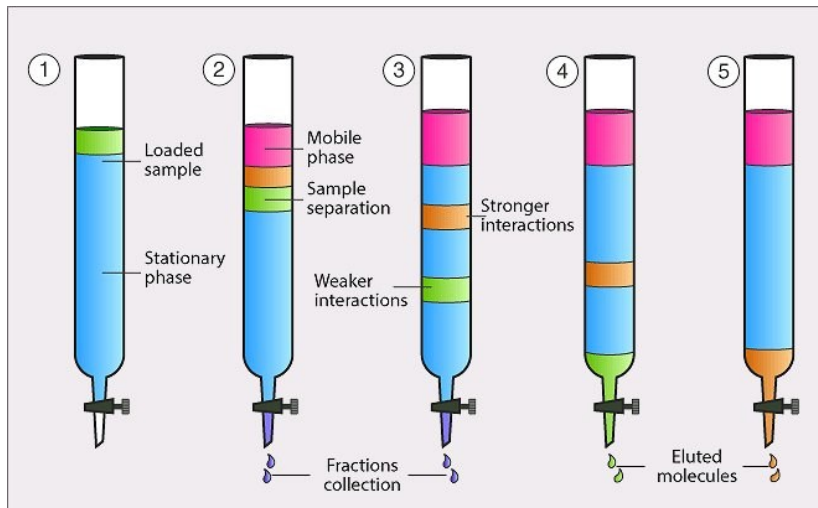


Figura 4—Schema del funzionamento di una colonna cromatografica.

La componente LC in questo caso è costituita da una pompa in grado di separare il campione raccolto, questo processo avviene sottoponendo il campione ad una spinta attraverso la fase stazionaria grazie ad una pressione applicata alla fase mobile di diverse atmosfere (può arrivare anche a 100 atm) *Figura 4*¹⁶¹.

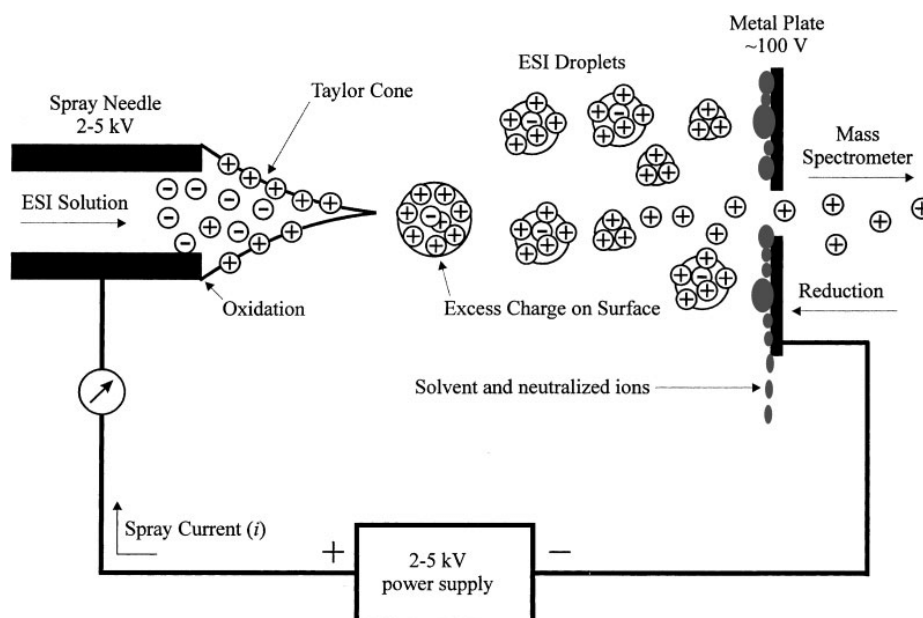


Figura 5-- Schema del funzionamento del sistema di ionizzazione Elettrospray.

Alla colonna cromatografica è accoppiato un sistema di rilevazione che in questo caso è costituito dal dispositivo “LTQ-Orbitrap mass spectrometry system”, uno spettrometro di massa che utilizza la tecnologia di ionizzazione elettrospray. Il campione viene quindi nebulizzato e ionizzato; questo porta alla formazione del cono di Taylor ed alla precipitazione di gocce contenenti molecole cariche che andranno a separarsi dalle gocce per effetto della forza coulombiana applicata e quindi entreranno nello spettrometro di massa *Figura 5*.

Lo spettrometro di massa di questo dispositivo utilizza la tecnologia a trappola ionica, a seconda del rapporto tra la massa e la carica di ogni ione questo percorrerà traiettorie diverse; ciascuna traiettoria viene captata dal ricevitore come un diverso segnale e questo consente quindi di individuare diverse tipologie di molecole contenute nel campione immesso nel sistema *Figura 6*¹⁶².

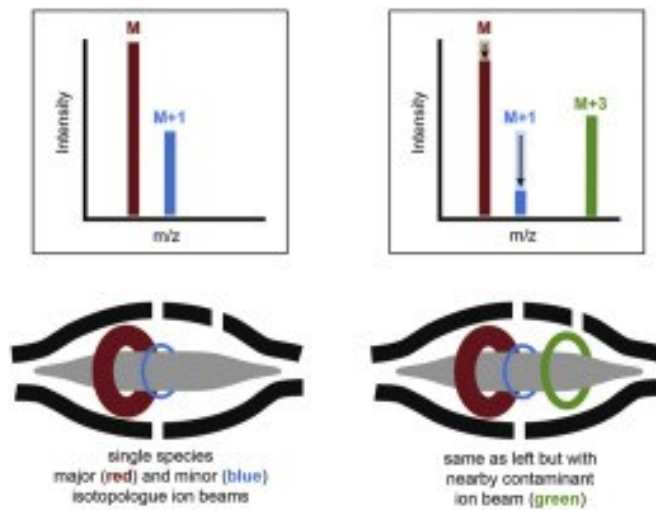


Figura 6—Schema del funzionamento di un sistema di spettrometria di massa a trappola ionica Orbitrapp.

3.3 Dati analizzati

Le informazioni clinico-anamnestiche riguardanti i soggetti di studio sono state ricavate dalle cartelle elettroniche di Pronto Soccorso attraverso il sistema informatico aziendale “eHealth-Galileo.

Tutti i dati ottenuti sono stati registrati in un database Microsoft Excel previo processo di anonimizzazione. In un file separato, protetto da una parola chiave custodito in un diverso supporto informatico, a ciascun nome è stato assegnato un codice numerico in modo che nel database definitivo non fosse più possibile ricollegare i risultati ai nomi dei soggetti esaminati.

Dalla consultazione dei verbali di Pronto Soccorso nelle cartelle DEA sono state ricavate:

- Informazioni anagrafiche: sesso, data di nascita, paese di provenienza (Italia, Est-Europa, Africa, Medioriente, Asia).
- Informazioni relative all’incidente: tipologia di incidente (tipologia di veicolo condotta dal paziente ed eventualmente gli altri tipi di veicoli coinvolti; es: auto-auto, bicicletta-moto, moto).
- Informazioni riguardanti l’accesso al Pronto soccorso – data ed ora di accesso al Pronto Soccorso, modalità di accesso (ambulanza, ambulanza con medico a bordo o autonoma) e codice triage all’ingresso (bianco, verde,

giallo, arancione, rosso). esito (dimissione, ricovero, allontanamento), prognosi (<20 giorni, 20 -40 giorni, >40 giorni, riservata), eventuale reparto di ricovero (Chirurgia, Unità di Terapia Intensiva, altro).

- Dati clinici del paziente: Glasgow Coma Scale (GCS), sede del trauma, cranico, del massiccio facciale, della colonna vertebrale, toracico, addominale, del bacino e degli arti, terapia in atto o somministrata in pronto soccorso (benzodiazepine, oppiacei, tramadolo), orario della raccolta del campione necessario per le analisi, risultati delle analisi condotte dalla Tossicologia Forense sul siero del paziente.
- Risultati delle analisi condotte con “QUIDEL Triage TOX Drug Screen 94600” – THC, anfetamine, metanfetamine, cocaina, oppiacei, EDDP (metabolita del metadone analizzabile), benzodiazepine, barbiturici.
- Risultato delle analisi condotte con tecnica HPLC-HRMS - THC, anfetamine, metanfetamine, cocaina, oppiacei, buprenorfina, EDDP (metabolita del metadone analizzabile), benzodiazepine, barbiturici ed etanolo.

Tramite contatto diretto con il personale della U.O.C. della Medicina di Laboratorio sono stati inoltre raccolti i risultati delle analisi condotte con strumentazione I Lab Taurus (Werfen) relativi a Buprenorfina, etanolo ed ETG.

3.4 Analisi statistica

Ai fini della valutazione del metodo “QUIDEL Triage TOX Drug Test”, l’analisi statistica è stata effettuata utilizzando gli strumenti “Chi-square”¹⁶³ e “Quantify agreement with Kappa”¹⁶⁴ del sito Graphpad.

L’elaborazione statistica dei dati ottenuti è stata effettuata con gli strumenti statistici del software Microsoft Office Excel.

RISULTATI

La popolazione studiata era composta di 100 pazienti. Prevalentemente di sesso maschile (84 %), di nazionalità italiana (80 %) ed età media di 42,05 anni ($\pm 18,84$).

	SESSO MASCHE	SESSO FEMMINILE	TOTALE
Numero Pz	84	16	100
Eta' media (\pm DS)	42,05 ($\pm 18,84$)	47,5 ($\pm 18,18$)	42,92 ($\pm 18,30$)
Pz dall'Italia	80,95%	75%	80%
Pz dall'Europa orientale	5,95%	18,75%	8%
Pz dall' Africa	9,53%	0%	8%
Altre nazionalità	3,57%	6,25%	4%

Tabella IV—Informazioni demografiche della popolazione arruolata: sesso, età media e provenienza dei pazienti.

La maggior parte dei pazienti è arrivata in Pronto Soccorso con ambulanza non medicalizzata (55 %) *Tabella V*. Frequentemente gli incidenti stradali hanno coinvolto automobili e motociclette, raramente furgoni e biciclette (19 %) *Tabella VII*. I codici di triage assegnati erano in prevalenza codici maggiori (rossi, arancioni e gialli) rispettivamente: 18 %, 16 %, 47 % e bianchi 19 % *Tabella V*. La quasi totalità dei pazienti (91, 91 %) presentava una Glasgow Coma Scale di 15. Per quanto riguarda la sede del trauma prevalevano i traumi degli arti (48 %) seguiti da trauma toracico (31 %), dal trauma cranico (21 %), dal trauma della colonna (17 %), meno frequenti il trauma addominale (7 %) di bacino (8 %) e del massiccio facciale (10 %) *Tabella VI*.

Rispetto agli esiti, i pazienti sono stati in gran parte dimessi dal Pronto Soccorso (77 %), il 23 % è stato ricoverato e di questi il 17,39 % in Chirurgia, il 26,08 % in Unità di Terapia Intensiva e il 56,52 % in altri reparti. Nella maggior parte dei casi (77 %) la prognosi è stata inferiore a 20 giorni *Tabella VIII*.

DATI DI ACCESSO IN PS	N°	%
Provenienza		
Italia	80	80
Europa orientale	8	8
Africa	8	8
Medio Oriente	2	2
Asia	1	1
Europa orientale	1	1
Codice triage		
Rosso	18	18
Arancione	16	16
Giallo	47	47
Verde	0	0
Bianco	19	19
Modalità di arrivo		
Ambulanza medicalizzata	35	35
Ambulanza NON medicalizzata	55	55
Autonoma	10	10

Tabella V—informazioni riguardanti l'accesso in Pronto Soccorso dei pazienti: provenienza, codice triage all'ingresso, modalità di arrivo. Abbreviazioni: PS, Pronto Soccorso.

Traumi	N°	%
Soggetti con trauma	78	78
Traumi multipli	41	41
Atraumatici	22	22
Tipologia di trauma		
T. cranico	21	26,92*
T. del massiccio facciale	10	12,82*
T. della colonna vertebrale	17	21,79*
T. toracico	31	39,74*
T. addominale	7	8,97*
T. del bacino	8	10,26*
T. degli arti	48	61,54*

*Tabella VI--Tipologia di traumi riscontrati nella popolazione arruolata. * percentuale calcolata sul totale dei soggetti traumatizzati.*

Tipologia di incidente	N°	%
AUTO-auto	22	22
AUTO-moto	1	1
AUTO-bicicletta	1	1
AUTO	18	18
MOTO-auto	16	16
MOTO-moto	1	1
MOTO-camion	1	1
MOTO	13	13
CAMIONE-auto	2	2
CAMION	3	3
BICICLETTA-auto	9	9
BICICLETTA-moto	2	2
BICICLETTA	2	2
FURGONE	4	4
FURGONE-moto	2	2
INCIDENTE AEREO	1	1
PEDONE	3	3

Tabella VII-- Tipologie di incidenti che hanno portato all'accesso in Pronto Soccorso. Il veicolo segnalato in maiuscolo indica il tipo di veicolo guidato dal paziente.

Esito dell'accesso in PS	N°	%
Dimesso	77	77
Ricoverato	23	23
Allontanato	0	0
Prognosi		
<20 gg	56	56
>20gg e <40gg	15	15
>40gg	8	8
Riservata	8	8
Non segnalata	13	13
Reparto di ricovero		
Chirurgia	4	4
Unità di terapia intensiva	6	6
Altro	13	13

Tabella VIII-- Esito dell'accesso in Pronto Soccorso: esito dell'accesso, prognosi, eventuale reparto di ricovero. Abbreviazioni: PS, Pronto Soccorso.

4.1 Analisi tossicologica su matrice urinaria

Dagli esami tossicologici effettuati con il test “QUIDEL Triage TOX Drug Screen 964000” sono state riscontrate 32 positività totali a sostanze stupefacenti, di queste 7 pazienti sono risultati positivi a multiple sostanze, in due casi in particolare erano presenti più di 3 sostanze; 12 positivi a cannabinoidi (THC 12 %), 12 alla cocaina (12 %), 3 a oppiacei (3 %) 1 al EDDP (1 %) e 13 a benzodiazepine (13 %).

Le positività riscontrate su “QUIDEL Triage TOX Drug Screen 96400” sono state altresì riscontrate su dispositivo “Ilab-Taurus”

Tutti i risultati ottenuti su matrice urinaria con il test Quidel sono stati confermati mediante HPLC/HRMS dalla U.O.C. di Medicina Legale e Tossicologia ed hanno evidenziato le seguenti positività: 9 (9 %) positività al THC, 9 (9 %) alla cocaina, 3 (3 %) agli oppiacei e 9 (9 %) alle benzodiazepine *Tabella IX*.

È da sottolineare che la discrepanza tra il numero dei positivi evidenziati tramite la

metodica POCT e spettrometria di massa sono da attribuire ai lunghi tempi di refertazione della U.O.C. Medicina Legale. Pertanto, le positività al POCT non confermate in spettrometria di massa non saranno incluse nell'analisi statistica.

POSITIVITA' TOTALI	N° pos. Quidel	% sul totale	N° pos. Taurus	% sul totale	N° pos. HPLC/HRMS	% sul totale
Totale	32	32	32	32	27*	27*
Pos. Multiple	7	7	7	7	3*	3*
THC	12	12	12	12	9*	9*
Anfetamine	0	0	0	0	0*	0*
Metanfetamine ed MDMA	0	0	0	0	0*	0*
Cocaina	12	12	12	12	9*	9*
Opiacei	3	3	3	3	3*	3*
EDDP	1	1	1	1	0*	0*
Benzodiazepine	13	13	13	13	9*	9*
Barbiturici	0	0	0	0	0*	0*

*Tabella IX-- Positività a diverse sostanze stupefacenti rilevate al POCT Quidel, con il dispositivo Ilab-Taurus e con LC/HRMS. Le sostanze indicate sono: THC, anfetamine, metanfetamine ed ecstasy, cocaina, oppiacei, EDDP (metabolita del metadone), benzodiazepine e barbiturici. * dati parziali.*

POSITIVITA' ETANOLO ED ETG	N° pos. Taurus	% sul totale	N° pos. HPLC/HRMS	% sul totale
Buprenorfina	0	0	0*	0*
Etanolo	15	15	13*	13*
ETG	25	25	-	-

*Tabella X—Positività per buprenorfina, etanolo ed ETG rilevate con la metodica HPLC/HRMS ed il dispositivo Ilab-Taurus. L'ETG non rientra nelle molecole analizzate dalla metodica HPLC/HRMS. *dati parziali.*

4.2 Analisi statistica

L'analisi è stata eseguita su 83 pazienti di cui si disponeva dei dati derivanti dalle strumentazioni QUIDEL Triage TOX Drug screen 96400, IlabTaurus e HPLC-HRMS.

Inizialmente è stato effettuato il Test chi quadro (χ^2) sui valori ottenuti da ogni sostanza risultata positiva al test Quidel o al test Taurus (il test non è stato eseguito per le sostanze risultate negative in quanto risulta impossibile l'applicazione dell'algoritmo).

THC		POCT			Cocaina		POCT	
		POS	NEG				POS	NEG
Taurus	POS	9	0		Taurus	POS	9	0
	NEG	0	74			NEG	0	74
Benzodiazepine		POCT			Oppiacei		POCT	
		POS	NEG				POS	NEG
Taurus	POS	9	0		Taurus	POS	3	0
	NEG	0	74			NEG	0	80

Tabella XI-- Tabella utilizzata per effettuare il Test chi quadro che indica le positività alle diverse sostanze stupefacenti.

Per ciascuna sostanza analizzata *Tabella XI*, l'esecuzione del test chi quadro ha fornito il seguente risultato: l'associazione tra i gruppi ed i risultati si può statisticamente considerare estremamente significativa (p-value <0,0001).

Successivamente, per le medesime positività alle singole sostanze riscontrate con la strumentazione "QUIDEL Triage TOX Drug Screen 96400" e HPLC/HRMS *Tabella XII*, è stato effettuato il Quantify Agreement with Kappa.

Questo test si utilizza per valutare la concordanza tra i dati osservati con due metodiche diverse attraverso il calcolo del coefficiente statistico Kappa di Cohen; questo coefficiente ha un valore compreso tra 0 ed 1; più il valore è prossimo ad 1 maggiore è il livello di concordanza tra i dati osservati. Se il valore risulta compreso tra 1 e 0,81 si può interpretare come una concordanza quasi perfetta, se è compreso tra 0,8 e 0,61 si interpreta come una sostanziale concordanza, se compreso tra 0,6 e 0,41 la concordanza è moderata, se <0,40 vi è una debole concordanza. Se il coefficiente assume valori negativi significa che non vi è concordanza tra i risultati.

THC		POCT		Cocaina		POCT	
		POS	NEG			POS	NEG
HPLC/HRMS	POS	9	0	HPLC/HRMS	POS	9	0
	NEG	0	74		NEG	0	74
Benzodiazepine		POCT		Oppiacei		POCT	
		POS	NEG			POS	NEG
HPLC/HRMS	POS	9	0	HPLC/HRMS	POS	3	0
	NEG	0	74		NEG	0	80

Tabella XII-- *Tabella utilizzata per il calcolo del coefficiente Kappa di Cohen.*

Per ciascuna delle categorie analizzate e risultate positive il coefficiente Kappa calcolato è uguale ad 1 (compreso quindi nell'intervallo tra 0,81 ed 1); questo significa che vi è una concordanza perfetta tra le categorie di dati osservati.

4.3 Descrizione di casi clinici discussi durante la raccolta dati

La raccolta dei dati ha evidenziato un totale di 3 casi che hanno richiesto una più approfondita valutazione ed interpretazione del dato analitico:

- Caso 1: un paziente arrivato in pronto soccorso con codice rosso a seguito di un incidente che ha coinvolto solamente la sua vettura. È stato ricoverato con prognosi Riservata nel reparto di Neurochirurgia T.I.P.O. In seguito alla richiesta pervenuta dalle Forze dell'Ordine sono stati prelevati i campioni per le analisi tossicologiche ai sensi degli ex. Artt. 186 e 187 del codice della strada. L'analisi point-of-care ha evidenziato la positività per benzodiazepine (somministrate durante la permanenza in pronto soccorso). Il risultato concordava con quello ottenuto mediante strumentazione "ILab Taurus". Le analisi eseguite presso la U.O.C. Medicina Legale hanno evidenziato, oltre alla positività per le benzodiazepine, anche la presenza in tracce di fentanile che è stata valutata come una negatività per gli oppiacei alla analisi HPLC/HRMS.

- Caso 2: paziente giunto in Pronto Soccorso accompagnato dalle Forze dell'Ordine per effettuare i prelievi per le analisi tossicologiche ai sensi degli ex. Artt. 186 e 187 del Codice della Strada in seguito ad un incidente stradale, poi dimesso. L'analisi point-of-care ha evidenziato la positività ai cannabinoidi. Il risultato concordava con quello ottenuto mediante strumentazione "ILab Taurus".

Le analisi su matrice urinari eseguite presso la U.O.C. Medicina Legale hanno evidenziato, oltre alla positività per THC, anche la presenza di cocaina con le seguenti concentrazioni:

- Cocaina – 1,9 ng/ml
- Benzoilecgonina – 59 ng/ml

In questo caso la concentrazione della sostanza e del suo metabolita su matrice urinaria sono significativamente inferiori rispetto al cut-off del point-of care (150 ng/ml). Pertanto, il risultato ottenuto è stato considerato un vero negativo. Inoltre, nel commento interpretativo del referto della U.O.C. di Medina Legale si descrive che il paziente al momento del prelievo si trovava solamente sotto l'influenza di THC e non veniva in alcun modo menzionata la presenza cocaina.

- Caso 3: paziente di 50 anni giunto in Pronto Soccorso a seguito di un incidente in moto. Dal confronto eseguito presso la U.O.C. di Medicina di Laboratorio è emersa una discrepanza tra il risultato del test point-of-care, negativo per la presenza di benzodiazepine, e del dispositivo "ILab Taurus-Werfen", positivo alle benzodiazepine. La conferma in spettrometria di massa ha evidenziato la presenza di Etizolam, una benzodiazepina non rilevabile dal point-of-care in quanto non dichiarata dal produttore tra le sostanze in grado di cross-reagire con la determinazione. Per questo motivo il risultato del point-of-care è stato considerato un vero negativo.

DISCUSSIONE

Già da una prima analisi dei dati emerge l'elevata prevalenza di positività alle sostanze psicotrope nei conducenti di veicoli sottoposti ad accertamenti tossicologici su richiesta della Polizia Giudiziaria. Se la polizia richiedesse gli accertamenti tossicologici nei soli conducenti con alterazioni del comportamento alla guida, vi sarebbe un bias di selezione a priori. Più spesso gli accertamenti tossicologici a scopo forense vengono richiesti in tutti i conducenti di veicoli coinvolti in incidenti stradali. In letteratura la sostanza più frequentemente rilevata, da sola o in associazione con altre, è l'alcool. I nostri dati sono coerenti con la letteratura: 15 campioni di urina su 83 testati con la metodica HPLC/HRMS sono risultati positivi all'etanolo urinario, mentre utilizzando il dispositivo ILab Taurus sulla matrice urine 15 campioni su 100 sono risultati positivi all'etanolo e 25 su 100 all'ETG *Tabella X*. Il test Quidel non prevede il dosaggio dell'alcool o dei suoi metaboliti; quindi, per non trascurare la rilevazione della più frequente sostanza d'abuso è stato utilizzato la strumentazione ILab Taurus, in uso presso la U.O.C. di Medicina di Laboratorio in regime di routine. Nella popolazione testata, in ben 7 casi su 100 i conducenti sono risultati positivi a più di una sostanza (5 positivi a due sostanze e 2 positivi a 3 o più sostanze). Dopo l'alcol, le sostanze d'abuso più frequentemente rilevate, sia con strumentazione Quidel che con HPLC/HRMS, sono risultate THC, cocaina, benzodiazepine ed EDDP *Tabella IX*.

Mentre la positività ad alcool e THC riflettono il largo uso di queste sostanze a scopo voluttuario, la diffusa positività alle benzodiazepine potrebbe dipendere dal loro sempre maggiore utilizzo a scopo terapeutico.

Per ciò che pertiene il confronto fra le due metodiche, i nostri risultati dimostrano l'affidabilità del test Quidel i cui esiti concordano al 100% con quelli dei test HPLC/HRMS; i tempi di esecuzione sono molto più rapidi dei test di riferimento (ore vs giorni) e compatibili con i tempi dell'emergenza.

Un test di screening viene eseguito su una popolazione per identificare malattie a livello subclinico e deve pertanto possedere elevata sensibilità, mentre può essere scarsamente specifico ed avere valore predittivo nullo. I test di screening sono in genere qualitativi, in grado cioè di determinare solo la presenza o l'assenza di una sostanza. Un test diagnostico invece viene effettuato sul singolo individuo ed è

dotato di elevata specificità, sufficiente sensibilità ed alto valore predittivo. Il test POCT Quidel nasce come test di screening per le più comuni droghe d'abuso ma viene correntemente usato come test diagnostico nei Dipartimenti di Emergenza poiché in grado di fornire risultati in tempi più rapidi in confronto ad altre metodiche.

Nella pratica clinica il test Quidel sulla matrice urinaria viene usato per uno scopo a cui non era destinato; pertanto, non ha né valore diagnostico e né medico legale del test HPLC/HRMS di riferimento, ma potrebbe orientare la diagnosi differenziale nelle sospette intossicazioni.

Tuttavia, in letteratura è dibattuta l'effettiva utilità clinica di un test che consenta di individuare la specifica sostanza da cui un paziente è intossicato. Infatti, i test di screening ci dicono se un paziente che presenta certi sintomi quali coma, convulsione, agitazione psicomotoria, delirio e sintomi psicotici abbia o meno assunto una o più sostanze psicotrope ma non se i sintomi siano dovuti alla presenza di quelle sostanze.

Inoltre, la conoscenza della specifica sostanza psicotropa da cui è intossicato un paziente critico raramente ne modifica la gestione in emergenza, che si basa sul sostegno delle funzioni vitali secondo il metodo riassunto dall'acronimo ABCD (Airway, Breathing, Circulation, Disability) applicabile ad ogni paziente critico, indipendentemente dalla causa che ha portato all'alterazione delle funzioni vitali stesse. Lo screening tossicologico urinario può comunque rivelarsi utile nella gestione clinica del paziente dopo la sua stabilizzazione, quando la fase critica sia risolta oppure in casi specifici come nelle sospette intossicazioni da metadone in cui il paziente anche se in buono stato di salute può essere messo in osservazione e monitorato per il possibile rischio di sviluppo di aritmie maggiori, che persiste per diverse ore in seguito alla assunzione della sostanza.

Nel caso delle intossicazioni acute può essere utilizzato l'approccio DEAD (Decontamination, Enhanced elimination, Antidotes, Disposition), solo se è disponibile un antidoto specifico. Pertanto, in questo è utile identificare la sostanza responsabile del quadro. Anche se può essere sospettata sulla base dei sintomi presentati dal paziente. Infatti, le 5 grandi sindromi della tossicologia

(simpaticomimetica, colinergica, anticolinergica, oppiacea, da sedativi ipnotici) rendono conto della maggior parte dei quadri clinici presentati dai pazienti intossicati. I principali antidoti disponibili (naloxone e flumazenil) vanno somministrati immediatamente, sulla base del sospetto clinico anche ex adiuvantibus. A ciò si aggiunga che gli antidoti specifici sono disponibili solo per alcune sostanze e che vengono continuamente immesse nel mercato degli stupefacenti nuove sostanze, per cui le capacità di rilevare le nuove sostanze d'abuso viene superata.

CONCLUSIONI

Dallo studio effettuato emerge una piena concordanza tra i risultati del “POCT QUIDEL Triage TOX Drug Test 96400” con metodo di riferimento HPLC/HRMS, quindi sicuramente affidabile come test, più rapido e con facilità d’uso.

Per quanto emerge dalla letteratura, nella maggior parte dei casi la conoscenza della specifica sostanza psicotropa da cui è intossicato un paziente critico non ne modifica la gestione in emergenza, infatti, se disponibile un antidoto specifico alla sostanza riscontrata il risultato del POCT potrebbe influire sulla decisione clinica¹⁶⁵. Un limite evidente dello studio risulta l’impossibilità di verificare l’effettivo vantaggio/svantaggio di avere dei risultati in tempo reale da parte del clinico, modificando ipoteticamente il percorso diagnostico-terapeutico.

Altro limite è la selezione dei pazienti, che non rispecchia il reale target (gli ex artt.186-187 che richiedono la verifica di attualità d’uso e quindi dell’utilizzo di sangue come matrice d’elezione rispetto all’urina).

Il POCT sicuramente può rivelarsi utile nella diagnosi differenziale, un esempio può essere l’impiego nella diagnosi differenziale tra uno scompenso psicotico acuto ed una agitazione psicomotoria provocata dalla assunzione di una sostanza stupefacente, e nella gestione successiva alla permanenza in Pronto Soccorso nella fase precedente al ricovero dove può fornire informazioni utili per la gestione del paziente.

Concludendo, si ritiene necessaria l’esecuzione di ulteriori studi che approfondiscano e forniscano dati maggiormente inerenti al possibile impiego nell’ambito della emergenza di questo dispositivo di analisi.

BIBLIOGRAFIA

1. Levinthal, C. F. Milk of paradise/milk of hell--the history of ideas about opium. *Perspect Biol Med* **28**, 561–577 (1985).
2. Goldstein, R. A., DesLauriers, C. & Burda, A. M. Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity-A Review. *Disease-a-Month* vol. 55 6–38 (2009).
3. Cameron, L. P. & Olson, D. E. Dark Classics in Chemical Neuroscience: N, N-Dimethyltryptamine (DMT). *ACS Chemical Neuroscience* vol. 9 2344–2357 (2018).
4. Cassels, B. K. & Sáez-Briones, P. Dark Classics in Chemical Neuroscience: Mescaline. *ACS Chemical Neuroscience* **9**, 2448–2458 (2018).
5. Relazione europea sulla droga Tendenze e sviluppi. doi:10.2810/119866.
6. Grabski, M. *et al.* Drug Use Changes at the Individual Level: Results from a Longitudinal, Multisite Survey in Young Europeans Frequenting the Nightlife Scene. *European Addiction Research* (2021) doi:10.1159/000520118.
7. Dayer, L. E. *et al.* A recent history of opioid use in the US: Three decades of change. *Substance Use and Misuse* vol. 54 331–339 (2019).
8. Mellos, E. & Paparrigopoulos, T. Substance use during the COVID-19 pandemic: What is really happening? *Psychiatriki* (2022) doi:10.22365/jpsych.2022.072.
9. Ministero degli Interni, M. della S. Tabella ministeriale anfetamine e composti anfetamino-simili.
10. Liechti, M. E. Novel psychoactive substances (designer drugs): Overview and pharmacology of modulators of monoamine signalling. *Swiss Medical Weekly* vol. 145 (2015).
11. Belujon, P. & Grace, A. A. Dopamine system dysregulation in major depressive disorders. *International Journal of Neuropsychopharmacology* vol. 20 1036–1046 (2017).
12. Kanny D, Brewer RD, Mesnick JB, Paulozzi LJ, Naimi TS, Lu H. Vital signs: alcohol poisoning deaths - United States, 2010-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015 Jan 9;63(53):1238-42. PMID: 25577989; PMCID: PMC4646044.
13. Frezza M, di Padova C, Pozzato G, Terpin M, Baraona E, Lieber CS. High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. *N Engl J Med.* 1990 Jan 11;322(2):95-9. doi: 10.1056/NEJM199001113220205. Erratum in: *N Engl J Med* 1990 Aug 23;323(8):553. Erratum in: *N Engl J Med* 1990 May 24;322(21):1540. PMID: 2248624.

14. Vonghia, L. *et al.* Acute alcohol intoxication. *European Journal of Internal Medicine* vol. 19 561–567 (2008).
15. Nobay, F., Simon, B. C., Levitt, M. A. & Dresden, G. M. A prospective, double-blind, randomized trial of midazolam versus haloperidol versus lorazepam in the chemical restraint of violent and severely agitated patients. *Academic Emergency Medicine* **11**, 744–749 (2004).
16. Hopper, A. B. *et al.* Ketamine use for acute agitation in the emergency department. *Journal of Emergency Medicine* **48**, 712–719 (2015).
17. Steinkellner, T., Freissmuth, M., Sitte, H. H. & Montgomery, T. The ugly side of amphetamines: Short-and long-term toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'), methamphetamine and d-amphetamine. *Biological Chemistry* vol. 392 103–115 (2011).
18. Spiller, H. A., Ryan, M. L., Weston, R. G. & Jansen, J. Clinical experience with and analytical confirmation of “bath salts” and “legal highs” (synthetic cathinones) in the United States. *Clinical Toxicology* **49**, 499–505 (2011).
19. Nicholson, P. J., Quinn, M. J. & Dodd, J. D. Headshop heartache: Acute mephedrone “meow” myocarditis. *Heart* **96**, 2051–2052 (2010).
20. Wood, D. M. *et al.* Case series of individuals with analytically confirmed acute mephedrone toxicity. *Clinical Toxicology* **48**, 924–927 (2010).
21. Wood, D. M. *et al.* Recreational Use of Mephedrone (4-Methylmethcathinone, 4-MMC) with Associated Sympathomimetic Toxicity. *Journal of Medical Toxicology* **6**, 327–330 (2010).
22. Dorairaj, J. J., Healy, C., McMenamin, M. & Eadie, P. A. The untold truth about “bath salt” highs: A case series demonstrating local tissue injury. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* **65**, (2012).
23. Chiang WK. Amphetamines. In: Goldfrank’s Toxicologic Emergencies, 9th, Goldfrank LR (Ed), McGraw-Hill, New York 2011. p.1078. in.
24. Westover, A. N. & Nakonezny, P. A. Aortic dissection in young adults who abuse amphetamines. *American Heart Journal* **160**, 315–321 (2010).
25. Schaiberger PH, Kennedy TC, Miller FC, Gal J, Petty TL. Pulmonary hypertension associated with long-term inhalation of “crank” methamphetamine. *Chest*. 1993 Aug;104(2):614-6. doi: 10.1378/chest.104.2.614. PMID: 8101799.
26. United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report 2015 https://www.unodc.org/documents/wdr2015/World_Drug_Report_2015.pdf (Accessed on November 14, 2016).
27. Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Results from the 2013 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings, NSDUH Series H-48, HHS Publication No. (SMA) 14-4863. Rockville, MD: Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2014.

28. Drug Fact Sheet: Methamphetamine.
https://www.dea.gov/druginfo/drug_data_sheets/Methamphetamine.pdf
(Accessed on November 14, 2016).
29. Hendrickson, R., Zane Horowitz, B., Norton, R. & Notenboom, H. “Parachuting” meth: A novel delivery method for methamphetamine and delayed-onset toxicity from “body stuffing.” *Clinical Toxicology* **44**, 379–382 (2006).
30. Kashani, J. & Ruha, A. M. Methamphetamine toxicity secondary to intravaginal body stuffing. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology* **42**, 987–989 (2004).
31. Meredith, C. W., Jaffe, C., Ang-Lee, K. & Saxon, A. J. Implications of chronic methamphetamine use: A literature review. *Harvard Review of Psychiatry* vol. 13 141–154 (2005).
32. Hawley, L. A. *et al.* Cardiac complications of adult methamphetamine exposures. *Journal of Emergency Medicine* **45**, 821–827 (2013).
33. Turnipseed, S. D., Richards, J. R., Kirk, J. D., Diercks, D. B. & Amsterdam, E. A. Frequency of acute coronary syndrome in patients presenting to the Emergency Department with chest pain after methamphetamine use. *Journal of Emergency Medicine* **24**, 369–373 (2003).
34. Mowry, J. B., Spyker, D. A., Brooks, D. E., Mcmillan, N. & Schauben, J. L. 2014 annual report of the American association of poison control centers National Poison Data System (NPDS): 32nd Annual Report. in *Clinical Toxicology* vol. 53 962–1147 (Taylor and Francis Ltd, 2015).
35. Chin, K. M., Channick, R. N. & Rubin, L. J. Is methamphetamine use associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension? *Chest* **130**, 1657–1663 (2006).
36. Schwiberger, P. H. *Pulmonary Hypertension Associated With Long-term Inhalation of “Crank” Methamphetamine**. *Chest* vol. 104 (1993).
37. Timothy D Johnson, M. M. B. Methamphetamine-Induced Ischemic Colitis. *J Clin Gastroenterology*.
38. Sperling LS, Horowitz JL. Methamphetamine-induced choreoathetosis and rhabdomyolysis. *Ann Intern Med* 1994; 121:986.
39. Zweben, J. E. *et al.* Psychiatric Symptoms in Methamphetamine Users. *American Journal on Addictions* **13**, 181–190 (2004).
40. Blostein, P. A. *et al.* Methamphetamine production is hazardous to your health. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care* **66**, 1712–1717 (2009).
41. Valentine, J. L. *et al.* GC-MS Determination of Amphetamine and Methamphetamine in Human Urine for 12 Hours Following Oral Administration of Dextro-Methamphetamine: Lack of Evidence Supporting the Established Forensic Guidelines for Methamphetamine Confirmation. *Journal of Analytical Toxicology* vol. 19.

42. Derlet, R. W., Rice, P., Horowitz, B. Z. & Lord, R. v. *Toxicology AMPHETAMINE TOXICITY: EXPERIENCE WITH 127 CASES. The Journal of Emergency Medicine* vol. 7 (1969).
43. Connors, N. J. *et al.* Antipsychotics for the treatment of sympathomimetic toxicity: A systematic review. *American Journal of Emergency Medicine* **37**, 1880–1890 (2019).
44. Tse, J., Ferguson, K., Whitlow, K. S. & Erickson, K. The use of intravenous lipid emulsion therapy in acute methamphetamine toxicity. *American Journal of Emergency Medicine* **34**, 1732.e3-1732.e4 (2016).
45. Hick, J. L., Smith, S. W. & Lynch, M. T. *Metabolic Acidosis in Restraint-associated Cardiac Arrest: A Case Series. ACADEMIC EMERGENCY MEDICINE* vol. 6 (1999).
46. Shulgin, A. T. The background and chemistry of MDMA. *Journal of Psychoactive Drugs* **18**, 291–304 (1986).
47. Christophersen, A. S. *Amphetamine designer drugs-an overview and epidemiology. Toxicology Letters* www.elsevier.com/locate/toxlet (2000).
48. Mithoefer, M. C. *et al.* MDMA-assisted psychotherapy for treatment of PTSD: study design and rationale for phase 3 trials based on pooled analysis of six phase 2 randomized controlled trials. *Psychopharmacology (Berl)* **236**, 2735–2745 (2019).
49. Wu, L. T., Parrott, A. C., Ringwalt, C. L., Yang, C. & Blazer, D. G. The variety of ecstasy/mdma users: Results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *American Journal on Addictions* **18**, 452–461 (2009).
50. Armenian, P. *et al.* Multiple MDMA (ecstasy) overdoses at a rave event: A case series. *Journal of Intensive Care Medicine* **28**, 252–258 (2013).
51. Harold Kalant. The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs.
52. Colado, M. I., Williams, J. L. & Green, A. R. The hyperthermic and neurotoxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) in the Dark Agouti (DA) rat, a model of the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *British Journal of Pharmacology* **115**, 1281–1289 (1995).
53. Hwang, J.-J., Fang, C.-C. & Chen, W.-J. Ting-I Methylene 3, 4 Dioxymethamphetamine-Induced Acute Myocardial Infarction D E C E M B E R 2 0 0 3 4 2 : 6 A N N A. (2003) doi:10.1016/mem.2003.326.
54. Kahn, D. E., Ferraro, N. & Benveniste, R. J. 3 cases of primary intracranial hemorrhage associated with Molly, a purified form of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Journal of the Neurological Sciences* **323**, 257–260 (2012).
55. Johnson, J. *et al.* Posterior spinal artery aneurysm rupture after "Ecstasy" abuse. doi:10.1136/bcr-2014.

56. Williams, H., Dratcu, L., Taylor, R., Roberts, M. & Oyefeso, A. “Saturday night fever”: Ecstasy related problems in a London accident and emergency department. *Emergency Medicine Journal* **15**, 322–326 (1998).
57. Andreu, V. *et al.* Ecstasy: a common cause of severe acute hepatotoxicity. *Journal of Hepatology* **29**, 394–397 (1998).
58. Bodner, R. A., Lynch, T., Lewis, L. & Kahn, D. *Serotonin syndrome*. *NEUROLOGY* vol. 45 (1995).
59. Mueller, P. D. & Korey, W. S. *Death by “Ecstasy”: The Serotonin Syndrome?* (1995).
60. In, H., Overdose, P., Callaway, C. W. & Clark, R. F. *Hyperthermia in Psychostimulant Overdose*.
61. Freeman, T. P. *et al.* Changes in delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) concentrations in cannabis over time: systematic review and meta-analysis. *Addiction* vol. 116 1000–1010 (2021).
62. United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report 2021 (United Nations publication, Sales No. E.21.XI.8).
63. Adams, A. J. *et al.* “Zombie” Outbreak Caused by the Synthetic Cannabinoid AMB-FUBINACA in New York. *New England Journal of Medicine* **376**, 235–242 (2017).
64. Reynolds, A. J., Eales, L., Ou, S. R., Mondì, C. F. & Giovanelli, A. A Comprehensive, Multisystemic Early Childhood Program and Obesity at Age 37 Years. *JAMA Pediatrics* vol. 175 637–640 (2021).
65. Adams IB, Martin BR. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*. 1996 Nov;91(11):1585-614. PMID: 8972919.
66. Degenhardt, L. *et al.* The global burden of disease attributable to alcohol and drug use in 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Psychiatry* **5**, 987–1012 (2018).
67. Mcgilveray, I. J. *Pharmacokinetics of cannabinoids*. *Pain Res Manage* vol. 10 (2005).
68. Grotenhermen, F. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids*.
69. Fantegrossi, W. E., Moran, J. H., Radominska-Pandya, A. & Prather, P. L. Distinct pharmacology and metabolism of K2 synthetic cannabinoids compared to Δ9-THC: Mechanism underlying greater toxicity? *Life Sciences* vol. 97 45–54 (2014).
70. Jampel, H. American glaucoma society position statement: Marijuana and the treatment of glaucoma. *Journal of Glaucoma* vol. 19 75–76 (2010).
71. di Forti, M. *et al.* High-potency cannabis and the risk of psychosis. *British Journal of Psychiatry* **195**, 488–491 (2009).

72. Boggs, D. L. *et al.* The dose-dependent psychomotor effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) in humans. *Journal of Psychopharmacology* **32**, 1308–1318 (2018).
73. Leirer VO, Yesavage JA, Morrow DG. Marijuana carry-over effects on aircraft pilot performance. *Aviat Space Environ Med.* 1991 Mar;62(3):221-7. PMID: 1849400.
74. Carstairs, S. D., Fujinaka, M. K., Keeney, G. E. & Ly, B. T. Prolonged coma in a child due to hashish ingestion with quantitation of THC metabolites in urine. *Journal of Emergency Medicine* **41**, (2011).
75. Perisetti, A. *et al.* Cannabis hyperemesis syndrome: An update on the pathophysiology and management. *Annals of Gastroenterology* vol. 33 571–578 (2020).
76. Sorensen, C. J., DeSanto, K., Borgelt, L., Phillips, K. T. & Monte, A. A. Cannabinoid Hyperemesis Syndrome: Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment—a Systematic Review. *Journal of Medical Toxicology* vol. 13 71–87 (2017).
77. Richards, J. R. Cannabinoid Hyperemesis Syndrome: Pathophysiology and Treatment in the Emergency Department. *Journal of Emergency Medicine* **54**, 354–363 (2018).
78. Wagner, S., Hoppe, J., Zuckerman, M., Schwarz, K. & McLaughlin, J. Efficacy and safety of topical capsaicin for cannabinoid hyperemesis syndrome in the emergency department. *Clinical Toxicology* **58**, 471–475 (2020).
79. National Heroin Threat Assessment Summary April 2015
https://www.dea.gov/divisions/hq/2015/hq052215_National_Heroin_Threat_Assessment_Summary.pdf.
80. Degenhardt, L., Roxburgh, A. & Barker, B. Underlying causes of cocaine, amphetamine and opioid related deaths in Australia. *Journal of Clinical Forensic Medicine* **12**, 187–195 (2005).
81. Javitt, D. C. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry* vol. 9 984–997 (2004).
82. Inaba, T., Stewart, D. J., Kalow Toronto, W. & Ontario, C. *Metabolism of cocaine in man.* (1978).
83. Bourland JA, Martin DK, Mayersohn M. In vitro transesterification of cocaethylene (ethylcocaine) in the presence of ethanol. esterase-mediated ethyl ester exchange esterase-mediated ethyl ester exchange. *Drug Metab Dispos.* 1998 Mar;26(3):203-6. PMID: 9492381.
84. Wilson, L. D. & French, S. Cocaethylene's effects on coronary artery blood flow and cardiac function in a canine model. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology* **40**, 535–546 (2002).
85. Lange RA, Cigarroa RG, Yancy CW Jr, Willard JE, Popma JJ, Sills MN, McBride W, Kim AS, Hillis LD. Cocaine-induced coronary-artery

- vasoconstriction. *N Engl J Med.* 1989 Dec 7;321(23):1557-62. doi: 10.1056/NEJM198912073212301. PMID: 2573838.
86. Edward Weber, J. *et al.* *Cocaine-associated Chest Pain: How Common Is Myocardial Infarction? ACADEMIC EMERGENCY MEDICINE* vol. 7 (2000).
 87. Kolodgie, F. D. *et al.* *Increased Prevalence of Aortic Fatty Streaks inCholesterol-Fed Rabbits AdministeredIntravenous Cocaine:The Role of Vascular Endothelium. Cardiology Sci-entific Sessions.*
 88. Dressler, F. A., Malekzadeh, S. & Roberts, W. C. *Quantitative Analysis of Amounts of Coronary Arterial Narrowing in Cocaine Addicts. THE AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY FEBRUARY* vol. 1 (1990).
 89. Brody, S. L. & Wrenn, K. D. *Cocaine-Related Medical Problems: Consecutive Series of 233 Patients.*
 90. Koppel, B. S., Samkoff, L. & Daras, M. *Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 0 International League Against Epilepsy.* vol. 37 (1996).
 91. Ramadan NM, Levine SR, Welch KM. Pontine hemorrhage following “crack” cocaine use. *Neurology.* 1991 Jun;41(6):946-7. doi: 10.1212/wnl.41.6.946. PMID: 2046953.
 92. Schwartz KA, Cohen JA. Subarachnoid hemorrhage precipitated by cocaine snorting. *Arch Neurol.* 1984 Jul;41(7):705. doi: 10.1001/archneur.1984.04050180027008. PMID: 6743055.
 93. Levine SR, Brust JC, Futrell N, Ho KL, Blake D, Millikan CH, Brass LM, Fayad P, Schultz LR, Selwa JF, et al. Cerebrovascular complications of the use of the “crack” form of alkaloidal cocaine. *N Engl J Med.* 1990 Sep 13;323(11):699-704. doi: 10.1056/NEJM199009133231102. PMID: 2388668.
 94. Marzuk, P. M. *et al.* *Ambient Temperature and Mortality From Unintentional Cocaine Overdose.* <https://jamanetwork.com/>.
 95. Fisher, A. & Holroyd, B. R. *Toxicology COCAINE-ASSOCIATED DISSECTION OF THE THORACIC AORTA. The Journal of Emergency Me&me* vol. 10 (1992).
 96. Fernandez-nebro, A., Valdivielso, P., Sanchez-carrillo, J., Ramon, E. de & Hospital of SAS PEDRO GONZALEZ-SANTOS, R. *BRIEF CLINICAL OBSERVATIONS tions resulting from shock secon-dary to upper digestive tract hemorrhage.*
 97. Smith GT, McClaughry PL, Purkey J, Thompson W. Crack cocaine mimicking pulmonary embolism on pulmonary ventilation/perfusion lung scan. A case report. *Clin Nucl Med.* 1995 Jan;20(1):65-8. doi: 10.1097/00003072-199501000-00016. PMID: 7895442.
 98. Osborn, H. H., Tang, M., Bradley, K. & Duncan, B. R. *Asthma and Cocaine, Osborn et al. New-onset Bronchospasm or Recrudescence of Asthma Associated with Cocaine Abuse.*

99. Etwger, N., Lou, sf & Albin, R. *A Review of the Respiratory Effects of Smoking Cocaine*.
100. Maeder, M. & Ullmer, E. Pneumomediastinum and bilateral pneumothorax as a complication of cocaine smoking. *Respiration* **70**, 407 (2003).
101. Libman RB, Masters SR, de Paola A, Mohr JP. Transient monocular blindness associated with cocaine abuse. *Neurology*. 1993 Jan;43(1):228-9. doi: 10.1212/wnl.43.1_part_1.228-a. PMID: 8423897.
102. Hoffman, R. & Reimer, B. I. “Crack” Cocaine-Induced Bilateral Amblyopia. (1993).
103. Ravin JG, Ravin LC. Blindness due to illicit use of topical cocaine. *Ann Ophthalmol*. 1979 Jun;11(6):863-4. PMID: 496179.
104. Muirhead, T. T., Eide, M. J. & Henry, M. *images in clinical medicine Toxic Effects of Levamisole in a Cocaine User A B The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at NYU WASHINGTON SQUARE CAMPUS on.*
105. Chai, P. R., Bastan, W., MacHan, J., Hack, J. B. & Babu, K. M. Levamisole exposure and hematologic indices in cocaine users. *Academic Emergency Medicine* vol. 18 1141–1147 (2011).
106. Vagi, S. J. *et al.* Passive multistate surveillance for neutropenia after use of cocaine or heroin possibly contaminated with levamisole. *Annals of Emergency Medicine* **61**, 468–474 (2013).
107. Klar SA, Brodtkin E, Gibson E, Padhi S, Predy C, Green C, Lee V. Notes from the Field: Furanyl-Fentanyl Overdose Events Caused by Smoking Contaminated Crack Cocaine - British Columbia, Canada, July 15-18, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Sep 23;65(37):1015-1016. doi: 10.15585/mmwr.mm6537a6. PMID: 27657853.
108. Khatri, U. G., Viner, K. & Perrone, J. Lethal Fentanyl and Cocaine Intoxication. *New England Journal of Medicine* **379**, 1782–1782 (2018).
109. Richards, J. R. *et al.* Treatment of cocaine cardiovascular toxicity: A systematic review. *Clinical Toxicology* vol. 54 345–364 (2016).
110. Lo, K. B. *et al.* Clinical Outcomes After Treatment of Cocaine-Induced Chest Pain with Beta-Blockers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Medicine* **132**, 505–509 (2019).
111. Albertson, T. E. *et al.* Tox-ACLS: Toxicologic-oriented advanced cardiac life support. *Annals of Emergency Medicine* **37**, (2001).
112. Kaufmann, C. N., Spira, A. P., Alexander, G. C., Rutkow, L. & Mojtabai, R. Emergency department visits involving benzodiazepines and non-benzodiazepine receptor agonists. *American Journal of Emergency Medicine* **35**, 1414–1419 (2017).
113. Bauer, M. *et al.* *Prolonged sedation due to accumulation of conjugated metabolites of midazolam Divisions of Intensive Care (T.*

114. Dresser, G. K., Spence, J. D. & Bailey, D. G. *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Consequences and Clinical Relevance of Cytochrome P450 3A4 Inhibition*.
115. Greenblatt, D., Shader, R., Divoll, M. & Harmatz, J. Benzodiazepines: a summary of pharmacokinetic properties. *British Journal of Clinical Pharmacology* **11**, 11S-16S (1981).
116. Potokar J, Coupland N, Wilson S, Rich A, Nutt D. Assessment of GABA(A)benzodiazepine receptor (GBzR) sensitivity in patients on benzodiazepines. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999 Sep;146(2):180-4. doi: 10.1007/s002130051104. PMID: 10525753.
117. HÖJER, J., BAEHRENDTZ, S. & GUSTAFSSON, L. Benzodiazepine poisoning: experience of 702 admissions to an intensive care unit during a 14-year period. *Journal of Internal Medicine* **226**, 117–122 (1989).
118. Riker, R. R. & Fraser, G. L. Adverse events associated with sedatives, analgesics, and other drugs that provide patient comfort in the intensive care unit. *Pharmacotherapy* vol. 25 (2005).
119. Seger, D. L. Flumazenil - Treatment or toxin. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology* vol. 42 209–216 (2004).
120. Weinbroum, A. A., Flaishon, R., Sorkine, P., Szold, O. & Rudick, V. *RISK-BENEFIT ASSESSMENT A Risk-Benefit Assessment of Flumazenil in the Management of Benzodiazepine Overdose*. *Drug Safety* vol. 17 (1997).
121. Shalansky SJ, Naumann TL, Englander FA. Effect of flumazenil on benzodiazepine-induced respiratory depression. *Clin Pharm*. 1993 Jul;12(7):483-7. PMID: 8354035.
122. Park, T. W., Saitz, R., Ganoczy, D., Ilgen, M. A. & Bohnert, A. S. B. Benzodiazepine prescribing patterns and deaths from drug overdose among US veterans receiving opioid analgesics: Case-cohort study. *BMJ (Online)* **350**, (2015).
123. Dumps, C., Halbeck, E. & Bolkenius, D. Drugs for intravenous induction of anesthesia: barbiturates. *Anaesthetist* **67**, 535–552 (2018).
124. Roberts, D. M. & Buckley, N. A. Enhanced elimination in acute barbiturate poisoning - A systematic review. *Clinical Toxicology* vol. 49 2–12 (2011).
125. Watson, W. A. *et al*. 2004 Annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *American Journal of Emergency Medicine* **23**, 589–666 (2005).
126. Smith, H. S. Opioid metabolism. *Mayo Clinic Proceedings* vol. 84 613–624 (2009).
127. Tori, M. E., Larochele, M. R. & Naimi, T. S. Alcohol or Benzodiazepine Co-involvement with Opioid Overdose Deaths in the United States, 1999-2017. *JAMA Network Open* **3**, (2020).

128. Ghoneim MM, Dhanaraj J, Choi WW. Comparison of four opioid analgesics as supplements to nitrous oxide anesthesia. *Anesth Analg*. 1984 Apr;63(4):405-12. PMID: 6230953.
129. Duberstein, J. L. & MYIAND KAUFMAN, D. *A Clinical Study of an Epidemic of Heroin Intoxication and Heroin-Induced Pulmonary Edema*.
130. Barash, J. A. *et al*. Acute Amnestic Syndrome Associated with Fentanyl Overdose. *New England Journal of Medicine* **378**, 1157–1158 (2018).
131. Vakkalanka, J. P., Charlton, N. P. & Holstege, C. P. Epidemiologic Trends in Loperamide Abuse and Misuse. *Annals of Emergency Medicine* **69**, 73–78 (2017).
132. Borron, S. W. *et al*. Intentional Misuse and Abuse of Loperamide: A New Look at a Drug with “Low Abuse Potential.” *Journal of Emergency Medicine* **53**, 73–84 (2017).
133. Manini, A. F., Stimmel, B. & Vlahov, D. Racial susceptibility for QT prolongation in acute drug overdoses. *Journal of Electrocardiology* **47**, 244–250 (2014).
134. Berlot G, Gullo A, Romano E, Rinaldi A. Naloxone in cardiorespiratory arrest. *Anaesthesia*. 1985 Aug;40(8):819. doi: 10.1111/j.1365-2044.1985.tb11024.x. PMID: 4037279.
135. Mills CA, Flacke JW, Flacke WE, Bloor BC, Liu MD. Narcotic reversal in hypercapnic dogs: comparison of naloxone and nalbuphine. *Can J Anaesth*. 1990 Mar;37(2):238-44. doi: 10.1007/BF03005476. PMID: 2311152.
136. Osterwalder, J. J., Osterwalder, J. & Znf, A. *Naloxone-For Intoxications with Intravenous Heroin and Heroin M i x t u r e s-Harmless or Hazardous? A Prospective Clinical Study*. *Clinical Toxicology* vol. 34 (1996).
137. Gahr, M. *et al*. “Krokodil” revival of an old drug with new problems. *Substance Use and Misuse* **47**, 861–863 (2012).
138. Helpern M, Rho YM. Deaths from narcotism in New York City. Incidence, circumstances, and postmortem findings. *N Y State J Med*. 1966 Sep 15;66(18):2391-408. PMID: 5222195.
139. Liu, J. *et al*. Methadone bioavailability and dose conversion implications with intravenous and enteral administration: A scoping review. doi:10.1093/ajhp/zxab166/6238008.
140. Kintz, P. *A new series of 13 buprenorphine-related deaths*. (2002).
141. Lastair, A., Ood, J. J. W., Ack, J., Endelson, H. M. & Ello, A. K. M. *15 DRUG THERAPY 965) from the National Institute on Drug Abuse*. *National Institutes of Health* vol. 334 (1996).
142. van Heugten-Van der Kloet, D. *et al*. MDMA, cannabis, and cocaine produce acute dissociative symptoms. *Psychiatry Research* **228**, 907–912 (2015).

143. Raji, M. A., Priyadarshni, S., Yu, X., Digbeu, B. & Kuo, Y.-F. Association of medication-assisted-therapy with new onset of cardiac arrhythmia in patients diagnosed with opioid use disorders. *The American Journal of Medicine* (2022) doi: 10.1016/j.amjmed.2022.01.032.
144. Corpo, C. & Gambettola, P. M. *ART. 186 C.D.S. SINTESI DELLE PROCEDURE OPERATIVE ALLA LUCE DELLA PIU' RECENTE GIURISPRUDENZA* Maurizio Marchi.
145. *Position Statement and Practice Guidelines on the Use of Multi-Dose Activated Charcoal in the Treatment of Acute Poisoning* American Academy of Clinical Toxicology, European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists. www.dekker.com (1999).
146. Benson, B. E. *et al.* Position paper update: Gastric lavage for gastrointestinal decontamination. *Clinical Toxicology* vol. 51 140–146 (2013).
147. Chyka PA, Seger D, Krenzelok EP, Vale JA; American Academy of Clinical Toxicology; European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists. Position paper: Single-dose activated charcoal. *Clin Toxicol* (Phila). 2005;43(2):61-87. doi: 10.1081/clt-200051867. PMID: 15822758.
148. Seger, D. & Meulenbelt, J. Position paper: Whole bowel irrigation #. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology* vol. 42 843–854 (2004).
149. Trent, M. S. & Kim, U. *Cocaine Packet Ingestion Surgical or Medical Management?* <http://archsurg.jamanetwork.com/>.
150. Ministero degli Interni & Ministero dei Trasporti. *NUOVO CODICE DELLA STRADA*.
151. Jones AW. Disappearance rate of ethanol from the blood of human subjects: implications in forensic toxicology. *J Forensic Sci*. 1993 Jan;38(1):104-18. Erratum in: *J Forensic Sci* 1994 Mar;39(2):591. PMID: 8426147.
152. Salomone, A., Palamar, J. J., Gerace, E., di Corcia, D. & Vincenti, M. Hair testing for drugs of abuse and new psychoactive substances in a high-risk population. *Journal of Analytical Toxicology* **41**, 376–381 (2017).
153. Jannetto, P. J. & Fitzgerald, R. L. Effective use of mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry* vol. 62 92–98 (2016).
154. Antonelli, G., Marinova, M., Artusi, C. & Plebani, M. Mass spectrometry or immunoassay: Est modus in rebus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* vol. 55 1243–1245 (2017).
155. Curtis, E. G., Arbor, A., Jayant, M., Patel, A. & Batsakir, J. O. *ENZYME MULTIPLIED IMMUNOASSAY TECHNIQUE: A REVIEW*. (1978).
156. Nishihara K. [Enzyme immunoassay of drug in blood (serum)]. *Nihon Rinsho*. 1995 Sep;53(9):2301-9. Japanese. PMID: 7474397.

157. Raharjo, T. J. & Verpoorte, R. Methods for the Analysis of Cannabinoids in Biological Materials: a Review. *PHYTOCHEMICAL ANALYSIS Phytochem. Anal* **15**, 79–94 (2004).
158. Instrumentation Laboratory. Werfen Company. DRI® Amphetamine. Referenza W150017 Taurus IT, R4, 04/2020.
159. Thermo Scientific. CEDIATM Benzodiazepine Assay. Referenza 10006458-9-IT, 06/2019.
160. Marchioro, A. Trombin, F. Boscolo, M. Plebani: Utilità Del Dosaggio Cedia Della Eddp (2-Etilidene-1,5-Dimetil-3,3-Difenilpirrolidina) Urinaria Per La Valutazione Dell'outcome Di Soggetti Tossicodipendenti Sottoposti A Programma Di Trattamento Farmacologico Con Metadone. *Biochimica clinica*, 2009, vol. 33, n. 1.
161. Favretto, D. *et al.* High-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and micropulverized extraction for the quantification of amphetamines, cocaine, opioids, benzodiazepines, antidepressants and hallucinogens in 2.5mg hair samples. *Journal of Chromatography A* **1218**, 6583–6595 (2011).
162. O'sullivan, M. J., Bridges, J. W. & Marks, V. *Annals of Clinical Biochemistry*. vol. 16 (1979).
163. Graphpad, chi-square.
<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>.
164. Graphpad, Q. agreement with kappa.
<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/#:~:text=Quantify%20agreement%20with%20kappa,agreement%20is%20quantified%20by%20kappa.>
165. Tenenbein, M. Do you really need that emergency drug screen? *Clinical Toxicology* vol. 47 286–291 (2009).