

Procedure operative per la determinazione delle sostanze d'abuso nelle matrici biologiche

Paolo Bucchioni¹, Paolo Berretta², Francesco Paolo Busardò³, Paolo Francheschini¹, Adele Minutillo², Simona Pichini², Manuela Pellegrini²

¹Tossicologia "Levante Ligure" ASL5 Liguria, Sarzana (La Spezia)

²Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, Roma

³Dipartimento di Eccellenza-Scienze Biomediche e Sanità Pubblica Università Politecnica delle Marche, Ancona

1. Generalità

1.1 Introduzione

L'attività del laboratorio di tossicologia assume una duplice veste in funzione delle proprie finalità, cliniche o forensi e l'identità, l'autenticità nonché la scelta di una determinata metodologia di analisi sono presupposti indispensabili per l'attendibilità dei risultati analitici e per la loro corretta interpretazione (1,2). Poiché la analisi tossicologiche con valenza forense, a differenza di quelle eseguite a scopo clinico, possono assumere un valore di prova giudiziaria, devono fornire risposte certe ed univoche garantendo una rintracciabilità di ogni fase operativa in modo da risultare non contestabili in sede di dibattimento giudiziario. In generale le determinazioni delle sostanze psicotrope a scopo medico-legale riguardano per lo più casi di guida sotto l'effetto di sostanze d'abuso (articolo 187 c.d.s) e/o sotto l'effetto di alcol (articolo 186 c.d.s.), il controllo dei lavoratori addetti a mansioni a rischio (Conferenza Stato_Regioni Provvedimento del 18 settembre del 2008) e la verifica dei requisiti fisici e psichici per il conseguimento, la revisione o la conferma di validità della patente di guida per autoveicoli o motoveicoli da parte delle Commissioni Patenti (3). Inoltre non va dimenticato che anche per il rilascio del porto d'armi e nell'affidamento di minori e adozioni sono richiesti accertamenti analitici per dimostrare la non assunzione di sostanze stupefacenti e psicotrope.

1.2 Scopo delle procedure operative

La redazione di queste Procedure Operative nasce dall'esigenza di avere un documento condiviso sui protocolli analitici e sui valori soglia utilizzabili per l'analisi delle sostanze stupefacenti e psicotrope nelle diverse matrici biologiche in particolar modo quando questi accertamenti assumono carattere di prova giudiziaria. La carenza di precise normative ha infatti portato i singoli laboratori, nel corso degli anni, ad adottare delle "proprie" modalità operative adattandole alle loro esigenze e generando così una disomogeneità metodologica tra gli stessi che si occupano di accertamenti analitici anche a scopo forense. Lo scopo di queste Procedure Analitiche è quindi quello di uniformare e standardizzare, a livello nazionale, le procedure analitiche ed organizzative dei laboratori del Servizio Sanitario Nazionale che si occupano d'analisi di sostanze, fornendo un sostegno pratico ai laboratori che progettano di effettuare (o che già effettuano) le analisi sulle sostanze stupefacenti e psicotrope nelle diverse matrici biologiche, in modo che essi possano far propri i requisiti necessari all'implementazione di un servizio all'utente di elevata qualità. In queste procedure operative verranno quindi trattati agli aspetti di carattere generale (matrici, catena di custodia, analisi di screening e conferma), con riferimento anche agli accertamenti analitici stabiliti da normative di Legge (mansioni a rischio, articolo 187 articolo 186, rilascio/rinnovo delle patenti).

1.3 Organizzazione del laboratorio (Sicurezza del laboratorio, Personale di laboratorio)

1.3.1 Sicurezza del laboratorio

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca delle sostanze d'abuso nelle matrici biologiche devono disporre di un solido sistema di sicurezza in grado di garantire il divieto di accesso al personale non autorizzato nel laboratorio o nei luoghi in cui sono conservati i campioni o documenti relativi ad essi. Il laboratorio deve possedere un registro che documenti l'entrata e l'uscita dei visitatori presso le aree protette del laboratorio stesso.

1.3.2 Personale di laboratorio

Solamente il personale opportunamente qualificato e la cui competenza sia stata formalmente riconosciuta può lavorare all'interno del laboratorio anche se è possibile che una stessa persona ricopra più ruoli. Il laboratorio deve possedere un registro dove vengono riportate le competenze del personale in funzione delle mansioni svolte. I documenti, cartacei o informatici, di coloro che prestano servizio nel laboratorio devono contenere un curriculum vitae aggiornato periodicamente. Ogni membro dello staff di laboratorio, deputato ad una specifica funzione, deve avere la necessaria preparazione ed esperienza commisurata alla propria responsabilità di funzione, documentata da un percorso formativo specifico per la tecnologia utilizzata in questa peculiare branca di laboratorio. Tutto il personale impiegato in laboratorio deve aver ricevuto adeguata formazione in materia di salute e sicurezza sul luogo di lavoro (4).

1.3.3 Procedure per la catena di custodia

La catena di custodia è una procedura atta a documentare la raccolta, il trasporto, la conservazione, l'analisi, il referto e lo smaltimento di un determinato campione biologico. L'obiettivo è garantire che l'autenticità e l'integrità di tale campione siano mantenute dalla raccolta allo smaltimento. Un laboratorio deve essere in grado di rispondere alle seguenti domande:

- Dove si trovano attualmente i campioni in fase di analisi?
- Chi possiede ora i campioni da analizzare?
- Quando il laboratorio ha ricevuto i campioni per l'analisi?
- Dove sono stati conservati i campioni?
- Chi è entrato in possesso dei campioni da analizzare?

La catena di custodia deve specificare dove e da chi i campioni sono stati raccolti, elaborati e conservati e dimostrare che non sono stati manomessi o manipolati.

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze stupefacenti indipendentemente dalla matrice biologica utilizzata, devono poi prendere in carico la catena di custodia dei campioni inviati, al fine di documentare la tracciabilità degli stessi dal momento della loro accettazione in laboratorio fino al completamento delle analisi, inclusi la refertazione, la conservazione e l'eventuale smaltimento del materiale residuo. La registrazione dei dati relativi alla catena di custodia dovrebbe essere conservata su carta e/o su supporto informatico, per un periodo di tempo non inferiore ai 5 anni o secondo quanto raccomandato dalla normativa vigente (4).

1.4 Modulistica (Modulo per il verbale di prelievo, Modulo per la catena di custodia, Modulo Consenso informato)

1.4.1 Modulo per il verbale di prelievo

Sul modulo del verbale di prelievo, che deve essere redatto in triplice copia, occorre indicare:

- i dati relativi al responsabile del prelievo;
- i dati relativi alla persona sottoposta ad accertamento analitico (generalità, residenza, numero documento d'identità etc.). Se il soggetto non possiede un documento d'identità valido, sarà possibile procedere all'identificazione dello stesso mediante l'ausilio di un supervisore

autorizzato o di un testimone con documento di identità. Se l'identità del soggetto non può essere accertata, il responsabile non potrà procedere al prelievo del campione;

- i dati relativi al prelievo per l'identificazione univoca del campione (codice di identificazione, struttura/reparto ove viene effettuato il prelievo etc.);
- l'elenco dei farmaci eventualmente assunti o somministrati alla persona sottoposta ad accertamento analitico nei giorni antecedenti la raccolta del campione;

Inoltre:

- dovrà essere apposta la firma sia di chi ha effettuato il prelievo sia della persona sottoposta ad accertamento analitico;
- delle tre copie del verbale di prelievo, una viene consegnata insieme ai campioni da analizzare e al modulo di catena di custodia alla struttura che effettua l'analisi, una copia viene conservata dalla struttura/ incaricato che ha effettuato il prelievo di sangue e una copia consegnata alla persona sottoposta ad accertamento analitico (4).

1.4.2 Modulo per la catena di custodia

Il modulo per la catena di custodia rende tracciabile ogni spostamento del campione, dal momento della sua raccolta all'arrivo nel laboratorio che eseguirà l'analisi.

Le informazioni che devono essere contenute nel modulo per la catena di custodia sono:

- etichette adesive con codice a barre o codice alfanumerico identiche a quelle apposte sul verbale di prelievo e sui contenitori di raccolta delle tre aliquote del campione;
- luogo, data e ora del prelievo;
- eventuali informazioni sul campione;
- nome, indirizzo, indirizzo e-mail e numero di telefono del laboratorio d'analisi;
- nome e firma di tutte le persone che hanno avuto in custodia le aliquote del campione durante il viaggio dal luogo del prelievo sino alla destinazione finale (laboratorio di analisi) (4).

1.4.3 Modulo consenso informato

Il modulo per esprimere il consenso informato è un documento indispensabile poiché permette di dare forma all'espressione di volontà affermativa del paziente di accettare in piena coscienza gli accertamenti a cui deve essere sottoposto. In caso di presenza di minori, il consenso informato dovrà essere dato dai genitori o da chi esercita la responsabilità genitoriale o dal tutore tenendo conto anche della volontà del minore in relazione alla sua età ed al grado di maturità sviluppato (4).

2. Tipologie di campioni biologici

Le analisi tossicologiche per la ricerca di xenobiotici (farmaci, composti tossici, sostanze stupefacenti o psicotrope) nelle matrici biologiche, vengono generalmente richieste per finalità cliniche e/o medico-legali. Poiché frequentemente tali indagini possono essere utilizzate in diversi ambiti (diagnosi di tossicodipendenza, valutazione dell'idoneità alla guida, idoneità al lavoro, idoneità al porto d'armi, idoneità a determinate norme di concorrenza e/o contrattuali, affido di minori o adozione nazionale o internazionale), o anche assumere carattere di prova giudiziaria, devono possedere precisi requisiti di certezza e di affidabilità con la evidenza della documentazione e la rintracciabilità di ogni fase analitica, nonché di trasparenza ed uniformità con l'applicazione di chiare procedure.

Alla base del quesito medico legale richiesto risulta fondamentale il tipo di matrice da utilizzare poiché tale scelta ci permette di evidenziare la finestra temporale in cui le sostanze d'abuso sono rivelabili.

Nel caso in cui si debba valutare un consumo "recente" di sostanze stupefacenti o psicotrope la matrice da utilizzare sarà l'urina; è bene tuttavia sottolineare che il risultato di un'analisi di una sostanza d'abuso ottenuto su campione di urina non è correlabile all'eventuale stato di alterazione psicofisica

del soggetto consumatore al momento del prelievo del campione. Infatti nel caso sia necessario una valutazione di attualità d'uso la matrice da utilizzare dovrà essere sangue.

La matrice biologica alternativa al sangue è rappresentata dalla saliva idonea per la determinazione di xenobiotici e/o delle sostanze d'abuso e/o metaboliti in campo clinico, per dimostrarne l'attualità d'uso nella guida, nello svolgimento di mansioni lavorative particolari (ad esempio prima dell'inizio del turno lavorativo) e nell'ambito medico-legale.

Qualora sia necessario incrementare la finestra temporale di rilevabilità di una determinata sostanza la matrice pilifera rappresenta la matrice idonea. Infatti, se una sostanza (per esempio una sostanza d'abuso e/o un suo metabolita) è rilevabile per alcune ore nel sangue ed alcuni giorni nell'urina, la stessa sostanza è rilevabile nella matrice cheratinica per alcuni mesi od anni, a seconda della sede e della lunghezza della stessa (2).

2.2 Urina

Le urine sono una matrice biologica di elezione nelle analisi per la ricerca delle sostanze psicoattive o psicotrope. Il loro utilizzo presenta vantaggi quali una modalità di raccolta non invasiva, la possibilità di campionare grandi volumi e la possibilità di rilevare la sostanza parente e/o i suoi metaboliti dopo diversi giorni dall'assunzione. La positività dell'analisi, infatti, indica che la sostanza è stata assunta da alcune ore ad alcuni giorni prima del prelievo, ma non può correlare l'eventuale stato di alterazione psico-fisica ad una recente assunzione.

Il principale limite di tale matrice è la scarsa rilevanza clinica dell'analisi quantitativa in quanto le concentrazioni degli analiti varia con la dose, la modalità di somministrazione, il tempo dall'assunzione e con il metabolismo individuale (2,4).

2.2.1 Modalità di raccolta

La raccolta delle urine deve avvenire secondo una procedura che assicuri, nel rispetto della privacy della persona sottoposta a controllo, l'identità, l'integrità e l'autenticità del campione. Nel caso che il prelievo sia per motivi amministrativi e/o giudiziari, i campionamenti devono essere effettuati a vista da un operatore sanitario qualificato ed autorizzato, che deve spiegare la procedura di raccolta del campione alla persona sottoposta ad accertamento analitico. I contenitori devono essere dotati di chiusura ermetica antiviolazione oppure chiusi e sigillati con sigillo adesivo a nastro non rinnovabile sul quale l'interessato e l'operatore addetto ai prelievi appongono congiuntamente la propria firma. Il materiale adoperato per effettuare la raccolta deve essere integro e sigillato, fino al momento in cui viene aperto per eseguire la raccolta.

La raccolta della matrice urinaria, per un volume compreso tra i 40 e 60 ml deve avvenire in appositi contenitori di plastica monouso e deve essere effettuata in locali dove non siano presenti possibili fonti di inquinamento del campione quali acqua, saponi o detersivi di alcun tipo. Si ricorda infatti che uno svantaggio non trascurabile nell'analisi tossicologica su campione urinario è che questo può facilmente essere soggetto a tentativi di adulterazione e/o diluizione. Per questa ragione si raccomanda, al fine di verificare la non adulterazione del campione, la misurazione della temperatura (32-38°C) e la determinazione della creatininuria (20 mg/dL). Un campione di urine raccolto con finalità medico-legali deve essere suddiviso in tre aliquote denominate A (aliquota per le analisi di screening), B (aliquota per le analisi di conferma) e C (aliquota per le analisi di revisione).

Dal momento dell'accettazione del campione da parte del laboratorio, o nel caso delle mansioni a rischio, del medico competente, è necessario attivare una procedura interna di catena di custodia (2,4).

2.3 Saliva

La matrice salivare, utilizzata in fase preliminare di accertamento (test di screening) o in caso di rifiuto al prelievo ematico eseguito presso una struttura sanitaria, può essere considerata una matrice biologica da utilizzare per dimostrare una attualità d'uso sebbene la matrice di elezione in **questo** caso rimanga la matrice ematica che presenta comunque una finestra di rilevabilità temporale diversa rispetto alla matrice salivare (6).

2.3.1 Modalità di raccolta

La raccolta della saliva deve avvenire secondo una procedura che assicuri, nel rispetto della privacy della persona sottoposta ad accertamento analitico, l'identità, l'integrità e l'autenticità del campione. È possibile raccogliere campioni di saliva, senza stimolazione, in normali provette con chiusura ermetica ma negli ultimi anni, tuttavia, sono stati commercializzati dei kit di raccolta per la saliva provvisti di contenitori specifici, sprovvisti di additivi. Questi sono capaci di raccogliere un volume noto e costante di saliva attraverso un indicatore di volume incorporato nel dispositivo di raccolta. Le ditte produttrici dei dispositivi per la raccolta della saliva devono garantire che questi ultimi non interferiscano in nessun modo con la determinazione delle sostanze d'abuso effettuata dai laboratori. Un campione di saliva raccolto con finalità medico-legali deve infatti essere suddiviso in due aliquote denominate A e B. L'aliquota A viene immediatamente utilizzata per le analisi di screening ed in caso di positività per le analisi di conferma, l'aliquota B viene conservata in congelatore a -20°C per eventuali analisi di revisione richiesta dal soggetto sottoposto all'accertamento analitico (6).

2.4 Sangue

Il sangue è la matrice biologica di elezione per dimostrare l'attualità di consumo, idoneo per la determinazione di xenobiotici e/o delle sostanze d'abuso e/o metaboliti in campo clinico e in ambito medico-legale. La concentrazione ematica e/o plasmatica della sostanza ricercata, infatti, consente di stabilire o di escludere la recente assunzione ed è direttamente correlabile allo status psicofisico del soggetto al momento del prelievo. Il prelievo ematico effettuato dal personale sanitario su richiesta della Polizia Giudiziaria (es. in caso di incidente stradale), costituisce un atto di polizia giudiziaria per il compimento del quale vi è l'obbligo di dare avviso all'interessato della facoltà di farsi assistere da un difensore di fiducia (7,8).

2.4.1 Modalità di raccolta

La raccolta del campione deve avvenire secondo una procedura che assicuri, nel rispetto della privacy della persona sottoposta ad accertamento analitico, l'identità, l'integrità e l'autenticità del campione stesso. Il prelievo di sangue deve essere effettuato in locali dedicati esclusivamente alla raccolta nel rispetto delle norme sanitarie e di sicurezza e deve essere effettuato detergendo la cute con prodotti non alcolici. Il dispositivo per la raccolta deve contenere un anticoagulante (es. sodio fluoruro/ossalato potassio) e deve essere in grado di raccogliere un volume noto e costante di sangue (almeno 5 ml). Anche in questo caso il campione raccolto con finalità medico-legali deve essere suddiviso in tre aliquote denominate A, B, C. L'aliquota A verrà utilizzata per la eventuale analisi di screening, l'aliquota B per l'analisi di conferma e l'aliquota C verrà conservata in congelatore a -20°C per eventuali analisi di revisione richieste dal soggetto sottoposto all'accertamento analitico. A tutte e tre le provette deve essere apposto un sigillo antimanomissione, opportunamente firmato per garantire l'integrità del campione (7,8).

2.5 Matrice cheratinica

Le analisi per la ricerca di xenobiotici (farmaci, composti tossici, sostanze stupefacenti o psicotrope) e biomarcatori di uso e abuso alcolico nella matrice pilifera, vengono generalmente richieste per finalità cliniche e/o medico-legali. La richiesta di una analisi tossicologica sulla matrice pilifera è legata soprattutto alla possibilità di incrementare la finestra temporale di rilevabilità di una determinata sostanza. Se nella parte prossimale del capello, quella cioè vicina alla cute, è possibile rilevare una esposizione temporalmente vicina all'assunzione, spostandosi nella parte distale, verso la punta, si rileva una esposizione più lontana nel tempo. Inoltre, essendo la velocità di crescita del capello in fase anagenica di circa 1 cm/mese, l'analisi segmentale per cm di capello può fornire informazioni riguardanti storia e tipologia di consumo di una sostanza in ognuno dei mesi corrispondenti al segmento analizzato. Il prelievo del campione non è invasivo e il trasporto e la conservazione non richiedono particolari accorgimenti (2,9).

2.5.1 Modalità di raccolta

È preferibile prelevare il campione dall'area corrispondente alla parte posteriore della testa (*vertex*), il più possibile vicino al cuoio capelluto; si considera infatti che questa regione della testa sia associata ad una minima variabilità interindividuale nella velocità di crescita del capello. Quando il prelievo del campione è effettuato su un bambino o su persone con un evidente diradamento dei capelli, la raccolta del campione può essere effettuata prelevando ciocche più piccole in aree differenti del capo, concentrandosi tuttavia nella zona del vertice posteriore della testa. La matrice pilifera d'elezione per le analisi delle sostanze stupefacenti è rappresentata dai capelli, tuttavia, quando il loro prelievo non è possibile (ad esempio calvizie, rasatura a zero) si può ricorrere a siti di prelievo alternativi come il torace, il pube, le ascelle o il viso (peli della barba). La raccolta dei campioni soprattutto in parti intime del corpo richiede una attenta valutazione del rispetto della privacy del soggetto sottoposto al controllo, garantendo tuttavia che non venga compromessa la correttezza del processo di prelievo. Si ricorda inoltre che la velocità di crescita e la dormienza (fase telogenica) dei peli prelevati in queste zone del corpo sono differenti dalla velocità di crescita e dalla dormienza dei capelli. Pertanto, non è possibile risalire ad una finestra temporale di uso di sostanza, ma si può solo confermare o escludere un uso pregresso. La quantità di capelli necessaria all'analisi è una ciocca il cui spessore deve essere riconducibile allo spessore di una matita, divisibile in due parti (aliquota A e B). È importante raccogliere una quantità di capelli sufficiente ad effettuare sia le analisi di screening che le analisi di conferma (aliquota A), nonché conservare una parte del campione per una eventuale analisi di verifica (controanalisi, aliquota B). La ciocca di capelli da prelevare deve essere fissata con uno filo legato il più vicino possibile alla cute (Figura 1) prima di eseguire il taglio. La ciocca di capelli una volta tagliata deve essere sistemata nell'apposito foglio di alluminio possibilmente millimetrato e la porzione corrispondente alle radici opportunamente legata con lo spago deve fuoriuscire dal foglio. Se la lunghezza del capello non è sufficiente da permettere la procedura sopra descritta è possibile comunque raccogliere il campione e in tal caso, la ciocca tagliata, viene fissata su un foglio con una clip indicando con una freccia la parte prossimale alla cute (9).

2.5.2 Preparazione del campione di matrice pilifera

Un campione di matrice pilifera è significativamente diverso da un campione di urina, sangue o saliva perché si tratta di una matrice solida; pertanto la preparazione del campione prevede diverse fasi iniziali, tra cui il lavaggio, l'asciugatura e l'eventuale segmentazione della ciocca. La procedura di lavaggio è fondamentale per rimuovere la contaminazione superficiale e viene solitamente eseguita con solventi organici come cloruro di metilene o acetone, che interferiscono in maniera trascurabile con l'estrazione degli analiti contenuti all'interno della matrice. I campioni vengono poi lasciati asciugare a temperatura ambiente e successivamente sminuzzati e pesati (30-50 mg a seconda dell'analisi richiesta). La ricerca di xenobiotici in un campione di capelli prevede una fase iniziale di pretrattamento ("digestione") del campione per far sì che gli analiti siano rilasciati dalla matrice

cheratinica. E' importante sottolineare che l'uso di tamponi acquosi acidi o basici durante la digestione idrolizza (parzialmente o completamente) composti chimicamente labili come la cocaina e l'eroina. D'altra parte, l'incubazione della matrice dei capelli con alcol metilico o soluzioni acquose tamponate a pH neutro, pur non presentando problemi di idrolisi dei composti chimicamente labili, può influenzare la resa dell'analita o degli analiti che possono risultare generalmente inferiori rispetto a quelli ottenuti con la digestione in tamponi acidi o basici. Tuttavia mentre la digestione in ambiente acido o basico richiede sempre una successiva estrazione liquido-liquido o in fase solida, gli estratti metanolici o acquosi a pH neutro possono essere analizzati come tali. L'estrazione successiva alla digestione assicura comunque una maggiore pulizia dell'estratto. L'efficienza di una metodologia digestiva ed estrattiva va pertanto verificata nella fase di validazione generale della metodologia d'analisi (9).

3. Procedure per le analisi di laboratorio

3.1 Accettazione dei campioni biologici

Al laboratorio di analisi le aliquote dei campioni biologici contrassegnate con le lettere A, B, e C nei casi in cui è prevista la terza aliquota, devono pervenire all'interno di un contenitore termico refrigerato. Per quanto riguarda le matrici pilifere subito dopo la raccolta dovranno essere inserite all'interno di una busta che dovrà essere poi sigillata. Unitamente al contenitore termico e/o alla busta contenenti le matrici devono pervenire al laboratorio i corrispondenti moduli per la catena di custodia ed i verbali di prelievo. Al momento dell'accettazione dei campioni sono fondamentali le seguenti verifiche:

- a) integrità dell'imballaggio al fine di escludere una manomissione del campione durante il trasporto
- b) le informazioni riportate sopra i contenitori e/o sulla busta delle aliquote relative alle matrici raccolte corrispondano alle informazioni riportate sul modulo della catena di custodia.

Nel caso in cui fossero riscontrate anomalie o mancanze, il laboratorio è tenuto a redigere un apposito verbale di non conformità e deve notificare tale non conformità alla struttura che ha richiesto l'accertamento analitico (22).

3.2 Modalità di conservazione dei campioni raccolta

Una volta raccolti i campioni biologici se il tempo che intercorre tra il prelievo e l'inizio delle procedure analitiche è di alcuni giorni è possibile conservarli ad una temperatura di +4°C. Per quanto riguarda la conservazione a lungo termine (mesi/anni) questa deve essere effettuata alla temperatura di -18/-22°C (3,5). La matrice cheratinica dovrà invece essere conservata in luogo asciutto a temperatura ambiente (9).

3.3 Le non conformità che rendono inaccettabili i campioni da analizzare (4,5,6,8,9)

Urine

- Codici a barre assenti o non identici tra loro
- Campione senza documentazione allegata
- Assenza del consenso informato della persona sottoposta ad accertamento analitico
- Sigilli di sicurezza sui contenitori del campione o sul contenitore per il trasporto rotti
- manomessi
- Assenza dei sigilli di sicurezza

- Ricezione di una o due sole aliquote
- Volume del campione insufficiente al completamento delle analisi
- Contenitori non integri con evidente perdita del campione
- Incongruità del campione urinario con il tipo di richiesta pervenuta
- Creatinina <20 mg/dl
- Peso specifico <1003 mg/L o >1035 mg/l
- pH <3 o >10

N.B. Normalmente un campione di urina può risultare adulterato per la presenza di nitriti (≥ 500 $\mu\text{g/ml}$), di cromo (VI) (≥ 50 $\mu\text{g/ml}$); di un alogeno (candeggina, iodio, fluoro); di glutaraldeide; di piridina (piridinio clorocromato); di un surfattante

Sangue e Saliva

- Codici a barre assenti o non identici tra loro
- Campione senza documentazione allegata
- Assenza del consenso informato della persona sottoposta ad accertamento analitico
- Sigilli di sicurezza sui contenitori del campione o sul contenitore per il trasporto rotti o manomessi
- Assenza dei sigilli di sicurezza
- Ricezione di una o due sole aliquote
- Volume del campione insufficiente al completamento delle analisi
- Contenitori non integri con evidente perdita del campione.

Capelli

- Codici a barre assenti o non identici tra loro.
- Campione senza documentazione allegata.
- Assenza del consenso informato del soggetto sottoposto al controllo.
- Ricezione di un solo campione.
- Quantitativo di campione insufficiente al completamento delle analisi.
- Perdita del campione.

3.4 Analisi di screening

È possibile effettuare uno screening iniziale per la ricerca di classi di sostanze d'abuso utilizzando sia tecniche immunochimiche che siano state validate per le matrici in oggetto e siano commercializzate con tale indicazione, che direttamente tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa. (2)

I test immunochimici comunemente utilizzati per lo screening di sostanze stupefacenti utilizzano sistemi di rivelazione differenti, ma uno stesso principio di reazione antigene-anticorpo in cui gli analiti (sostanze stupefacenti e/o metaboliti) competono con un analita o enzima presenti nel test di screening. I metodi di tipo immunochimico sono generalmente caratterizzati da tempi di esecuzione rapidi, elevata o totale automazione ma, per contro, presentano ridotta specificità ed elevata inaccuratezza del risultato quantitativo, in particolare quando nel campione sono presenti più specie chimiche in grado di essere rilevate ma non discriminate dal metodo (es. composto immodificato e suoi metaboliti). Questi metodi pertanto producono un risultato di tipo qualitativo, in altre parole esprimono la probabile positività o meglio definita "non negatività" del campione per un determinato analita o più spesso per una classe di sostanze in relazione ad un valore soglia o cut-off definito dal produttore. Se l'esito di un test di

screening risulta negativo è fondamentale verificare sempre che il metodo sia in grado di minimizzare il numero dei falsi negativi.

Le tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa tandem o all'analizzatore a tempo di volo (TOF), anche se meno veloci per lo screening di un gran numero di campioni, hanno il vantaggio di poter identificare simultaneamente in un'unica analisi una vasta gamma di analiti differenti. Tuttavia queste metodiche analitiche non sono frequentemente a disposizione dei laboratori e richiedono una elevata expertise da parte del personale che vi opera.

Tutti i risultati positivi al test di screening devono essere confermati mediante l'utilizzo di metodologie analitiche specifiche per gli analiti ricercati come le tecniche analitiche separative di tipo cromatografico associate a tecniche di rivelazione come la spettrometria di massa. Non deve essere refertato alcun valore semiquantitativo ma nel referto deve essere riportata esclusivamente la "non negatività" (2).

3.5 Valori soglia di screening per le matrici biologiche

Si riportano di seguito i valori soglia dei test di screening raccomandati dalle principali Organizzazioni responsabili della salute dei cittadini come il Substance Abuse and Mental Health Service Administration (SAHMSA) statunitense (11,12), dalla European Workplace Drug Testing Society (EWTS) (13,14) e dalla Society of Hair Testing (SoHT)(15,16) e dal gruppo dei Tossicologi Forensi Italiani (17) per le diverse matrici biologiche

Tabella 1. Valori soglia dei test di screening raccomandati dalle principali Organizzazioni responsabili della salute dei cittadini come il Substance Abuse and Mental Health Service Administration (SAHMSA) statunitense, dalla European Workplace Drug Testing Society (EWTS) per la matrice Urina

Classe di sostanze	SAHMSA ng/mL	EWTS ng/mL
Amfetamine	500	500
Cannabinoidi	50	50
Cocaina e metaboliti	150	150
Oppicei e metaboliti	2000	300
Metadone (EDDP)	/	300 (100)
Buprenorfina	/	5

Tabella 2. Valori soglia dei test di screening raccomandati dalle principali Organizzazioni responsabili della salute dei cittadini come il Substance Abuse and Mental Health Service Administration (SAHMSA) (12) statunitense, dalla European Workplace Drug Testing Society (EWTS) (13) per la matrice Saliva

Classe di sostanze	SAHMSA ng/mL	EWTS ng/mL	GTFI ng/mL
Amfetamine	50	40	40
Cannabinoidi	4	10	10
Cocaina e metaboliti	15	30	30
Oppicei e metaboliti	30	40	40

Metadone	/	40	50
Buprenorfina	/	5	5

Tabella 3. Valori soglia dei test di screening raccomandati dalla Society of Hair Testing (SoHT) Capelli (14)

Classe di sostanze	SOHT ng/mg
Amfetamine	0.2
Cannabinoidi	0.05
Cocaina e metaboliti	0.5
Oppiacei e metaboliti	0.2
Metadone	0.2
Buprenorfina	0.01

3.6 Analisi di conferma

I metodi di conferma debbono garantire l'identificazione certa e la quantificazione accurata delle sostanze di interesse (sostanze parenti e/o loro metaboliti) con idonea sensibilità e specificità. L'identificazione e la quantificazione degli analiti di interesse si ottiene utilizzando metodi separativi cromatografici accoppiati ad una tecnica identificativa specifica e sensibile quale la spettrometria di massa che identifica i composti per il loro peso molecolare ed i frammenti tipici ottenuti per collisione con un fascio di elettroni ad energia nota o con un gas a pressione elevata all'interno di una cella di collisione sottovuoto (gas cromatografia (GC-MS) o la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS) e/o spettrometria di massa tandem (LC-MS-MS). E' fondamentale l'impiego di uno standard interno (meglio se deuterato) poiché quando aggiunto prima della fase preparativa, garantisce l'affidabilità del dato analitico sia in funzione del processo estrattivo sia in funzione della separazione strumentale.

È bene ricordare che il valore soglia di un test di conferma deve essere necessariamente inferiore a quello di un test di screening. I campioni che contengono le sostanze d'abuso e/o i loro metaboliti a concentrazioni uguali o superiori ai cut-off prestabiliti, sono considerati positivi. L'aliquota B e l'aliquota C di un campione risultato positivo vanno conservate in apposito congelatore provvisto di chiave per un periodo concordato con chi richiede l'analisi (clinico, autorità amministrativa o giudiziaria) o secondo quanto previsto dalle normative di Legge. Tale periodo di conservazione deve essere riportato nelle Procedure Operative Standard (POS) (9).

3.7 Valori soglia di conferma per le matrici biologiche

Si riportano di seguito i valori soglia dei test di conferma raccomandati dalle principali Organizzazioni responsabili della salute dei cittadini come il Substance Abuse and Mental Health Service Administration (SAMHSA) statunitense, dalla European Workplace Drug Testing Society (EWTS) e i requisiti minimi* riportati nelle Linee Guida dei Tossicologi Forensi italiani per le diverse matrici biologiche ed i valori soglia da utilizzare per individuare un consumo cronico ed eccessivo di alcol o verificare l'astinenza da sostanze d'abuso stabiliti in un documento di consenso della Society of Hair Testing (SoHT). In riferimento alle analisi relative alla matrici pilifere se l'accertamento riguarda un reato facilitato dal consumo inconsapevole di sostanze farmacologicamente attive da parte della vittima, si considera valore soglia il LOQ del metodo analitico utilizzato che deve avere un valore

dell'ordine di picogrammi per milligrammo di capello (pg/mg). Inoltre in riferimento ad alcune sostanze che sono presenti nell'organismo (acido gamma idrossibutirrico GHB, testosterone , cortisolo...) per la loro determinazione è fondamentale effettuare l'analisi segmentale del capello per dimostrare una eventuale differenza di concentrazione della sostanza tra i vari segmenti presi in esame, in modo da poter possibilmente discriminare il picco legato all'assunzione o somministrazione rispetto alla produzione endogena. Per quanto riguarda la matrice ematica non esistono al momento in Italia cut-off stabiliti per legge al fine di stabilire o escludere una recente assunzione correlabile con lo status psicofisico del soggetto al momento del prelievo . Si riportano pertanto i *Requisiti Minimi di Prestazione* per l'analisi quantitativa di SSP in sangue riportate dai Tossicologi Forensi nelle loro linee guida ed una proposta di cut -of riportati in un documento nato dalla collaborazione di professionisti che si occupano di sostanze d'abuso appartenenti a Società scientifiche ed Istituzioni Ministeriali

Tabella 4. Valori soglia dei test di conferma raccomandati dalle principali Organizzazioni responsabili della salute dei cittadini come il Substance Abuse and Mental Health Service Administration (SAHMSA) statunitense, dalla European Workplace Drug Testing Society (EWTS) , e requisiti minimi* riportati nelle Linee Guida dei Tossicologi Forensi italiani per Urina

Analiti	SAHMSA ng/mL	EWTS ng/mL	Requisiti minimi di prestazioni * ng/mL
Amfetamina	250	200	0.2
Metamfetamina	250	200	0.2
MDA	250	200	0.2
MDMA	250	200	0.2
MDEA	250	200	0.2
THC	/		0.05
THCCOOH	15	15	/
Cocaina	/	/	0.5
BEG	100	100	/
Morfina	4000	300	0.2
Codeina	2000	300	0.2
6-MAM	10	10	0.2
Metadone	/	250	0.2
EDDP	/	75	/
Buprenorfina	/	2	0.01
Norbuprenorfina	/	2	/

* “**Requisiti minimi di prestazione**”, ovvero le concentrazioni degli analiti nel fluido biologico oggetto di indagine che il laboratorio deve essere in grado di quantificare, con accuratezza, ed atti a valutare l'applicabilità di un metodo rispetto ad una determinata finalità analitica tossicologico-forense, ove non sussistano specifici requisiti normativi

Tabella 5 Valori soglia dei test di conferma raccomandati dalle principali Organizzazioni responsabili della salute dei cittadini come il Substance Abuse and Mental Health Service Administration (SAHMSA) statunitense (129), dalla European Workplace Drug Testing Society (EWTS) (13), e dai Tossicologi Forensi italiani (9) per Saliva

Analiti	SAHMSA ng/mL	EWTS ng/mL	GTF ng/mL I
Amfetamina	25	15	15
Metamfetamina	25	15	15
MDA	25	15	15
MDMA	25	15	15
MDEA		15	/
THC	2	2	2
THCCOOH	/	/	/
Cocaina	8	8	8
BEG	8	8	8
Morfina	15	15	15
Codeina	15	15	15
6-MAM	2	2	2
Metadone	/	20	20
EDDP	/	20	20
Buprenrfina	/	1	1
Norbuprenorfina	/	1	1

Tabella 6. Valori soglia dei test di conferma raccomandati dalla Society of Hair Testing (SoHT) per i Capelli

Analiti	SOHT ng/mg
Amfetamina	0.2
Metamfetamina	0.2
MDA	0.2
MDMA	0.2
MDEA	0.2
THC	0.05
THCCOOH	0.0002
Cocaina	0.5
BEG	*
Morfina	0.2
Codeina	0.2
6-MAM	0.2
Metadone	0.2
EDDP	**
Buprenrfina	0.1
Norbuprenorfina	***

*La presenza di benzoilecgonina, norcocaina, cocaetilene, idrossil-cocaina o idrossibenzoilecgonina deve essere considerato per confermare l'uso.

** La conferma di EDDP dimostra l'uso di metadone *** La conferma di norbuprenorfina dimostra l'uso di buprenorfina

Tabella 7. Valori soglia relativi ai marcatori dell'abuso alcolico raccomandati Society of Hair Testing (SOHT) per i Capelli

Classe di sostanza	Analiti	Cut-off per consumo cronico eccessivo (ng/mg)	Cut-off per verifica dell'astinenza (ng/mg)
Esteri etilici degli acidi grassi (Fatty Acid Ethyl Esters) FAEEs	Etil miristato, Etil palmitato, Etil oleato, Etil stearato	$\geq 0,5$ (come somma delle concentrazioni dei quattro esteri etilici) nel segmento 0-3 cm prossimale $\geq 0,1$ nel segmento 0-6 cm prossimale	$\leq 0,2$ (come somma delle concentrazioni dei quattro esteri etilici) nel segmento 0-3 cm prossimale $\leq 0,4$ nel segmento 0-6 cm prossimale
EtG	Etil glucuronide	$\geq 0,03$ sia nel segmento 0-3 che 0-6 cm prossimale	$\leq 0,007$ sia nel segmento 0-3 che 0-6 cm prossimale

Tabella 8. Valori soglia relativi alle sostanze d'abuso raccomandati dai Tossicologi Forensi e dal Tavolo Tecnico per la matrice Sangue (8)

Analiti	Requisiti minimi di prestazioni *GTFI ng/mL	Proposta Cu-off	
		Concentrazione ematica in assenza di alcol ng/mL	Concentrazione ematica in presenza di alcol con concentrazione ≥ 0.2 g/L ng/mL
Amfetamina	0.2	25	20
Metamfetamina	0.2	25	20
MDA	0.2	25	20
MDMA	0.2	25	20
MDEA	0.2	25	20
THC	0.05	2	1.3
THCCOOH	/	/	/
Cocaina	0.5	15	10
BEG	/	/	/
Morfina	0.2	10	5
Codeina	0.2	/	/
6-MAM	0.2	/	/
Metadone	0.2	/	/
EDDP	/	/	/
Buprenorfina	0.01	/	/
Norbuprenorfina	/	/	/

4. Consegna dei risultati analitici

4.1 Comunicazione dei risultati analitici

Il risultato analitico ottenuto sia da un solo test di screening (risultato negativo) o da un test di screening ed un'analisi di conferma (test positivo allo screening, ma negativo alla conferma o, infine, positivo sia allo screening che alla conferma) deve essere refertato dal responsabile del laboratorio o da un collaboratore abilitato, che deve essere un esperto di analisi di sostanze d'abuso in matrice biologiche e deve tener conto di tutte le osservazioni e informazioni riportate nel verbale di prelievo riguardo ad eventuali trattamenti farmacologici del soggetto. (2,4,6,7,9)

Il referto analitico deve contenere i seguenti dati identificativi:

1. il numero identificativo del campione e i dati anagrafici del soggetto sottoposto all'accertamento;
2. la data di raccolta del campione;
3. la data di ricezione del campione da parte del laboratorio (se diversa dalla data di raccolta);
4. la data della refertazione;
5. il nome dell'autorità o persona fisica che ha richiesto l'analisi.

Il referto deve inoltre includere:

- a) la matrice biologica analizzata (capelli, peli pubici, ascellari, peli della barba, del petto, delle braccia o delle gambe);
- b) il tipo di analisi eseguita;
- c) il metodo analitico utilizzato;
- d) il risultato delle analisi eseguite. Qualora le analisi di screening e di conferma abbiano rilevato la presenza di sostanze stupefacenti e/o metaboliti al di sopra del valore soglia prestabilito, il referto deve contenere il nome della/e sostanza/e rilevata/e con le relative concentrazioni;
- e) i cut-off utilizzati
- f) il metodo di calcolo utilizzato per la determinazione dell'incertezza analitica applicata

Per quanto riguarda le matrici pilifere, oltre al tipo di matrice analizzata, il referto deve inoltre contenere:

- a) la lunghezza originale del campione;
- b) la lunghezza del segmento di campione analizzato (o la lunghezza dei vari segmenti analizzati);
- d) eventuali informazioni sulla colorazione dei capelli/peli, nonché sugli ulteriori trattamenti cosmetici;

Non vanno aggiunti ulteriori commenti o altre informazioni, a meno che l'autorità (o persona fisica) che ha ordinato il controllo richieda un parere o un'interpretazione sul dato analitico ottenuto. Qualora espressamente richiesto, il responsabile del laboratorio redigerà un parere scritto su utili informazioni per l'interpretazione dei risultati ottenuti dall'analisi di laboratorio.

4.2 Conservazione dei campioni

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze d'abuso nelle matrici biologiche devono conservare a -20°C le aliquote B e C dei campioni risultati positivi secondo quanto stabilito dalla Legge (o dalle circolari regionali che regolamentano l'analisi delle sostanze d'abuso nelle matrici biologiche a fini medico-legali).

Per quanto riguarda la conservazione dei campioni di matrice pilifera, i laboratori che effettuano analisi delle sostanze d'abuso e dei biomarcatori dell'abuso alcolico, devono conservare in luogo asciutto a temperatura ambiente ed al buio l'aliquota B del campione di capelli secondo quanto stabilito dalle leggi (ad esempio Provvedimento 18 settembre 2008) o dalle circolari regionali che regolamentano l'analisi delle sostanze d'abuso in matrice pilifera a fini medico-legali.

Il laboratorio inoltre deve conservare e rendere sempre disponibile tutta la documentazione relativa ai procedimenti analitici utilizzati (2,4,6,7,9).

La documentazione deve comprendere:

- i moduli della catena di custodia;

- le registrazioni dei controlli interni di qualità effettuati dal laboratorio e della valutazione esterna di qualità a cui il laboratorio ha partecipato;
- le Procedure Operative Standard (POS) che il laboratorio utilizza per l'analisi delle principali sostanze d'abuso nelle matrici biologiche
- tutti i risultati analitici (compresi quelli relativi alla validazione dei metodi con le curve di calibrazione ed i calcoli utilizzati per la formulazione del risultato);
- copia del referto finale.

5. Contestazione dei risultati

In caso di accertata presenza di una o più sostanze stupefacenti nelle matrici biologiche esaminate, la persona sottoposta ad accertamento può richiedere l'esecuzione della controanalisi sull'aliquota B del campione biologico o sull'aliquota C, nel caso gli accertamenti analitici prevedano la raccolta di una terza aliquota.

Il test di revisione, con costo a carico del richiedente, potrà essere eseguito presso lo stesso laboratorio che ha analizzato l'aliquota A o B del campione biologico o altro laboratorio scelto a cura del soggetto sottoposto a controllo. Tale aliquota deve essere accompagnata dalla modulistica attestante le procedure legate alla catena di custodia ed includere informazioni riguardanti i risultati dell'analisi originale nonché i cut-off utilizzati nell'analisi stessa. Tutti i laboratori che effettuano analisi sulle aliquote B o C del campione in esame, devono possedere la documentazione atta a dimostrare l'utilizzo di metodologie d'analisi validate con requisiti di precisione ed accuratezza adeguate alle analisi richieste. Nelle controanalisi (o analisi di revisione) devono essere ricercate solamente le sostanze d'abuso e/o metaboliti risultati presenti nell'aliquota A o B del campione biologico e il referto deve essere disponibile secondo le norme vigenti delle leggi e delle circolari regionali in materia (2,4,6,7,9).

6. Assicurazione della Qualità delle analisi

I laboratori che effettuano analisi sulle sostanze stupefacenti o psicotrope devono implementare un sistema di gestione in qualità che comprenda tutti gli aspetti del processo analitico come:

- ricezione del campione;
- catena di custodia;
- sicurezza e comunicazione dei risultati;
- test di screening e di conferma;
- certificazione dei calibratori e dei controlli;
- validazione delle procedure analitiche.

Le procedure per l'assicurazione della qualità devono essere progettate, implementate e periodicamente revisionate al fine di monitorare l'andamento di ciascuna fase all'interno del processo di analisi (2,4,6,7,9).

6.1 Validazione delle metodologie d'analisi

La validazione dei metodi analitici include tutte quelle procedure atte a dimostrare che un particolare metodo, utilizzato per l'identificazione e/o la quantificazione di un analita in una data matrice biologica, è affidabile e riproducibile per l'uso per il quale è stato implementato.

Ogni metodologia d'analisi utilizzata di routine dal laboratorio deve essere preventivamente validata secondo procedure condivise a livello nazionale e internazionale. Per i metodi di screening più comunemente utilizzati non sono di solito necessarie procedure di validazione in quanto il metodo viene validato dalla ditta produttrice. Tuttavia ogni kit per le analisi è corredato da calibratori di controllo che, inseriti in ogni lotto di campioni da analizzare, verificano l'accuratezza e la precisione

delle analisi all'interno di un valore prestabilito. Nel caso vengano apportate modifiche alle indicazioni fornite dalle case produttrici dei kit, (ad esempio uso del kit per una matrice biologica differente da quella indicata dal produttore, variazione del limite di quantificazione, etc.) il laboratorio deve effettuare una validazione completa del metodo/kit modificato.

E' auspicabile evitare ogni modifica rispetto a quanto indicato dalla Ditta produttrice nell'utilizzo di un kit ; una eventuale modifica dovrebbe essere effettuata solo nei casi in cui non si abbia la possibilità di utilizzare altre metodologie (2,4,6,7,9).

La procedura di validazione adottata dai laboratori deve tenere conto dei seguenti parametri:

- **Accuratezza** intesa come il grado di accordo tra il valore trovato ed il valore che si è accettato convenzionalmente come vero; il valore di accuratezza espresso come bias% non deve essere superiore al 15%, per ogni livello di concentrazione ad eccezione dell'esattezza al valore di LLOQ che non deve essere superiore al 20%.
- **Precisione** intesa come la misura di accordo fra misure ripetute dello stesso campione nelle identiche circostanze o in circostanze sostanzialmente simili; tale valore espresso come CV % non deve superare il 15% per i campioni con una concentrazione pari ai tre controlli di qualità (alto, medio e basso), e il 20% per i campioni con una concentrazione pari al LLOQ, il CV non deve essere superiore al 20%;
- **Limite di rilevazione (LOD)** che rappresenta la minima quantità rilevabile dalla strumentazione per ogni singolo analita
- **Limite di quantificazione (LOQ)** che rappresenta la più bassa concentrazione di analita, che fornisce un picco identificabile con una precisione del 20% e un'inaccuratezza del 15%. Il LOQ dovrebbe essere utilizzato come punto più basso della curva di calibrazione per ogni singolo analita;
- **Selettività del metodo:** al fine di valutare una interferenza analitica da parte di composti di natura endogena presenti nelle matrici biologiche; l'assenza di interferenti è accettata quando la risposta per gli analiti è al di sotto del 20% del limite inferiore di quantificazione (LLOQ) e del 5% per lo Standard Interno (IS);
- **Linearità del metodo** cioè la sua capacità di dare risultati analitici che sono direttamente proporzionali alla concentrazione degli analiti nei campioni all'interno di un range di concentrazioni prestabilito; la linearità viene stabilita attraverso una curva di calibrazione che copra un intervallo di valori significativi e descritta da una equazione di tipo lineare;
- **Effetto matrice** parametro da valutare attentamente durante lo sviluppo di un metodo poiché può generare una soppressione o, più raramente, un incremento del segnale, inficiando la qualità del dato; il suo valore non deve superare il 20%, in caso contrario il metodo o la estrazione del campione dovrebbero essere modificati;
- **Effetto trascinamento o carry-over** va studiato attentamente e minimizzato durante lo sviluppo di un metodo; tale effetto viene valutato iniettando campioni bianchi (o neat, per gli analiti endogeni) dopo il calibratore a più alta concentrazione di analita o dopo un campione con una concentrazione vicina al limite di quantificazione più alto; il valore di carry-over nel bianco dopo un campione ad alta concentrazione non deve essere maggiore del 20% del LLOQ e del 5% per l'IS
- **Recupero** rappresenta un valore fondamentale per valutare l'efficienza di una procedura di estrazione del campione. Il recupero dell'analita non deve essere necessariamente al 100%, i criteri di accettazione sono soddisfatti quando i risultati sono tra 90-110%
- **Stabilità** è una parte importante del metodo di validazione al fine di garantire una corretta gestione di tutti i reagenti e dei campioni durante l'intero processo di analisi
- **Test della integrità della diluizione** tale valutazione è fondamentale poiché può essere necessario diluire il campione e la diluizione deve essere una parte di un metodo validato; in questo caso l'inaccuratezza e il bias che ne derivano devono essere al di sotto del 15%.

6.2 Controllo di qualità interno

Utilizzare un programma di qualità interno è fondamentale al fine di garantire l'affidabilità dei risultati analitici e permettere di evitare gli errori casuali che possono avvenire in fase analitica e/o pre o post-analitica rendendo il risultato non accurato (2,4,6,7,9)

6.3 Valutazione Esterna di Qualità (VEQ)

Un laboratorio deve partecipare ad adeguati programmi di valutazione esterna della qualità. Le performance analitiche al di fuori dei criteri stabiliti dal programma di VEQ devono essere prontamente corrette. La scelta di un programma a cui partecipare deve essere fatta sulla base del miglior riscontro scientifico ottenibile. La partecipazione può riguardare la identificazione delle classi di sostanze o delle singole sostanze e la quantificazione nel caso delle analisi di conferma secondo i cut-off di Legge o stabiliti dall'ente gestore del programma. Nel caso dei test di screening, l'espressione dei risultati è in genere in termini di "positivo" o "negativo". In caso di analisi di conferma, è necessario fornire non solo un dato qualitativo, ma anche uno quantitativo, ossia la concentrazione rilevata secondo una data curva di calibrazione per l'analita identificato come presente nella matrice biologica esaminata. I risultati della partecipazione alla VEQ costituiscono un possibile oggetto di riflessione tra il personale del laboratorio e il direttore dello stesso, sulla performance del laboratorio poiché nel caso in cui ci siano errori è fondamentale individuarne le cause e apportare le correzioni necessarie al fine di impedire il ripetersi di tali errori. È opportuno conservare i risultati in formato cartaceo e telematico per almeno tre anni ((2,4,6,7,9).

7. Accertamenti tossicologici stabiliti da Normative di Legge

7.1 Procedure accertative per lavoratori con mansioni a rischio

L'Italia è uno tra i pochi paesi europei che ha una Legge in tema di accertamenti tossicologici sui lavoratori. Il Provvedimento del 18 settembre 2008, pubblicato sulla G.U. 236 del 8/10/2008 "Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi" (16) ha attuato e reso applicative le indicazioni presentate della Conferenza Unificata Stato-Regioni (Provvedimento n. 99/cu 30 ottobre 2007 - G.U. n. 266 del 15 novembre 2007). La Legge mette in evidenza l'obbligatorietà del datore di lavoro di sottoporre a specifica sorveglianza sanitaria le categorie di lavoratori che sono elencate nell'allegato I del Provvedimento. Le procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di alcoldipendenza, consumo eccessivo di alcol, tossicodipendenza e/o assunzione di sostanze stupefacenti allo scopo di definire ed attivare procedure e misure di sicurezza rivolte a tutelare l'incolumità del lavoratore stesso e di terze persone, devono essere finalizzate primariamente a prevenire incidenti collegati allo svolgimento di mansioni lavorative a rischio. Ricordiamo che l'iter procedurale si compone di due distinti momenti; il primo momento è indicato al fine di prevenire l'inizio di una attività lavorativa a rischio sotto l'influenza di alcol e/o sostanze di natura psicotropa, mentre il secondo momento è fondamentale per escludere una condizione di consumo eccessivo di alcol o dipendenza da alcol e da sostanze anche se con assunzioni occasionali. Il medico competente, una volta ricevuto l'elenco dei lavoratori da monitorare, ha 30 giorni di tempo per determinare la data e l'ora del test e il controllo deve essere comunicato al lavoratore con un preavviso massimo di 24 ore (la Legge non prevede un limite minimo di preavviso) (18).

7.1.1 Matrici utilizzate

Accertamenti per la valutazione di una influenza di alcol e/o sostanze stupefacenti nel lavoratore all' inizio del turno lavorativo

Per gli accertamenti analitici eseguiti al fine di escludere **una influenza di alcol e/o sostanze stupefacenti nel lavoratore all' inizio del turno lavorativo** risulta fondamentale la scelta della matrice biologica da raccogliere in modo semplice dal medico competente e correlabile alla matrice di elezione utilizzata per stabilire l'attualità d'uso cioè il sangue. A tal proposito è importante richiamare le linee di indirizzo per la “prevenzione degli infortuni gravi e mortali correlati all'assunzione di alcolici e sostanze stupefacenti, l'accertamento di condizioni di alcol dipendenza e tossicodipendenza e il coordinamento delle azioni di vigilanza”, inviate nel 2018 dal Ministero della Salute alla Conferenza Permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le province Autonome, dove risulterebbero indicate le seguenti matrici:

- **Alcol: l'aria espirata** attraverso l'utilizzo di strumentazioni portatili quali gli etilometri;
- **sostanze psicotrope: la saliva** sulla quale dovrebbero essere eseguiti inizialmente dei test di screening ed in caso di positività i test di conferma.

La normativa attuale prevede per l'alcol l'uso dell'aria espirata (etilometro), per le sostanze invece un esame su matrice urinaria (fermo restando la possibilità di eseguire test analitici immunochimici on site, il medico competente può fare ricorso a laboratori autorizzati).

- **Urina.** Verranno prelevate 3 aliquote indicate con le lettere A, B e C utilizzate per le analisi di screening, conferma ed eventuale revisione come riportato nei precedenti capitoli;

Il lavoratore risultato **positivo** a tali accertamenti, viene considerato temporaneamente inidoneo e inviato dallo stesso medico competente, alla struttura sanitaria, identificata nel Servizio per le Dipendenze (SerD) che oltre agli accertamenti di natura medica effettuerà anche accertamenti chimico-tossicologici su nuovi campioni.

Accertamenti per la valutazione di assenza di alcoldipendenza, consumo eccessivo di alcol, tossicodipendenza o di assunzione di sostanze

Per gli accertamenti analitici volti a verificare uno stato di assenza di **tossicodipendenza o di assunzione di sostanze** le matrici utilizzate sono le seguenti:

- **Urina** Verranno prelevate 3 aliquote indicate con le lettere A,B e C utilizzate per le analisi di screening, conferma ed eventuale revisione come riportato precedentemente nel capitolo 2.2
- **Matrici cheratiniche** Il campione deve essere raccolto da un operatore sanitario qualificato secondo le indicazioni riportate nel capitolo 2.5.1 ed inviati a laboratori di tossicologia forense autorizzati o ai laboratori delle strutture sanitarie competenti

Per gli accertamenti volti a verificare uno stato di assenza di **alcoldipendenza e consumo eccessivo di alcol** le matrici biologiche utilizzate sono le seguenti :

- **Sangue** per la ricerca del bio-marcatore transferrina desialata (CDT)
- **Matrice pilifera** per la determinazione del bio-marcatore EtG.

Valori soglia

Le procedure operative per le mansioni a rischio sono al momento le uniche procedure che prevedono valori soglia stabiliti per Legge sia per le analisi di screening sia per le analisi di conferma nelle due matrici prese in esame. I valori vengono riportati nelle tabelle successive.

Si riportano di seguito i valori soglia relativi ai test di screening e conferma nella matrice urinaria e di conferma nella matrice pilifera contenuti nel Provvedimento del 18 settembre 2008.

Tabella 9. Concentrazioni soglia (cut-off) nei test di screening in matrice urinaria riportate dal Provvedimento del 18 settembre 2008

Classe di sostanza	Cut-off (ng/mL)
Oppiacei Metaboliti	300
Cocaina Metaboliti	150
Cannabinoidi (THC)	50
Amfetamina, Metamfetamina	500
Metilediossimetamfetamina (MDMA)	500
Metadone	300

Tabella 10. Concentrazioni soglia (cut-off) nei test di conferma in matrice urinaria riportate dal Provvedimento del 18 settembre 2008

Classe di sostanza	Cut-off (ng/mL)
Oppiacei metaboliti (morfina, codeina, 6-acetil morfina)	100
Cocaina e metaboliti	100
Cannabinoidi metaboliti	15
Metadone	100
Amfetamine ed analoghi	
Amfetamina	250
Metamfetamina (MA)	250
Metilediossimetamfetamina (MDMA)	250
Metilediossiamfetamina (MDA)	250
3,4-metilediossi-N-etilfetamina (MDEA)	250
Buprenorfina	5

Tabella 11. Concentrazioni soglia (cut-off) nei test di conferma nella matrice cheratinica riportate dal Provvedimento del 18 settembre 2008

Classe di sostanza	Cut-off (ng/mg)
Oppiacei metaboliti (morfina, codeina, 6-acetil morfina)	0.2
Cocaina	0.2
Benzoilecgonina	0.05
Cannabinoidi metaboliti	0.1
Metadone	0.2

Amfetamine ed analoghi	
Amfeamina	0.2
Metamfetamina (MA)	0.2
Metilediossimetamfetamina (MDMA)	0.2
Metilediossiamfetamina (MDA)	0.2
3,4-metilendiossi-N-etilfetamina (MDEA)	0.2
Buprenorfina	0.05

Per i valori soglia relativi ai marcatori dell'abuso alcolico nei capelli si fa riferimento ai valori raccomandati dalla SOHT (Tabella 7)

7.3 Procedure accertative per articolo 186 e 187 del Codice della Strada

Gli accertamenti sanitari per valutare la guida sotto l'influenza di alcol e/o sostanze stupefacenti hanno lo scopo di tutelare la salute pubblica e prevenire di incidenti stradali conseguenti all'uso di tali sostanze, sia nell'interesse del conducente sia di tutti gli altri possibili soggetti interessati (altri conducenti, passeggeri, pedoni).

7.3.1 Matrici utilizzate in caso di fermo

- **Aria espirata** attraverso apparecchiature strumentali in dotazione alle Forze di Polizia per la valutazione di assunzione di **alcol al momento del fermo**;
- **Saliva** raccolta mediante dispositivi commerciali strumentali in dotazione alle Forze di Polizia per valutare **al momento del fermo** la presenza di sostanze stupefacenti;

7.3.2 Matrici utilizzate in caso di incidente stradale e successivo trasporto in struttura ospedaliera

- **Sangue intero** raccolto dal personale sanitario in strutture ospedaliere per stabilire la presenza di sostanze non modificate e/o loro metaboliti al fine di valutare la presenza dell'effetto farmaco-tossicologico in atto al momento del prelievo. Il prelievo ematico effettuato dal personale sanitario su richiesta della Polizia Giudiziaria (es. in caso di incidente stradale), costituisce un atto di polizia giudiziaria per il compimento del quale vi è l'obbligo di dare avviso all'interessato della facoltà di farsi assistere da un difensore.
- **Urina** raccolta contestualmente alla matrice ematica per indicare una avvenuta esposizione del soggetto a sostanze xenobiotiche che sebbene non sia utile per stabilire la cronologia può comunque essere utile per l'interpretazione dei risultati e sufficiente per procurare una sanzione amministrativa.

È importante ricordare che i prelievi effettuati dal personale sanitario (sangue e urine) dovrebbero essere effettuati nel minimo tempo possibile dalla avvenuta richiesta con orari vicini tra il prelievo ematico e quello urinario.

Inoltre i campioni raccolti per gli esami tossicologici dovranno essere sempre accompagnati dalla corretta modulistica (modulo di richiesta analisi, catena di custodia, consenso informato) e conservati in contenitori termici con elementi refrigeranti fino all'arrivo e alla presa in carico del laboratorio. È comunque fondamentale che i campioni biologici raccolti dal personale sanitario vengano inviati nel più breve tempo possibile al laboratorio stesso.

7.3.2 Risultati

La presenza di alcol etilico e/o sostanze psicoattive nella matrice ematica mette in evidenza quella che si definisce “attualità d’uso” che rappresenta pertanto la condizione di “**guida sotto l’effetto**”. La presenza di metaboliti inattivi di sostanze psicoattive nel sangue o di principi attivi e /metaboli **SOLO NELLE URINE** non permette di affermare che il soggetto sottoposto ad esami sia in uno stato di intossicazione. È comunque importante verificare che il soggetto non sia stato sottoposto a cure mediche con sostanze proibite durante il soccorso stradale e quindi prima del prelievo.

7.3.3 Cosa succede se in caso di fermo si è positivi ad alcol e/o sostanze stupefacenti

Quando si viene fermati per guida in stato di ebbrezza da alcol e/o stupefacenti, oltre alle sanzioni amministrative e/o penali previste, il Prefetto dispone la revisione dei requisiti psicofisici per la guida. Tale revisione è un provvedimento cautelare disposto per Legge e va effettuata presso la Commissione Medica Locale Patenti (CML) competente per territorio di residenza del sanzionato. Al fine di valutare che la persona sottoposta a fermo abbia i requisiti psicofisici di idoneità alla guida e sia in grado di dissociare la guida dal consumo di alcol e/o sostanze d’abuso la CML predispone dei controlli successivi nel tempo ai quali è obbligatorio sottoporsi.

7.3.4 Analisi effettuate per la valutazione del consumo di alcol

Matrice Sangue

Possono essere eseguite le seguenti analisi con marcatori aspecifici:

- Transaminasi
- Gamma Glutamil Transferas (γ -GT)
- Proteine
- Emocromo (MCV)

Questi accertamenti vengono effettuati per avere un quadro generale dello stato epatico e della eventuale sofferenza epatica che può essere indotta dall’alcol o da un volume dei globuli rossi notevolmente aumentato, ma poiché tali marcatori possono essere alterati per altre diverse patologie e sono influenzati da molti fattori biologici (età, sesso, genetica) e iatrogeni, risultano non fondamentali per valutare l’idoneità richiesta e pertanto non possono essere utilizzati da soli, senza l’utilizzo di marcatori diretti.

Sono eseguite le analisi con un marcatore specifico:

- CDT o transferrina carboidrato carente (Carbohydrate-Deficient Transferrin)

È un indicatore di consumo recente di alcol, con un range di valori considerato normale, un range considerato dubbio e un range indice di abuso di alcol.

Matrice Pilifera

- EtG o EtilGlicuronide

È un marcatore specifico e diretto poiché metabolita epatico dell’alcol, si deposita sul capello e viene richiesto per avere una visione storica del consumo di alcol.

7.3.5 Valori soglia

Per La CDT si raccomanda ad ogni Laboratorio di definire il proprio livello decisionale o valore soglia in base al metodo utilizzato, alla imprecisione, alla popolazione di riferimento e allo scopo per cui è eseguita la determinazione della CDT. Seguendo le linee guida IFCC è comunque consigliata la espressione in % con un cut off < 2 .

Per i valori soglia dell' EtG nella matrice pilifera è possibile fare riferimento alle tabelle riportate nei capitoli precedenti

7.3.6 Analisi effettuate per la valutazione del consumo di sostanze psicotrope

Le matrici biologiche sulle quali vengono effettuato gli accertamenti analitici sono:

Urina

- Verranno prelevate 3 aliquote indicate con le lettere A, B e C utilizzate per le analisi di screening, conferma ed eventuale revisione come riportato nei precedenti capitoli;

Matrice pilifera la lunghezza minima esaminata è di 3 cm.

Si ricerca la presenza degli stupefacenti di maggiore diffusione e consumo:

- oppiacei (eroina, morfina, ecc.)
- cocaina
- THC (tetraidrocannabinoidi, ovvero tutti i derivati della cannabis)
- metamfetamina
- extasy
- ketamina
- metadone
- buprenorfina
-

La procedura descritta è quella prevista per i controlli relativi alla prima infrazione commessa e rilevata all'art.186 e 187; i controlli saranno più severi e marcati nel tempo se viene commessa una seconda infrazione entro i due anni dalla prima (recidiva) o dopo i due anni dalla prima infrazione (fatto reiterato), ma comunque l'impegnativa redatta su apposito modulo dalla CML, riporterà gli esami richiesti, nonché la sede e la lunghezza della matrice e a questa richiesta il laboratorio dovrà attenersi. Da ricordare che tali esami non sono a carico del SSN e sono quindi a carico dell'utente.

Conclusioni

Le determinazioni analitiche delle sostanze stupefacenti e psicotrope nelle matrici biologiche richiedono sempre una particolare attenzione soprattutto se tali determinazioni assumo carattere medico-legale e considerate prove in ambito amministrativo o penale. Devono infatti possedere dei requisiti di attendibilità e affidabilità del dato che deve essere correttamente interpretato. Lo scopo di queste Procedure Analitiche è quindi quello di fornire indicazioni di carattere generale che possano essere condivise fra i laboratori che effettuano accertamenti analitici anche con finalità forensi al fine di uniformare le procedure analitiche ed organizzative dei laboratori stessi e che possano essere utilizzate come "strumento iniziale" per quei laboratori che progettano di effettuare analisi sulle sostanze stupefacenti e psicotrope in matrici biologiche fornendo così un servizio di qualità.

Bibliografia

1. Zuccaro P, Marchei E, Pellegrini M, Palmi I, Mortali C, Pichini S. Il dosaggio delle droghe d'abuso nelle urine e nei capelli: linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità. ESA DIA Roche (2004) 20:10-15
2. Favretto, D., Pichini, S., Bucchioni, P., Pacifici R. Linee Guida in materia di analisi su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali. Documento di Consenso Gruppo

Tossicologi Forensi – Gruppo di Studio di Farmacotossicologia e Doping Sibioc sulle Indagini di Laboratorio per la determinazione delle Sostanze d'Abuso. Bioch.Clin (2017)..; Vo41(3) 91

3. Pacifici R, Gori P, Martucci L, et al. Considerazioni sulle matrici biologiche idonee alla valutazione dell'“attualità”uso di sostanze illecite” ai fini degli articoli 186 e 187 del nuovo Codice della Strada. Biochim Clin 2014; 38:27-31
4. Pichini S, Pacifici R, Mortali C, Gori P, Marchei E, Marchioro L, Martucci L, Palmi I, Pellegrini M, Rotolo MC. “Linee Guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nelle urine” Istituto Superiore di Sanità; Ottobre 2013
5. Ciancio G M, Pellegrini M, Berretta P, Minutillo A, Castaldo P, Busardò FP, Rotolo MC L'utilizzo della matrice urinaria in tossicologia forense Biochim Clin.2023;.47: SS1
6. Pichini S, Pacifici R, Mortali C, Gori P, Marchei E, Martucci L, Palmi I, Pellegrini M, RotoloMC. “Linee Guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella saliva” Istituto Superiore di Sanità; Ottobre 2013
7. Pichini S, Bucchioni P, Pellegrini M, Pacifici R. “Procedure operative per la determinazione delle sostanze d'abuso su sangue” Istituto Superiore di Sanità; Giugno 2017
8. Pichini S, Bucchioni P, Busardò FP, Bertol E, Ruggieri MP, Basili E, Lecce MG , Leonardi C, Berretta P, Pacifici R, Pellegrini M. Procedure analitiche e valori decisionali ematici per accertare la guida in stato di alterazione psicofisica da sostanze d'abuso Biochim Clin. 2023; 47: 370-376
9. Pichini S, Pacifici R, Gori P, Marchei E, Martucci L, Mastrobattista L, Palmi I, Pellegrini M, Rotolo MC. “Linee Guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera” Istituto Superiore di Sanità; Ottobre 2013
10. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing for urine. Programs Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA), Department of Health and Human Services (HHS). Federal Register , 2022; 87, 67 : 20560-20605
11. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing for oral fluid. Programs Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA), Department of Health and Human Services (HHS). Federal Register 2022;87, 67: 20522-20557
12. European Guidelines for Workplace Drug Testing in Urine European Workplace Drug Testing Society 2022
13. European Guidelines for Workplace Drug Testing in Oral Fluid European Workplace Drug Testing Society 01-11-2022
14. Soht Consensus On Drugs Of Abuse (Doa) Testing In Hair 2021
15. Soht Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption 2019

16. Strano Rossi S, Frison G, Chericoni S, Bertol E, Favretto D, Pichini S, Salomone A, Tagliaro F, Vignali C Linee guida per la determinazione di sostanze stupefacenti e psicotrope su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio 2023 Oct

18. Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi. GU Serie Generale n.236 del 08-10-2008)