

Linee guida per i laboratori di analisi delle sostanze di abuso in campioni biologici*

Renata Borriello, Marina Caligara, Marcello Chiarotti, Santo Davide Ferrara, Roberto Gagliano Candela, Fausto Gigli, Manuela Licata, Paolo Procaccianti

Riassunto

Vengono elencate nei dettagli le procedure operative per la raccolta, la conservazione e l'analisi tossicologica e medico legale con particolare riguardo per la sicurezza e la catena di custodia oltre che per l'adozione di procedure analitiche certificate ed i controlli di qualità. Le linee guida sono il frutto di un consensus allargato che ha coinvolto società scientifiche ed esperti.

Parole chiave: Analisi tossicologiche, Campioni biologici, Controlli di qualità, Catena di custodia

Abstract

Guidelines for the laboratory analysis of substances of abuse in biological samples

The Authors provide details of the procedures for the collection, conservation and the toxicological and forensic analysis of biological samples. Particular attention is given to safety and the chain of custody, and to the use of certified analysis procedures and quality control. These guidelines are the outcome of a wide consensus on the part of the scientific and expert community.

Keywords: Toxicological analysis, Biological samples, Quality control, Chain of custody

Presentazione delle Linee Guida

Tra i Tossicologi Forensi, il percorso verso la definizione di Linee Guida per i laboratori che si occupano di analisi delle sostanze d'abuso, nei liquidi biologici, a fini medico legali, ha inizio a Pavia nel Novembre 1998.

In tale data, nel corso di una assemblea plenaria dei soci del Gruppo Tossicologi Forensi della Società Italiana di Medicina Legale e delle Assicurazioni (GTF della SIMLA), fu affidato ad un gruppo di lavoro ⁽¹⁾ il mandato di elaborare una proposta in tema di "Qualità Totale". Tale compito fu svolto con impegno, nella convinzione che la disciplina dovesse porsi "al passo" delle società scientifiche internazionali (SOFT, TIAFT, ABFT) che proprio in quegli anni avevano già prodotto proposte operative in tema di qualità ed accreditamento. Inoltre la promulgazione

in Italia di una serie di norme che prevedevano il coinvolgimento anche di strutture del servizio sanitario nazionale per l'esecuzione di indagini tossicologiche con finalità medico-legali, richiedeva un'attenta riflessione sulla affidabilità e sulla omogeneità metodologica dei dati di laboratori prodotti sia negli istituti di medicina legale, pur se storicamente collaudati nello svolgimento di tali indagini, che nelle altre strutture laboratoristiche del SSN.

Era infatti condivisa nel GTF la consapevolezza che, a garanzia della qualità delle prestazioni tossicologiche, non fosse più sufficiente l'esperienza di singoli operatori afferenti a ciascun laboratorio ma che occorresse individuare criteri e procedure comuni, utilizzabili ai fini di una valutazione oggettiva delle prestazioni fornite all'utenza, visto che ad esse è attribuito un valore di prova giudiziaria.

Il primo "documento-proposta" elaborato dal gruppo di

* Proposta elaborata dal Gruppo di lavoro istituito presso il Ministero della Salute nel giugno 2001 del Gruppo Tossicologi Forensi della Società Italiana di Medicina Legale e delle Assicurazioni.

lavoro fu oggetto di relazione al VII Congresso Nazionale di Tossicologia Forense, svoltosi nell'ottobre 1999 a Cagliari, ed ivi fu occasione di ampia discussione nell'Assemblea Plenaria.

La verifica del consenso su tale "proposta" fu affidata ad un Questionario distribuito ai presenti, allo scopo di integrare con suggerimenti e proposte il documento elaborato. Il recepimento di tutti i contributi dei soci del GTF consentì di presentare il II elaborato del gruppo di lavoro, al XXXIII congresso Nazionale della SIMLA svoltosi a Brescia nell'Ottobre 2000.

L'iniziativa trovò inoltre sollecito consenso presso il Dipartimento di Prevenzione del Ministero della Salute poiché congruente con il Progetto "Rete Nazionale dei laboratori tossicologici universitari di riferimento" proprio in vista degli obiettivi di formazione e di coordinamento che tale "Rete" avrebbe dovuto svolgere nei confronti dei laboratori del SSN.

Per tali motivi, su richiesta del Ministero della Salute, fu esteso il gruppo di lavoro ad altre sedi universitarie ⁽²⁾, con il compito di interagire con il GTF e l'Istituto Superiore di Sanità, per la preparazione di un ulteriore documento.

Sulla scorta di una più approfondita disamina delle esigenze culturali ed operative nel settore della diagnostica tossicologica a fini medico-legali, le "Linee Guida" elaborate da tale gruppo, risultano quindi non solo calibrate, come le precedenti sugli aspetti strutturali ed organizzativi generali dei laboratori tossicologici ma affrontano, in misura più specifica, aspetti meglio caratterizzanti la qualità analitica (Glossario, catena di custodia, procedure operative standard, procedure analitiche, controllo di qualità etc.).

Nel Giugno 2001, nell'ambito del VIII Congresso Nazionale di Tossicologia Forense svoltosi a Badia a Passignano (FI), è stato dedicato ampio spazio alla presentazione ed alla discussione delle "Linee Guida" ed è stato richiesto il contributo dei soci del GTF attraverso un secondo questionario.

Le "LINEE GUIDA" seguenti rappresentano pertanto lo stato di elaborazione e consenso sinora raggiunto e condiviso. È evidente che l'estensione di tali "Linee Guida" nel S.S.N., almeno per i laboratori che saranno deputati a svolgere attività diagnostiche, a fini medico-legali, in tema di abuso di sostanze illecite, richiederà un più ampio dibattito e l'estensione delle procedure di consenso. Tale ulteriore fase è da ritenersi prioritaria alla pianificazione di un Progetto di "accreditamento tra pari" sempre più urgente ed opportuno alla luce della legislazione vigente.

1. Scopo delle Linee Guida

1.1 Poiché gli accertamenti tossicologici in tema di analisi delle sostanze d'abuso nei reperti biologici, possono assumere carattere di prova giudiziaria, vi è la necessità, non solo di migliorare la qualità analitica, ma soprattutto di uniformare a livello nazionale tutte le procedure analitiche ed organizzative.

1.2 I laboratori autorizzati ad eseguire le suddette anali-

si, dovrebbero pertanto attenersi ai principi enunciati nell'ambito delle presenti linee guida sotto il profilo organizzativo e metodologico, al fine di rispettare requisiti - uniformi e verificabili - che garantiscano la sicurezza di qualità.

1.2.1 Tali requisiti riguardano:

- l'organigramma del personale, con individuazione dei compiti e delle relative responsabilità;
- le procedure di acquisizione dei campioni e di analisi degli stessi;
- l'interpretazione dei risultati, anche in funzione dei valori di cut-off predeterminati;
- il monitoraggio interno ed esterno dell'affidabilità analitica;
- le modalità di refertazione.

1.3 La conformità alle linee-guida definite in questo documento, costituisce un elemento fondamentale per implementare un sistema qualità che permetta la verifica dei requisiti dichiarati, divenendo una componente essenziale di un eventuale processo di "accreditamento all'eccellenza".

1.3.1 Ai fini delle presenti linee-guida i laboratori deputati all'esecuzione di analisi delle droghe d'abuso nel materiale biologico, con finalità diagnostiche di tipo amministrativo o medico legale, saranno indicati più semplicemente come "laboratori di analisi tossicologiche".

1.4 È auspicabile che i laboratori di analisi tossicologiche adottino una politica di verifica della qualità, intesa come eccellenza del risultato ed efficienza organizzativa, con i seguenti obiettivi:

- costante miglioramento dello standard di qualità del servizio fornito;
- qualità come responsabilità di tutti;
- responsabilizzazione del personale nell'assicurare la qualità del lavoro svolto nell'ambito della propria funzione;
- diffusione della Politica della Qualità a tutto il personale del Laboratorio.

1.4.1 A tal fine dovrebbe essere implementato un sistema di garanzia della qualità verificabile mediante:

- adozione di procedure scritte che regolino le attività principali;
- verifica dell'adeguatezza e della corretta esecuzione delle attività;
- misurazione dell'efficienza del Sistema Qualità.

2. Personale

2.1. La direzione del laboratorio di analisi tossicologiche comporta l'assunzione di responsabilità professionali, organizzative, educative ed amministrative.

2.1.1 Per tale carica è necessaria una laurea in discipline scientifiche idonee, accompagnata da una specifica competenza in diagnostica chimico-tossicologica, documentabile dal percorso formativo, dall'esperienza pratica, dall'aggiornamento e da pubblicazioni attinenti.

2.1.2 Il direttore deve assicurarsi che il personale del

laboratorio sia adeguatamente qualificato, addestrato e aggiornato. Deve assicurare inoltre il rispetto delle procedure contenute nel manuale del laboratorio.

2.1.3 Nel laboratorio debbono essere messe in atto procedure finalizzate alla tutela della incolumità degli operatori ed in particolare deve essere fornita adeguata indicazione delle manipolazioni dei procedimenti analitici a rischio per la salute. Devono essere adottati sistemi di prevenzione ed il loro utilizzo deve essere costantemente monitorato. La manipolazione e lo smaltimento dei materiali a rischio deve essere rigorosamente regolamentata. Devono essere attuate misure idonee a garantire la possibilità di interventi di prima urgenza nei confronti degli infortunati.

2.2 Il personale preposto alle analisi deve essere adeguato in relazione al numero degli accertamenti e deve essere in grado di eseguire le procedure analitiche prestabilite.

2.2.1 È indispensabile la presenza di almeno un laureato in discipline scientifiche idonee, con adeguata esperienza in tossicologia analitica (documentabile dal percorso formativo, dall'esperienza pratica, dall'aggiornamento e da pubblicazioni) che supervisioni il lavoro e verifichi i risultati dei vari test eseguiti, assumendo il ruolo di responsabile della qualità.

3. Definizioni

Accreditamento: processo volontario, volto al miglioramento continuo della qualità, mediante il quale un organismo indipendente valuta se un'istituzione od un programma soddisfano requisiti predeterminati.

Analisi di conferma: seconda analisi da eseguirsi con una metodica dotata di maggiore specificità rispetto a quella impiegata per lo screening, su una differente aliquota del campione originale, al fine di identificare e/o quantificare la presenza di una sostanza o dei suoi metaboliti.

Analisi di screening: analisi preliminare che determina, in riferimento a cut-off prestabiliti, la positività o la negatività di un campione.

Analisi tossicologiche con finalità medico-legali: ai fini delle presenti linee guida, sono analisi eseguite su materiale biologico, in particolare delle droghe d'abuso, a fini amministrativi ovvero medico-legali, e che pertanto possono assumere carattere di prova giudiziaria.

Batch: gruppo di campioni che viene esaminato in serie.

Analisi qualitativa: analisi tossicologica che fornisce soltanto un risultato in termini di presenza/assenza di un analita.

Analisi quantitativa: analisi tossicologica in grado di esprimere la concentrazione dell'analita nel campione biologico esaminato.

Catena di custodia: procedure documentate da adottare in tutte le operazioni di laboratorio, dal prelievo allo smaltimento, per garantire l'integrità del campione.

Cut-off o valore soglia: limite di concentrazione definito per stabilire se un campione è positivo o negativo.

Controllo cieco: campione contenente una predetermi-

nata concentrazione di analita o negativo, usato per valutare l'abilità del laboratorio nell'esecuzione di uno specifico test; il laboratorio non conosce la concentrazione.

Controllo noto: campione contenente una quantità definita di analita, allestito in matrice biologica simile a quella dei campioni reali.

Controllo di qualità esterno: monitoraggio esterno dell'affidabilità analitica del laboratorio, valutata attraverso i risultati quali-quantitativi ottenuti dall'analisi di una serie di controlli ciechi.

Controllo di qualità interno: monitoraggio delle metodologie adottate dal laboratorio attraverso l'analisi di controlli ciechi e controlli noti.

CV: coefficiente di variazione o deviazione standard relativa, frequentemente utilizzato per misurare la riproducibilità. È dato dal rapporto percentuale della deviazione standard sul valore medio.

LOD: limite di rilevabilità, calcolato in base al valore pari, generalmente, a tre volte la deviazione standard.

LOQ: limite di quantificazione, può essere calcolato addizionando al valore del bianco, dieci volte la deviazione standard; tuttavia è preferibile determinare il LOQ sperimentalmente come la concentrazione più bassa per ottenere routinariamente un CV accettabile.

Procedure Operative Standard: sequenze ordinate di azioni, eventi, necessari allo svolgimento dell'analisi in condizioni standardizzate ed in uso nel laboratorio.

Risultato Negativo: mancata identificazione dell'analita in accordo con i protocolli analitici propri del laboratorio.

Risultato Positivo: identificazione dell'analita in accordo con i protocolli analitici propri del laboratorio.

Sistema Qualità: insieme delle procedure e dei processi reali che in una organizzazione presidiano lo sviluppo continuo della qualità.

Tracce: espressione semiquantitativa utilizzabile per indicare la presenza di un analita in concentrazioni inferiori al calibratore più basso nel sistema analitico impiegato.

4. Procedure operative standard

4.1 Il laboratorio di analisi tossicologiche con finalità diagnostiche medico-legali deve raccogliere, in forma documentale, la descrizione dei criteri di svolgimento delle attività relative all'effettuazione di analisi (a partire dalla fase di accettazione delle richieste di analisi, per finire alla consegna dei referti analitici). Tale documentazione, che deve garantire lo svolgimento delle procedure analitiche secondo caratteristiche verificabili in tema di qualità e che potrebbe essere identificata con il Manuale della Qualità, deve comprendere una raccolta delle Procedure Operative Standard, contenenti il dettaglio di tutte le operazioni di laboratorio.

4.2 La descrizione dei criteri di svolgimento delle attività relative all'effettuazione di analisi deve essere completa nei suoi contenuti, aggiornata e sempre disponibile al personale impegnato nell'esecuzione delle analisi. Deve includere le procedure amministrative. Deve essere redatta

dal responsabile della assicurazione di qualità e deve essere controfirmata dal Direttore del laboratorio, con data della prima stesura e di ogni successiva revisione.

4.3 L'esecuzione delle procedure secondo documenti costantemente aggiornati e controllati assicura che tutti i campioni vengano trattati ed analizzati in modo omogeneo e riproducibile.

La descrizione dei criteri di svolgimento delle attività relative all'effettuazione di analisi deve includere una descrizione dettagliata dei seguenti punti:

- procedure adottate per la catena di custodia;
- procedure di ricezione ed accettazione del campione;
- controlli di qualità, interni ed esterni;
- apparecchiature, utilizzo e manutenzione;
- procedure di gestione del sistema informativo;
- formazione ed aggiornamento del personale;
- elenco delle procedure operative standard;
- modalità di trascrizione dei risultati;
- tutela e riservatezza dei risultati.

4.4 Ciascuna procedura operativa standard deve riportare dettagliatamente:

- finalità dell'analisi;
- principio del metodo analitico con eventuali riferimenti bibliografici;
- dettagli operativi con riferimento a: reagenti (composizione, preparazione; precauzione d'uso, conservazione; caratteristiche di instabilità o deterioramento); preparazione del campione, dei calibratori e dei controlli;
- caratteristiche di specificità, sensibilità, precisione e accuratezza.

4.5 Ogni revisione delle procedure operative standard deve essere registrata e le procedure modificate o sostituite devono comunque essere conservate in un archivio facilmente consultabile.

5. Campioni biologici

5.1 Le analisi tossicologiche orientate a varie finalità diagnostiche, possono avvalersi dell'esame di diversi campioni biologici (sangue, urina, capelli, saliva, sudore) che permettono da soli od in combinazione tra loro di esprimere diagnosi con valenza medico-legale in più fattispecie, tra cui: idoneità alla guida, infortunistica stradale, mansioni lavorative a rischio, porto d'armi, idoneità a specifiche norme concorsuali, affidamento di minori, annullamento di matrimonio, etc.

5.2 Il laboratorio preposto all'analisi tossicologica dovrebbe poter garantire l'esecuzione di analisi almeno sui seguenti campioni biologici: sangue, urina, capelli.

5.3 La valutazione della attualità della intossicazione può avvalersi, motivatamente, del solo accertamento ematico.

5.4 La minima quantità di campione biologico ritenuta sufficiente per l'esecuzione di analisi tossicologiche deve essere chiaramente indicata nelle procedure operative standard e tale quantità deve essere congrua con la possibilità di ripetizione dell'analisi, con il numero degli analiti og-

getto d'indagine, con la finalità qualitativa e/o quantitativa dell'esame.

5.5 Per ogni campione biologico debbono essere chiaramente indicate le modalità di prelievo, conservazione, eventuale trasporto, nonché le condizioni di stoccaggio.

5.6 Il laboratorio può adottare un sistema qualità anche nei confronti di una sola delle diverse tipologie di materiale biologico sopra indicate. In tal caso il laboratorio potrà indicare la conformità alle linee guida soltanto per quella tipologia di campione biologico.

5.6.1 Il sistema qualità può essere inoltre adottato per uno o più analiti, può essere limitato alla sola analisi di screening (con valutazione esclusivamente qualitativa), ovvero comprendere anche l'analisi di conferma con espressione del risultato in termini quantitativi).

6. Sicurezza e catena di custodia

6.1 L'accesso al laboratorio dovrebbe essere limitato soltanto alle persone autorizzate.

6.1.2 Le persone non autorizzate dovrebbero essere accompagnate e dovrebbero essere registrate su un apposito registro.

6.2 Per i laboratori che eseguono anche analisi tossicologiche su reperti non biologici, l'acquisizione, la manipolazione e lo stoccaggio dei campioni biologici deve avvenire in ambienti che evitino il rischio di contaminazione passiva.

6.3 Il laboratorio deve documentare l'adozione di procedure idonee a preservare le caratteristiche di un prelievo biologico, in tutte le operazioni di laboratorio cui è necessario sottoporlo, dal campionamento sino allo smaltimento. Deve inoltre fornire documentazione di tutte le operazioni cui il prelievo è sottoposto.

Tali procedure, caratterizzanti della catena di custodia, debbono essere indicate in un documento (che costituisce parte integrante del manuale della qualità) che definisca quanto segue:

6.3.1 Le modalità di registrazione del prelievo, che devono comprendere:

- le generalità del soggetto (rilevate attraverso un documento di identità);
- la data del prelievo;
- l'Ente richiedente e la finalità d'indagine (clinica, amministrativa, medico-legale etc.);
- eventuali terapie in corso;
- l'attribuzione a ciascun prelievo di un numero di protocollo, identificativo del campione, cui riferirsi in tutte le fasi successive.

6.3.2 Le caratteristiche del luogo di prelievo (con particolare riferimento ai campioni di urina), che devono assicurare:

- l'accessibilità solo a personale autorizzato, appartenente alla struttura;
- la disponibilità nel locale o nelle sue adiacenze, di appositi ripostigli ove il soggetto (che deve eseguire il prelie-

vo) depositerà borse ed ogni indumento non necessario (giacche, soprabiti, etc.);

- la possibilità di controllare che prima del prelievo il soggetto possa lavare accuratamente le mani ed asciugarle, solo dopo potrà accedere nel locale e ricevere il materiale per il campionamento;

- nel caso di prelievo di urine, nel locale (che deve garantire, se necessario, anche la possibilità di osservazione diretta) non dovrebbero essere disponibili fonti o materiali utilizzabili per la diluizione o l'adulterazione del campione (acqua corrente, contenitori di sapone, di disinfettanti, di detergenti per la pulizia del locale, etc.).

6.3.3 I compiti del personale che sovrintende o esegue il prelievo, che prevedono:

- l'informazione al soggetto, sottoposto ad accertamento, sulle modalità di campionamento, suddivisione ed etichettatura del campione biologico;

- la fornitura del materiale necessario al prelievo, integro e sigillato, e l'esecuzione di tutte le operazioni di suddivisione ed etichettatura del prelievo alla presenza dell'interessato;

- l'apposizione della firma sulle etichette e sulla sigillatura dei contenitori utilizzati;

- la "Dichiarazione di integrità e corretta identificazione dei prelievi" rilasciata dall'interessato;

- la segnalazione all'operatore di laboratorio, di qualsiasi sospetto di alterazione o non corretto campionamento, perché se ne tenga conto nelle fasi successive.

6.3.4 Le caratteristiche dei materiali utilizzabili per il campionamento, che debbono assicurare:

- la garanzia della corretta preservazione del reperto da qualsivoglia adulterazione, inquinamento, o dispersione del materiale contenuto;

- la perfetta chiusura e l'utilizzo di materiale non suscettibile a rotture in caso di urto, durante il trasporto, o durante il congelamento;

- la notazione delle finalità dell'indagine;

- la memoria di tutti i dati indispensabili al riconoscimento del campione, in ogni fase analitica, mantenendo l'anonimato ove previsto;

- nel caso di trasporto presso altra sede, diversa da quella di campionamento, devono essere previste condizioni che garantiscano la "catena del freddo" ed impediscano qualsiasi manipolazione dei campioni.

6.3.5 Le procedure di campionamento del prelievo biologico, che definiscano:

- le quantità minime di campione da prelevare, in funzione delle diverse tipologie di prelievo;

- la predisposizione per ciascun campione biologico, di aliquote sufficienti, per l'eventuale ripetizione dell'analisi e per la successiva analisi di conferma e/o di revisione, in funzione della finalità di indagine;

- le procedure di etichettatura che garantiscano l'identificazione univoca del prelievo.

6.3.6 Le modalità di identificazione del prelievo, devono garantire:

- l'identificazione del prelievo tramite l'apposizione sui contenitori (all'atto del prelievo ed alla presenza dell'inte-

ressato) delle etichette di riconoscimento e di quelle di sigillatura, ciascuna contrassegnata col numero di protocollo di ingresso e firmata per esteso dall'interessato, omettendo il nominativo ove è richiesto l'anonimato;

- le aliquote destinate all'analisi di conferma e/o di revisione devono essere predisposte con procedure che consentano all'interessato, ed al personale di laboratorio, la verifica dell'integrità del campione conservato.

6.3.7 Le modalità di manipolazione del reperto, devono avvalersi quantomeno dei seguenti requisiti:

- per le urine, entro pochi minuti dal campionamento, vanno annotate sul modulo (di campionamento) colore, temperatura (tra 32-37°C) e pH (tra 4,8 - 8). Qualunque alterazione di tali parametri va segnalata perché se ne tenga conto nelle fasi analitiche successive (dosaggio creatinina, misura densità, etc.);

- dopo l'etichettatura e la suddivisione delle aliquote, i campioni biologici vanno opportunamente sistemati in contenitori refrigerati, per il trasporto in laboratorio;

- devono essere previsti frigoriferi diversi, con chiusura a chiave, per lo stoccaggio a breve, ovvero a medio e lungo termine. La quota da analizzare nell'immediato o entro le 48 ore va conservata in frigorifero a 4°C mentre le aliquote destinate all'analisi di conferma/revisione vanno conservate a -20°C;

- sul modulo di campionamento vanno indicate la data e l'ora del trasporto in laboratorio nonché l'identità dell'operatore che consegna e che riceve i campioni;

- deve esistere una apposita modulistica (modulo di laboratorio) che accompagna il campione in ogni fase di utilizzo. Su tale documento va indicato il luogo di conservazione (n. frigorifero, n. dell'armadio o casella nello stesso) a breve oppure a medio-lungo termine e l'identità dell'operatore che ha provveduto allo stoccaggio;

- tutte le manipolazioni successive, ivi compresi il prelievo di aliquote, per quante sono le indagini richieste, vanno annotate nel modulo di laboratorio, che va controfirmato e datato da ciascun operatore, ogni qualvolta riceve ed utilizza il campione;

- per i campioni risultati positivi, sia nei test di screening che nell'analisi di conferma, va prevista la conservazione dell'aliquota destinata all'eventuale analisi di revisione, per almeno un anno, o un periodo maggiore se diversamente regolamentato;

- il modulo di laboratorio, che contiene la sintesi di tutti i passaggi cui è stato sottoposto il campione dall'ingresso in laboratorio sino allo smaltimento, deve essere conservato per almeno 3 anni, o per un periodo maggiore secondo i regolamenti sanitari vigenti.

6.4 Deve esistere una documentazione inerente la catena di custodia.

6.4.1 Sia il modulo di campionamento che il modulo di laboratorio che contengono la sintesi di tutti i passaggi cui è stato sottoposto il campione dal momento del prelievo, all'ingresso in laboratorio sino allo smaltimento, deve essere conservato per almeno 3 anni, o per un periodo maggiore secondo i regolamenti sanitari vigenti.

7. Procedure analitiche

7.1 Le procedure analitiche debbono assicurare la migliore possibilità di identificazione e dosaggio degli analiti, compatibilmente con le risorse strumentali del laboratorio, nel rispetto delle seguenti linee guida.

7.2 Le procedure analitiche debbono essere orientate alla identificazione diretta di ciascun analita e debbono assicurare la minima alterazione possibile nei rapporti dei singoli metaboliti, quando questi possono essere prodotti anche come artefatti di laboratorio.

7.3 Per ogni categoria di metodi deve esistere una descrizione della procedura adottata e validata dal laboratorio (Manuale di Procedure operative standard).

7.4 Per tutti i metodi e le procedure deve essere definito il campo di applicazione relativamente alla matrice e al tipo di determinazione del parametro analitico. Sarebbe auspicabile per la redazione di procedure analitiche il seguente schema:

- avvertenze e precauzioni;
- scopo e campo di applicazione;
- riferimenti normativi e/o bibliografici;
- principio;
- reagenti e standard;
- apparecchiature;
- procedura;
- calcoli ed espressione dei dati;
- controllo di qualità dei dati.

7.5 Importante principio scientifico e forense è la conferma della rilevazione di un analita.

7.5.1 Di norma le procedure analitiche prevedono una prima fase di screening seguita da una successiva procedura di conferma, basata su principi chimico fisici diversi. Fra i metodi di screening vi sono quelli immunochimici (EIA, FPIA, RIA, FU). I metodi di conferma devono essere caratterizzati da una maggiore specificità e sensibilità, rispetto all'analisi di screening. In genere è consigliabile utilizzare, per l'analisi di conferma, la gas cromatografia abbinata alla spettrometria di massa.

7.5.2 Quando l'analisi di screening è eseguita con un metodo immunochimico, l'analisi di conferma è sempre necessaria. Debbono essere confermati tutti i risultati positivi provenienti da uno screening immunochimico ed almeno 5% dei risultati negativi.

7.5.3 Il risultato analitico ottenuto mediante un metodo immunochimico non può essere confermato in base ad una seconda procedura immunochimica, seppure basata su differenti principi di rivelazione (misura della radioattività, cinetiche enzimatiche, fluorescenza, agglutinazione, etc.) e caratterizzata dall'impiego di anticorpi dotati di differente specificità.

7.5.4 È consigliabile eseguire l'analisi di conferma su una seconda aliquota del campione biologico sul quale è stato effettuato lo screening preliminare.

7.5.5 L'analisi quantitativa di un analita precedentemente identificato con un metodo di screening (esempio dosaggio in GC-MS in SIM dopo EMIT), può essere valida come analisi di conferma.

7.5.6 Quando l'analisi quantitativa viene eseguita mediante gas-cromatografia con rivelatore di massa (GC-MS) in selezione di ioni (SIM), debbono essere considerati non meno di 3 frammenti ionici significativi per ogni analita. In caso di determinazione in gas-cromatografia di massa-massa (GC-MS-MS) l'analisi quantitativa verrà eseguita sullo ione più significativo dello spettro MS-MS.

7.5.7 Una analisi in gas-cromatografia dopo derivatizzazione può essere considerata come una procedura di conferma dello screening preliminare eseguito sempre mediante gas-cromatografia su analiti non derivatizzati. È necessario tuttavia procedere su estratti diversi dello stesso campione.

7.6 Tutti i metodi e le procedure devono essere ottimizzati e validati prima di essere utilizzati. Ciascun laboratorio deve validare il metodo prescelto per la determinazione dell'analita sulla base della natura della matrice. I criteri generalmente impiegati per la validazione del metodo sono:

- effettuazione di prove di recupero su campioni esenti da residui del principio attivo da determinare, rafforzati con una concentrazione nota di standard di riferimento, contenente lo stesso principio attivo;
- effettuazione di prove di recupero su campioni esenti da residui del principio attivo da determinare rafforzati con una concentrazione nota di standard di riferimento contenente lo stesso principio attivo;
- deve essere utilizzato uno standard certificato;
- devono essere stabiliti il numero di prove di recupero da effettuare, le concentrazioni da usare, l'intervallo, in cui devono essere compresi i valori medi di recupero, per ogni livello di concentrazione.

7.6.1 Campioni di controllo a concentrazione nota (incluso in essi anche i controlli negativi) debbono essere inseriti in ogni seduta analitica. È importante che i controlli abbiano la stessa matrice del campione da analizzare. Ciascun laboratorio individua e utilizza, motivandone la scelta, l'inclusione di campioni di controllo in modo da stabilire i limiti di accettabilità della seduta.

7.6.2 I metodi immuno-chimici possono soltanto esprimere un risultato analitico in termini semi quantitativi oppure in termini di presenza/assenza, in riferimento al valore di cut-off.

7.6.3 La scelta dei valori di *cut-off* deve essere eseguita in riferimento a quanto comunemente accettato in ambito scientifico internazionale.

7.6.4 Una minima quantità rilevabile con le metodiche di conferma deve essere determinata in riferimento al valore di deviazione standard del bianco a cui va addizionato un valore pari, generalmente, a tre volte la deviazione standard. Per ogni procedura analitica dovrebbero essere noti i valori del coefficiente di variazione (CV) o comunque le caratteristiche di riproducibilità. Il limite di quantificazione (LOQ) può essere calcolato addizionando al valore del bianco, dieci volte la deviazione standard; tuttavia è preferibile determinare il limite di quantificazione (LOQ) sperimentalmente come la concentrazione più bassa per ottenere routinariamente un coefficiente di variazione accettabile.

7.6.5 Per i metodi cromatografici (GC, HPLC) è consigliabile l'impiego di standard interni deuterati nel caso di GC-MS. L'impiego di standard interni è indispensabile per le metodiche basate su tecniche gas-cromatografiche a spazio di testa (HS-GC). Gli standard interni, selezionati in base ad opportune valutazioni di natura chimico-fisica, debbono essere aggiunti al campione biologico prima dell'inizio della procedura analitica.

7.6.6 La linearità della procedura analitica deve essere valutata sulla base di almeno tre calibratori. Se un campione contiene un analita in concentrazione superiore al calibratore più elevato, dovrà essere ripetuta l'analisi dopo diluizione del campione.

7.6.7 È necessario utilizzare procedure analitiche e sistemi di controllo che garantiscano l'individuazione di eventuali problemi di *carry-over*.

8. Controllo di qualità

8.1 La Sicurezza di Qualità assume un ruolo peculiare nelle attività tossicologico-analitiche aventi finalità medico-legale in quanto i risultati possono assumere rilevanza di "prova giudiziaria". La finalità della sicurezza di qualità consiste nell'identificare l'errore (random e sistematico) e nell'attuare appropriati rimedi per evitarlo.

La Sicurezza di Qualità coinvolge tutti gli aspetti del processo analitico, dalla raccolta e ricezione dei campioni biologici, dall'analisi alla revisione dei dati e alla certificazione dei risultati. Essa include il controllo di qualità del laboratorio.

La Sicurezza di Qualità implica una dettagliata documentazione delle attività di laboratorio per mezzo di Procedure Operative Standard (POS), le quali riguardano gli standard, i campioni di controllo, le metodologie analitiche, il controllo di qualità interno ed il controllo di qualità esterno.

8.2 Gli *standard*, corredati di documentazione attestante la fonte e la data di preparazione, devono essere idonei al tipo di analisi effettuata. La stabilità e integrità degli standard di riferimento devono essere preservate durante la loro conservazione. Nel caso di preparazione degli standard in laboratorio, la ditta produttrice dei reagenti, il metodo di preparazione e la verifica del prodotto finale devono essere documentati.

8.2.1 Gli *standard di farmaci, droghe e metaboliti*, acquisiti secondo la normativa vigente, hanno durata limitata. La loro degradazione alla luce, all'umidità o alle basse temperature deve essere verificata periodicamente. Gli standard in soluzione possono avere una stabilità più limitata di quella delle sostanze allo stato puro, secco o solido.

8.2.2 *L'identità* e il grado di *purezza* degli standard, comprese quelle di eventuali forme deuturate, devono essere verificate con idonee procedure in condizioni strumentali ottimali, soprattutto se essi non sono corredati da adeguate certificazioni della Ditta produttrice.

8.2.3 *L'etichettatura* deve essere uniforme per tutti gli standard e i reagenti. Nelle etichette devono essere riportati

la data di acquisizione e di preparazione, le iniziali del preparatore e la data di scadenza.

8.3.1 *Calibratori* servono a determinare la curva di calibrazione, per la quale sono sufficienti un blank e 3 calibratori corrispondenti a 3 diversi punti di calibrazione. La stabilità della curva deve essere verificata nelle condizioni operati ve del laboratorio mediante aggiunta di controlli, positivo e negativo.

8.3.1 *I Controlli Noti*, contenenti una quantità nota di standard (farmaco/droga/metabolita), devono essere il più possibile simili ai campioni biologici da analizzare. Le concentrazioni degli analiti contenute nei controlli (acquisiti dal commercio o preparati in laboratorio) devono essere confermate. Nel caso di analisi su matrici non convenzionali (capelli, unghie, ossa, tessuti, etc.) i controlli devono essere allestiti con matrici simili, tal quali (controlli "negativi") o addizionati di analiti (controlli "positivi"). Di norma, una adeguata serie di controlli può limitarsi ad un campione non contenente l'analita (controllo "negativo") e ad un campione contenente l'analita (controllo "positivo"), ad una concentrazione idonea a controllare l'affidabilità dell'analisi. Controlli aggiuntivi possono essere utilizzati per valutare la linearità della calibrazione nell'ambito dell'intervallo di concentrazione stabilita. Per ciascun batch di campioni biologici, singoli o multipli, i controlli devono essere trattati con la medesima procedura adottata in parallelo per quelli ignoti. Ciascun batch di campioni biologici deve includere almeno il 10% di controlli, inclusi un "positivo" e un "negativo". Il "controllo" deve fornire un risultato entro una predeterminata deviazione dal suo valore medio; in caso contrario, il test è considerato "fuori controllo" ed il risultato per un campione biologico incognito è inaccettabile.

8.3.2. *I Controlli ciechi*, aventi identità e composizione sconosciute all'analista, sono impiegati per il controllo di tutte le attività del laboratorio, dall'accettazione alla registrazione, dall'analisi alla refertazione del campione biologico processato.

8.4 Per la produzione di risultati affidabili sono indispensabili metodologie analitiche dotate di sensibilità, precisione e accuratezza. Tutti i metodi devono essere validati dal laboratorio nelle loro condizioni operative.

Ciascun metodo deve essere descritto nel Manuale di *Procedure Operative Standard* (POS), contenente: le procedure per la preparazione degli standard, dei reagenti e del campione; il funzionamento e la calibrazione degli strumenti; la sequenza di posizionamento degli standard, dei controlli e dei campioni; i criteri di accettabilità definiti per la produzione dei dati.

Ciascuna analisi deve essere eseguita in stretta aderenza alle POS.

Ciascun metodo deve includere un controllo di qualità del sistema di analisi, al fine di assicurare una qualità di produzione di dati equivalente a quella del metodo validato.

Il Manuale di POS deve prevedere le azioni correttive da adottare in caso di risultati dei controlli al di fuori di limiti accettabili.

8.5 I laboratori di analisi tossicologiche con finalità medico-legale devono adottare un sistematico *Controllo di Qualità Interno* (CQI). In ciascun laboratorio deve operare un *Supervisore del Controllo di Qualità Interno*, attuato mediante *controlli noti*, *controlli ciechi* e verifica di aderenza dei processi analitici alle Procedure Operative Standard del Laboratorio.

8.6 I laboratori di analisi tossicologiche con finalità medico-legale devono partecipare a Programmi di *Controllo di Qualità Esterno* (CQE), dotati di requisiti educativo-formativi e di sistemi di verifica della affidabilità analitica di ciascun laboratorio.

8.6.1 I Programmi di CQE sono utili per:

- definire lo stato dell'arte delle prestazioni analitiche volte a finalità predefinite;
- ottenere valori di consenso per materiali di controllo;
- studiare le variabili che influenzano i risultati in specifici processi analitici;
- favorire l'interscambio tecnico-scientifico fra laboratori impegnati nel medesimo settore analitico;
- migliorare il livello di prestazione dei singoli laboratori;
- consentire periodici monitoraggi di efficienza da parte di Organismi di controllo e/o accreditamento.

9. Rapporto analitico

9.1 Il rapporto analitico finale dovrebbe essere prodotto esclusivamente in forma scritta e consegnato esclusivamente a chi ha richiesto l'accertamento.

9.2 Nel rapporto analitico finale debbono essere indicati, oltre alla data e tutti gli estremi di identificazione del campione, anche il metodo impiegati per l'analisi, il cut-off e, per le analisi quantitative, il limite di sensibilità del metodo utilizzato.

9.3 Il rapporto d'analisi deve essere firmato dal Diretto-

re del laboratorio (che avrà avuto cura di validare i risultati ivi riportati in base alla verifica dei parametri strumentali, al controllo di qualità, alla documentazione della catena di custodia, etc.), eventualmente in associazione alla firma di chi ha eseguito l'analisi.

9.4 Per analisi esclusivamente qualitative deve essere fornito in termini di:

- positivo (identificazione dell'analita in accordo con i protocolli analitici propri del laboratorio);
- negativo (mancata identificazione dell'analita in accordo con i protocolli analitici propri del laboratorio).

9.5 Per le analisi quantitative il risultato deve essere espresso con riferimento ad unità di misura appropriata (mg%, mg/mL, mg/gr, mcg/mg, mcg/ml, etc.).

Il risultato dovrebbe essere sempre espresso in termini numerici tuttavia, qualora l'identificazione positiva riguardi un analita presente a valori di concentrazione inferiori al punto di calibrazione più basso previsto dalla procedura operativa standard, è possibile utilizzare l'espressione "tracce" per indicare la risposta in termini semiquantitativi.

9.6 Copia del rapporto analitico finale e della documentazione che ha concorso alla sua formulazione dovrebbe essere conservata per almeno 3 anni o per un periodo maggiore secondo i regolamenti sanitari vigenti.

Note

- (1) Primo Gruppo di lavoro: Renata Borriello (Napoli), Marcello Chiarotti (Roma), Fausto Gigli (Milano), Aldo Poletti (Pavia).
- (2) Secondo Gruppo di lavoro: Renata Borriello (Napoli), Marina Caligara (Milano), Marcello Chiarotti (Roma), Santo Davide Ferrara (Padova), Roberto Gagliano Candela (Bari), Fausto Gigli (Milano), Manuela Licata (Modena), Paolo Procaccianti (Palermo).