



ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA
Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)

LINEE GUIDA PER LA DETERMINAZIONE DI SOSTANZE
STUPEFACENTI E PSICOTROPE SU CAMPIONI
BIOLOGICI CON FINALITÀ TOSSICOLOGICO-FORENSI E
MEDICO-LEGALI

Revisione n. 6 del 8 giugno 2022

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA
Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)

**LINEE GUIDA PER LA DETERMINAZIONE DI SOSTANZE STUPEFACENTI E
PSICOTROPE SU CAMPIONI BIOLOGICI CON FINALITÀ TOSSICOLOGICO-
FORENSI E MEDICO-LEGALI**

*Revisione n. 6 del 8 giugno 2022 a cura del Consiglio Direttivo
dell'Associazione Scientifica Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)*

INTRODUZIONE

Il presente documento descrive le Linee Guida elaborate dall'Associazione Scientifica Gruppo Tossicologi Forensi Italiano (GTFI) per la determinazione di sostanze stupefacenti e psicotrope su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali.

Per sostanze stupefacenti e psicotrope (SSP) si intendono tutti i composti chimici, ed i loro metaboliti, di origine naturale, sintetica, o semi-sintetica, farmacologicamente attivi, idonei ad alterare in diversa misura la sfera psichica e comportamentale, con effetti di tipo psicolettico, psicoanalettico, e psicodislettico, ed in grado di generare fenomeni di tolleranza, assuefazione, dipendenza. In tale classificazione sono pertanto comprese le sostanze stupefacenti tradizionali, le nuove sostanze psicoattive (NSP), i principi attivi di farmaci ad azione psicoattiva, gli alcaloidi e le altre sostanze organiche o inorganiche ad azione psicoattiva o di generale interesse tossicologico.

Le Linee Guida sono indirizzate ai laboratori di tossicologia forense che effettuano determinazioni analitiche quali-quantitative di SSP su campioni biologici (prelevati da vivente o da cadavere), e rappresentano la revisione n. 6 delle Linee Guida originariamente elaborate nell'anno 2000.

La presente revisione delle Linee Guida è stata elaborata dal Consiglio Direttivo GTFI, costituito dai seguenti membri:

- Elisabetta Bertol - Università degli Studi di Firenze;
- Silvio Chericoni - Università degli Studi di Pisa;
- Donata Favretto - Università degli Studi di Padova;
- Giampietro Frison - AULSS 3 Serenissima, Venezia;
- Simona Pichini - Istituto Superiore di Sanità, Roma;
- Alberto Salomone - Università di Torino;
- Sabina Strano Rossi - Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma;
- Franco Tagliaro - Università di Verona;
- Claudia Vignali - Università degli Studi di Pavia.

Le Linee Guida si articolano nelle seguenti sezioni:

1. Scopo e applicazioni;
2. Termini e definizioni;
3. Requisiti del laboratorio;
4. Procedure del laboratorio;
5. Requisiti per le attività analitiche;
6. Accettazione, prelievo, movimentazione e manipolazione dei campioni;
7. Metodi analitici;
8. Referto o rapporto analitico;
9. Assicurazione della qualità;
10. Riferimenti normativi e bibliografici.

1. SCOPO E APPLICAZIONI

Gli accertamenti analitici per la determinazione di SSP in campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali sono suscettibili di miglioramento analitico continuo, dovuto non solo al consolidamento di nuove metodologie e strumentazioni, ma soprattutto ai progressi scientifici nell'individuazione di nuovi marcatori di esposizione a SSP, come anche alla utilizzabilità di matrici biologiche alternative o complementari a quelle di impiego tradizionale.

Detti accertamenti, assumendo carattere di prova in ambito amministrativo o penale, devono possedere requisiti di certezza e di affidabilità (dimostrabili attraverso la documentazione e la tracciabilità di ogni fase analitica) nonché di trasparenza e possibilmente di uniformità nazionale.

Un elevato livello qualitativo dei risultati dei suddetti accertamenti analitici è assicurato non solo dall'utilizzo di tecniche analitiche appropriate e di procedure e metodi analitici consolidati e condivisi dalla comunità scientifica nazionale ed internazionale in ambito tossicologico-forense, ma anche dall'assicurazione che gli stessi risultati provengono da strutture culturalmente preparate, dotate di organizzazione efficiente, caratterizzate da elevata affidabilità nel tempo, e costantemente aggiornate.

Scopo

Lo scopo delle presenti Linee Guida è riassumibile nei seguenti punti:

- Diffondere e promuovere la cultura analitico-tossicologica con finalità forensi, frutto dell'esperienza maturata negli anni dal GTFI nello sviluppo e nell'esecuzione degli accertamenti analitici e soprattutto nell'interpretazione critica dei risultati in ordine al loro significato biologico e statistico;
- Favorire l'acquisizione, da parte dei laboratori che effettuano accertamenti di SSP a scopo forense, dei requisiti per un'organizzazione efficiente, efficace ed affidabile.
- Mettere a disposizione dei suddetti laboratori uno strumento di riferimento per un corretto approccio analitico che garantisca uno standard di qualità, improntato all'armonizzazione e alla confrontabilità dei risultati, fornendo indicazioni e raccomandazioni sulla gestione dei processi analitici, ed un riferimento per la corretta refertazione degli accertamenti tossicologico-forensi e medico-legali.

Applicazioni

Le Linee Guida, ideate quale elemento di autodisciplina e requisito fondamentale di un sistema di gestione per la qualità, che garantisca il valore probatorio del dato analitico fornito, si propongono come componente essenziale di un auspicabile processo di "accreditamento all'eccellenza" per i

laboratori che effettuano determinazioni di SSP a scopo forense.

È necessario, quindi, che tali laboratori adottino un sistema di gestione per la qualità che esprima e verifichi la politica della qualità, basato sui seguenti principi:

- Efficacia organizzativa;
- Eccellenza del risultato;
- Costante miglioramento dello standard di qualità;
- Responsabilizzazione del personale nell'assicurare la qualità del lavoro svolto e diffusione della politica della qualità a tutto il personale;
- Costante riesame della politica della qualità e dei relativi obiettivi.

Ambito di applicazione

Le presenti Linee Guida devono essere obbligatoriamente recepite ed applicate da tutti i laboratori con documentabili caratteristiche di cui al paragrafo 1, che vogliano eseguire accertamenti di SSP in campioni biologici, con finalità applicativa di disposti di legge dettati dalla normativa vigente.

Le strutture che operano in questo ambito devono pertanto attenersi ai principi enunciati nelle presenti Linee Guida, sotto il profilo organizzativo e metodologico, al fine di rispettare i requisiti di uniformità e verificabilità che garantiscono la sicurezza di qualità in ordine a:

- Organigramma, qualificazione scientifica, compiti e responsabilità del personale;
- Procedure di acquisizione, gestione e conservazione dei campioni;
- Procedure di sviluppo, validazione ed applicazione dei metodi analitici;
- Criteri minimi di identificazione e quantificazione di SSP in campioni biologici;
- Verifica interna ed esterna dell'affidabilità analitica;
- Stesura ed emissione del rapporto analitico (referto), con interpretazione dei risultati e indicazione dell'ambito della loro utilizzabilità, anche in relazione alla normativa vigente.

2. TERMINI E DEFINIZIONI

Accuratezza (o Esattezza): Vicinanza del risultato medio di concentrazione dell'analita ottenuto con il metodo quantitativo al valore di concentrazione reale. Si esprime in termini di Errore percentuale (E%).

Attestazione di qualità: Processo volto al miglioramento continuo della qualità, mediante il quale un laboratorio si sottopone alla valutazione di un ente indipendente per la verifica del proprio operato secondo requisiti predeterminati.

Analisi: Il termine è sinteticamente riferibile in questo contesto agli accertamenti di laboratorio per la determinazione di SSP a scopo forense in campioni biologici prelevati da vivente o da cadavere.

Analisi di screening: Analisi preliminare, generalmente eseguita con tecniche immunochimiche, che fornisce un risultato presuntivo (probabile negatività o presunta positività - non negatività -) di un campione rispetto ad una sostanza/classe di sostanze anche, ma non necessariamente, in riferimento a un valore di *cut-off* ove stabilito per legge, norma o regolamento. Per definizione, un risultato ottenuto con la sola analisi di *screening* non possiede valenza legale (forense).

Analisi di conferma: Analisi da eseguirsi obbligatoriamente con un metodo dotato di maggiore specificità rispetto all'analisi di screening, fondato su principi chimico-fisici diversi, al fine di identificare specificamente una sostanza e/o suoi metaboliti individuati in maniera presuntiva attraverso l'analisi di screening.

Analisi di revisione (o controanalisi): Analisi eseguita su un campione di revisione (controcampione) con un metodo avente caratteristiche di specificità e di sensibilità uguali o superiori a quelle del metodo analitico utilizzato per l'analisi oggetto di contestazione. Il soggetto sottoposto ad accertamento ha facoltà di assistere, tramite un proprio legale e/o tramite un proprio consulente tecnico, al riconoscimento del campione, alla verifica dell'integrità dello stesso e a tutte le procedure dell'analisi di revisione. L'analisi di revisione può essere effettuata dal medesimo Laboratorio che ha eseguito l'analisi di prima istanza, ovvero da laboratori specificamente individuati sulla base di una valutazione esterna oggettiva, ufficialmente riconosciuti per tale scopo, e documentanti la piena adesione alle presenti Linee Guida. In quest'ultimo caso il trasferimento del campione tra i due laboratori dovrà essere necessariamente effettuato con il mantenimento della catena di custodia.

Analisi qualitativa: Analisi in grado di fornire un risultato in termini di presenza/assenza di un analita, anche rispetto ad un valore di *cut-off* ove previsto da specifiche normative, o comunque predeterminato.

Analisi quantitativa: Analisi in grado di misurare la concentrazione di uno o più analiti con un livello predeterminato di precisione e accuratezza.

Assicurazione della qualità: Rispetto delle Procedure Documentate (gestionali e tecniche) attraverso l'applicazione rigorosa delle istruzioni operative e il monitoraggio continuo delle varie fasi del processo analitico.

Batch (lotto): Gruppo di campioni esaminati in serie o in parallelo, analizzati nell'ambito della stessa sessione analitica.

Bianco (o campione bianco): Campione biologico in precedenza sottoposto ad analisi e risultato negativo per una o più sostanze di interesse (contenuto degli analiti inferiore al limite di identificazione, LOD).

Campione: Determinata quantità o volume di matrice biologica da sottoporre agli accertamenti analitici.

Calibratore: Campione contenente una quantità definita di analita, nota all'operatore, allestito in matrice biologica uguale o simile a quella dei campioni da analizzare, da utilizzare per l'allestimento della curva di calibrazione.

Carry-over (effetto di "trascinamento" o "effetto memoria"): Presenza indesiderata di uno o più analiti di interesse osservata durante l'analisi strumentale di un campione biologico, misurabile attraverso l'analisi di un bianco successivamente all'analisi di un campione contenente una determinata quantità/concentrazione di analita. Se l'analisi di tale bianco produce un risultato inferiore al limite di identificazione, LOD, il *carry-over* del metodo è accettabile.

Catena di custodia: Procedura documentata atta a garantire l'autenticità, l'integrità e la tracciabilità di un campione biologico dal momento del prelievo/raccolta sino al suo smaltimento; essa deve permettere di ricostruire l'iter del campione (dal prelievo all'accettazione e alla conseguente gestione all'interno del laboratorio), di documentarne le condizioni di conservazione in tutte le fasi, di preservarlo da manomissioni e adulterazioni volontarie o involontarie, nonché di individuarne tutte le movimentazioni e lavorazioni con registrazione della data e degli operatori che le hanno effettuate.

Coefficiente di Variazione Percentuale (CV%) o deviazione standard relativa (RSD): Indice di dispersione delle misure analitiche, utilizzato per misurare la precisione di una determinazione

quantitativa, dato dal rapporto percentuale della deviazione standard di una serie di misurazioni, eseguite su aliquote diverse di uno stesso campione, e il valore della media aritmetica di tali misurazioni.

Controcampione (campione di revisione): Campione prelevato dal medesimo soggetto contestualmente al campione sul quale viene eseguita un'analisi, da destinarsi all'eventuale controanalisi.

Controllo: Campione contenente una quantità definita e nota di analita, preferibilmente diversa da quella dei calibratori, allestito in matrice biologica uguale o simile a quella dei campioni reali.

Controllo cieco: Controllo non dichiarato, atto a verificare la conformità di un'analisi alla rispettiva Procedura Documenta. Se di concentrazione ignota all'operatore di un laboratorio a cui tale campione è inviato o ad uno o più operatori del laboratorio (controllo cieco ad uso interno) è utilizzato per valutare se, e in che misura, il risultato analitico prodotto soddisfa caratteristiche di qualità prestabilite (controllo di qualità interno).

Criteri di identificazione e quantificazione: Insieme di criteri prestabiliti che devono essere simultaneamente e obbligatoriamente ottemperati al fine di attribuire il grado di specificità richiesto per l'identificazione di un analita e/o di precisione e accuratezza per la sua quantificazione.

Curva di calibrazione: Valutazione grafica e matematica della relazione esistente tra quantità o concentrazione di un analita e il segnale da esso prodotto.

Cut-off o Valore Soglia o Soglia Decisionale: Limite di concentrazione definito, in maniera convenzionale, per stabilire la negatività, ovvero la positività (non negatività nel caso di analisi di *screening*) di un campione. Il valore di *cut-off*, pertanto, può variare dipendendo dall'ambito di applicazione dell'analisi.

Effetto matrice: Effetto combinato di tutti i componenti di un campione biologico, o di un suo estratto, diversi dall'analita, sulla misura della quantità dell'analita stesso.

Incertezza di misura: Parametro associato al risultato di una misurazione che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando ed espresso nella stessa unità di misura.

Informazioni documentate (ID): Informazioni che l'organizzazione (il laboratorio) ritiene essere necessario gestire per garantire l'efficacia del sistema, comunicare informazioni, supportare il funzionamento dei propri processi e conservare informazioni affinché si possa garantire che i processi siano condotti come pianificato e si possano fornire evidenze di conformità. Possono essere in formato cartaceo, o elettronico.

Intervallo di calibrazione (o di linearità): Intervallo all'interno del quale un metodo è in grado di produrre risultati quantitativi che soddisfino predeterminati criteri di accettabilità.

Limite inferiore di quantificazione (*Lower Limit of Quantification, LLOQ*): Concentrazione o quantità più piccola di analita che il metodo è in grado di misurare con sufficiente accuratezza e precisione.

Limite di rilevazione (*Limit of Detection, LOD*): Quantità di analita presente in un campione in grado

di produrre un segnale distinguibile da quello prodotto da un controllo negativo (bianco).

Limite superiore di quantificazione (*Upper Limit of Quantification, ULOQ*): Concentrazione o quantità più elevata di analita che un metodo analitico è in grado di misurare con sufficiente accuratezza e precisione.

Manuale della Qualità: Raccolta della documentazione concernente tutta le attività del laboratorio; contiene le Procedure Documentate, gestionali e tecniche. La revisione 2015 della norma ISO 9001 non prevede più il manuale della qualità ma richiede che il sistema di gestione sia supportato da "informazioni documentate".

Materiale di Riferimento Certificato (*Certified Reference Material, CRM*): Campione di matrice biologica, omogeneo e stabile per un periodo di tempo specificato, contenente quantità note e certificate di uno o più analiti.

Precisione: Caratteristica di un metodo analitico che si riferisce alla dispersione di una serie di misurazioni ripetute su aliquote diverse di un medesimo campione. Essa può essere stimata dal coefficiente di variazione ottenuto da tali misurazioni. È generalmente misurata all'interno di una sessione analitica (ripetibilità *intra-batch*,) e tra sessioni analitiche diverse o anche tra diversi laboratori (*inter-batch*, riproducibilità).

Procedure Documentate (Vedasi Informazioni Documentate): Procedure scritte relative a tutte le attività gestionali e tecniche del laboratorio.

Proficiency Testing (PT): Percorso di miglioramento della qualità del laboratorio, generalmente su base volontaria, svolto mediante l'esame periodico di controlli ciechi al fine di individuare errori di natura sistematica o casuale e adottare le necessarie contromisure, la cui efficacia potrà essere valutata nei controlli successivi. La partecipazione a PT esterni permette la verifica della qualità delle prestazioni del laboratorio.

Referto o Rapporto analitico: Documentazione riepilogativa finale del processo analitico, che contiene i risultati ed eventualmente il relativo commento interpretativo.

Risultato negativo: Risultato inferiore ad un *cut-off*/Valore Soglia/Valore Decisionale o ad un valore di riferimento scelto dal laboratorio (ad esempio, inferiore al LOQ).

Risultato positivo: Identificazione dell'analita nel rispetto dei criteri di identificazione prestabiliti, con presenza nel campione in concentrazione superiore o uguale al *cut-off*/Valore Soglia/Valore Decisionale, una volta sottratta l'incertezza di misura, o ad un valore di riferimento scelto dal laboratorio (ad esempio, superiore al LOQ).

Robustezza: Caratteristica di un metodo analitico riferita alla capacità di produrre nel tempo risultati validi e stabili, anche a seguito di lievi, deliberate variazioni (es. diversi operatori, diversi laboratori).

Specificità analitica (o selettività): Capacità di un metodo analitico di identificare un determinato analita in presenza di altre sostanze (quali altri xenobiotici di struttura o composizione simile, metaboliti, prodotti di degradazione, componenti endogeni della matrice biologica, impurezze, etc.).

Stabilità: Misura della suscettibilità dell'analita a fenomeni degradativi-idrolitici di natura biotica (nel campione biologico, successivamente al prelievo) e/o abiotica (esposizione a luce, calore, pH, cicli di

congelamento/scongelamento).

Taratura: Definizione delle caratteristiche di misurazione di uno strumento di misura tramite confronto con una grandezza o con uno strumento di riferimento.

Validazione di un metodo analitico: Insieme di prove atte a valutare la capacità di un metodo analitico di raggiungere gli obiettivi per i quali è stato predisposto.

Verifica Esterna della Qualità (VEQ): Monitoraggio esterno dell'affidabilità analitica di un laboratorio effettuata da un organismo indipendente, valutata attraverso l'esame dei risultati quali-quantitativi ottenuti dall'analisi di una serie di controlli ciechi. Diversamente da un *Proficiency Testing*, la partecipazione a una VEQ può essere resa obbligatoria in relazione ad alcune norme: in tal caso può determinare provvedimenti di natura limitativa e/o sanzionatoria nei confronti dei laboratori che non rispettano gli standard minimi previsti dalla VEQ.

3. REQUISITI DEL LABORATORIO

Direzione del laboratorio

La direzione del laboratorio comporta l'assunzione di responsabilità professionali, organizzative, didattiche, ed amministrative.

Tale carica richiede il possesso di una laurea in discipline scientifiche, accompagnata da una specifica competenza in ambito tossicologico-analitico e tossicologico-forense, ottenuta attraverso idoneo e documentabile percorso formativo di tipo universitario, ovvero attraverso una provata esperienza nel settore per un periodo continuativo di almeno cinque anni, e documentata da pubblicazioni scientifiche pertinenti e continuità nell'aggiornamento.

Organigramma, qualificazione scientifica, compiti e responsabilità del personale

Il personale del laboratorio deve possedere una preparazione specifica in campo tossicologico-analitico e forense, associata ad una documentata formazione professionale adeguata alle responsabilità specifiche e deve approfonditamente conoscere le normative vigenti che riguardano le SSP, soprattutto in relazione alla loro determinazione nei campioni biologici.

L'attività di addestramento e di aggiornamento del personale del laboratorio deve essere documentata e conservata. La numerosità del personale preposto alle analisi deve essere adeguata al numero degli accertamenti svolti nel laboratorio.

Oltre al Direttore è raccomandata la presenza di almeno un altro dirigente, laureato in discipline scientifiche idonee, con adeguata esperienza in tossicologia analitica e forense (documentata dal percorso formativo, dall'esperienza, dall'aggiornamento e da pubblicazioni scientifiche pertinenti) che coordini e supervisioni l'attività del personale, accertando il rispetto delle procedure e verificando i requisiti di qualità.

Norme minime di sicurezza

Nel Laboratorio devono essere messe in atto procedure finalizzate alla tutela della incolumità degli operatori e, in particolare, deve essere fornita adeguata informazione ed indicazione dei rischi, delle misure necessarie per la loro prevenzione e, in generale, per la sicurezza degli operatori nel rispetto della normativa vigente.

Il Direttore, o un suo referente, al quale è conferito l'incarico di "Responsabile della Sicurezza", deve accertarsi che tali disposizioni siano rigorosamente rispettate. La manipolazione e lo smaltimento dei materiali a rischio devono essere regolamentate da specifiche procedure, nel rispetto della normativa vigente.

4. PROCEDURE DEL LABORATORIO

Generalità

Il laboratorio deve redigere e conservare in forma documentale le procedure relative a tutte le attività gestionali e tecniche realizzate.

Procedure Documentate (o Informazioni Documentate)

Le Procedure Documentate descrivono in dettaglio tutte le attività necessarie al corretto svolgimento di ogni tipo di accertamento analitico che il laboratorio dichiara di effettuare; contengono anche i metodi analitici e stabiliscono sequenze ordinate di azioni ed eventi affinché tutti i processi in esse descritti, realizzati in modo omogeneo e riproducibile, consentano di effettuare ogni analisi in condizioni standardizzate.

Per l'**Attività Gestionale** sono necessarie Procedure Documentate relative a:

- Caratteristiche e finalità delle analisi e dei relativi risultati;
- Accettazione e catena di custodia dei campioni;
- Utilizzo, manutenzione ordinaria, e taratura degli strumenti di misura e della strumentazione analitica;
- Redazione, consegna/invio del referto (rapporto analitico);
- Tutela e riservatezza dei dati personali e giudiziari sensibili e dei relativi risultati;
- Archiviazione e conservazione della documentazione analitica e dei dati ad essa correlati;
- Utilizzo di controlli di qualità interni ed esterni, monitoraggio e miglioramento della qualità;
- Qualificazione, formazione ed aggiornamento del personale.

Per l'**Attività Tecnica** le Procedure Documentate devono riportare dettagliatamente:

- Finalità dell'analisi (obiettivi diagnostici e ambiti applicativi dell'analisi; elenco dei singoli analiti o delle classi di sostanze che l'analisi è in grado di rilevare presuntivamente o identificare specificamente e/o quantificare; matrice biologica alla quale l'analisi si applica; eventuale valore di *cut-off*);
- Principi dei metodi analitici con eventuali riferimenti bibliografici;
- Elenco dei parametri di validazione dei metodi utilizzati e dei rispettivi valori ottenuti;
- Dettagli operativi con riferimento agli standard di riferimento, ai reagenti (composizione, preparazione, precauzioni d'uso, condizioni di conservazione, caratteristiche di instabilità o deterioramento, durata di validità), ai solventi ed altri prodotti consumabili;
- Caratteristiche qualitative e quantitative della matrice biologica necessarie per poter eseguire l'analisi ed eventuali ripetizioni;
- Procedura per l'allestimento del campione e dei controlli, per la loro identificazione e posizionamento nel batch analitico;
- Strumentazione utilizzata con riferimento alle relative procedure di manutenzione ordinaria, di verifica della funzionalità e di taratura, nonché alla loro periodicità;
- Criteri prestabiliti per l'accettabilità dei risultati di una sessione analitica;
- Criteri minimi di identificazione e/o quantificazione di ciascun analita o classe di sostanze.

Ciascuna Procedura Documentata tecnica riferita ad un metodo di *screening* o di conferma, deve prevedere, nell'ambito di ciascuna sessione analitica, un numero di controlli positivi e negativi commisurato alla numerosità dei campioni da esaminare (almeno un controllo positivo e un controllo negativo ogni dieci campioni) al fine di assicurare la qualità dei risultati prodotti e adottare le azioni correttive qualora non sia rispettato il requisito dell'accettabilità dei risultati.

5. REQUISITI PER LE ATTIVITA' ANALITICHE

Sistema di gestione per la qualità delle analisi

Il laboratorio deve erogare i propri servizi e sviluppare i relativi processi in condizioni controllate e deve adottare un sistema di gestione per la qualità per tutte le attività relative ai processi dedicati ad analisi a scopo tossicologico-forense e medico-legale.

Finalità diagnostiche e matrici biologiche

Le analisi tossicologiche con finalità diagnostiche in ambito forense prevedono l'esame di plurime matrici biologiche prelevate da vivente o da cadavere i cui rispettivi esiti, da soli o in combinazione tra loro, forniscono elementi utili per una corretta diagnosi con valenza tossicologico forense o medico-legale in diversi ambiti, quali ad esempio l'accertamento di guida sotto l'influenza di SSP, l'accertamento di idoneità alla guida, idoneità al lavoro, idoneità al porto d'armi, idoneità a specifiche norme concorsuali e/o contrattuali, diagnosi di uso/abuso (anche nell'ambito dell'affidamento di minori o di adozioni internazionali), diagnosi di intossicazione (in attualità di effetto biologico ovvero "sotto l'influenza di"), diagnosi di tossicodipendenza, diagnosi di intossicazione acuta mortale, etc.

Pertanto il laboratorio che dichiara la sua competenza nell'esecuzione di accertamenti con finalità tossicologico-forensi e medico-legali deve dimostrare di essere in grado di eseguire gli accertamenti analitici almeno su campioni biologici quali sangue intero o plasma e siero, saliva, urina, formazioni pilifere; il Direttore deve essere altresì in grado (per le caratteristiche sopra descritte) di valutare, a seconda delle varie esigenze e richieste, la tipologia di matrice biologica necessaria e la metodologia da adottare.

Si riportano di seguito, a titolo esemplificativo, situazioni di frequente osservazione:

- Nei casi in cui si debba valutare l'attualità d'uso di SSP, ovvero la sussistenza degli effetti da esse prodotti, le indagini devono necessariamente essere eseguite su campioni di sangue. Anche la saliva (più propriamente il fluido del cavo orale) può essere utilizzata a tale scopo, pur valutando la diversa finestra di rivelabilità temporale rispetto al sangue; è inaccettabile, per diagnosticare l'effetto biologico prodotto da SSP a scopo tossicologico-forense e medico-legale (ad esempio uno stato di alterazione psico-fisica per uso di sostanze stupefacenti), l'impiego della matrice urinaria. Ciò dal momento che la rilevabilità di una sostanza e/o di suoi metaboliti nell'urina può protrarsi ben oltre la sua completa eliminazione dal sangue (e quindi la cessazione dell'effetto biologico).
- Per la determinazione del consumo "recente" di SSP (con una finestra di rilevabilità temporale di ore-giorni a seconda delle caratteristiche farmacocinetiche della sostanza in questione) il campione d'elezione è l'urina. Tale campione può essere impiegato anche per la determinazione dello stato di assunzione cronica qualora l'analisi sia estesa a più campioni raccolti in giorni diversi e "a sorpresa" (vale a dire con preavviso all'interessato il più breve possibile, comunque non superiore alle 24 ore);
- L'assunzione cronica, come pure comportamenti pregressi di uso/abuso, possono essere verificati attraverso accertamenti su formazioni pilifere (campioni di capelli e/o peli). L'analisi segmentale dei capelli consente di ricostruire pur con margine di incertezza la cronologia dell'assunzione. L'analisi di peli provenienti da altri distretti corporei (quali ascelle, torace, pube) non permette valutazioni cronologiche seriate, pur permettendo di dimostrare uso o esposizioni pregressi. Inoltre, considerando il tempo complessivo di ricambio del pelo in una area corporea sufficientemente estesa, può essere valutata una "finestra temporale" di alcuni mesi in relazione al tipo di pelo e alla sua crescita naturale (toracico, pubico, ascellare etc.). Naturalmente, la rasatura più o meno recente del pelo corporeo influenza tale finestra temporale. Per i peli pubici la valutazione dei livelli quantitativi delle sostanze e dei metaboliti presenti diviene più complessa, attesa la possibilità di contaminazione attraverso le urine del soggetto stesso.

Campioni biologici

La minima quantità di campione biologico e di controcampione ritenuta sufficiente per l'esecuzione di ciascuna analisi deve essere indicata dal laboratorio nella corrispondente Procedura Documentata. Essa deve tenere in considerazione l'eventuale necessità di esaminare il campione più volte, anche in rapporto al numero degli analiti oggetto d'indagine, alla finalità qualitativa e/o quantitativa dell'esame, o alla necessità per qualsivoglia motivo di ripetere l'analisi stessa.

La Tabella successiva riporta volumi e quantità di matrici biologiche ottenute da vivente raccomandati per eseguire molteplici accertamenti analitici di screening e conferma. Anche volumi/quantità inferiori a quelli indicati in Tabella possono permettere l'esecuzione delle analisi di screening e conferma, ma deve essere sempre garantita da parte del laboratorio la ripetibilità delle analisi con conservazione di aliquote sufficienti della matrice biologica oggetto del campionamento.

Per ogni campione biologico debbono essere chiaramente indicate in una specifica Procedura Documentata le modalità di prelievo, di trasporto, di conservazione prima dell'analisi, nonché le condizioni ed il tempo di conservazione dopo l'esecuzione dell'analisi.

Tabella. Volumi e quantità delle diverse matrici biologiche raccomandati per l'esecuzione di accertamenti analitici di screening e conferma.

Matrice Biologica	Campione	Controcampione	Volume o Quantità totale
Urina	10 mL	10 mL	20 mL
Sangue per alcolemia	3 mL	3 mL	6 mL
Sangue per altre SSP	5 mL	5 mL	10 mL
Formazione pilifera ^a	100 ^b mg	100 ^b mg	200 mg
Saliva (fluido orale)	1 mL	1 mL	2 mL

^a In caso di analisi segmentale la quantità è riferita a ciascun segmento; in caso di analisi dei marcatori di uso alcolico, è necessario prevedere aliquote ad hoc di provenienza e lunghezza adatte.

^b Quantità che permette l'utilizzo di più metodi analitici per le diverse classi di composti.

Manutenzione, monitoraggio e taratura degli strumenti di misurazione e della strumentazione analitica

Per ciascuno strumento di misurazione di peso, volume, temperatura e pH, nonché per la strumentazione analitica, il laboratorio deve stabilire ed indicare in apposita Procedura Documentata le modalità e la cadenza della taratura, della manutenzione ordinaria, del monitoraggio delle prestazioni.

Ad esempio, frigoriferi e congelatori devono essere dotati di un sistema di monitoraggio manuale (con cadenza almeno quotidiana) o automatico della temperatura. A tal fine, il laboratorio deve disporre, direttamente o indirettamente, di almeno un termometro certificato da Laboratori di Taratura (LAT) da utilizzare per la taratura degli altri termometri impiegati, di uno o più pesi di riferimento certificati per la taratura delle bilance analitiche, e di tamponi di riferimento per la taratura dei pH-metri.

Le tarature possono essere affidate a enti certificati. Le attestazioni delle tarature devono essere registrate in cartaceo e in forma elettronica, ove disponibile, e conservate per almeno tre anni.

Rintracciabilità della documentazione analitica e di ogni altra documentazione relativa al campione

Il laboratorio deve attuare un sistema di registrazione e archiviazione di tutte le informazioni in cartaceo ed in forma elettronica, ove disponibile, relative alle determinazioni strumentali eseguite (ad esempio cromatogrammi e spettri di massa relativi al campione e ai controlli positivi e negativi utilizzati), in modo che ciascuna di esse sia completamente rintracciabile e documentabile.

Nella Procedura Documentata vanno stabilite le modalità e la frequenza di creazione delle copie di sicurezza (*back-up*) della documentazione analitica.

In aggiunta alla documentazione analitica, il laboratorio è tenuto a conservare:

- La documentazione cartacea relativa ai campioni (es. moduli o verbali di richiesta/nomina, di accettazione, di prelievo, di trasporto);
- La documentazione, cartacea ed elettronica, ove disponibile, relativa alla catena di custodia dei campioni;
- La copia del referto/rapporto analitico;
- La documentazione relativa alla certificazione (o alla verifica) del grado di purezza e della durata di validità degli standard di riferimento utilizzati;
- I dati relativi all'analisi, alla manutenzione, al monitoraggio e alla taratura degli strumenti di misurazione e della strumentazione analitica. Essi vanno conservati per almeno tre anni dalla data di emissione del referto, se non diversamente indicato da normativa specifica;
- Copia della documentazione riguardante entrata/uscita/movimentazione/utilizzo delle SSP impiegate sotto forma di materiali di riferimento.

Tale documentazione deve essere conservata in formato cartaceo o elettronico per almeno tre anni, se non previsto altrimenti da specifiche normative.

6. ACCETTAZIONE, PRELIEVO, MOVIMENTAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

Accesso al laboratorio

L'accesso al laboratorio deve essere consentito soltanto alle persone autorizzate; il laboratorio deve adottare misure atte a garantire che l'accesso di estranei non possa avvenire né durante, né al di fuori dell'orario di servizio.

Limitazioni e cautele

I laboratori che oltre ad eseguire accertamenti analitici su reperti biologici eseguono analisi tossicologico-forensi su campioni non biologici devono effettuare l'acquisizione, la manipolazione e lo stoccaggio di tali campioni in ambienti diversi rispetto a quelli in cui vengono accettati e trattati i reperti biologici, allo scopo di evitare il rischio di contaminazione ambientale da principi attivi, adulteranti, diluenti, etc.

Accettazione di una richiesta di analisi

Nel caso in cui i campioni biologici siano prelevati/raccolti esternamente al laboratorio è necessario preliminarmente concordare con le strutture responsabili le modalità di prelievo e trasporto, in modo da garantire la catena di custodia. In ogni caso, la responsabilità del laboratorio in merito al rispetto della catena di custodia si riferisce al momento dell'accettazione dei campioni e alle operazioni successivamente effettuate.

In fase di accettazione il laboratorio deve verificare:

- La corretta modalità di confezionamento e di conservazione del campione durante il trasporto, con particolare attenzione alla catena del freddo, quando richiesta;
- L'idoneità della richiesta di analisi e la eseguibilità della stessa da parte del laboratorio;
- L'idoneità quali-quantitativa del campione rispetto alla richiesta d'analisi;
- La corrispondenza tra i dati identificativi del campione e la documentazione di accompagnamento;
- L'avvenuta raccolta del consenso informato all'accertamento e informazione del soggetto interessato delle relative garanzie difensive, ove tali procedure siano previste dalle normative vigenti (per es. negli accertamenti sanitari ai sensi degli Artt. 186/186 bis e 187 del Codice della Strada).

Inoltre, il laboratorio deve registrare:

- Data e ora del prelievo, quando note;
- Data e ora di accettazione dei campioni;
- Dati anagrafici del richiedente, recapito e firma leggibile;
- Finalità dell'analisi;
- Tipologia del campione, suo protocollo di conservazione e ubicazione in attesa delle analisi;
- Eventuali dati clinici, anamnestici e circostanziali utili all'esecuzione dell'analisi e/o all'interpretazione del risultato;
- Nome e firma del trasportatore;
- Nome e firma dell'operatore del laboratorio che effettua l'accettazione.

Nel caso in cui i prelievi di campioni biologici siano effettuati in ambulatori della stessa sede del laboratorio la fase di accettazione si realizza con:

- L'identificazione del soggetto mediante documento d'identità in corso di validità;
- L'informativa al soggetto sulla finalità dell'analisi, sull'esecuzione del prelievo e sulle successive fasi di campionamento, confezionamento ed etichettatura dei campioni;
- La raccolta del consenso informato scritto del soggetto al prelievo e all'analisi;
- L'attestazione da parte del soggetto, mediante firma da apporre sul modulo di prelievo, di aver presenziato a tutte le fasi di suddivisione, confezionamento ed etichettatura dei campioni prelevati con le registrazioni pertinenti citate.

Nel caso in cui i campioni siano prelevati da cadavere, il laboratorio deve verificare:

- La corretta modalità di prelievo, confezionamento, etichettatura e di conservazione dei campioni autoptici. Se l'autopsia non è effettuata nella stessa struttura di appartenenza del laboratorio, il personale di laboratorio deve ricevere attestazione circa il mantenimento della catena del freddo durante il trasporto dei campioni;
- L'idoneità quali-quantitativa dei campioni rispetto alla richiesta di analisi;
- La corrispondenza tra i dati identificativi dei campioni e la documentazione di accompagnamento.

Prelievo da vivente

L'accessibilità al luogo del prelievo è consentita esclusivamente al personale specificamente autorizzato e al singolo soggetto che deve essere sottoposto al prelievo.

Il prelievo del campione deve sempre prevedere la raccolta di un controcampione per eventuali analisi di revisione. Normative specifiche possono richiedere il prelievo di tre aliquote di campione equivalenti. In questo caso le tre aliquote devono essere utilizzate per l'analisi di *screening* (campione A), di conferma (campione B) e di revisione (campione C), rispettivamente. Tale procedura di prelievo è da utilizzarsi obbligatoriamente nel caso in cui l'analisi di *screening* e l'analisi di conferma siano effettuate da due diversi laboratori.

Raccolta di urina

La raccolta di campioni di urina deve rispettare le seguenti procedure:

- Prima di accedere al luogo di prelievo il soggetto è tenuto a depositare qualunque oggetto, borsa, indumento tali da poter occultare materiale utile ad adulterare o manomettere il campione urinario;
- Il soggetto è tenuto a lavarsi accuratamente le mani e ad asciugarle;
- Il personale deve consegnare al soggetto il materiale per la raccolta urinaria, informarlo del quantitativo di urina che deve essere approssimativamente raccolto e invitarlo a entrare nel locale di prelievo;
- Il locale di prelievo deve poter garantire la possibilità di osservazione diretta o indiretta

(telecamera a circuito chiuso, della cui presenza il soggetto deve essere preventivamente informato) e in esso (ad eccezione del caso di osservazione) non devono essere presenti fonti o materiali utilizzabili per la diluizione o l'adulterazione del campione.

L'adozione di queste modalità di prelievo si ritiene offra sufficienti garanzie rispetto a tentativi di adulterazione o manomissione del campione urinario. È tuttavia possibile effettuare ulteriori controlli sul campione successivamente alla raccolta (ad es. temperatura, peso specifico, creatininuria, pH). La verifica del peso specifico o della creatininuria consentono di controllare l'eventuale diluizione del campione. La valutazione di questi parametri in ordine all'idoneità del campione all'analisi è competenza del Direttore o del Responsabile del laboratorio, e non è necessariamente legata a valori chimico-clinici standardizzati.

Prelievo di capelli o altre formazioni pilifere

Il personale del laboratorio che effettua il prelievo deve verificare se la lunghezza dei capelli è correlabile alla richiesta di analisi, se i capelli presentano trattamenti estetici visibili e di possibile interferenza, e deve richiedere al soggetto informazioni utili all'esecuzione dell'analisi e all'interpretazione del risultato analitico (trattamenti igienici, cosmetici, uso di lozioni, lacche, gel o di altre sostanze potenzialmente interferenti con l'analisi) e registrare tutte le informazioni raccolte.

L'operatore addetto al prelievo, munito di guanti del tipo monouso, deve isolare una ciocca di capelli del diametro di circa 0,5 – 0,7 cm, preferibilmente nella zona del vertice posteriore del capo, prelevarla mediante taglio con forbici il più possibile vicino alla cute. Mantenendo l'allineamento dei capelli prelevati, l'operatore deve dividere longitudinalmente la ciocca in due parti approssimativamente uguali da destinare, rispettivamente, all'allestimento del campione e del controcampione. Il confezionamento degli stessi, a meno di richiesta di analisi della ciocca di capelli in toto, deve permettere l'identificazione inequivocabile dell'estremità prossimale della ciocca e impedire il disallineamento dei capelli. A tal fine, risulta più agevole legare con nastro o filo la ciocca prima del suo taglio; in tal caso il controcampione sarà costituito da una seconda ciocca prelevata dalla stessa zona. Non dovranno essere accettate motivazioni estetiche volte ad evitare il prelievo dei capelli. Inoltre, è necessario accertarsi che il campione di capelli sia perfettamente asciutto prima del confezionamento. In caso contrario, è necessario attendere la completa asciugatura del campione lasciandolo a contatto con l'aria dopo averlo posto su una superficie pulita.

Nel caso di indisponibilità dei capelli è possibile prelevare formazioni pilifere da altre zone della superficie corporea, attenendosi ai fini valutativi a quanto riportato nella specifica sezione del capitolo 5. Tutte le particolarità relative alla zona di prelievo devono essere registrate sul modulo di prelievo. Il confezionamento dei capelli deve garantire la preservazione dalla luce e dall'umidità (es. busta di carta o di alluminio all'interno di una busta o contenitore di plastica, conservazione a temperatura ambiente, al buio).

Prelievo di sangue

Il prelievo di campioni di sangue deve essere eseguito dalla vena di un arto superiore dopo disinfezione della superficie cutanea con un disinfettante non alcolico. Poiché si tratta di un prelievo di tipo invasivo, esso deve essere eseguito nel rispetto della normativa vigente in materia e deve essere atto a ridurre al minimo il rischio per la salute del soggetto che vi si sottopone.

La conservazione a lungo termine (mesi/anni) dei campioni ematici deve essere effettuata alla temperatura di -18/-22 °C. In caso di limitati periodi di tempo intercorrenti tra prelievo ed analisi (ad es. alcuni giorni) è sufficiente la conservazione a +2/+8 °C.

Prelievo di sangue per la determinazione dell'alcolemia a scopi forensi

La determinazione dell'alcolemia con finalità tossicologico-forensi deve necessariamente tenere in considerazione le seguenti criticità:

- Potenziale contaminazione del campione dovuta all'improvvido uso di disinfettanti cutanei contenenti alcol etilico;
- Possibili fenomeni chimici o biochimici favorevoli alla neoformazione di alcol etilico;
- Manipolazioni del campione (ad es. sierazione, centrifugazione) tali da alterarne le caratteristiche originarie;
- Possibile evaporazione dell'alcol etilico dal campione dopo il prelievo.

Per tali ragioni il prelievo di sangue per la determinazione dell'alcolemia a scopi forensi (ne è classico esempio la determinazione alcolemica ai fini dei disposti del Codice della Strada) richiede obbligatoriamente di:

- Disinfettare l'area di prelievo con un disinfettante non alcolico;
- Effettuare il prelievo procedendo alla raccolta contestuale, mediante singola venipuntura, di almeno due aliquote di sangue in separate provette sottovuoto;
- Utilizzare provette sottovuoto contenenti sodio fluoruro come conservante ed un anticoagulante, come potassio ossalato, dotate di sistemi anti-effrazione ed etichette di sicurezza;
- Procedere, terminato il prelievo, all'inversione ripetuta delle provette per evitare la sierazione del campione;
- Procedere alla conservazione del campione e del controcampione secondo le modalità (tempi e temperature) in precedenza riportate.

È opportuno ricordare che la determinazione dell'alcol etilico sui derivati del sangue (plasma, siero) produce una sovrastima (mediamente del 12 - 18 %) rispetto alla sua determinazione su sangue intero e quindi non è idonea – ad esempio – nel contesto dei limiti normati dal Codice della Strada; pertanto, una determinazione alcolimetrica su plasma o siero può avere valenza esclusivamente diagnostico-clinica.

Prelievo di saliva

Il prelievo del fluido del cavo orale (saliva) può essere eseguito con un dispositivo commerciale la cui vendita sia autorizzata a livello nazionale, ovvero mediante la raccolta del fluido, senza stimolazione della salivazione, in un apposito contenitore. La suddivisione del prelievo in campione e controcampione può essere omessa solo nel caso in cui sia stato prelevato contestualmente alla saliva anche un campione di sangue.

Relativamente alle operazioni e agli accorgimenti da eseguire dopo il prelievo (conservazione) si fa riferimento a quanto illustrato nel paragrafo relativo al sangue.

Per tutte le fattispecie di prelievo illustrate nei paragrafi precedenti valgono inoltre i seguenti obblighi:

- Il soggetto deve poter verificare che il materiale necessario al prelievo sia integro, nuovo e sigillato;
- L'esecuzione di tutte le operazioni di suddivisione, confezionamento ed etichettatura del campione e del controcampione devono essere effettuate alla presenza dell'interessato che controfirma il modulo di campionamento nonché l'etichetta del campione e del controcampione;
- La corretta preservazione del campione da qualsivoglia adulterazione, inquinamento, o dispersione deve essere garantita mediante l'utilizzo di materiale idoneo, a perfetta chiusura, inviolabile o comunque sigillabile, non suscettibile di rotture in caso di urto durante il trasporto, o per shock termico durante il congelamento ove questo sia necessario;
- Ogni fase analitica relativa al campione deve essere riportata su apposita modulistica.

Prelievo da cadavere

Se i prelievi non vengono effettuati nella sede di appartenenza del laboratorio, il laboratorio stesso deve

richiedere l'osservanza delle procedure citate nel capitolo 6.

Riguardo alla tipologia di campioni autoptici da prelevare, è raccomandato il prelievo di campioni di sangue periferico, sangue centrale, urina, umor vitreo, bile, matrici cheratiniche.

Cause di esclusione e modalità di riacquiescenza dei campioni biologici

Nel caso in cui il campione biologico sia prelevato esternamente al laboratorio, è possibile riacquiescere il materiale inviato se è documentabile:

- L'incongruità, sotto il profilo qualitativo o quantitativo, del campione biologico in relazione alla specifica richiesta di analisi;
- La non corretta conservazione del campione durante il trasporto;
- La mancata o non verificabile (es. illeggibilità) corrispondenza tra i dati identificativi del campione e la documentazione di accompagnamento;
- L'evidenza di manomissione del campione (es. rimozione o rottura dei sistemi anti-effrazione).
- In tutti i casi di riacquiescenza, il Direttore del laboratorio è tenuto a compilare un rapporto di "non conformità" menzionando specificamente le cause di riacquiescenza del campione.

Conservazione, manipolazione e movimentazione del campione

Il campione deve essere correttamente conservato ponendo in atto ogni precauzione e modalità utili a preservare il campione da eventuale degradazione e garantire la stabilità degli analiti.

Tali modalità devono assicurare:

- L'identificazione e l'idoneità dei luoghi di conservazione;
- la conservazione alla temperatura idonea a seconda della tipologia di campione, del tempo di stoccaggio prima delle analisi e della finalità dell'accertamento. In linea generale, se gli accertamenti analitici vengono effettuati in limitati periodi di tempo (es. alcuni giorni) intercorrenti tra prelievo ed analisi i campioni possono essere mantenuti alla temperatura di +2/+8 °C, mentre devono essere conservati a -18/-22 °C se le analisi vengono effettuate con tempistiche maggiori (mesi/anni);
- Per i campioni da conservare a -18/-22°C (sangue, saliva ed urina) devono essere previsti congelatori diversi per la conservazione pre-analitica e per il successivo stoccaggio; le condizioni di conservazione dei capelli o altre formazioni pilifere devono essere tali da proteggere i campioni dall'umidità e dalla luce;
- Il rispetto della catena di custodia;
- La conservazione dei campioni sia positivi che negativi sino alla produzione del rapporto analitico/referto, se non diversamente indicato da normativa specifica;
- La conservazione dei controcampioni (dei campioni risultati positivi dopo analisi di conferma) per almeno un anno dalla data del rapporto analitico/referto, se non diversamente previsto da normativa specifica;
- Per campioni riferibili a specifici procedimenti giudiziari la conservazione è estesa fino a specifica autorizzazione di distruzione o eliminazione da parte dell'Autorità Giudiziaria. In caso di richiesta di analisi dopo lunghi tempi di conservazione, adeguati avvisi di cautela dovranno essere espressi riguardo la significatività dei risultati ottenuti, in relazione alla possibile instabilità degli analiti anche se il campione viene mantenuto nelle condizioni raccomandate.

METODI ANALITICI

Generalità

Per tutti i metodi analitici impiegati nel laboratorio deve essere definita la Procedura Documentata (Attività Tecniche), con il dettaglio delle informazioni descritte nel capitolo 4.

I risultati delle prove di validazione dei metodi analitici originari e delle sue revisioni successive devono essere documentati, archiviati e conservati dal laboratorio.

Il laboratorio può emettere referti con validità tossicologico-forense/medico-legale solo nel caso in cui i risultati analitici eventualmente ottenuti mediante l'applicazione di test di *screening* enzimatici o immunochimici vengano confermati, o direttamente ottenuti, con l'utilizzo di tecniche basate su principi chimico-fisici diversi dalle precedenti. In questo contesto l'impiego della spettrometria di massa (MS) nelle sue molteplici possibilità metodologiche, in combinazione con una tecnica di separazione di tipo cromatografico (es. gascromatografia, GC; cromatografia liquida ad alta pressione, LC) o elettroforetico (elettroforesi capillare, EC) per l'analisi quali-quantitativa di SSP trova il consenso generale della comunità scientifica nazionale e internazionale.

In linea generale, per ogni batch analitico deve essere processato un campione negativo di controllo ("bianco") ed almeno un positivo di riferimento in matrice biologica, al fine di valutare l'assenza di interferenze e le performance strumentali.

La sequenza analitica di iniezione deve sempre prevedere nell'ordine indicato:

- L'analisi del campione "bianco"
- L'analisi dei campioni incogniti (o dei campioni da sottoporre a conferma)
- L'analisi del o dei campioni positivi di riferimento e/o della curva di calibrazione.

Metodi di *screening*

L'impiego di un metodo di *screening* trova giustificazione in un laboratorio di tossicologia forense quando vi è necessità di analizzare un elevato numero di campioni in tempi brevi e a costi contenuti, con i vantaggi di elevata o totale automazione. I metodi di *screening* utilizzati per l'analisi di campioni biologici impiegano solitamente tecniche enzimatiche e immunochimiche, ma possono essere utilizzate anche tecniche cromatografiche/spettrometriche di massa.

I metodi di *screening* immunochimici sono tuttavia caratterizzati da ridotta specificità (dato qualitativo) ed elevata inaccuratezza (dato 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, varie tipologie di composti simili chimicamente).

Questi metodi, per le loro caratteristiche intrinseche, producono esclusivamente un risultato di tipo presuntivo, vale a dire la probabile negatività (assenza) o positività (presenza, meglio definita come "non negatività") del campione rispetto ad un analita, o più spesso a una classe di sostanze, relativamente a un valore di *cut-off* prestabilito dal metodo. In ogni caso, qualunque sia la specificità analitica del metodo di *screening* vale il presente assunto:

NON PUO' AVERE VALIDITA' FORENSE UN RISULTATO POSITIVO OTTENUTO ATTRAVERSO L'ESCLUSIVO UTILIZZO DI TECNICHE DI SCREENING ENZIMATICHE O IMMUNOCHEMICHE. È PERTANTO INDISPENSABILE CHE TALE RISULTATO SIA VERIFICATO DA UN'ANALISI EFFETTUATA MEDIANTE TECNICA SPETTROMETRICA DI MASSA IN COMBINAZIONE CON UNA TECNICA CROMATOGRFICA SU UNA NUOVA ALIQUOTA DI CAMPIONE.

Dal momento che l'esito negativo di un'analisi di *screening* è generalmente accettato come valido non è sufficiente verificare che il metodo di *screening* sia in grado di minimizzare il numero di risultati falsi negativi, ma deve essere accertata (o documentata dal produttore per i reattivi di tipo immunochimico)

la capacità del metodo di non produrre falsi negativi. A tale riguardo è consigliabile applicare comunque l'analisi di conferma anche ad una certa percentuale randomizzata di campioni risultati negativi allo *screening*.

L'effettuazione di analisi di *screening* enzimatiche o immunochimiche mediante l'impiego di *kit* e di calibratori direttamente forniti dalle ditte produttrici è ammessa. È altresì da rilevare che il valore di *cut-off* è definito dalla ditta produttrice di un *kit* analitico di *screening* per una determinata matrice e potrebbe essere diverso dai valori di *cut-off* stabiliti da specifici accordi o normative. Peraltro, anche nell'ambito della tossicologia forense esistono fattispecie che possono richiedere l'individuazione di valori di *cut-off* differenti nell'uso di *screening* immunochimici, talvolta inferiori a quelli suggeriti dai produttori.

Non è pertanto corretto adottare incondizionatamente il *cut-off* proposto dal produttore. Nel caso in cui sia necessario individuare un valore di *cut-off* differente da quello suggerito dal produttore, il metodo di *screening* deve in ogni caso essere sottoposto a rivalidazione nel laboratorio che lo utilizza, mediante uso di calibratori preparati *ad hoc*.

Il risultato di una analisi di *screening* non può essere espresso in termini di certezza di presenza o in termini quantitativi, ma unicamente sotto forma di presunta positività (presenza) o di negatività (assenza) di un analita o classe di sostanze nel campione.

Metodi di conferma qualitativa e di quantificazione

La fase di conferma, intesa come univoca identificazione di specifici analiti, deve essere in grado di produrre un risultato analitico il più possibile indipendente da quello ottenuto nella fase di *screening*, quando essa sia stata effettuata con tecniche enzimatiche o immunochimiche. Per tale ragione è necessario l'uso di tecniche di conferma basate su principi chimico-fisici diversi da quelli dello *screening*. Inoltre, il metodo di conferma deve essere caratterizzato da selettività e sensibilità analitiche superiori a quello di *screening*. A tale riguardo, si ritiene accettabile un metodo di conferma quantitativo in grado di raggiungere un limite di quantificazione inferiore, LLOQ, pari ad almeno la metà del *cut-off* del metodo di *screening*.

Non è accettabile l'impiego di un metodo di conferma che sia fondato su un principio analitico analogo o altamente correlato a quello dello *screening*, quando ottenuto con tecniche enzimatiche o immunochimiche (es. conferma di un dato immunochimico con un altro metodo immunochimico). L'impiego di una identica tecnica cromatografica per confermare un dato ottenuto per via cromatografica è accettabile se la tecnica di rivelazione abbinata alla cromatografia è differente.

L'impiego di una tecnica cromatografica per confermare un dato di *screening* ottenuto per via cromatografica con lo stesso sistema di rilevazione è ammesso esclusivamente se le due tecniche separative producono risultati scarsamente correlati (ad esempio due serie di tempi di ritenzione significativamente diversi, con uso di colonne a diversa selettività, etc.).

In ambito tossicologico-forense, la separazione cromatografica è comunque sempre necessaria in un metodo di conferma.

Come già accennato, l'impiego della MS in combinazione con una tecnica di separazione di tipo cromatografico (es. GC; LC) o elettroforetico (EC) per l'analisi quali-quantitativa di SSP trova il consenso generale della comunità scientifica internazionale e nazionale.

Pertanto:

IL GTFI RACCOMANDA L'UTILIZZO DELLA SPETTROMETRIA DI MASSA, ACCOPPIATA AD UNA TECNICA CROMATOGRAFICA, COME TECNICA IDENTIFICATIVA DI ELEZIONE PER L'ANALISI DI CONFERMA

Qualora il metodo di *screening* utilizzi tecniche cromatografiche abbinate alla spettrometria di massa, pertanto ad elevata specificità, la conferma potrà essere eseguita con analoga tecnica cromatografica abbinata alla spettrometria di massa, avendo cura di massimizzare il potere informativo del metodo di

acquisizione (vedasi i paragrafi relativi ai criteri minimi di identificazione) e l'uso dei controlli di qualità nella sequenza analitica.

Uso di standard interni

L'impiego di uno o più standard interni è fortemente raccomandato nel caso di applicazioni analitiche esclusivamente qualitative, ed è obbligatorio nel caso di metodi di analisi quantitativa. Lo standard interno, infatti, garantisce un elevato controllo, sia in relazione ai processi estrattivi degli analiti di interesse dalla matrice originaria, sia in relazione alla separazione cromatografica ed al sistema di rivelazione, come quello spettrometrico di massa. Gli standard interni devono essere aggiunti al campione ed ai controlli prima di qualsiasi loro trattamento preparativo. Unica eccezione a tale regola è l'analisi delle formazioni pilifere per la quale l'aggiunta degli standard interni deve essere effettuata dopo le operazioni di lavaggio, di sminuzzamento (se del caso) e di pesata. Nel caso di impiego di tecniche di rivelazione mediante spettrometria di massa il GTFI incoraggia l'uso di standard interni deuterati (se possibile con numero di deuteri ≥ 3) previa verifica che la quantità/concentrazione dello standard deuterato non sia tale da interferire significativamente sulla efficienza di ionizzazione (ad es. per fenomeni di competizione) o sulla quantificazione (ad es. contributi isotopici) dell'analita. La stabilità degli standard interni durante tutto il trattamento e l'analisi del campione deve essere preventivamente accertata o verificata.

Criteri minimi di identificazione

La scelta dei criteri minimi di identificazione, e dei rispettivi intervalli di tolleranza, può variare in relazione alle tecniche di analisi strumentale impiegate dal laboratorio ma deve comunque attenersi alle indicazioni di eventuale normativa di riferimento, e comunque a quanto generalmente accettato dalla comunità scientifica.

Si definiscono di seguito i criteri minimi di identificazione per le tecniche di analisi strumentale più diffuse:

Analisi cromatografica

- Il tempo di ritenzione relativo dell'analita, rispetto al corrispondente standard interno, deve essere compreso entro $\pm 1\%$ (GC) o $\pm 2\%$ (LC) di quello prodotto dal corrispondente analita nel controllo positivo.

Analisi MS in scansione (Full Scan, con ionizzazione ad impatto elettronico o chimica)

- Presenza nello spettro incognito di tutti gli ioni dello spettro del composto di riferimento (controllo positivo o spettro di libreria) con intensità, relativamente al picco base, $\geq 10\%$, incluso lo ione molecolare e gli ioni del suo cluster isotopico se $\geq 10\%$;
- Le abbondanze relative di tali ioni nello spettro incognito devono essere comprese in un intervallo di tolleranza ($\pm 20\%$) rispetto al corrispondente valore ottenuto per il composto di riferimento;
- Lo spettro di massa dell'analita di interesse deve contenere almeno 3 ioni con abbondanza $\geq 10\%$; altrimenti è necessario procedere all'analisi con una seconda metodica di ionizzazione od una procedura di derivatizzazione;
- La presenza nello spettro incognito di frammenti ionici assenti nello spettro di riferimento deve essere spiegabile con la parziale co-eluzione di componenti della matrice.

Analisi MS mediante monitoraggio di ioni specifici (Selected Ion Monitoring, SIM)

- Devono essere monitorati almeno 3 frammenti ionici (ove possibile includenti lo ione molecolare o un suo addotto, in dipendenza della tecnica di ionizzazione utilizzata) escludendo ioni isotopici e derivati da perdite aspecifiche. I frammenti ionici devono essere diagnostici dell'intera struttura molecolare e, se possibile, corrispondere a porzioni diverse della molecola;
- Qualora lo spettro di massa dell'analita di interesse non contenga specie ioniche con le

caratteristiche descritte si deve procedere all'analisi con una seconda metodica di ionizzazione od una procedura di derivatizzazione.

Analisi mediante MS tandem (MS-MS) in modalità di scansione degli ioni prodotto (Product Ion Scan)

- Lo ione precursore deve essere isolato con la minima ampiezza possibile, compatibilmente con l'intensità del segnale, al fine di escludere interferenze;
- Valgono inoltre gli stessi principi dell'analisi MS in Full Scan.

Analisi MS-MS in modalità Selected Reaction Monitoring (SRM)

- Devono essere acquisite almeno 2 transizioni dallo ione precursore agli ioni prodotto;
- Lo ione precursore delle due transizioni può essere comune, purché i frammenti delle transizioni siano relazionabili a porzioni diverse della molecola e, per almeno una transizione, deve essere lo ione molecolare o un suo addotto (dipendendo dalla tecnica di ionizzazione); gli ioni prodotto non devono risultare da perdite aspecifiche (es. perdita di H₂O).

Analisi MS in scansione, o mediante monitoraggio di ioni specifici, in modalità High-Resolution MS (HR-MS)

- In modalità di accoppiamento con cromatografia LC ed in Full Scan, devono essere effettuate, nelle migliori condizioni permesse di risoluzione ed accuratezza strumentali, a) le misure di massa accurata delle specie ioniche molecolari protonate (MH⁺); b) la comparazione dei pattern isotopici sperimentali e calcolati delle specie ioniche MH⁺; c) possibilmente l'esame della struttura fine dei pattern isotopici delle specie ioniche MH⁺ (discriminazione dei multipletti isotopici per i picchi isotopici M+1, M+2, M+3, ed in alcuni casi M+4).
- In modalità di accoppiamento con cromatografia LC e secondo le diverse modalità strumentali di monitoraggio di ioni specifici, deve essere effettuato, nelle migliori condizioni permesse di risoluzione ed accuratezza strumentali, il monitoraggio di specie ioniche scelte con i medesimi criteri descritti per l'analisi MS in bassa risoluzione.

Eccezioni a questi criteri minimi di identificazione devono trovare giustificazione nelle caratteristiche fisico-chimiche e/o strutturali degli analiti di interesse, ovvero nei limiti della tecnica di analisi strumentale utilizzata. Le ragioni che giustificano deviazioni rispetto ai criteri sopra elencati devono essere descritte nella Procedura Documentata. In tali casi, e comunque in generale, l'identificazione nel campione di metaboliti specifici di un analita e/o i risultati di altre tipologie di analisi possono essere utilizzati a supporto dell'identificazione dello stesso. Si rammenta altresì che è talora possibile, a scopo identificativo, modificare il comportamento cromatografico e spettrometrico di massa delle SSP attraverso numerose reazioni di derivatizzazione.

Utilizzando tecniche di conferma in spettrometria di massa (tecnica di conferma elettiva per il GTFI) è consigliato l'impiego del sistema degli *Identification Points* (IP) adottato con *Decisione della Commissione Europea 2002/657/EC in attuazione della Direttiva 96/23/EC del Consiglio dell'Unione Europea relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati* (G.U. dell'Unione Europea L 221 del 17.8.2002). Nel caso in cui il metodo di conferma abbia anche obiettivi di quantificazione, oltre ai criteri minimi di identificazione esso deve soddisfare i criteri minimi di quantificazione sopra descritti.

Valutazione dei risultati rispetto al cut-off

Se il metodo analitico ha valenza esclusiva di conferma qualitativa rispetto a un valore di *cut-off* prestabilito, l'incertezza di misura in corrispondenza di tale valore deve essere nota, evidenziata e sottratta al valore effettivamente misurato, riferendo la positività esclusivamente ai casi in cui il valore misurato, sottratto dell'errore di misura, risulti ancora superiore al *cut-off*.

L'analisi di controlli positivi per concentrazioni prossime al *cut-off* (ad es. $cut-off \pm 25\%$) permette di verificare le prestazioni del metodo qualitativo in tale ambito critico.

Il risultato di un'analisi di conferma di tipo qualitativo deve essere espresso esclusivamente sotto forma di positività (presenza) o di negatività (assenza).

Analisi quantitativa e criteri minimi di quantificazione

L'analisi quantitativa prevede l'allestimento di una opportuna curva di calibrazione per ogni analita da quantificare, in modo da comparare i segnali ottenuti dall'analisi di un campione incognito (ad es. aree dei picchi cromatografici dell'analita di interesse e del corrispondente standard interno) con i segnali ottenuti dall'analisi di una serie di campioni a concentrazione nota.

La curva di calibrazione dovrebbe essere tale da coprire una variazione di almeno un ordine di grandezza di segnale strumentale. Per quanto riguarda la scelta e le modalità di utilizzo dello standard interno valgono le raccomandazioni riportate nel paragrafo dedicato all'analisi qualitativa, al quale si rimanda.

Ai fini della corretta quantificazione è necessario che il segnale strumentale ottenuto dall'analisi del campione incognito sia significativamente superiore al segnale corrispondente al Limite Inferiore di Quantificazione analitica (LLOQ) determinato in fase di validazione del metodo, e comunque compreso nell'intervallo analitico della curva di calibrazione in uso.

Sono da ritenersi valide le raccomandazioni espresse per l'analisi qualitativa in merito alla verifica preventiva dell'assenza di interferenti/inquinanti. È indispensabile disporre di stime di recupero medio di principio attivo ottenute su matrici analoghe o simili a quelle per le quali deve essere stimata la quantità assoluta di principio attivo.

È inoltre necessaria la valutazione quantitativa di un congruo numero di controlli negativi e di controlli positivi. Tali controlli devono avere una concentrazione corrispondente a quella attesa entro un prefissato intervallo di tolleranza dichiarato nella Procedura Documentata. Qualora tale criterio non fosse rispettato deve essere riesaminata, contestualmente ai campioni, la curva di calibrazione completa. I controlli positivi devono essere distribuiti in maniera uniforme nell'ambito dell'intervallo di calibrazione, prevedendo anche controlli inferiori al *cut-off* (ove previsto) (ad es. - 50% del *cut-off*) e controlli a concentrazioni elevate (es. + 200% del *cut-off*), o comunque rispetto al punto medio della retta di calibrazione.

La curva di calibrazione deve essere allestita con almeno 5 calibratori diversi dallo zero.

Gli standard utilizzati per la preparazione dei controlli positivi e la quantificazione di specifici analiti (ed i relativi standard interni) devono essere di composizione e purezza certificata e in corso di validità. Qualora non disponibili in commercio è ammesso l'uso di standard non certificati, per esempio di grado farmaceutico, purché il laboratorio ne abbia verificato e dichiarato nella Procedura Documentata la validità.

I risultati di analisi quantitative devono essere espressi in modo tale da escludere dubbi interpretativi, con unità di misura direttamente confrontabili con eventuali valori di riferimento ed accettate dal Sistema Internazionale di Unità di Misura (SI). Gli stessi risultati devono preferibilmente essere espressi indicando l'incertezza associata alla misurazione eseguita ed il confronto con valori soglia o di riferimento dovrà tenere conto di questa incertezza. Il numero di cifre con cui è opportuno esprimere il risultato è dettato dall'entità dell'incertezza.

Determinazione dell'alcolemia a scopi forensi

Tenendo presente quanto descritto nel capitolo 6 in tema di prelievo di campioni ematici per la determinazione dell'alcolemia con finalità tossicologico-forensi, il GTFI dichiara

TECNICA D'ELEZIONE PER LA DETERMINAZIONE DELL'ALCOLEMIA A SCOPO FORENSE LA GASCROMATOGRAFIA CON CAMPIONAMENTO DELLO SPAZIO DI TESTA (HS-GC), ACCOPPIATA A RIVELAZIONE FID (FLAME IONIZATION DETECTOR) O MS

In tal caso, il relativo metodo deve essere in grado di quantificare nell'intervallo di calibrazione compreso almeno tra 0,05 e 3,0 grammi/litro (g/L), con imprecisione (CV%) e inaccuratezza (E%) ai valori di 0,05 - 0,1 - 0,5 - 0,8 - 1,5 g/L non superiori al 10%.

Il LOD del metodo deve essere inferiore a 0,05 g/L. Tuttavia, per stabilire la positività a fini tossicologico-forensi di un campione ematico (ad es. ai sensi dell'Art. 186 bis del Codice della Strada) si suggerisce di fissare la soglia decisionale a 0,1 g/L, in relazione all'esistenza di minimi valori fisiologici di etanolo nel sangue, della possibile assunzione di etanolo per mezzo di prodotti alimentari e/o farmaceutici, e soprattutto considerando che i livelli di disabilità causati dall'alcol iniziano ad essere prodotti da alcolemie di 0,1 – 0,2 g/L.

Inoltre, si raccomanda che ciascun laboratorio provveda, analogamente a quanto esposto per la soglia decisionale di 0,1 g/L, a definire criteri decisionali per stabilire l'effettivo superamento anche di altri specifici limiti di legge (ad es. 0,5 – 0,8 – 1,5 g/L, con riferimento all'Art. 186 del Codice della Strada).

In definitiva, si raccomanda che ciascun laboratorio provveda ad ottenere la stima delle incertezze di misura associate ai diversi valori di alcolemia determinati, prendendo in considerazione tutti i contributi delle diverse fonti di variabilità che influenzano le misure alcolemiche. La stima delle incertezze risulta infatti determinante per la definizione delle soglie decisionali in corrispondenza di ciascun limite di legge.

Si ribadisce infine che per quanto attiene la determinazione alcolemica, non è valida ai fini forensi ogni determinazione eseguita su derivati ematici.

Validazione dei metodi analitici

La validazione dei metodi analitici impiegati dal laboratorio consiste nell'ottenimento della conferma, sostenuta da evidenze oggettive, che i requisiti relativi ad una specifica utilizzazione o applicazione prevista sono stati soddisfatti.

La validazione dei metodi analitici deve essere effettuata precedentemente alla loro applicazione routinaria, sia per metodi sviluppati dal laboratorio che per quelli desunti, ed applicati in toto o in parte, dalla letteratura scientifica. La validazione è un processo continuo: ogni modificazione del sistema analitico rende necessaria una nuova fase di validazione.

La **validazione di un metodo qualitativo** deve includere almeno i seguenti parametri:

- Selettività/specificità analitica;
- Limite di rivelabilità (LOD);
- Stabilità degli analiti;
- Valutazione dell'effetto matrice;
- Assenza di carry-over.

La **validazione di un metodo quantitativo** deve includere almeno i seguenti parametri:

- Selettività/specificità analitica;
- Stabilità degli analiti;
- Linearità nell'intervallo di calibrazione;
- Valutazione dell'effetto matrice;
- Assenza di *carry-over*;
- Limite di rivelabilità (LOD);
- Limiti inferiore e superiore di quantificazione (LLOQ e ULOQ),
- Applicabilità della diluizione del campione (*dilution integrity*);

- Precisione (almeno ripetibilità intra-laboratorio);
- Accuratezza;
- Recupero;
- Robustezza.
- Incertezza di misura;

La scelta dei parametri da includere nelle prove di validazione deve tenere conto anche della frequenza di impiego di un metodo analitico.

Cut-off e requisiti minimi di prestazione

Ribadendo il carattere del tutto convenzionale del valore di *cut-off* (o Valore Soglia o Soglia Decisionale) per stabilire la negatività ovvero la positività di un campione e ribadendo altresì che esso non coincide necessariamente con i valori di LLOQ né LOD, il GTFI ritiene di dover proporre il concetto di "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.

Si riportano in **TABELLA 1** i requisiti minimi adottati dal GTFI, per la determinazione quantitativa delle più frequenti classi di SSP in campioni ematici ed urinari.

Il laboratorio che intende svolgere accertamenti analitici quali-quantitativi con finalità tossicologico-forensi e medico-legali deve essere in grado di assicurare la corretta quantificazione almeno delle concentrazioni indicate, comunemente ottenibile utilizzando tecniche cromatografiche abbinate a spettrometria di massa.

Si ribadisce che tali valori non sono *cut-off* interpretativi.

Stante l'ampia varietà di tecniche e metodi di screening adottabili per le diverse matrici e caratterizzati da prestazioni spesso molto diverse fra loro, non è opportuno indicare *cut-off* di *screening*, i cui valori il laboratorio avrà cura di scegliere in armonia con le prestazioni delle tecniche o metodi di conferma adottati.

Naturalmente, qualora si eseguano determinazioni analitiche riferibili a specifiche norme di legge o regolamenti, i *cut-off* decisionali indicati nella norma/regolamento dovranno essere applicati per la valutazione del risultato quantitativo come positivo o negativo.

Per i controlli sui lavoratori addetti a mansioni che espongono terzi a rischi per la salute e l'incolumità, ai sensi dell'art. 41 comma 4 del D.lgs. 81/2008, si dovranno utilizzare i *cut-off* di *screening* e di conferma su urine e formazioni pilifere del protocollo relativo al *Provvedimento 18 settembre 2008 della Conferenza Stato-Regioni* (pubblicato in G.U. n. 236 dell'8 ottobre 2008) che stabilisce le modalità e le procedure dei controlli.

Per i capelli si riportano in **TABELLA 2**, a titolo di riferimento, i valori di concentrazione (*cut-off* interpretativi) adottati nel documento di consenso, nella revisione del 2021, della *Society of Hair Testing* (SoHT) per l'identificazione dell'utilizzo delle più comuni classi di SSP.

In questo contesto GTFI ritiene possibile l'utilizzo di tecniche di *screening* immunochimiche per la ricerca di SSP nelle formazioni pilifere. In tal caso i relativi metodi adottati devono essere validati nel laboratorio con particolare riguardo alla sensibilità (valutazione dei veri negativi e dei falsi negativi).

Per il fluido orale (saliva) si riportano in **TABELLA 3**, sempre a titolo di riferimento, i *cut-off* di *screening* e conferma utilizzati dalla *European Workplace Drug Testing Society* (EWDTS).

I valori riportati nelle Tabelle 2 e 3 non hanno, allo stato, valore di legge e consentono di discriminare tra negatività o positività di un campione rispetto a determinate sostanze (e/o loro metaboliti) secondo

l'interpretazione fornita dalla società scientifica di merito. L'utilizzo di valori decisionali diversi, e comunque sottoposti ad una rigorosa valutazione tossicologico forense, è possibile per particolari contesti e scopi analitici (ad esempio nei casi di accertamenti tossicologici nell'ambito di reati facilitati dall'uso di sostanze psicoattive o accertamenti su minori).

7. REFERTO O RAPPORTO ANALITICO

Il rapporto analitico deve essere prodotto in formato cartaceo e consegnato – salvo diverse disposizioni di legge – al richiedente l'accertamento o a persona munita di delega scritta del richiedente. È ammesso l'invio aggiuntivo del rapporto analitico in formato elettronico (previo consenso scritto del destinatario, indicato nel modulo di richiesta di analisi) qualora il Laboratorio metta in atto una Procedura Documentata sufficiente a garantire l'inaccessibilità delle informazioni in esso contenute da parte di persone diverse dal destinatario e, in ogni caso, in ottemperanza alla normativa vigente in tema di riservatezza dei dati personali e sensibili. Tale procedura deve essere descritta nel dettaglio nelle Procedure Documentate.

Il rapporto analitico deve contenere almeno i seguenti elementi:

- Titolo;
- Dati identificativi del laboratorio;
- Numero identificativo del rapporto analitico (es. numero progressivo). Se il rapporto consta di più pagine esse devono essere numerate progressivamente con indicazione del numero totale di pagine;
- Dati identificativi del richiedente;
- Dati identificativi del soggetto (ovvero, se richiesto, codice alfanumerico anonimo) da cui sono stati prelevati i campioni oggetto dell'analisi;
- Tipo e finalità degli accertamenti analitici richiesti;
- Data e ora del prelievo dei campioni (se noti al laboratorio);
- Data di accettazione dei campioni;
- Data di refertazione;
- Descrizione della tipologia di campioni (con dettaglio di eventuali anomalie);
- Indicazione delle tipologie di analisi eseguite;
- Tecniche analitiche utilizzate;
- Risultati analitici quali-quantitativi con relative unità di misura e relativi limite di quantificazione, *cut-off*, incertezza di misura, quando applicabili;
- Legenda riportante il significato di abbreviazioni o terminologie inusuali;
- Interpretazione dei risultati analitici, compresa la valutazione sui limiti di utilizzabilità del risultato, quando necessario, nei limiti delle informazioni disponibili al Direttore refertante;
- Nome e firma del Direttore del laboratorio (e facoltativamente dell'analista).

8. ASSICURAZIONE DELLA QUALITÀ

Per garantire la correttezza, la validità, e l'utilizzabilità in ambito tossicologico-forense e medico-legale delle determinazioni analitiche e dei relativi risultati, il laboratorio deve adottare un sistema organizzato di controllo interno delle strutture, della qualificazione e della formazione del personale, delle apparecchiature, dei metodi e delle procedure analitiche. È auspicabile la nomina di un cosiddetto Responsabile della Qualità, a cui affidare compiti organizzativi di sistemi di sorveglianza e miglioramento dei requisiti di qualità del laboratorio.

La gestione del laboratorio deve essere mirata ad assicurare che i requisiti per la qualità siano soddisfatti: deve cioè dare evidenza oggettiva di "assicurazione di qualità".

L'assicurazione della qualità assume un ruolo peculiare nelle attività analitiche di cui alle presenti Linee Guida trattandosi di accertamenti con finalità tossicologico-forensi e medico-legali che rispondono a dettati normativi; per di più i risultati di detti accertamenti possono spesso assumere anche rilevanza di prova giudiziaria. Devono quindi essere adottati meccanismi in grado d'identificare eventuali errori ed applicare conseguenti rimedi.

L'assicurazione della qualità coinvolge tutti i processi che si svolgono all'interno del laboratorio, dalla raccolta ed accettazione dei campioni biologici, allo svolgimento delle analisi, alla validazione dei risultati ed alla refertazione degli stessi.

Controllo di Qualità Interno ed Esterno

Il Controllo di Qualità Interno comporta una valutazione critica e continua di tutti i processi del laboratorio. Il controllo deve comprendere infatti tutte le fasi del protocollo analitico, dall'accettazione dei campioni all'emissione del referto analitico.

Il laboratorio deve disporre di procedure di controllo per monitorare la validità dei processi effettuati. I dati risultanti devono essere registrati in modo tale da rilevare tendenze in atto e permettere un'analisi statistica per la loro revisione.

Il **Controllo di Qualità Interno** deve riguardare almeno le seguenti fasi:

- Accettazione dei campioni (ad es. tipologia e quantità dei campioni);
- Conservazione e sicurezza dei campioni e controcampioni (accesso ai dispositivi adibiti alla conservazione, sistemi di identificazione dei campioni, monitoraggio delle temperature, etc.);
- Strumentazione analitica (verifica di funzionamento, taratura, manutenzione ordinaria e straordinaria);
- Analisi (utilizzo di campioni di controllo positivi e negativi da analizzarsi assieme a campioni reali e di carte di controllo);
- Refertazione (completezza della compilazione).

L'uso di carte e liste di controllo rappresentano strumenti importanti del controllo di qualità interno per il monitoraggio delle prestazioni analitiche. Il laboratorio potrà utilizzare tali dati per la stima dell'incertezza di misura associata ai risultati delle determinazioni analitiche eseguite.

Il laboratorio che effettua determinazioni analitiche quali-quantitative di SSP dovrebbe inoltre partecipare ad uno o più circuiti inter-laboratorio per il **Controllo Esterno della Qualità** (ove esistenti, ed almeno per le procedure analitiche che rivestono carattere routinario), i quali prevedono il confronto dei risultati prodotti dal laboratorio con quelli di altri laboratori partecipanti al medesimo circuito. Usualmente ciò è realizzato attraverso la fornitura di campioni omogenei e stabili da parte di un soggetto terzo che raccoglie ed analizza statisticamente i risultati prodotti dai laboratori partecipanti. L'obiettivo principale di un circuito inter-laboratorio è l'auto-valutazione della qualità delle misurazioni analitiche eseguite e la possibilità di far emergere contributi di variabilità altrimenti non considerabili.

9. RIFERIMENTI NORMATIVI E BIBLIOGRAFICI

- Norma UNI EN ISO 9000:2015 - Sistemi di gestione per la qualità - Fondamenti e vocabolario;
- Norma UNI EN ISO 9001:2015 - Sistemi di gestione per la qualità – Requisiti;
- Norma UNI EN ISO 15189:2013 - Laboratori medici - Requisiti riguardanti la qualità e la competenza;
- Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 - Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura;
- Articoli 119, 186, 186 bis, 187 del Codice della Strada;
- 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 applicative del provvedimento n. 99/cu 30 10 2007. G.U. n. 236 del 8 10 2008.
- DECISIONE 2002/657/CE 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati;
- Society of Hair Testing: 2021 SoHT CONSENSUS ON DRUGS OF ABUSE (DOA) TESTING IN HAIR. https://www.soht.org/images/pdf/Consensus_DoA_2021.pdf;
- Society of Hair Testing: Recommendations for Hair Testing;
- European Guidelines for Workplace Drug Testing in Urine. <http://www.ewdts.org/data/uploads/documents/ewdts-urine-guideline-2015-11-01-v2.0.pdf>;
- TIAFT – The International Association of Forensic Toxicologists - Laboratory Guidelines. TIAFT-Bulletin XXXI Number 4 p. 23-26;
- Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 4TH EDITION. Eds A.C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. Pharmaceutical Press 2011.

APPENDICE

TABELLA 1

Concentrazioni che definiscono i *Requisiti Minimi di Prestazione* per l'analisi quantitativa di SSP in sangue ed urina con finalità tossicologico-forensi, mediante tecniche cromatografiche abbinate a spettrometria di massa

Classe di sostanze o sostanze	Concentrazioni (ng/mL) relative ai requisiti minimi di prestazione
Oppiacei	
<i>morfina</i>	2
<i>codeina</i>	2
<i>6-acetilmorfina</i>	2
Cocaina	
<i>cocaina</i>	2
<i>benzoilecgonina</i>	2
<i>cocaetilene</i>	2
<i>norcocaina</i>	2
Amfetamina e congeneri	
<i>amfetamina</i>	2
<i>metamfetamina</i>	2
3,4-Metilendioossimetamfetamina e congeneri	
<i>MDMA</i>	2
<i>MDA</i>	2
<i>MDEA</i>	2
<i>MBDB</i>	2
Metadone	
<i>metadone</i>	2
<i>EDDP</i>	2
Cannabinoidi	
<i>THC</i>	1
<i>11-OH-THC</i>	0,1
<i>THC-COOH</i>	2
Buprenorfina	
<i>buprenorfina</i>	2
<i>norbuprenorfina</i>	2

TABELLA 2

Valori di concentrazione (*cut-off* interpretativi) adottati dalla Society of Hair Testing (SoHT) per identificare l'utilizzo di diverse classi di SSP in campioni di capelli (3 cm prossimali) (da 2021 SoHT Consensus on Drugs of Abuse – DOA - Testing in Hair)

Classe di sostanze o sostanze	Concentrazioni (ng/mg) relative ai <i>cut-off</i> interpretativi
Oppiacei^a	
<i>morfina</i>	0,2
<i>codeina</i>	0,2
<i>diidrocodeina</i>	0,2
<i>6-acetilmorfina</i>	0,2
<i>eroina</i>	0,2
Cocaina^{b,c}	
<i>cocaina</i>	0,5*
<i>benzoilecgonina</i>	
<i>ecgonina metilestere</i>	
<i>cocaetilene</i>	
<i>norcocaina</i>	
<i>OH-cocaina</i>	
<i>OH-benzoilecgonina</i>	
Amfetamine e congeneri	
<i>amfetamina</i>	0,2
<i>metamfetamina</i>	0,2
<i>MDMA</i>	0,2
<i>MDA</i>	0,2
<i>MDEA</i>	0,2
Cannabinoidi^d	
<i>THC</i>	0,05**
<i>CBD</i>	0,05
Oppioidi	
<i>tramadolo^e</i>	0,2
<i>ossicodone</i>	0,1
Metadone^f	
<i>metadone</i>	0,2
Buprenorfina^g	
<i>buprenorfina</i>	0,01
Ketamina^h	
<i>ketamina</i>	0,2

* Valore per le mansioni a rischio ex L. 81/2008, 0,2 ng/mg di cocaina e metaboliti

** Valore per le mansioni a rischio ex L. 81/2008, 0,1 ng/mg di cannabinoidi metaboliti

^a L'assunzione di eroina deve essere differenziata da quella di codeina o morfina tramite identificazione di eroina o 6-MAM

^b La presenza di uno o più metaboliti deve essere accertata per confermare l'uso della sostanza

^c Per l'utilizzo della cocaina base (*crack*), deve essere considerata la presenza dell'anidroecgonina metilestere

^d La rilevazione del THC-COOH (MR LOQ 0.2 pg/mg) supporta fortemente l'uso di THC

^e La conferma del desmetiltramadolo prova l'uso del tramadolo

^f La conferma di EDDP prova l'uso del metadone

^g La conferma della norbuprenorfina prova l'uso della buprenorfina

^h La conferma della norketamina prova l'uso della ketamina.

TABELLA 3

Valori di concentrazione (*cut-off* massimi di screening e conferma) raccomandati per l'analisi del fluido orale nei controlli sui lavoratori secondo le linee guida EWTDS (da European Guidelines for Workplace in Oral Fluid 2015-11-01 Version 2.0).

Classe di sostanze o sostanza	Cut - off di screening (ng/mL)	Cut-off di conferma (ng/mL)
Oppiacei		
<i>morfina</i>	Oppiacei (<i>morfina</i>) 40 Oppiacei (<i>6-MAM</i>) 4	15
<i>codeina</i>		15
<i>norcodeina</i>		2
<i>6-acetilcodeina</i>		2
<i>diidrocodeina</i>		15
<i>6-monoacetilmorfina</i>		2
Cocaina e metabolita		
<i>cocaina</i>	Cocaina + metaboliti 30	8
<i>benzoilecgonina</i>		8
Amfetamina e congeneri		
<i>amfetamina</i>	Amfetamine classe 40	15
<i>metamfetamina</i>		15
<i>MDMA</i>		15
<i>MDA</i>		15
Cannabinoidi		
<i>THC</i>	<i>THC</i> 10	2
Metadone e metaboliti	<i>L-Metadone</i> 50	20
Buprenorfina e metaboliti	5	1