

# LINEE GUIDA PER LA DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE D'ABUSO NELLA MATRICE PILIFERA

A cura di Simona Pichini e Roberta Pacifici

# CAPI



REGIONE  
LAZIO





Reparto Farmacodipendenza, Tossicodipendenza e Doping  
Osservatorio Fumo Alcol e Droga  
Dipartimento del Farmaco  
Istituto Superiore di Sanità  
Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma  
Tel. 06 49902909  
Fax 06 49902016  
e-mail: [osservatorio.fad@iss.it](mailto:osservatorio.fad@iss.it)

# LINEE GUIDA PER LA DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE D'ABUSO NELLA MATRICE PILIFERA

---

## **Autori**

Simona Pichini e Roberta Pacifici

## **In collaborazione con**

Patrizia Gori

Emilia Marchei

Laura Martucci

Luisa Mastrobattista

Ilaria Palmi

Manuela Pellegrini

Maria Concetta Rotolo

Pubblicazione realizzata grazie al finanziamento della Regione Lazio:  
Progetto regionale "Monitoraggio e miglioramento della qualità  
dei laboratori di tossicologia in ambito regionale" DGR 556/2010



---

# INDICE

<b>1. Generalità</b>	p. 9
1.1 Introduzione	p. 9
1.2 Obiettivi e campi d'applicazione	p. 10
1.3 Procedure per la catena di custodia	p. 11
1.4 Sicurezza del laboratorio	p. 12
1.5 Personale di laboratorio	p. 12
<b>2. Il prelievo del campione</b>	p. 13
2.1 Introduzione	p. 13
2.2 Modalità di raccolta	p. 14
2.3 Moduli per il verbale di prelievo	p. 19
2.4 Kit per la raccolta del campione di capelli (o altra matrice pilifera)	p. 20
2.5 Moduli per la catena di custodia	p. 21
2.6 Prelievo di matrici pilifere post mortem	p. 22
2.7 Prelievo di matrici pilifere in soggetti che hanno avuto una assunzione inconsapevole di sostanze	p. 22
<b>3. Procedure per le analisi di laboratorio</b>	p. 23
3.1 Ricezione del campione (Accettazione)	p. 23
3.2 Trattamento del campione	p. 23
3.2.1 <i>Lavaggio</i>	p. 23
3.2.2 <i>Preparazione del campione</i>	p. 24
3.3 Digestione della matrice cheratinica ed estrazione degli analiti	p. 25

3.4	Analisi di screening	p. 26
3.5	Analisi di conferma	p. 26
3.6	Cut-off	p. 27
<b>4.</b>	<b>Consegna dei risultati analitici</b>	<b>p. 30</b>
4.1	Refertazione	p. 30
4.2	Comunicazione dei risultati analitici	p. 32
4.3	Conservazione dei campioni	p. 34
<b>5.</b>	<b>Contestazione dei risultati</b>	<b>p. 35</b>
<b>6.</b>	<b>Assicurazione della Qualità delle analisi</b>	<b>p. 36</b>
6.1	Assicurazione di qualità	p. 36
6.2	Validazione delle metodologie d'analisi	p. 36
6.3	Controllo di qualità interno	p. 38
6.4	Valutazione Esterna di Qualità (VEQ)	p. 41
6.5	Analisi per conto terzi	p. 41
<b>7.</b>	<b>Procedure accertative per lavoratori con mansioni a rischio</b>	<b>p. 42</b>

**Appendice A**

*Organizzazione del personale del laboratorio* p. 46

**Appendice B**

*Esempio di dichiarazione di consenso informato da parte del soggetto sottoposto al controllo* p. 50

**Appendice C**

*Esempio di un verbale di prelievo* p. 51

**Appendice D**

*Esempio di modulo di catena di custodia* p. 52

**Appendice E**

*Alcuni esempi di non-conformità nella catena di custodia* p. 53

**Appendice F**

*Esempio di procedura operativa standard per la determinazione di amfetamine, cocaina ed oppiacei nei capelli* p. 54

**Appendice G**

*Esempio di procedura operativa standard per la determinazione dei cannabinoidi nei capelli* p. 56

**Appendice H**

*Esempio di procedura operativa standard per la determinazione dell'etilglucuronide nei capelli* p. 58

**Appendice I**

*Esempio di procedura operativa standard per la determinazione degli esteri etilici degli acidi grassi nei capelli* p. 59

**Appendice L**

*Criteri cromatografici e di spettrometria di massa per l'accettabilità del risultato* p. 60

**Appendice M**

*Parametri principali nella validazione di un metodo analitico* p. 62

**Bibliografia consigliata**

p. 67





---

# 1. Generalità

## 1.1 Introduzione

Le analisi per la ricerca di xenobiotici (farmaci, composti tossici, sostanze stupefacenti o psicotrope) e biomarcatori di uso e abuso alcolico nella matrice pilifera, vengono generalmente richieste per finalità cliniche e/o medico-legali.

La richiesta di una analisi tossicologica sulla matrice pilifera è legata soprattutto alla possibilità di incrementare la finestra temporale di rilevabilità di una determinata sostanza. Infatti, se una sostanza (per esempio una sostanza d'abuso e/o un suo metabolita) è rilevabile per alcune ore nel sangue ed alcuni giorni nell'urina, la stessa sostanza è rilevabile nei capelli per alcuni mesi od anni, a seconda della lunghezza degli stessi. Ricordiamo infatti che ogni bulbo pilifero possiede un proprio ciclo vitale: una prima fase di crescita detta *anagenica* (l'unico stadio in cui avverrebbe l'incorporazione delle droghe) della durata variabile da 2 a 7 anni, uno stadio intermedio detto *catagenico* di 2 settimane circa ed uno stadio di riposo detto *telogenico* di 3-4 mesi. Pertanto nella parte prossimale del capello, quella cioè vicina alla cute, è possibile rilevare una esposizione temporaneamente vicina all'assunzione, mentre spostandosi nella parte distale, verso la punta, si rileva una esposizione più lontana nel tempo. Inoltre, essendo la velocità di crescita del capello in fase anagenica di circa 1 cm/mese, l'analisi segmentale per cm di capello può fornire informazioni riguardanti storia e tipologia di consumo di una sostanza in ognuno dei mesi corrispondenti al segmento analizzato. Il prelievo del campione non è invasivo e il trasporto e la conservazione non richiedono particolari accorgimenti.

A differenza di quanto avviene per le altre matrici biologiche, quando si effettuano analisi su un campione di capelli e si procede all'interpretazione del risultato, occorre tenere conto di alcune peculiarità della matrice pilifera, come la sua natura (matrice solida), l'eterogeneità, eventuali trattamenti igienici e

cosmetici che potrebbero alterare la presenza e la concentrazione della/e sostanza/e da ricercare.

## 1.2 Obiettivi e campi d'applicazione

Lo scopo di questo documento è quello di fornire ai laboratori di farmacotossicologia ed agli enti nazionali di accreditamento delle linee guida condivise a livello nazionale che tengono conto di quanto prodotto a livello internazionale sulle migliori pratiche di laboratorio da seguire per effettuare analisi delle sostanze d'abuso e dei biomarcatori di uso e abuso alcolico nei capelli. Queste linee guida mirano a fornire un sostegno pratico ai laboratori che progettano di effettuare o che già effettuano le analisi di tali sostanze nei capelli, in modo che essi possano far propri i requisiti necessari all'implementazione di un servizio di elevata qualità.

Schematizzando, le presenti linee guida intendono:

- fornire un contesto operativo comune ai laboratori che eseguono analisi per le sostanze d'abuso nei capelli a fini clinici e/o medico legali;
- promuovere ed armonizzare le procedure proponendo linee guida condivise a livello nazionale;
- assicurare che le procedure operative messe in atto dal laboratorio producano un risultato legalmente difendibile;
- fornire garanzie a tutela della dignità dei soggetti sottoposti all'analisi ed assicurare la validità dei risultati ottenuti sui campioni di matrice pilifera;
- definire, per tutti i laboratori, criteri comuni di assicurazione e controllo della qualità accreditabili da un organismo esterno.

Oltre che per finalità cliniche o medico legali legate alla ricerca delle sostanze stupefacenti o psicotrope nel corso delle indagini

penali (decessi per droga, crimini facilitati dall'uso di droghe, detenzione di sostanze stupefacenti) le analisi vengono richieste anche per decidere l'affidamento di minori, valutare l'assenza di consumo di sostanze stupefacenti nei programmi di riabilitazione o per ottenere un nuovo rilascio della patente di guida. L'analisi dei capelli può essere utilizzata per accertare un abuso cronico di alcol attraverso la valutazione di biomarcatori quali l'etilglucuronide (EtG) e gli esteri etilici degli acidi grassi (FAEE). Con il Provvedimento del 18 settembre 2008, pubblicato in Gazzetta Ufficiale N. 236 dell'8/10/2008, lo Stato ha emanato le procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza e di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope nei lavoratori che svolgono mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi. In questo provvedimento viene espressa la necessità di effettuare l'analisi tossicologica sulla matrice pilifera negli accertamenti tossicologico-analitici di II livello (accertamento dell'assunzione sporadica di sostanze stupefacenti o di tossicodipendenza) predisposti dai servizi per le tossicodipendenze (Ser.T.), qualora quelli di I livello su matrice urinaria abbiano dato un risultato positivo.

### 1.3 Procedure per la catena di custodia

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze stupefacenti o psicotrope e/o metaboliti e/o biomarcatori di uso e abuso alcolico nella matrice pilifera devono istituire una catena di custodia dei campioni al fine di documentare il controllo e la tracciabilità degli stessi dal momento del prelievo, alla loro accettazione nel laboratorio che effettua le analisi fino al completamento delle analisi, inclusi la refertazione del risultato, la conservazione e lo smaltimento finale del materiale residuo.

La registrazione dei dati relativi alla catena di custodia dovrebbe essere conservata su carta o su supporto informatico, per un periodo di tempo non inferiore ai 5 anni salvo diverse disposizioni legislative.

## 1.4 Sicurezza del laboratorio

I laboratori che effettuano le analisi sulle sostanze d'abuso, devono disporre di un valido sistema di sicurezza per garantire il divieto di accesso al personale non autorizzato alle aree dove si svolgono le analisi e/o ad aree in cui sono conservati i campioni e la documentazione.

Il laboratorio deve registrare l'entrata e l'uscita del personale nelle aree protette del laboratorio.

## 1.5 Personale di laboratorio

Solamente il personale qualificato e la cui competenza sia stata formalmente riconosciuta può lavorare all'interno del laboratorio. I ruoli, le qualifiche e le responsabilità sono descritte nell'Appendice A. È possibile che una stessa persona ricopra più ruoli. Il laboratorio deve possedere un registro dove vengono riportate le competenze del personale in funzione delle mansioni svolte. I documenti cartacei o informatici di coloro che prestano servizio nel laboratorio devono contenere un *curriculum vitae* aggiornato con un elenco delle qualifiche e delle esperienze maturate in precedenti impieghi, nonché l'addestramento e le competenze relative alle mansioni svolte al momento. Tutto il personale impiegato in laboratorio deve aver ricevuto adeguata formazione in materia di salute e sicurezza sul luogo di lavoro.

---

## 2. Il prelievo del campione

### 2.1 Introduzione

La raccolta del campione deve essere effettuata da una persona autorizzata ad effettuare la raccolta stessa. Questa persona spiega ed esegue la procedura di prelievo del campione al soggetto sottoposto al controllo, compila il verbale di prelievo, fa firmare il consenso informato e compila le apposite sezioni del modulo della catena di custodia.

È essenziale predisporre delle Procedure Operative Standard (POS) relative alla raccolta e conservazione del campione, alla formazione del personale addetto al prelievo e al trasporto del campione al laboratorio che effettuerà l'analisi tossicologica. Tali procedure devono essere seguite scrupolosamente.

Occorre documentare accuratamente:

- il rispetto della privacy e della sicurezza del soggetto sottoposto al controllo al momento della raccolta;
- la verifica dell'identità del soggetto sottoposto al controllo;
- la sede dove è avvenuto il prelievo;
- la corretta attribuzione del campione al soggetto sottoposto al controllo;
- che non abbia avuto luogo alcuna falsificazione o manomissione del campione;
- che non abbia avuto luogo alcun accesso non autorizzato al campione stesso;
- che sia stato firmato il consenso informato da parte del soggetto sottoposto al controllo (Appendice B);
- l'utilizzo da parte del soggetto sottoposto al controllo di particolari medicinali che possano interferire con i risultati analitici;
- la tracciabilità del campione attraverso opportune registrazioni delle movimentazioni dello stesso, dal luogo del prelievo sino alla ricezione in Laboratorio, incluse le registrazioni dell'identità del personale autorizzato alla sua manipolazione.

## 2.2 Modalità di raccolta

Quando possibile è preferibile prelevare il campione dall'area corrispondente alla parte posteriore della testa (*vertex*), il più possibile vicino al cuoio capelluto; si considera infatti che questa regione della testa sia associata ad una minima variabilità interindividuale nella velocità di crescita del capello.

Quando il prelievo del campione è effettuato su un bambino o su persone con un evidente diradamento dei capelli, può sorgere la preoccupazione di lasciare loro una zona calva. In questi casi, la raccolta del campione può essere effettuata prelevando ciocche più piccole in aree differenti del capo, concentrandosi tuttavia nella zona del vertice posteriore della testa.

La matrice pilifera d'elezione per le analisi delle sostanze stupefacenti è rappresentata dai capelli, tuttavia, quando il loro prelievo non è possibile (ad esempio calvizie, rasatura a zero) si può ricorrere a siti di prelievo alternativi come il torace, il pube, le ascelle o il viso (peli della barba). La raccolta dei campioni in parti intime del corpo richiede una attenta valutazione del rispetto della privacy del soggetto sottoposto al controllo, garantendo tuttavia che non venga compromessa la correttezza del processo di prelievo. Si ricorda inoltre che la velocità di crescita e la dormienza (fase telogenica) dei peli prelevati in queste zone del corpo sono differenti dalla velocità di crescita e dalla dormienza dei capelli. Pertanto, non è possibile risalire ad una finestra temporale di uso di sostanza, ma si può solo confermare o escludere un uso pregresso.

La quantità di capelli necessaria all'analisi è una ciocca dello spessore di una matita, divisibile in due parti (aliquota A e B). È importante raccogliere una quantità di capelli sufficiente ad effettuare sia le analisi di screening che le analisi di conferma (aliquota A), nonché conservare una parte del campione per una eventuale analisi di verifica (controanalisi, aliquota B). La ciocca di capelli da prelevare deve essere fissata con uno filo legato il più vicino possibile alla cute (Figura 1) prima di eseguire

il taglio. Nel caso di capelli corti ciò non è possibile. In tal caso, la ciocca tagliata viene fissata su un foglio di carta con una clip indicando con una freccia la parte prossimale alla cute.

Figura 1. Il prelievo di un campione di capelli.



*Arrotolare e stringere con uno filo una ciocca di capelli dello spessore di una matita o diverse ciocche più sottili dal vertice posteriore della testa.*



*I capelli devono essere tagliati immediatamente sopra la cute, il più vicino possibile al cuoio capelluto. È necessario annotare la lunghezza della ciocca di capelli .*



*La ciocca di capelli deve essere sistemata nell'apposito foglio di alluminio. La porzione della ciocca corrispondente alle radici deve fuoriuscire dalla parte dentata del foglio.*

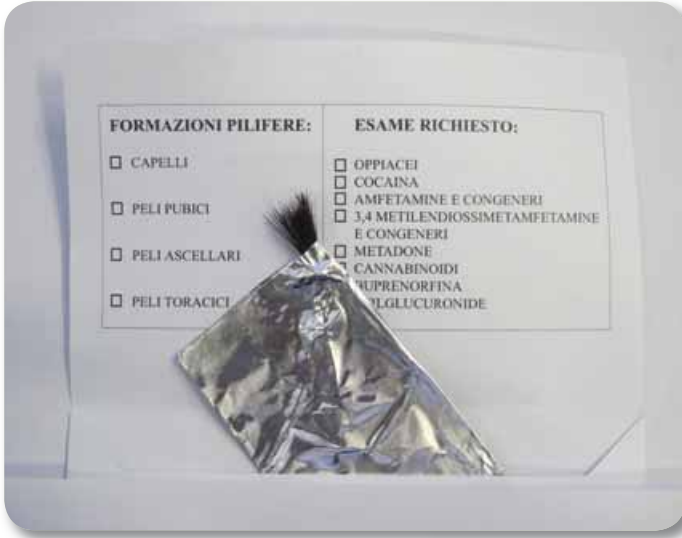
**NOTA BENE.**

**L'OPERAZIONE VA RIPETUTA per l'aliquota A e per l'aliquota B.**



*Ciascun foglio di alluminio deve essere ripiegato come mostrato in figura.*





*Il foglio di alluminio deve essere inserito nell'apposita busta-contenitore. La busta-contenitore deve essere sigillata.*



*La busta deve essere accompagnata dal verbale del prelievo e dal modulo di catena di custodia. Le aliquote A e B devono essere portate al laboratorio o spedite via posta prioritaria tracciabile o via corriere espresso.*

È importante porre attenzione a tutti i passaggi necessari durante il prelievo e la conservazione dei campioni:

- a) il responsabile del prelievo spiegherà al soggetto sottoposto al controllo le finalità del prelievo. Il soggetto sottoposto al controllo avrà la possibilità di dichiarare qualunque sostanza farmacologicamente attiva egli abbia utilizzato nel periodo antecedente il prelievo e tale informazione sarà riportata nel verbale di prelievo;
- b) il personale incaricato di effettuare il prelievo deve indossare guanti monouso;
- c) sia il soggetto sottoposto al controllo che il responsabile del prelievo non mancheranno di tenere bene in vista in ogni momento i contenitori (fogli di alluminio con le buste) e le due aliquote del campione di capelli fino a che questi non siano stati sigillati ed etichettati;
- d) il responsabile del prelievo chiederà al soggetto sottoposto al controllo di verificare la raccolta del campione nelle due buste per la conservazione delle aliquote A e B, nonché la successiva apposizione su di esse dei sigilli di garanzia. Il sigillo di garanzia fa sì che qualsiasi manomissione messa in atto sul campione possa essere rilevata dal personale di laboratorio al momento dell'accettazione dello stesso;
- e) le buste contenenti le aliquote A e B avranno una etichetta di identificazione con indicati la data, il numero del campione e la firma/iniziali del soggetto sottoposto al controllo e del responsabile del prelievo. Il responsabile del prelievo inserirà tutte le informazioni nel modulo della catena di custodia. Entrambe le buste con le aliquote A e B, il verbale di prelievo e il modulo della catena di custodia devono avere lo stesso numero identificativo;

- f) al soggetto sottoposto al controllo sarà chiesto di leggere e firmare il verbale di prelievo e il consenso informato. Il responsabile del prelievo conserverà il consenso informato firmato dal soggetto e invierà il modulo della catena di custodia, insieme al verbale di prelievo e ai campioni, alla struttura che effettuerà le analisi. Se i campioni non vengono spediti sul momento, il responsabile dovrà provvedere alla loro idonea conservazione e alle condizioni di sicurezza degli stessi;
- g) il responsabile del prelievo ed il soggetto sottoposto al controllo saranno presenti durante l'esecuzione di tutte le procedure descritte.

I trattamenti cosmetici quali il regolare lavaggio con shampoo, l'uso di prodotti come balsamo, maschere per capelli, lacche, spume, gelatina, ed anche tinture, permanenti, decolorazioni, possono alterare in diversa misura la concentrazione degli xenobiotici presenti nei capelli. Pertanto occorre riportare sul verbale di prelievo del campione gli eventuali trattamenti cosmetici dichiarati e/o accertati al momento del prelievo.

### 2.3 Moduli per il verbale di prelievo

Nel modulo del verbale di prelievo, redatto in triplice copia, occorre indicare:

- i dati relativi al responsabile del prelievo;
- i dati relativi al soggetto sottoposto al controllo (generalità, residenza, numero documento d'identità etc.). Se il soggetto non possiede un documento d'identità valido, sarà possibile procedere all'identificazione dello stesso mediante l'ausilio di un supervisore autorizzato o di un testimone con documento di identità. Se l'identità del soggetto non può essere accertata, il responsabile non potrà procedere al prelievo del campione;
- la provenienza della matrice pilifera (testa, pube, ascelle, torace, etc.);
- i dati relativi al prelievo per l'identificazione univoca del campione (codice di identificazione, struttura/reparto ove viene effettuato il prelievo, etc.);
- l'elenco dei farmaci eventualmente assunti dal soggetto sottoposto al controllo nei giorni o nei mesi antecedenti la raccolta del campione;
- gli eventuali trattamenti cosmetici cui è stato sottoposto il campione, come sopra riportato.

Verrà infine apposta la firma sia di chi ha effettuato il prelievo che del soggetto sottoposto al controllo.

Un esempio di modulo per il verbale di prelievo è riportato in Appendice C.

Delle tre copie del verbale di prelievo, una viene consegnata insieme ai campioni da analizzare e al modulo di catena di custodia alla struttura che effettua l'analisi, una copia viene conservata dalla struttura/incaricato che ha effettuato il prelievo dei capelli e una copia consegnata al soggetto sottoposto all'analisi.

## 2.4 Kit per la raccolta del campione di capelli (o altra matrice pilifera)

Il kit per il prelievo del campione deve includere:

- fogli di alluminio e buste per le due aliquote del campione di capelli – o altra matrice pilifera (aliquota A e B);
- il verbale di prelievo del campione e il consenso informato;
- il modulo per la catena di custodia;
- etichette adesive con codice a barre o codice alfanumerico o altro sistema di identificazione che andranno applicate al verbale di prelievo, al modulo per la catena di custodia e ad ognuna delle due buste che contengono le aliquote A e B del campione;
- una busta per il trasporto e/o la spedizione delle buste con le aliquote A e B, del verbale di prelievo e del modulo per la catena di custodia.

Il campione deve essere prelevato in modo tale da rendere chiaramente identificabile la parte prossimale del campione rispetto alla radice, nel caso dei capelli. A tale scopo può essere

utilizzato uno filo che legni la ciocca di capelli vicino al punto del prelievo e tenga unita la stessa ciocca quando viene introdotta nella busta per la conservazione o, nel caso di capelli molto corti, una clip che appunti il campione di capelli su un foglio di carta dove si possa indicare con una penna o matita la parte prossimale del capello.

I campioni di capelli devono essere conservati in un ambiente asciutto a temperatura ambiente, lontano dalla luce diretta del sole. I campioni di capelli non devono essere conservati in frigorifero o nel congelatore, in quanto possono verificarsi rigonfiamenti della matrice pilifera.

I campioni di capelli che si presentano bagnati al momento del prelievo, devono essere asciugati prima della loro conservazione nelle apposite buste.

### 2.5 Moduli per la catena di custodia

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

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

- luogo, data e ora del prelievo;
- informazioni sul campione;
- nome, indirizzo, indirizzo e-mail e numero di telefono del laboratorio d'analisi;
- nome e firma di tutte le persone che hanno avuto in custodia le aliquote del campione durante il viaggio del luogo del prelievo fino alla destinazione finale (laboratorio di analisi).

Un esempio di modulo per la catena di custodia è riportato in Appendice D.

## 2.6 Prelievo di matrici pilifere post mortem

L'analisi tossicologica post-mortem di un campione di capelli può fornire importanti informazioni sulla storia di consumo di xenobiotici da parte del defunto. In particolare, l'analisi del segmento prossimale può fornire informazioni relative all'uso di farmaci, sostanze d'abuso, alcol nel periodo di tempo immediatamente antecedente al decesso.

*Nel prelievo post-mortem del campione si raccomanda di:*

- prelevare i capelli all'inizio dell'autopsia;
- qualora si vogliano ricavare dall'analisi tossicologica informazioni relative ad un consumo recente di sostanze stupefacenti o psicotrope, occorre prelevare un campione di capelli con le radici ("strappandoli" dal cuoio capelluto) in aggiunta al consueto prelievo mediante taglio.

## 2.7 Prelievo di matrici pilifere in soggetti che hanno avuto una assunzione inconsapevole di sostanze

Nei casi di crimini facilitati da assunzione inconsapevole di una o più sostanze psicotrope da parte della vittima, l'analisi segmentale del capello potrebbe fornire utili informazioni su una singola assunzione di sostanza avvenuta inconsapevolmente. Bisogna però porre cautela su tale analisi e ricordare che essa è solo di supporto alle indagini che devono chiarire quanto più possibile lo svolgimento dei fatti ed escludere una assunzione volontaria dolosa.

Il momento in cui effettuare la raccolta del campione di capelli è criticamente legato al tempo trascorso dall'aggressione, nel caso in cui la vittima non presenta immediatamente denuncia, ma solo dopo diversi giorni, settimane o addirittura mesi dall'accaduto. Pertanto conoscere i dettagli relativi al tempo trascorso tra l'aggressione e la data della denuncia è essenziale al fine di stabilire il momento più appropriato per effettuare il prelievo e per poter calcolare in quale segmento del capello sarà più probabile incontrare l'analita ricercato. Eventuali trattamenti cosmetici dei capelli (ad esempio tinture e decolorazioni) effettuati dopo l'aggressione influiranno negativamente sull'idoneità degli stessi ad essere utilizzati come prova a causa della possibile degradazione delle sostanze da ricercare. Tali trattamenti vanno dunque riportati nel verbale di prelievo dei capelli.

Si fa presente che nei casi di crimini facilitati dal consumo inconsapevole di sostanze psicoattive da parte della vittima queste sono presenti nel segmento di capelli corrispondente al momento dell'accaduto in concentrazioni dell'ordine dei pg/mg, di capelli in quanto normalmente si tratta di una singola assunzione.

---

## 3. Procedure per le analisi di laboratorio

### 3.1 Ricezione del campione (Accettazione)

Nel momento in cui il campione viene accettato in laboratorio, occorre:

- verificare l'integrità della busta che lo contiene, onde poter escludere la manomissione del campione durante il trasporto;
- annotare qualunque discrepanza o non conformità del campione per poterle poi riportare a chi (entità o persona fisica) ha richiesto le analisi;

In Appendice E viene elencata una serie di gravi non conformità nella catena di custodia che possono essere utilizzate come guida. Queste non conformità comportano l'impossibilità a procedere alle analisi del campione e al rigetto dello stesso. Se il campione viene accettato, possono iniziare i controlli analitici.

Il laboratorio riceve due buste sigillate contenenti le aliquote A e B ed il corrispondente modulo della catena di custodia ed il verbale di prelievo. L' aliquota contrassegnata dalla lettera A viene sottoposta alle analisi mentre l' aliquota contrassegnata dalla lettera B viene conservata per eventuale controanalisi o analisi di revisione.

### 3.2 Trattamento del campione

#### 3.2.1 Lavaggio

La preparazione di un campione di capelli comporta una serie di passaggi iniziali tra cui il lavaggio, l'asciugatura e l'eventuale segmentazione della ciocca. Si ricorda che l'analisi segmentale del capello può essere effettuata solamente se il prelievo è stato effettuato in maniera corretta (capelli tagliati alla base del cuoio capelluto ed allineati a partire dall'estremità della radice).

È possibile rimuovere la contaminazione superficiale di un campione di capelli utilizzando solventi organici quali cloruro di metilene o acetone, che interferiscono in maniera trascurabile con l'estrazione degli analiti contenuti all'interno della matrice o anche soluzioni acquose, tamponi o alcol metilico che possono avere un effetto più pronunciato sull'estrazione degli analiti contenuti all'interno della matrice pilifera.

*Raccomandazioni per il lavaggio del campione di capelli:*

- il laboratorio deve avere una propria procedura standardizzata per il lavaggio dei campioni di capelli prima di effettuare l'analisi quali-quantitativa dei principi attivi eventualmente contenuti in essi; i lavaggi devono essere veloci e devono utilizzare un volume ridotto di soluzione di lavaggio;
- la procedura potrebbe comprendere sia fasi di lavaggio con soluzioni acquose che quelle con solventi organici;
- il laboratorio dovrebbe accertare se la procedura di lavaggio applicata abbia rimosso una eventuale contaminazione esterna (effettuando ad esempio analisi quali-quantitativa dei lavaggi);
- campioni di capelli contaminati da altri fluidi corporei (esempio: sangue), possono richiedere ulteriori procedure di lavaggio.

### 3.3.2 Preparazione del campione

Il campione di capelli differisce in maniera significativa da un campione di urine o sangue a partire dalla maggior difficoltà che si incontra nel volerlo aliquotare, trattandosi di una matrice solida. I campioni di capelli precedentemente lavati e asciugati devono essere tagliati in piccoli pezzi o polverizzati (ad esempio mediante un mulino a palle), quindi pesati al fine di ottenere un quantitativo di campione pari a 10-50 mg da sottoporre



ad analisi (nei casi pediatrici o nei casi di capelli radi o corti è possibile avere a disposizione anche pochi mg di capelli).

La ricerca di xenobiotici in un campione di capelli prevede una prima fase di pre-trattamento (“digestione”) del campione per il rilascio degli analiti dalla matrice pilifera. Il prodotto di questa digestione può essere direttamente analizzato (mediante tecniche di screening) o richiedere ulteriori passaggi di purificazione utilizzando una estrazione liquido-liquido o una estrazione in fase solida prima di analisi di screening e/o di conferma. Nelle Appendici F, G, H ed I, vengono illustrate le Procedure Operative Standard (POS) relative alla determinazione analitica delle principali sostanze d’abuso e dei biomarcatori di uso e abuso alcolico in matrice pilifera.

#### 3.3 Digestione della matrice cheratinica ed estrazione degli analiti

Il tipo di digestione del capello e la successiva estrazione devono essere scelti dal laboratorio in funzione degli analiti che si vogliono ricercare. Nell’interpretazione dei risultati bisogna tener conto dei metodi utilizzati. Si ricorda a tal proposito che utilizzando tamponi acquosi acidi o alcalini è dimostrata una idrolisi (parziale o totale) di composti labili come la cocaina e l’eroina. Per contro, le procedure di incubazione con alcol metilico o soluzioni acquose tamponate a pH neutro non danno problemi di idrolisi dei composti chimicamente labili, sebbene i recuperi degli analiti dalla matrice risultino generalmente inferiori a quelli ottenuti con la digestione in tamponi acidi o basici. Mentre la digestione in ambiente acido o basico richiede sempre una successiva estrazione liquido-liquido o in fase solida, gli estratti metanolici o acquosi a pH neutro possono essere analizzati come tali. L’estrazione successiva alla digestione assicura una maggiore pulizia dell’estratto. L’efficienza di una metodologia digestiva ed estrattiva va comunque verificata nella fase di validazione generale della metodologia d’analisi.

### 3.4 Analisi di screening

Su un campione di capelli è possibile effettuare uno screening iniziale per ricercare classi di sostanze d'abuso utilizzando sia tecniche immunochimiche che siano state validate per la matrice pilifera e siano vendute con tale indicazione, che tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa tandem o all'analizzatore a tempo di volo che possano identificare tutte le sostanze eventualmente presenti in una sola corsa cromatografica.

*Raccomandazioni per le analisi di screening:*

- i laboratori devono poter garantire che i test di screening abbiano una sensibilità tale da rilevare le concentrazioni di analiti normalmente presenti nella matrice pilifera, e siano inoltre in grado di determinare sia la sostanza parente (se presente) e/o i principali metaboliti presenti nella matrice pilifera (che in molti casi possono essere differenti da quelli presenti nei liquidi biologici o in diverse proporzioni rispetto alla sostanza parente);
- tutti i risultati positivi ai test di screening DEVONO essere confermati utilizzando una metodica specifica per l'analita ricercato, come una tecnica separativa cromatografica accoppiata ad un rivelatore che utilizza la spettrometria di massa.

### 3.5 Analisi di conferma

L'identificazione e la quantificazione degli analiti di interesse si ottiene utilizzando metodi separativi cromatografici accoppiati ad una tecnica identificativa specifica e sensibile quale la spettrometria di massa, ad esempio la gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) o la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS)

e/o spettrometria di massa tandem (LC-MS-MS).

Nelle appendici da F a I sono riportate alcune POS come esempio di metodologie per l'analisi delle principali sostanze d'abuso in matrici pilifere. In Appendice L vengono illustrati i criteri di accettabilità di una analisi cromatografica e di una identificazione in spettrometria di massa.

*Raccomandazioni per le analisi di conferma:*

- i laboratori devono garantire che le tecniche di conferma siano in grado di misurare con accuratezza e precisione concentrazioni nell'ordine dei pg-ng di sostanza per mg di capelli o altra matrice pilifera;
- i metodi di conferma devono essere in grado di misurare sia la sostanza d'abuso parente che il/i metabolita/i, per aiutare l'analista a distinguere tra contaminazione esterna ed uso.

### 3.6 Cut-off

Le tecniche analitiche di screening devono essere in grado di identificare le classi di sostanze eventualmente presenti rispetto ad una concentrazione soglia (cut-off) stabilita a livello nazionale ed internazionale per identificare l'uso pregresso di una sostanza d'abuso. Similmente, le tecniche di conferma devono essere in grado di misurare la concentrazione della sostanza parente e/o dei suoi metaboliti assicurando un limite di quantificazione che presenti adeguata accuratezza e precisione e sia inferiore alle concentrazioni soglia stabilite a livello nazionale ed internazionale per per tali tecniche. Tali concentrazioni soglia o cut-off raccomandati per i soli capelli a livello internazionale dalla Society of Hair Testing vengono riportati nella Tabella 1. Nella medesima Tabella vengono riportati anche i valori soglia stabiliti nel Provvedimento del 18 settembre 2008 relativo alle "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 l'incolumità e la salute di terzi" (Gazzetta Ufficiale n. 236 dell'8/10/2008) negli accertamenti tossicologico-analitici di II livello per la presenza di sostanze d'abuso in matrice pilifera.

**Tabella 1.** Concentrazioni soglia (cut-off) raccomandate dalla Society of Hair Testing (SOHT) e stabilite dal Provvedimento del 18/9/2008 per le principali sostanze d'abuso nelle analisi di screening e conferma sui capelli.

Cut-off di screening secondo le raccomandazioni SOHT			Cut-off di conferma secondo le raccomandazioni SOHT	Cut-off di conferma secondo il provvedimento 18/09/2008 sui lavoratori con mansioni a rischio
Classe di sostanza	Cut-off (ng/mg)	Analita	Cut-off (ng/mg)	Cut-off (ng/mg)
Amfetamine	0,2	Amfetamina	0,2	0,2
		Metamfetamina	0,2	0,2
		MDA	0,2	0,2
		MDMA	0,2	0,2
		MDEA	-	0,2
Cannabinoidi	0,1	THC	0,05	0,1
		THC-COOH	0,0002	-
Cocaina	0,5	Cocaina	0,5	0,2
		BEG, EME, CE, NC*	0,05	0,05
Oppiacei	0,2	Morfina	0,2	0,2
		Codeina	0,2	0,2
		6-MAM <sup>§</sup>	0,2	0,2
Metadone	0,2	Metadone	0,2	0,2
		EDDP	0,05	-
Buprenorfina	0,01	Buprenorfina	0,01	0,05
		Norbuprenorfina	0,01	-

\* BEG: benzoilecgonina, EME: ecgoninametilestere, CE: cocaetilene, NC: norcocaina  
<sup>§</sup> 6-MAM – 6-monoacetilmorfina

### 3. PROCEDURE PER LE ANALISI DI LABORATORIO

I cut-off da utilizzare per individuare un consumo cronico ed eccessivo di alcol e quelli per verificare invece l'astinenza sono stati stabiliti attraverso un documento di consenso della SOHT e vengono riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Concentrazioni soglia (cut-off) raccomandate dalla SOHT per i marcatori d'abuso alcolico nei capelli.

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

Si ricorda che quando l'analisi dei capelli viene richiesta per accertare un crimine facilitato dal consumo inconsapevole di droga/farmaco da parte della vittima non esistono cut-off ma si considera come valore soglia il limite di quantificazione della metodologia di analisi applicata che deve necessariamente essere nell'ordine dei picogrammi per milligrammo di capelli.

Per i composti naturalmente presenti nell'organismo (come l'acido gamma idrossibutirrico GHB, il cortisolo, il testosterone, etc.), deve sempre essere effettuata l'analisi segmentale del capello per poter dimostrare una eventuale differenza di concentrazione dell'analita in esame tra i vari segmenti analizzati. L'analisi deve quindi poter dimostrare, nel segmento di interesse, concentrazioni compatibili con un'assunzione esogena mentre, negli altri, concentrazioni assimilabili ai livelli endogeni di tali analiti in matrice pilifera. Il rapporto di concentrazione di analita nel segmento di interesse rispetto alla quantità presente negli altri dovrebbe essere almeno uguale o superiore a tre.

## 4. Consegna dei risultati analitici

Il risultato analitico ottenuto sia da un solo test di screening (risultato negativo) o da un test di screening ed un'analisi di conferma (test positivo allo screening, ma negativo alla conferma, o infine positivo sia allo screening che alla conferma) deve essere refertato dal responsabile del laboratorio o da un collaboratore abilitato, che deve tener conto di tutte le osservazioni e informazioni riportate nel verbale di prelievo riguardo ad eventuali trattamenti farmacologici del soggetto o trattamenti cosmetici particolari del capello.

### 4.1 Refertazione

Il Responsabile del laboratorio deve essere un esperto di analisi di sostanze d'abuso e biomarcatori di uso e abuso alcolico in matrice pilifera affinché possa rispondere a quesiti relativi al risultato analitico del test posti dall'autorità o persona fisica che ha richiesto il controllo.

Quando si interpreta un risultato analitico occorre tener presente alcuni aspetti:

#### a) Caratteristiche della matrice cheratinica

I capelli sono una matrice unica nel loro genere poiché non possiedono un metabolismo attivo ed una escrezione tale da eliminare gli xenobiotici una volta che questi sono stati incorporati nella matrice stessa. La concentrazione di un biomarcatore di sostanze psicoattive o alcol pertanto dipende essenzialmente da:

- la quantità di sostanza consumata e la frequenza del consumo: più elevata è la quantità di sostanza utilizzata e la finestra temporale di consumo, tanto più lungo è il tempo di rilevanza della stessa in diversi segmenti del capello;
- la distanza dalla radice: quanto più la sostanza ricercata è lontana dalla radice, tanto maggiore è la probabilità di una naturale diminuzione della sostanza dovuta ai trattamenti igienici cui sono sottoposti i capelli. Similmente, nelle porzioni di capelli più vicine alle radici, maggiore è la possibilità di contaminazioni a causa dell'incorporazione nei capelli delle sostanze escrete con il sebo e con il sudore;
- il colore dei capelli;
- la percentuale di capelli in fase anagenica e telogenica.

È importante tener presente la difficoltà di correlare la concentrazione di un analita nel capello alla quantità di sostanza assunta, alle modalità e al tempo di assunzione.

La velocità di accrescimento dei capelli varia da un minimo di 0,6 ad un massimo di 1,5 cm/mese e circa l'80-95% dei follicoli è in fase anagenica (fase di crescita attiva del capello). La velocità di crescita potrebbe tuttavia essere influenzata dall'uso di farmaci, dall'età, dal sesso e dalla razza. Esiste inoltre anche una variabilità stagionale nel tasso di crescita dei capelli. I peli hanno un tasso di crescita più lento rispetto ai capelli (0,5-1,1 cm/mese) nonché un differente ciclo vitale. Il 40-60% dei peli della barba, di quelli ascellari e pubici, infatti, è nella fase di quiescenza. Pertanto i peli corporei non sono utilizzabili per un'analisi di tipo segmentale né per poter definire una finestra temporale di consumo, essi sono utili solamente per dimostrare o meno un'avvenuta assunzione.

### b) Contaminazione passiva

Al fine di escludere una contaminazione esterna, è necessario che nelle analisi su matrice pilifera delle principali sostanze d'abuso siano identificati (e quantificati) i seguenti metaboliti:

- benzoilecgonina (BEG) e cocaetilene (in caso di consumo simultaneo di alcol e cocaina) per confermare un'assunzione di cocaina;
- 6-monoacetilmorfina (6-MAM) e morfina per confermare un'assunzione di eroina;
- 11-nor-9-carbossi- $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo o THC acido (THC-COOH) per confermare un'assunzione di cannabis.

Inoltre devono essere rispettati i seguenti rapporti tra metabolita e sostanza parente:

- cocaina: BEG/cocaina  $>0,05$ ;
- eroina: 6-MAM/morfina  $>1,3$ .  
(corretta per un eventuale effetto di idrolisi)

### c) Effetto dei trattamenti cosmetici

Ogni azione aggressiva di natura fisica, chimica o meccanica può avere effetti nocivi sulla cuticola del capello: la permanente, la stiratura, la tintura, la decolorazione, i lavaggi eccessivi, un'intensa illuminazione con raggi UV ed una eccessiva esposizione ai raggi solari. In particolare, la decolorazione, lo "sbiondimento" e le meches determinano una distruzione irreversibile della melanina per ossidazione; è possibile pertanto arrivare ad una degradazione parziale o completa della cheratina. Quando si utilizza una decolorazione molto aggressiva, le proprietà fisiche del capello (ad esempio la porosità) vengono alterate. Pertanto, ogni trattamento cosmetico come quelli sopra riportati deve essere considerato e registrato in quanto potrebbe essere causa di risultati falsi negativi. Questo è particolarmente importante nel caso dei biomarcatori di abuso alcolico: le tinture o le decolorazioni possono causare risultati falsi negativi nella misurazione dell'etilglucuronide; l'utilizzo di lacche o lozioni alcoliche può causare risultati falsi positivi nella misurazione degli esteri etilici degli acidi grassi (FAEEs).

## 4.2 Comunicazione dei risultati analitici

Prima di essere comunicato, il referto delle analisi di laboratorio deve essere controllato ed approvato dal responsabile di laboratorio.

Il referto analitico deve contenere i seguenti dati identificativi:

1. il numero del campione;
2. la data di raccolta del campione;
3. la data di ricezione del campione da parte del laboratorio;
4. la data della refertazione;
5. il nome dell'autorità o persona fisica che ha richiesto l'analisi.



Inoltre, nel referto si deve includere:

- a) il tipo di matrice pilifera analizzata (capelli, peli pubici, ascellari, peli della barba, del petto, delle braccia o delle gambe);
- b) la lunghezza originale del campione;
- c) la lunghezza del segmento di campione analizzato (o la lunghezza dei vari segmenti analizzati);
- d) il colore dei capelli/peli;
- e) informazioni sulla frequenza dei lavaggi ed il tipo di prodotto utilizzato, nonché sugli eventuali trattamenti cosmetici;
- f) il tipo di analisi eseguita (di screening o di conferma);
- g) il metodo analitico utilizzato;
- h) l'elenco delle sostanze stupefacenti o psicotrope rilevate inclusi i marker dell'abuso alcolico e le relative concentrazioni, qualora esse siano al di sopra dei cut-off utilizzati dal laboratorio;
- i) i cut-off utilizzati dal laboratorio.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

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

In calce al referto si apporrà la firma del responsabile di laboratorio.

### 4.3 Conservazione dei campioni

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

Il laboratorio deve inoltre conservare e rendere disponibile tutta la documentazione relativa ai procedimenti di analisi utilizzati per l'esame di sostanze d'abuso in matrice pilifera e che hanno portato a refertare un risultato positivo.

La documentazione richiesta deve comprendere:

- i moduli della catena di custodia;
- le registrazioni dei controlli interni di qualità effettuati dal laboratorio e della valutazione esterna di qualità a cui il laboratorio ha partecipato;
- le Procedure Operative Standard (POS) che il laboratorio utilizza per l'analisi delle principali sostanze d'abuso e biomarcatori dell'abuso alcolico nei capelli;
- tutti i risultati analitici (compresi quelli relativi alle curve di calibrazione ed i calcoli utilizzati per la formulazione del risultato);
- copia del referto finale.

Il controllo dei documenti deve essere gestito in accordo alle disposizioni della ISO/IEC 17025, mentre le registrazioni contenenti informazioni riguardanti i dati personali degli individui dovrebbero essere trattate secondo quanto disposto dalla Legislazione vigente sulla Protezione dei Dati Personali.

---

## 5. Contestazione dei risultati

Nel caso di risultato positivo per la presenza di sostanze d'abuso o biomarcatori di abuso alcolico nei capelli, il soggetto sottoposto al controllo ha facoltà di richiedere un test di revisione dell'analisi sull'aliquota B. Questo test potrà essere eseguito presso lo stesso laboratorio che ha analizzato l'aliquota A o altro laboratorio scelto tra quelli abilitati dal soggetto che ha il diritto di richiedere l'aliquota B qualora desideri effettuare l'analisi di revisione. Il laboratorio deve essere lo stesso nel caso del lavoratore che richiede il test di revisione dell'aliquota B previsto nelle Procedure accertative per lavoratori con mansioni a rischio. L'aliquota B deve essere accompagnata dalla modulistica attestante le procedure legate alla catena di custodia e includere informazioni circa i risultati dell'analisi originale e il cut-off utilizzato nell'analisi stessa.

La data delle controanalisi deve essere comunicata almeno 30 giorni prima all'ente che ha commissionato le analisi e al laboratorio che ha eseguito le analisi sull'aliquota A. Alle controanalisi possono essere presenti periti nominati dalle parti. Tutti i laboratori che effettuano analisi sull'aliquota B devono possedere la documentazione atta a dimostrare l'utilizzo di metodologie d'analisi validate con requisiti di precisione ed accuratezza adeguate alle analisi richieste.

Si raccomanda che il laboratorio svolga le verifiche di validità del campione prima di effettuare le analisi di conferma. Nelle controanalisi devono essere ricercate solamente le sostanze d'abuso o i biomarcatori di abuso alcolico risultati positivi ai test di conferma e il referto deve essere disponibile secondo le norme vigenti nelle leggi e nelle circolari regionali in materia.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## 6. Assicurazione della Qualità delle analisi

### 6.1 Assicurazione di qualità

I laboratori che effettuano analisi delle sostanze d'abuso in matrice pilifera devono implementare un sistema di gestione in qualità che comprenda tutti gli aspetti del procedimento di analisi inclusi ma non limitati a:

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

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

Il laboratorio deve essere accreditato secondo le norme ISO/IEC 17025 per l'analisi delle sostanze d'abuso nei capelli da un organismo esterno ufficialmente riconosciuto.

### 6.2 Validazione delle metodologie d'analisi

Ogni metodologia d'analisi utilizzata dal laboratorio in maniera routinaria deve essere preventivamente validata secondo procedure di validazione di metodi analitici riconosciute a livello internazionale.

La procedura di validazione deve comprendere i seguenti parametri:

- linearità del metodo;
- precisione e accuratezza intrasaggio e intersaggio;
- calcolo del limite di rilevazione e di quantificazione di ogni singolo analita;
- studio dell'eventuale interferenza analitica da parte di composti di natura endogena presenti nella matrice cheratinica;
- studio dell'effetto matrice e del trascinamento (carry-over);
- studio del recupero analitico di ogni singola sostanza dopo le procedure di digestione ed estrazione del campione di capelli.

La metodologia d'analisi potrà essere utilizzata per le analisi routinarie soltanto se i parametri di validazione calcolati rientrano nei limiti stabiliti dalle direttive internazionali in materia (ICH Topic Q 2 B Validation of Analytical Procedures: Methodology, The European Agency for the evaluation of Medicinal Products, 1996.

Available at:

[http://www.uam.es/personal\\_pas/txrf/MU5.pdf](http://www.uam.es/personal_pas/txrf/MU5.pdf)

Guidance for Industry, Bioanalytical Method validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2001.

Available at:

<http://www.fda.gov/downloads/drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM07017.pdf>.

In Appendice M vengono descritti in dettaglio i principali parametri che devono essere valutati nella validazione di un metodo analitico.

### 6.3 Controllo di qualità interno

L'impiego di un buon programma di qualità interno permette di eludere il pericolo che "... la qualità analitica dei risultati forniti dal metodo in esame possa pregiudicare l'utilizzo clinico dei risultati...".

Per i test di screening e per quelli di conferma si raccomanda di inserire quotidianamente i seguenti campioni di controllo:

- controllo negativo (*drug-free*);
- controllo con concentrazioni di analiti  $\leq 25\%$  rispetto ai valori di cut-off;
- controllo con concentrazioni di analiti  $\geq 25\%$  rispetto ai valori di cut-off;
- controllo con concentrazioni di analiti prossimi al limite di quantificazione. È sempre preferibile l'acquisto dei materiali di controllo da ditte certificate o specializzate in questa produzione.

I calibratori e i controlli devono essere preparati utilizzando sia materiali di riferimento che soluzioni standard certificati e ottenuti, dove possibile, da due distinti fornitori. I calibratori ed i controlli devono essere preparati in matrice pilifera. È possibile utilizzare sia capelli di controllo (privi di qualsiasi sostanza d'abuso) addizionati con gli analiti in esame con le concentrazioni adeguate agli scopi del controllo, sia campioni reali ottenuti da consumatori e previamente analizzati da laboratori che possano fornire un certificato d'analisi.

I calibratori ed i controlli devono essere adeguatamente etichettati rispetto al loro contenuto, alla concentrazione dell'analita e alla data di scadenza.

Tutti gli standard (ad esempio, i materiali di riferimento puri, le soluzioni madri dello standard, gli standard acquistati) devono riportare nell'etichetta le seguenti informazioni:

- data di ricevimento (se applicabile);
- data di preparazione o apertura;
- data del primo utilizzo;
- data di scadenza.

L'esito quotidiano del controllo di qualità interno è determinante per decidere se dare inizio o meno al processo analitico. Sia i campioni della curva di calibrazione, sia i controlli sopra menzionati devono rispettare i parametri di accuratezza e precisione stabiliti a livello internazionale.

Tutti i dati acquisiti nelle varie fasi del controllo di qualità interno devono essere registrati in modo da facilitare la successiva interpretazione dei risultati e la performance generale del laboratorio. Le soluzioni madri degli standard chimici vanno periodicamente analizzate per verificare la concentrazione nominale dell'analita tramite l'esecuzione di uno spettro ultravioletto, misurazione del valore al massimo dell'assorbanza e successivo calcolo dell'assorbanza molare di tale soluzione rispetto all'assorbanza molare fornita in letteratura per tale composto.

Qualora il laboratorio effettui dei test di screening, i kit utilizzati per tali test devono essere calibrati una volta a settimana o tutte le volte che i risultati del controllo di qualità rilevano valori fuori controllo. In ciascun lotto di campioni da analizzare devono essere inseriti campioni di controllo a concentrazioni approssimativamente del 25% al di sopra e al di sotto il cut-off per ciascun gruppo di sostanze d'abuso. I campioni per il controllo di qualità devono rappresentare almeno il 5% del numero totale di campioni per lotto che deve essere analizzato. È necessario che i test di calibrazione settimanali rispettino quanto specificato dalla ditta produttrice dei test di screening e che i campioni di controllo abbiano un valore misurato che si avvicini al valore atteso entro limiti stabiliti a livello internazionale (es:  $\pm 20\%$ ).

È possibile costruire delle carte di controllo dove riportare le concentrazioni misurate nei campioni utilizzati per il controllo interno dei test di screening. Tali carte devono riportare graficamente il valore nominale di ogni campione di controllo e l'intervallo di variabilità ritenuto accettabile. Le concentrazioni dei campioni di controllo devono oscillare all'interno di questo intervallo. Qualora queste carte mostrino o valori fuori range e/o una tendenza univoca (i valori tendono sempre a scendere o sempre a salire all'interno dell'intervallo di variabilità) ad allontanarsi dai limiti di variabilità riconosciuti come accettabili nella validazione del metodo analitico, è necessario procedere ad una revisione completa di tutte le varie fasi di esecuzione del test.

Una volta eseguita la validazione completa di un'analisi di conferma e qualora i parametri di validazione siano stati giudicati idonei secondo criteri internazionalmente riconosciuti per le analisi da effettuare, l'analisi viene applicata routinariamente con dei requisiti minimi per un appropriato controllo di qualità interno.

- Verifica dell'idoneità e del funzionamento dello strumento prima di iniziare l'analisi dei campioni;
- Preparazione giornaliera di una curva di calibrazione che includa almeno cinque punti di calibrazione ed un bianco. Tra i punti della curva deve essere presente la concentrazione al cut-off;
- L'analisi quantitativa deve essere effettuata utilizzando uno standard interno. Quando disponibile, è raccomandato l'utilizzo di uno standard interno deuterato;
- In ogni lotto (batch) analitico devono essere inseriti almeno due campioni di controllo preparati indipendentemente e a concentrazioni prossime al cut-off per tutti gli analiti in esame.



### 6.4 Valutazione Esterna di Qualità (VEQ)

Il laboratorio deve partecipare a programmi di Valutazione Esterna della Qualità. Le prestazioni analitiche al di fuori dei criteri stabiliti dal programma di VEQ devono essere prontamente corrette.

La VEQ per l'analisi di sostanze d'abuso in matrice pilifera, oltre che soddisfare alle disposizioni delle norme ISO 15189 e ISO 9001, va interpretata anche come approccio culturale alla problematica e non solo come verifica dell'accuratezza di una misura.

### 6.5 Analisi per conto terzi

I Laboratori che effettuano analisi sulle droghe d'abuso dovrebbero svolgere tutto il lavoro di laboratorio con personale e attrezzature propri. Qualora sia necessario affidare a terzi le analisi, questi laboratori devono essere accreditati da un organismo ufficialmente riconosciuto e devono comunque attenersi alle presenti linee guida. Le analisi effettuate presso questi laboratori devono essere chiaramente identificabili sul referto analitico consegnato al cliente.

## 7. Procedure accertative per lavoratori con mansioni a rischio

Con il Provvedimento del 18 settembre 2008, pubblicato in Gazzetta Ufficiale n. 236 l'8 ottobre 2008, lo Stato ha individuato le procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza e di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope nei lavoratori che svolgono mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi.

L'iter procedurale si compone di due macrofasi: un *primo livello di accertamenti* a cura del medico competente ed un *secondo livello di approfondimento diagnostico-accertativo* a carico delle strutture sanitarie competenti.

Il lavoratore viene sottoposto agli accertamenti di II livello solo dopo un esito positivo agli accertamenti di I livello.

L'intervento accertativo di II livello è attuato dal Ser.T. (Servizio Tossicodipendenze) o da altra struttura sanitaria competente autorizzata a tale funzione ai sensi della CU 99/2007. (*Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, in materia di accertamento di assenza di tossicodipendenza G.U. Serie Generale n. 266 del 15 novembre 2007*). Gli accertamenti di II livello devono svolgersi di norma non oltre i 30 giorni dal momento della richiesta.

L'accertamento chimico-tossicologico, complementare all'accertamento clinico viene effettuato utilizzando sia la matrice urinaria che la matrice pilifera.

### RACCOLTA DEL CAMPIONE

Contestualmente alla raccolta e alla suddivisione del campione biologico urinario nelle tre aliquote il Ser.T. provvede alla raccolta della matrice pilifera (capello o, se di lunghezza inferiore a 5 cm, pelo ascellare o pubico). Il campione raccolto viene suddiviso in due aliquote:

## 7. PROCEDURE ACCERTATIVE PER LAVORATORI CON MANSIONI A RISCHIO

- la prima aliquota, denominata A, viene utilizzata per gli accertamenti analitici in gas cromatografia/spettrometria di massa o cromatografia liquida/spettrometria di massa;
- la seconda aliquota, denominata B, viene conservata per eventuale controanalisi richiesta dal lavoratore.

Il prelievo del campione viene effettuato secondo le modalità di raccolta riportate nel capitolo 2.2.

I campioni così preparati vanno inseriti in contenitori separati:

- non trasparenti;
- chiusi con tappi a chiusura ermetica;
- sigillati con nastro inamovibile;
- etichettati come indicato sopra per la matrice urinaria;
- conservati a temperatura ambiente.

Ai campioni deve essere allegato un verbale di prelievo in triplice copia dove sono riportati:

- a. il luogo, la data e l'ora del prelievo;
- b. quantità di campione raccolto;
- c. indicazioni riguardanti il colore;
- d. indicazioni riguardanti trattamenti cosmetici;
- e. le generalità del del sanitario addetto;
- f. le generalità del lavoratore;
- g. l'elenco dei farmaci che il medesimo abbia eventualmente dichiarato di aver assunto negli ultimi mesi sia per via sistemica, che per via orale, nonché per via topica;
- h. eventuali dichiarazioni aggiuntive richieste dal lavoratore e/o ritenute opportune dal sanitario addetto.



---

## **Appendice A**

*Organizzazione del personale del laboratorio*

## **Appendice B**

*Esempio di dichiarazione di consenso informato da parte del soggetto sottoposto al controllo*

## **Appendice C**

*Esempio di un verbale di prelievo*

## **Appendice D**

*Esempio di modulo di catena di custodia*

## **Appendice E**

*Alcuni esempi di non-conformità nella catena di custodia*

## **Appendice F**

*Esempio di procedura operativa standard per la determinazione di amfetamine, cocaina ed oppiacei nei capelli*

## **Appendice G**

*Esempio di procedura operativa standard per la determinazione dei cannabinoidi nei capelli*

## **Appendice H**

*Esempio di procedura operativa standard per la determinazione dell'etilglucuronide nei capelli*

## **Appendice I**

*Esempio di procedura operativa standard per la determinazione degli esteri etilici degli acidi grassi nei capelli*

## **Appendice L**

*Criteri cromatografici e di spettrometria di massa per l'accettabilità del risultato*

## **Appendice M**

*Parametri principali nella validazione di un metodo analitico*

---

## Appendice A

### *Organizzazione del personale del Laboratorio*

Tutte le fasi dell'attività di un Laboratorio devono essere chiaramente descritte, come pure le funzioni attribuite a ciascun componente lo staff del laboratorio.

Ogni membro dello staff, deputato ad una specifica funzione, deve avere la necessaria preparazione ed esperienza commensurata alla propria responsabilità di funzione.

**Direttore del laboratorio** - Il direttore è responsabile dell'attività professionale, organizzativa, amministrativa ed educativa (cioè della formazione) del laboratorio da lui diretto.

La direzione deve definire e mettere per iscritto la propria politica della qualità; deve perciò indicare gli obiettivi ed i mezzi necessari per il suo raggiungimento. È necessario definire il tipo di prestazioni che possono essere erogate, (analisi preliminari e analisi di conferma) l'idoneità delle risorse ed il livello di sicurezza e affidabilità garantite.

Alcune sue funzioni possono essere delegate a personale debitamente qualificato, ma la responsabilità generale di ciascuna delle funzioni delegate rimane tuttavia a carico del Direttore del laboratorio.

#### *Qualifiche:*

- almeno una laurea nell'area biomedica o titolo equivalente (ad esempio medicina, chimica, scienze biologiche o tecnologie biomediche);
- formazione, esperienza e conoscenza delle procedure legate alla catena di custodia, al controllo di qualità di tutti i metodi di analisi nonché delle procedure utilizzate in laboratorio.

#### *Responsabilità:*

- assicurare che il personale sia sufficiente, adeguatamente formato e fornito dell'esperienza necessaria al controllo ed alla conduzione delle analisi svolte nel laboratorio (nello specifico analisi di sostanze d'abuso in matrice pilifera);
- assicurare la competenza del personale di laboratorio, documentando la formazione in servizio, la competenza nelle analisi e rivalutando le prestazioni lavorative;
- assicurare che il laboratorio disponga del manuale delle Procedure Operative Standard (POS) completo, aggiornato e disponibile al personale che effettua i test;

*segue*

- mantenere un programma di controllo interno della qualità per garantire la corretta esecuzione dei test e la comunicazione dei risultati analitici delle prove in conformità alle POS;
- garantire la partecipazione con esito positivo ad appropriati programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ);
- mantenere le prestazioni analitiche accettabili per tutte le metodologie di analisi applicate nel laboratorio;
- assicurare e documentare la validità, l'affidabilità, l'accuratezza, la precisione e le prestazioni caratteristiche di ciascuna analisi e di ciascun sistema di analisi;
- assicurare che siano intraprese tutte le azioni correttive necessarie a mantenere a livelli soddisfacenti il funzionamento e le prestazioni del laboratorio (ad esempio in risposta a sistemi di controllo di qualità non rientranti nelle specifiche di prestazione, o in risposta ad errori nella refertazione dei risultati o nell'analisi dei risultati di una VEQ), e che i risultati analitici non siano refertati fino a quando non siano state adottate tutte le azioni correttive del caso.

**Analista (personale laureato o tecnico) di laboratorio** - La persona che quotidianamente ha la responsabilità di eseguire le analisi, cioè attuare le POS per le analisi in programmazione nella giornata di lavoro.

**Qualifiche:**

- appropriata formazione, competenza analitica ed esperienza nella teoria e pratica delle procedure e delle metodologie di analisi utilizzate in laboratorio.

**Responsabilità:**

- mantenere la catena di custodia dei campioni in arrivo e già presenti in laboratorio;
- attuare e gestire giorno dopo giorno le procedure analitiche secondo quanto previsto nelle POS;
- intraprendere azioni correttive in risposta a test di sistema che rilevano valori oltre i limiti stabiliti o risultati analitici o del controllo di qualità aberranti.

**Responsabile per l'Assicurazione (o Gestione) della Qualità (RAQ o RGQ)** - Il Direttore del laboratorio deve individuare un Responsabile per l'Assicurazione o Gestione della Qualità per garantire che le disposizioni relative alla qualità siano applicate e mantenute.

**Qualifiche:**

- formazione ed esperienza nell'auditing secondo le norme ISO/IEC 17025 o equivalenti.

**Responsabilità:**

- preparazione del manuale di qualità del laboratorio, dove vengano dettagliate tutte le attività svolte dal laboratorio, elencate tutte le POS utilizzate nel laboratorio e indicato il personale che svolge mansioni nel laboratorio;
- monitoraggio dei programmi di controllo interno di qualità in laboratorio e della partecipazione a valutazioni esterne di qualità;
- controllare che le attività di laboratorio siano conformi alle linee guida o a quanto indicato nel manuale della qualità;
- verificare che siano messe in atto tutte le azioni correttive necessarie a mantenere a livelli soddisfacenti le attività e le performance di laboratorio.

Il dirigente designato risponde direttamente alla direzione. Deve possedere nel proprio ambito la necessaria autorità, competenza e autonomia. Deve inoltre essere in possesso dell'educazione scientifica per una corretta comprensione degli aspetti delle metodologie analitiche adottate e presenti nel laboratorio.

Secondo la Società Italiana per la Qualità dell'Assistenza Sanitaria (2003) il responsabile della qualità "è un professionista che, su mandato della direzione, opera per orientare l'intera organizzazione verso il miglioramento continuo della qualità professionale, gestionale e relazionale" che agisce sia in modo diretto che come supporto per l'organizzazione.



**Tossicologo** - La persona responsabile dell'interpretazione del risultato analitico per il cliente o per il perito del Riesame eventualmente nominato dal cliente. Questa figura professionale non è obbligatoria, ma consigliabile laddove possibile nella struttura che comprende il laboratorio di analisi farmacotossicologica.

**Qualifiche:**

- almeno una laurea o titolo equivalente in chimica, medicina, scienze biologiche o tecnologie biomediche e diploma di scuola di specialità;
- formazione ed esperienza teorica e pratica di tutti i metodi e le procedure utilizzate in laboratorio, incluse una conoscenza approfondita delle procedure della catena di custodia, delle pratiche per il controllo qualità e le procedure analitiche rilevanti al fine dell'interpretazione del risultato.

**Responsabilità:**

- interpretazione dei risultati delle analisi per la ricerca delle sostanze d'abuso nelle diverse matrici biologiche per le autorità, persona fisica o medico competente che ha richiesto le analisi e per ogni eventuale cliente o per il perito rappresentante designato dal cliente. In mancanza della figura del Tossicologo si raccomanda la partecipazione del Personale Dirigente e Tecnico a corsi accreditati di formazione specifica, in Italia o all'estero, organizzati da Enti Scientifici Ministeriali o da Società Scientifiche Nazionali e/o Internazionali (ad esempio SIBioC, SIMEL, etc.).

## Appendice B

### *Esempio di dichiarazione di consenso informato da parte del soggetto sottoposto al controllo*

Confermo di aver donato un mio campione di capelli (o altra matrice pilifera) al responsabile della raccolta. Ho potuto osservare che la ciocca prelevata è stata divisa in due aliquote denominate **aliquota A e aliquota B** poste e sigillate in apposite buste e confermo che le informazioni contenute in questo modulo e sulle etichette delle buste sono corrette. Esprimo il mio consenso affinché le due buste sigillate contenenti le aliquote A e B (o campioni A e B) possano essere inviate al laboratorio e autorizzo il laboratorio ad effettuare analisi volte a determinare la presenza e la quantità di sostanze d'abuso e/o loro metaboliti e/o biomarcatori di uso e abuso di alcol. Ho inoltre compreso che i risultati analitici saranno comunicati in maniera confidenziale anche all'autorità (o persona fisica) che ha richiesto le analisi.

*Acconsento a tutto quanto sopra dichiarato*

*Dati identificativi del soggetto sottoposto al controllo*

*Nome e Cognome del soggetto*

---

*Firma del soggetto sottoposto al controllo*

---

*Data*

---

## Appendice C

### Esempio di un verbale di prelievo

#### DATI DELL'INCARICATO DEL PRELIEVO DEI CAPELLI

\_\_\_\_\_

#### DATI DEL SOGGETTO SOTTOPOSTO AL CONTROLLO

Cognome \_\_\_\_\_ Nome \_\_\_\_\_

Data di nascita \_\_\_\_\_ Sesso \_\_\_\_\_ Età \_\_\_\_\_

Documento di identità \_\_\_\_\_  
(specificare se carta d'identità, passaporto, patente di guida ecc.)

Residenza \_\_\_\_\_

Comune \_\_\_\_\_ (Prov.) \_\_\_\_\_ Nazionalità \_\_\_\_\_

#### DATI RELATIVI AL PRELIEVO

Struttura/reparto di prelievo \_\_\_\_\_

Data del prelievo \_\_\_\_\_ Ora prelievo \_\_\_\_\_

#### Codice identificativo del campione

*Incollare etichetta recante il codice  
identificativo del prelievo (codice a barre,  
codice alfanumerico, codice numerico)*

#### NOTE

Si prega di elencare ogni trattamento farmacologico in corso o pregresso (negli ultimi mesi) e/o notizie cliniche

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Frequenza dei lavaggi e tipo di prodotti utilizzati

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Eventuali trattamenti cosmetici effettuati negli ultimi mesi

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Firma di chi esegue il prelievo \_\_\_\_\_

Firma del soggetto esaminato \_\_\_\_\_

## Appendice D

### Esempio di modulo di catena di custodia

#### INFORMAZIONI SUL CAMPIONE (a cura della struttura di provenienza)

Data della raccolta \_\_\_\_\_

Ora della raccolta \_\_\_\_\_

Struttura di provenienza \_\_\_\_\_

Codice campione \_\_\_\_\_

#### Codice identificativo del campione

*Incollare etichetta recante il codice identificativo del prelievo (codice a barre, codice alfanumerico, codice numerico)*

Note:

Data \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

#### INFORMAZIONI SUL CAMPIONE (a cura della struttura di ricezione)

##### Contenuto del campione

- Corrisponde a quanto dichiarato nel verbale di prelievo
- Non corrisponde a quanto dichiarato nel verbale di prelievo
  - Quantità insufficiente
  - Nominativo errato
- Altro \_\_\_\_\_

##### NOTE SULL'INTEGRITÀ DEL CAMPIONE

Data \_\_\_\_\_

Firma di chi accetta il campione \_\_\_\_\_

#### CUSTODIA

Ricevuto da

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Trasmesso a

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Data e ora

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

---

## Appendice E

### *Alcuni esempi di non-conformità nella catena di custodia*

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

## Appendice F

### *Esempio di procedura operativa standard per la determinazione di amfetamine, cocaina ed oppiacei nei capelli*

Prelevare 20-70 mg di capelli



**Lavare:** 2 volte con un volume di diclorometano tale a coprire il campione  
1 volta con metanolo  
(questi lavaggi vanno eseguiti con rapidità)



Controllare l'ultimo lavaggio in GC/MS per verificare l'assenza di analiti



Asciugare in stufa (35°-45°C)



Sminuzzare i capelli con le forbici



Prelevare 20-50 mg di capelli sminuzzati



Aggiungere lo standard interno



Aggiungere 2 ml di tampone fosfato 0.1 M pH 5,2



Digerire in stufa per una notte a 45°C



Raffreddare a temperatura ambiente



Centrifugare a 3000 rpm per 3 minuti



Prelevare il tampone fosfato



**Estrazione del campione su colonnina Bondelut Certify (Varian):**

Attivazione della colonnina: 2 ml metanolo + 2 ml tampone fosfato 0.1 M pH 5,2  
**(NON mandare a secco la colonnina)**

*segue*

Introduzione del campione: il tampone deve passare lentamente per 2 min

Lavaggio: 2 ml H<sub>2</sub>O bidistillata  
+  
1 ml di HCl 0.1 M  
+  
Vuoto per 5 minuti  
+  
2 ml di metanolo

Eluizione: 4 ml di una miscela così composta:  
Diclorometano: isopropanolo (80:20)  
+  
2% di Ammoniaca

**Raccogliere** l'eluato in provetta di vetro con tappo a vite

Dividere il campione in 2 aliquote da 2 ml e portare a secco sotto flusso di azoto

Controllare che non vi siano tracce di umidità

**Derivatizzare**

**Amfetamine**  
50 ul MBTFA  
(N-metil-bis-trifluoroacetamide)  
per 30 minuti a 70°C

**Oppiacei e benzoilecgonina**  
50 ul BSTFA + 1% TMCS  
(N,O -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamide + 1%trimetilclorosilano)  
per 30 minuti a 70°C

Colonna cromatografica: DB-5 MS (30 m x 0,2 mm x 0,25 um)

Programmata T iniziale 70°C - x 3,5 minuti ----- 40°C ----- 180°C ----- 10°C ----- 250°C x 10 minuti

#### IONI DA MONITORARE

**MDMA-TFA** 110, 135, **154**, 162

**COCAINA** 82, **182**, 303

**BEG-TMS** 82, 240, **361**

**MORFINA-2TMS** 401, 414, **429**

**6-MAM-TMS** 287, 340, **399**

#### STANDARD INTERNO DEUTERATO

139, 149, **166**

85, 185, **306**

85, 243, **364**

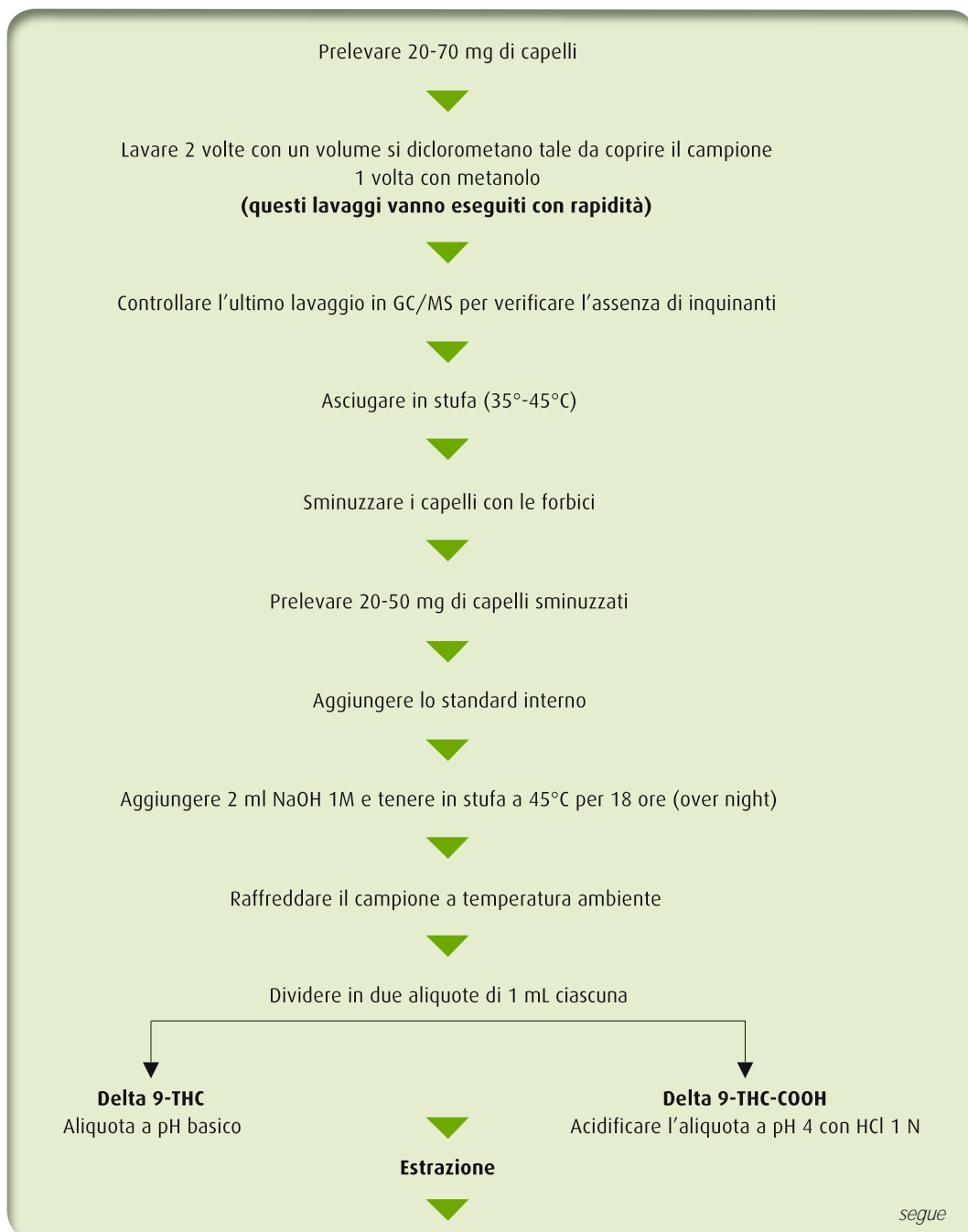
404, 417, **432**

290, 343, **402**

**In neretto gli ioni utilizzati per la quantificazione delle varie sostanze**

## Appendice G

### Esempio di procedura operativa standard per la determinazione dei cannabinoidi nei capelli





▼  
**Estrazione**

2 ml esano: etilacetato (9:1, v/v)  
Vortexare per 2 minuti  
Centrifugare a 3000 rpm per 5 minuti  
Separare la fase organica su ciascuna aliquota

} Ripetere 2 volte

▼  
Raccogliere la fase organica in provette con tappo a vite

▼  
Riunire le due fasi organiche di ciascuna aliquota

▼  
Evaporare i campioni sotto flusso di azoto

▼  
Derivatizzare con 50 µl di BSTFA - 1% TMCS  
(N,O -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamide + 1%trimetilclorosilano)  
per 30 minuti a 70°C

Colonna cromatografica: DB-5 MS (30 m x 0,2 mm x 0,25 µm)

Programmata: T iniziale 140°C - x 2 minuti ----- 20°C ----- 290°C x 10 minuti ----- 10°C ----- 250°C x 5 minuti

	<b>IONI</b>	<b>STANDARD INTERNO DEUTERATO</b>
DELTA 9-THC-TMS	303, 371, <b>386</b>	306, 374, <b>389</b>
DELTA 8-THC	303, 330, <b>386</b>	
THCCOOH-2TMS	473, <b>488</b> , 489	476, <b>491</b> , 492

**In neretto, gli ioni utilizzati per la quantificazione delle varie sostanze**

## Appendice H

*Esempio di procedura operativa standard per la determinazione dell'etilglucuronide nei capelli*



\* per la metodologia completa dell'analisi consultare la bibliografia di Morini L et al.

## Appendice I

*Esempio di procedura operativa standard per la determinazione degli esteri etilici degli acidi grassi nei capelli*



\* per la metodologia completa dell'analisi consultare la bibliografia di Pragst F et al.

## Appendice L

### *Criteria cromatografici e di spettrometria di massa per l'accettabilità del risultato*

#### **Criteria cromatografici specifici per l'accettabilità**

Per la gas-cromatografia (GC) il tempo di ritenzione di un composto dovrebbe presentare una variazione massima di  $\pm 3$  secondi rispetto al tempo di ritenzione dello standard di calibrazione

Per la cromatografia liquida il tempo di ritenzione di un composto dovrebbe presentare una variazione massima di  $\pm 6$  secondi rispetto al tempo di ritenzione dello standard di calibrazione.

#### **Criteria di accettabilità specifici per la spettrometria di massa**

##### *Monitoraggio del singolo ione (single ion monitoring SIM) (o equivalente)*

Per identificare una sostanza devono essere utilizzati come minimo tre ioni caratteristici e significativi della stessa. L'ione più abbondante (o più caratteristico o che possiede meno interferenze di composti endogeni) può essere utilizzato per la quantificazione, costruendo opportune curve di calibrazione.

Né per l'identificazione, né per la quantificazione devono essere usati ioni con rapporto massa/carica ( $m/z$ ) inferiore a 50.

Le intensità relative di qualunque ione utilizzato per identificare una sostanza non devono scostarsi oltre il 10-15% rispetto alle intensità relative degli stessi ioni negli standard di calibrazione.

Nel caso della cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa o alla spettrometria di massa tandem le procedure di validazione devono includere lo studio dell'effetto matrice sulla soppressione del segnale dei singoli ioni, da tenere in considerazione nei calcoli quantitativi. A tale problema si ovvia, costruendo una curva di calibrazione in matrice pilifera, in modo che l'eventuale soppressione ionica sia presente nel campione da analizzare, ma anche nella curva di calibrazione utilizzata per la quantificazione dei campioni.

Se si utilizza uno standard interno deuterato, sono sufficienti due ioni deuterati specifici e significativi per la sua identificazione e quantificazione.

### *Scansione totale*

Il range della scansione non deve avere come limite inferiore un rapporto  $m/z$  inferiore a 50 e come limite superiore non deve superare il valore atteso per il peso molecolare dei composti che si stanno analizzando o un suo derivato. Un range di scansione troppo ampio diminuisce la sensibilità dell'analisi.

Tutti gli ioni significativi presenti nello standard di calibrazione devono essere presenti anche nel campione.

La presenza di ioni significativi nello spettro dell'analita sconosciuto che non siano anche presenti nello spettro dello standard di calibrazione è accettabile se viene provato che la loro presenza può essere spiegata e ritenuta poco significativa.

### *Spettrometria di massa tandem*

Le condizioni di collisione che generano le transizioni dallo ione precursore a gli ioni figli devono essere selezionate in modo da assicurare che lo ione precursore sia presente nella scansione massa-massa. Anche in questo caso, le intensità relative di qualunque ione non devono scostarsi oltre il 10-15% rispetto alle intensità relative degli stessi ioni negli standard di calibrazione.

## Appendice M

### *Parametri principali nella validazione di un metodo analitico*

#### **Accuratezza**

Per accuratezza di un metodo analitico si intende la concordanza tra il risultato (quantitativo) ottenuto per un dato analita e il valore vero (denominato anche valore atteso).

L'accuratezza viene determinata attraverso l'analisi di replicati di campioni biologici di controllo (privi cioè di qualsiasi xenobiotico) contenenti una quantità nota di sostanza. Essa dovrebbe essere determinata con un minimo di 5 misure replicate per almeno tre livelli di concentrazione compresi all'interno della curva di calibrazione della metodologia di analisi. Tali livelli di concentrazione o campioni di controllo non devono coincidere con campioni della curva di calibrazione, ma dovrebbero essere costituiti da: un calibratore inferiore (Ci) corrispondente ad 1,5 volte la concentrazione del limite di quantificazione inferiore (lower limit of quantification LLOQ), un calibratore medio (Cm) corrispondente ad 1,2 volte la concentrazione del punto centrale della curva di calibrazione ed un calibratore superiore (Cs) corrispondente a 0,85 volte la concentrazione del limite di quantificazione superiore della curva di calibrazione (upper limit of quantification, ULOQ).

Il valore medio dei cinque replicati dovrebbe essere compreso nell'intervallo  $\pm 15\%$  del valore vero o atteso, fatta eccezione per LLOQ in cui l'intervallo di accuratezza può essere compreso nell'intervallo  $\pm 20\%$  valore vero o atteso.

Secondo la moderna metrologia, l'accuratezza (o anche l'inaccuratezza) si può esprimere come Errore%, essendo esso la differenza tra il valore ottenuto (o stima) per un certo campione e il suo valore vero o atteso in termini percentuali.

L'accuratezza può essere misurata nella singola giornata di lavoro (intrasaggio o intra-assay) o in più giornate (intersaggio o inter-assay). In questo ultimo caso si considerano nei calcoli tutti i replicati di ogni singola giornata (ad esempio 5 misure replicate per cinque diverse giornate di lavoro per almeno tre livelli di concentrazione).

#### **Precisione**

La precisione di un metodo analitico esprime il livello di riproducibilità di singole misure di una concentrazione prestabilita di analita. Essa dovrebbe essere determinata con un minimo di 5 misure replicate per almeno tre livelli di concentrazione compresi all'interno della curva di calibrazione della metodologia di analisi, come riportato nel caso dell'accuratezza.

La precisione (o anche l'imprecisione) si esprime mediante il Coefficiente di Variazione (CV%) ottenuto come rapporto tra la deviazione standard delle 5 misurazioni e il valore medio di tali misurazioni in termini percentuali.

Il CV% dovrebbe essere compreso nell'intervallo  $\pm 15\%$ , fatta eccezione per LLOQ in cui può essere compreso nell'intervallo  $\pm 20\%$ .

Anche la precisione può essere misurata nella singola giornata di lavoro (intrasaggio o intra-assay) o in più giornate (intersaggio o inter-assay). In questo ultimo caso si considerano nei calcoli tutti i replicati di ogni singola giornata (ad esempio 5 misure replicate per cinque diverse giornate di lavoro per almeno tre livelli di concentrazione).

### **Recupero Analitico, effetto matrice ed efficienza del processo**

Per valutare il recupero analitico, l'effetto matrice e l'efficienza totale del processo analitico occorre preparare tre serie di campioni di controllo: il gruppo 1 è rappresentato da soluzioni standard dei vari analiti disciolti nella fase mobile; il gruppo 2 viene preparato con campioni biologici di controllo prelevati da almeno cinque donatori diversi, sottoposti al processo di estrazione a cui successivamente si aggiungono le soluzioni standard degli analiti alla stessa concentrazione del gruppo 1; infine il gruppo 3 viene preparato con campioni biologici di controllo prelevati dagli stessi cinque donatori, a cui gli standard degli analiti vengono aggiunti prima del processo di estrazione.

Le differenze, espresse come rapporti percentuali, riscontrate nei risultati ottenuti tra i campioni corrispondenti dei gruppi 3 e 2 (aggiunta degli standard prima e dopo il trattamento) evidenziano il recupero analitico del processo di estrazione dei campioni, mentre le differenze rilevate nei risultati ottenuti per i campioni corrispondenti per i gruppi 1 e 2 indicano l'entità dell'effetto matrice. Infine, l'efficienza totale del processo è data dal confronto tra i risultati ottenuti nel gruppo 3 rispetto al gruppo 1.

### **Sensibilità**

Con questa misura possiamo definire due parametri fondamentali che contraddistinguono una metodologia analitica: il limite di rilevabilità di ogni singolo analita (Lower Limit Of Detection o LLOD) e il limite di quantificazione di ogni singolo analita (Lower Limit Of Quantification, LLOQ).

Con il LLOD si definisce la minima concentrazione di un analita che può essere distinta da un campione bianco. È quindi la più bassa concentrazione che si può rilevare qualitativamente per confermare la presenza o l'assenza di un analita.

Il LLOQ è invece la più bassa concentrazione dell'analita che può essere misurata con una precisione e accuratezza prestabilita (ad esempio 20%).

Di norma, il LLOQ è la concentrazione a cui il segnale analitico è maggiore di almeno 10 volte la deviazione standard del segnale del campione di controllo (privo della sostanza oggetto della ricerca) al tempo di ritenzione dell'analita in esame. Il LOD è la concentrazione a cui il segnale è maggiore di almeno 3 volte tale deviazione standard.

Il calibratore più alto definirà il limite di quantificazione superiore (Upper Limit of Quantification, ULOQ) di un metodo analitico.

Come principio generale, non è raccomandabile la misura di concentrazioni di analita ottenute per estrapolazione della curva standard, sia al di sotto del LLOQ che al di sopra del ULOQ.

In caso di campioni in cui l'analita è a concentrazioni superiori al ULOQ, è preferibile procedere alla ridefinizione della curva di calibrazione o eseguire una nuova determinazione dopo la diluizione del campione, quando si sia già verificato che la diluizione non modifica la precisione e l'accuratezza del metodo (misurando cioè accuratezza e precisione su campioni diluiti di controllo addizionati con Ci, Cm e Cs).

### **Linearità (o curva di calibrazione)**

La linearità del metodo analitico, cioè la sua capacità di dare risultati analitici che sono direttamente proporzionali alla concentrazione degli analiti nei campioni all'interno di un range di concentrazioni prestabilito (e che comprenda al suo interno l'eventuale cut-off stabilito a priori per la positività a tale analita) viene valutata attraverso la verifica matematica della linearità di una curva di calibrazione con campioni a concentrazione nota, misurando la risposta strumentale alle diverse concentrazioni di analita presente nel campione biologico.

Per l'allestimento della curva di calibrazione è necessario preparare un congruo numero di calibratori (almeno 5 livelli concentrazione) in triplicato per definire adeguatamente la relazione tra concentrazione e risposta strumentale (retta di calibrazione). Le concentrazioni dei calibratori dovrebbero corrispondere ad un range di valori presumibilmente riscontrabili nei campioni reali.

I calibratori devono essere preparati utilizzando la stessa matrice biologica dei campioni da analizzare aggiungendo volumi noti di soluzioni standard dei vari analiti tali da raggiungere i valori di concentrazioni prestabilite per la curva di calibrazione. Tali calibratori vengono quantificati misurando l'area del picco cromatografico in rapporto a quella dello standard interno e tale rapporto viene correlato alla concentrazione nota del calibratore. Tale misura si ripete per tutti i calibratori ed in triplicato per ogni calibratore. Si calcola quindi matematicamente l'equazione che lega le due variabili mediante il



metodo dei minimi quadrati (in inglese OLS: Ordinary Least Squares), una tecnica di ottimizzazione che permette di trovare una funzione (o retta di regressione) che si avvicini il più possibile ad un insieme di dati (tipicamente punti del piano). In particolare la funzione trovata deve essere quella che minimizza la somma dei quadrati delle distanze tra i dati osservati e quelli della curva che rappresenta la funzione stessa. Tale funzione è normalmente espressa dall'equazione:  $y=ax +b$  dove  $y$  è la concentrazione che dobbiamo misurare,  $x$  è il rapporto delle aree dei picchi cromatografici corrispondenti all'analita in esame e al suo standard interno,  $a$  è la pendenza della retta e  $b$  l'intercetta, che dovrebbe avere un valore assai prossimo allo zero, o comunque trascurabile in quanto esprime una concentrazione di analita in assenza di segnale cromatografico. Tale valore dovrebbe essere zero, ma poiché la retta è ottenuta con il metodo dei minimi quadrati, c'è una approssimazione - che deve essere minima - anche per il valore zero.

### **Selettività/Specificità**

La Selettività è la capacità di un metodo analitico di differenziare e di quantificare, in un campione biologico, un dato analita in presenza di altri componenti esogeni ed endogeni (possibili sostanze interferenti).

Selettività e Specificità hanno un significato equipollente sebbene si possa fare una distinzione tra le due grandezze. Il termine specificità è riferito ad un metodo utilizzato per la determinazione di un solo analita, mentre selettività riguarda la determinazione di più analiti contemporaneamente. Una tecnica analitica può essere selettiva ma non specifica, mentre una tecnica specifica è anche selettiva.

Le due grandezze Selettività/Specificità rappresentano quindi il grado secondo cui il metodo può determinare un certo analita, contenuto in una miscela complessa, senza subire interferenze da parte di altri componenti presenti nella miscela. Se un metodo è del tutto selettivo nei riguardi di un analita o di un gruppo di analiti, è anche specifico.

L'assenza di interferenze endogene si verifica con una serie di campioni di controllo casuali (che non contengono l'analita o gli analiti in esame) misurando un eventuale segnale strumentale (ad esempio picco cromatografico, reazione antigene anticorpo, ecc.) in assenza dell'analita in esame.

L'assenza di interferenze esogene si verifica invece con una serie di campioni di controllo casuali (che non contengono l'analita o gli analiti in esame) addizionati di xenobiotici, sostanze psicoattive, farmaci, metaboliti, ecc. che si ritiene potrebbero essere presenti insieme all'analita/i oggetto della ricerca, misurando eventuali segnali strumentali interferenti.

## Stabilità

La stabilità di un analita in una matrice biologica è funzione delle condizioni di conservazione (tempo e temperatura di conservazione), delle proprietà chimiche della sostanza, del tipo di matrice biologica e del tipo di contenitore utilizzato per la conservazione del campione in esame.

Le procedure adottate per la sua verifica (sui tre livelli di concentrazione  $C_i$ ,  $C_m$  e  $C_s$ ) dovrebbero prevedere come minimo:

- la valutazione della stabilità dell'analita dopo tre cicli di congelamento e scongelamento dei campioni  $C_i$ ,  $C_m$  e  $C_s$  in triplicato;
- la valutazione della stabilità dell'analita a breve/medio termine (ad esempio 3 aliquote delle tre concentrazioni  $C_i$ ,  $C_m$  e  $C_s$  lasciate a temperatura ambiente o a 4-8°C -in condizioni di refrigerazione- per 4-24 ore e analizzate dopo tali intervalli di tempo);
- la valutazione della stabilità dell'analita a lungo termine (3 aliquote delle tre concentrazioni  $C_i$ ,  $C_m$  e  $C_s$ , ad esempio nel tempo compreso tra l'inizio dello stoccaggio e il termine ultimo per l'analisi).

L'approccio statistico per stabilire i limiti di accettabilità o gli intervalli di confidenza delle prove di stabilità devono essere stabiliti da ciascun laboratorio e poi riportati sulle proprie POS. In generale, la variazione di concentrazione dopo i processi sopra menzionati non dovrebbe superare il 10% del valore dell'analita misurato in un campione biologico al tempo zero, cioè nel momento più vicino alla raccolta del campione nel caso di campioni reali, o nel caso dei campioni  $C_i$ ,  $C_m$  e  $C_s$  al momento della loro preparazione.

---

## Bibliografia consigliata

Cooper GA, Kronstrand R, Kintz P; Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int.* 2012 May 10; 218(1-3): 20-4. Epub 2011 Nov 15. PubMed PMID: 22088946.

Friguls B, Joya X, Garcia-Serra J, Gómez-Culebras M, Pichini S, Martínez S, Vall O, Garcia-Algar O. Assessment of exposure to drugs of abuse during pregnancy by hair analysis in a Mediterranean island. *Addiction.* 2012 Aug; 107(8): 1471-9 doi: 10.1111/j.1360-0443.2012.03828.x. Epub 2012 May 8. PubMed PMID: 22296208.

Joya X, Friguls B, Ortigosa S, Papaseit E, Martínez SE, Manich A, Garcia-Algar O, Pacifici R, Vall O, Pichini S. Determination of maternal-fetal biomarkers of prenatal exposure to ethanol: a review. *J Pharm Biomed Anal.* 2012 Oct; 69: 209-22. Epub 2012 Jan 16. PubMed PMID: 22300909.

Joya X, Papaseit E, Civit E, Pellegrini M, Vall O, Garcia-Algar O, Scaravelli G, Pichini S. Unsuspected exposure to cocaine in preschool children from a Mediterranean city detected by hair analysis. *Ther Drug Monit.* 2009 Jun; 31(3): 391-5. PubMed PMID: 19333147.

Kintz P. Bioanalytical procedures for detection of chemical agents in hair in the case of drug-facilitated crimes. *Anal Bioanal Chem.* 2007 Aug; 388(7): 1467-74. Epub 2007 Mar 6. Review. PubMed PMID: 17340077.

Kintz P. Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2009. *Forensic Sci Int.* 2010 Mar 20; 196(1-3): 2. Epub 2010 Jan 8. PubMed PMID: 20060250.

Kintz P. Hair testing and doping control in sport. *Toxicol Lett.* 1998 Dec 28; 102-103: 109-13. Review. PubMed PMID: 10022241.

Kintz P, Villain M, Cirimele V. Hair analysis for drug detection. *Ther Drug Monit.* 2006 Jun; 28(3): 442-6. Review. PubMed PMID: 16778731.

Kintz P. Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int.* 2004 Jun 10; 142(2-3): 127-34. Review. PubMed PMID: 15172076.

Llaquet H, Pichini S, Joya X, Papaseit E, Vall O, Klein J, Garcia-Algar O. Biological matrices for the evaluation of exposure to environmental tobacco smoke during prenatal life and childhood. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Jan; 396(1): 379-99. Epub 2009 May 24. Review. PubMed PMID: 19466395.

Morini L, Varango C, Filippi C, Rusca C, Danesino P, Cheli F, Fusini M, Iannello G, Groppi A. Chronic excessive alcohol consumption diagnosis: comparison between traditional biomarkers and ethyl glucuronide in hair, a study on a real population. *Ther Drug Monit.* 2011 Oct; 33(5): 654-7. PubMed PMID: 21912328.

Morini L, Politi L, Acito S, Groppi A, Poletti A. Comparison of ethyl glucuronide in hair with carbohydrate-deficient transferrin in serum as markers of chronic high levels of alcohol consumption. *Forensic Sci Int.* 2009 July 188(1-3): 140-3. Epub 2009 May 1. PubMed PMID: 19410394.

Morini L, Politi L, Poletti A. Ethyl glucuronide in hair. A sensitive and specific marker of chronic heavy drinking. *Addiction.* 2009 Jun; 104(6): 915-20. Epub 2009 Apr 9. PubMed PMID: 19392911.

Pichini S, De Luca R, Pellegrini M, Marchei E, Rotolo MC, Spoletini R, D'Aloja P, Pacifici R, Mortali C, Scaravelli G. Hair and urine testing to assess drugs of abuse consumption in couples undergoing assisted reproductive technology (ART). *Forensic Sci Int.* 2012 May 10; 218(1-3): 57-61. Epub 2011 Oct 20. PubMed PMID: 22018744.

Pichini S, Poudevida S, Pujadas M, Menoyo E, Pacifici R, Farré M, de la Torre R. Assessment of chronic exposure to MDMA in a group of consumers by segmental hair analysis. *Ther Drug Monit.* 2006 Feb;28(1):106-9. PubMed PMID: 16418703.

Pichini S, Ventura M, Pujadas M, Ventura R, Pellegrini M, Zuccaro P, Pacifici R, de la Torre R. HAIRVEQ: an external quality control scheme for drugs of abuse analysis in hair. *Forensic Sci Int.* 2004 Oct 29; 145(2-3): 109-15. PubMed PMID: 15451081.

Pichini S, Zuccaro P, Pellegrini M, Lopez A, Pacifici R. Analysis of drugs and abuse substances in the keratinic matrix. *Ann Ist Super Sanita.* 2000; 36(1): 17-27. Review. Italian. PubMed PMID: 11070605.

Politi L, Morini L, Leone F, Poletti A. Ethyl glucuronide in hair: Is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption? *Addiction.* 2006 Oct; 101(10): 1408-12. PubMed PMID: 16968341.

Polla M, Stramesi C, Pichini S, Palmi I, Vignali C, Dall'Olio G. Hair testing is superior to urine to disclose cocaine consumption in driver's licence regranting. *Forensic Sci Int.* 2009 Aug 10; 189(1-3):e41-3. Epub 2009 May 15. PubMed PMID: 19446971.

Pragst F, Auwaerter V, Sporkert F, Spiegel K. Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Forensic Sci Int.* 2001 Sep 15;121(1-2):76-88.

Pujadas M, Pichini S, Poudevida S, Menoyo E, Zuccaro P, Farré M, de la Torre R. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for hair analysis of amphetamine, methamphetamine and methylenedioxy derivatives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003 Dec 25; 798(2): 249-55. PubMed PMID: 14643504.

Society of Hair Testing, Cooper G, Moeller M, Kronstrand R. Current status of accreditation for drug testing in hair. *Forensic Sci Int.* 2008 Mar 21; 176(1): 9-12. Epub 2007 Nov 19. PubMed PMID: 18024039.

Society of Hair Testing. Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int.* 2004 Oct 29; 145(2-3): 83-4. PubMed PMID: 15451078.

Ventura M, Pichini S, Pujadas M, Ventura R, Di Giovannandrea R, Zuccaro P, Pacifici R, Langohr K, Jurado C, de la Torre R. Four years' experience in external proficiency testing programs for hair testing of drugs of abuse in Italy (HAIRVEQ) and comparison with the Society of Hair Testing program in 2005. *Ther Drug Monit.* 2007 Feb; 29(1): 11-9. PubMed PMID: 17304145.

Ventura M, Stramesi C, Pichini S, Ventura R, Pujadas M, Di Giovannandrea R, Zuccaro P, Pacifici R, Langohr K, de la Torre R. HAIRVEQ 2006: evolution of laboratories' performance after different educational actions. *Forensic Sci Int.* 2008 Mar 21; 176(1): 2-8. Epub 2007 Nov 5. PubMed PMID: 17980986.

Villain M, Cirimele V, Kintz P. Hair analysis in toxicology. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42(11): 1265-72. Review. PubMed PMID: 15576289.





Finito di stampare nel mese di settembre 2013  
da De Vittoria srl - Via degli Aurunci, 19 - 00185 Roma

