

# LINEE GUIDA PER LA DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE D'ABUSO NELLE URINE


A cura di Simona Pichini e Roberta Pacifici

# URINE



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 NELLE URINE

---

## **Autori**

Simona Pichini e Roberta Pacifici

## **In collaborazione con**

Patrizia Gori

Emilia Marchei

Lucio Marchioro

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. 11
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 Kit per la raccolta del campione di urine	p. 16
2.4 Moduli per il verbale di prelievo	p. 17
2.5 Moduli per la catena di custodia	p. 18
<b>3. Procedure per le analisi di laboratorio</b>	p. 19
3.1 Introduzione	p. 19
3.2 Ricezione del campione (Accettazione)	p. 19
3.3 Analisi di screening	p. 20
3.4 Analisi di conferma	p. 21
3.5 Cut-off	p. 22

<b>4. Consegna dei risultati analitici</b>	p. 25
4.1 Comunicazione dei risultati analitici	p. 25
4.2 Conservazione dei campioni	p. 26
<b>5. Contestazione dei risultati</b>	p. 27
<b>6. Assicurazione della Qualità delle analisi</b>	p. 28
6.1 Assicurazione di qualità	p. 28
6.2 Validazione delle metodologie d'analisi	p. 28
6.3 Controllo di qualità interno	p. 30
6.3.1 <i>Analisi di screening</i>	p. 32
6.3.2 <i>Analisi di conferma</i>	p. 33
6.4 Valutazione Esterna di Qualità (VEQ)	p. 34
6.5 Analisi per conto terzi	p. 34
<b>7. Procedure accertative per lavoratori con mansioni a rischio</b>	p. 35

**Appendice A**

*Organizzazione del personale del laboratorio* p. 41

**Appendice B**

*Esempio di dichiarazione di consenso informato da parte della persona sottoposta ad accertamento analitico* p. 45

**Appendice C**

*Esempio di un verbale di prelievo* p. 46

**Appendice D**

*Esempio di modulo di catena di custodia* p. 47

**Appendice E**

*Alcuni esempi di non-conformità nella catena di custodia e parametri chimico-fisici che rendono inaccettabile il campione di urine da utilizzare* p. 48

**Appendice F**

*Criteri cromatografici e di spettrometria di massa per l'accettabilità del risultato* p. 49

**Appendice G**

*Procedure Operative Standard (POS) per l'analisi delle principali sostanze d'abuso in matrice urinaria* p. 51

**Appendice H**

*Parametri principali nella validazione di un metodo analitico per la ricerca di sostanze d'abuso nelle urine* p. 55

**Bibliografia consigliata**

p. 60







predefinito. **Il risultato di un'analisi di una sostanza d'abuso ottenuto su campione di urina non è correlabile all'eventuale stato di alterazione psicofisica del soggetto consumatore al momento del prelievo del campione.**

## 1.2 Obiettivi e campi d'applicazione

Nell'ambito della ricerca delle sostanze d'abuso nelle urine, il laboratorio di farmacotossicologia è oggi chiamato ad offrire le proprie professionalità in situazioni differenti, quali ad esempio: casi clinici provenienti dal pronto soccorso ospedaliero o da specifici reparti, casi di tossicodipendenti in trattamento, casi di idoneità alla guida (valutazione differenziale fra attualità d'uso e abitudine), casi di richiesta del porto d'armi e nei lavoratori che svolgono mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi.

Lo scopo di questo documento è quello di fornire, ai laboratori ed agli enti nazionali di accreditamento; delle linee guida condivise a livello nazionale, che tengano conto di quanto prodotto a livello internazionale sulle pratiche di laboratorio da seguire per effettuare la ricerca delle sostanze d'abuso nella matrice urinaria. Queste linee guida, inoltre, mirano a fornire un sostegno pratico ai laboratori che progettano di effettuare (o che già effettuano) le analisi sulle sostanze d'abuso nelle urine, in modo che essi possano far propri i requisiti necessari all'implementazione di un servizio al cliente di elevata qualità.

Tali requisiti riguardano:

- l'organigramma del personale, con individuazione dei compiti e delle relative responsabilità;
- le procedure di acquisizione dei campioni e di analisi degli stessi;
- le procedure di validazione dei metodi analitici;
- i criteri minimi di identificazione e quantificazione;

- i valori di cut-off;
- il monitoraggio interno ed esterno dell'affidabilità analitica;
- le modalità di stesura e di emissione del rapporto analitico o referto, con eventuale interpretazione dei risultati.

### 1.3 Procedure per la catena di custodia

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze stupefacenti nella matrice urinaria, devono istituire una catena di custodia dei campioni, al fine di documentare il controllo e la tracciabilità degli stessi dal momento della loro accettazione in laboratorio fino al completamento delle analisi, inclusi la refertazione, la conservazione e lo smaltimento 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 o secondo quanto raccomandato dalla normativa vigente. Nel capitolo 2.5 e in Appendice D viene indicato un esempio di modulo di catena di custodia che rende tracciabile ogni movimentazione del campione di urine.

### 1.4 Sicurezza del laboratorio

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca delle sostanze d'abuso nelle urine devono disporre di un solido sistema di sicurezza in grado di garantire il divieto di accesso al personale non autorizzato nel laboratorio o nei luoghi in cui sono conservati i campioni o documenti relativi ad essi.

Il laboratorio deve possedere un registro che documenti l'entrata e l'uscita dei visitatori presso le aree protette del laboratorio stesso.

## 1.5 Personale di laboratorio

Solamente il personale opportunamente qualificato e la cui competenza sia stata formalmente riconosciuta può lavorare all'interno del laboratorio. I ruoli chiave, 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 periodicamente, 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

Il prelievo del campione è il primo passo della catena di custodia che può dimostrare inequivocabilmente come il risultato analitico finale sia riconducibile ad un ben determinato campione.

La raccolta del campione deve essere effettuata da personale qualificato ed autorizzato, che deve spiegare la procedura di raccolta del campione alla persona sottoposta ad accertamento analitico, deve compilare il verbale di prelievo, far firmare il consenso informato e compilare il 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 ed alla spedizione del campione al laboratorio che effettuerà l'analisi tossicologica. Tali procedure devono essere seguite scrupolosamente.

È necessario verificare:

- il rispetto della privacy e della sicurezza della persona sottoposta ad accertamento analitico;
- l'identità della persona sottoposta ad accertamento analitico;
- la corretta attribuzione del campione alla persona sottoposta ad accertamento analitico;
- che non ci sia adulterazione o manomissione del campione;
- che sia stato compilato in ogni sua parte il modulo del consenso informato da parte del soggetto (Appendice B). Bisogna precisare che in caso di minore, un genitore (o chi esercita la patria potestà) deve farsi garante della richiesta dell'accertamento analitico;
- l'eventuale assunzione, da parte della persona sottoposta ad accertamento, di farmaci che possano interferire con i risultati analitici nei 4-5 giorni antecedenti la raccolta;
- la tracciabilità del campione dal sito di raccolta sino alla ricezione in laboratorio, incluse le registrazioni dell'identità del personale autorizzato alla sua utilizzazione.

*segue*

La ricerca di sostanze d'abuso su matrice urinaria può essere effettuata su campioni:

- raccolti direttamente presso il servizio di medicina di laboratorio;
- provenienti dagli altri reparti ospedalieri;
- provenienti da strutture esterne o enti convenzionati.

Per quanto riguarda i campioni provenienti dai reparti di cura ospedalieri, si ritiene che per essi siano valide le procedure di raccolta, conservazione e trasporto previste per i campioni biologici redatte in accordo con il laboratorio. Le problematiche relative al consenso, alla identificazione e integrità del campione di urine, raccolto per la determinazione delle sostanze d'abuso, sono di competenza di ciascun reparto. Per quanto riguarda invece i campioni provenienti da strutture esterne o enti convenzionati, occorre stabilire e concordare con l'ente o struttura esterna, una procedura per la corretta raccolta, conservazione, trasporto e ricezione dei campioni di urine.

Dal momento dell'accettazione del campione da parte del laboratorio, è necessario attivare la procedura interna di catena di custodia.

## 2.2 Modalità di raccolta

La persona sottoposta ad accertamento analitico deve esibire un documento valido di identità, (nel caso di campioni provenienti da reparti ospedalieri, deve essere accertata l'identità della persona da parte dei responsabili del reparto stesso).

La raccolta delle urine deve avvenire secondo una procedura che assicuri, nel rispetto della privacy della persona sottoposta a controllo, l'identità, l'integrità e l'autenticità del campione.

Il prelievo di urine deve essere effettuato in locali non comunicanti con l'esterno sotto osservazione diretta di un medico o di un operatore sanitario.



L'etichetta identificativa, emessa in fase di registrazione o accettazione del campione biologico, deve contenere i principali dati anagrafici della persona sottoposta ad accertamento analitico (nome e cognome, data di nascita e codice univoco di identificazione).

Nell'etichetta devono essere apposte le firme della persona sottoposta ad accertamento analitico e della persona che ha effettuato la raccolta del campione.

### 2.3 Kit per la raccolta del campione di urine

Il kit per la raccolta del campione deve includere:

- contenitori per la raccolta del campione (due aliquote, A, B ; tre aliquote A,B e C per gli accertamenti relativi ai lavoratori con mansioni a rischio) (Capitolo 7);
- il verbale di prelievo redatto in triplice copia;
- il modulo per la catena di custodia e il consenso informato;
- un identificatore univoco (esempio: adesivo con codice a barre o codice alfanumerico) che colleghi il verbale di prelievo ed il modulo per la catena di custodia ad ognuno dei contenitori che contengono il campione;
- un contenitore termico dotato di adeguato elemento refrigerante per il trasporto o la spedizione dei campioni.

I campioni di urine devono essere conservati a +4°/+8°C per un massimo di 24 ore, o a -20°C per periodi di tempo superiori alle 24 ore.





## 2.5 Moduli per la catena di custodia

La catena di custodia rende tracciabile ogni movimento del campione, dal momento della sua raccolta all'arrivo nel laboratorio che eseguirà l'analisi, fino allo smaltimento o conservazione.

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

- identificatore univoco per la catena di custodia, per il verbale di prelievo e per i campioni (solitamente si usa una etichetta con codice a barre);
- informazioni sul campione (a cura della struttura di provenienza e a quella di ricezione)
- nome, indirizzo, e-mail e numero di telefono del laboratorio d'analisi;
- data e ora della raccolta;
- nome e firma di tutte le persone che hanno avuto in custodia il campione durante tutti i vari processi di raccolta dello stesso (Appendice D).



### 3.3 Analisi di screening

È possibile effettuare uno screening iniziale per la ricerca di classi di sostanze d'abuso utilizzando sia tecniche immunochimiche che cromatografiche.

I test immunochimici comunemente utilizzati per lo screening di sostanze stupefacenti e/o metaboliti in urine, utilizzano sistemi di rivelazione differenti (polarizzazione della luce fluorescente-FPIA, inibizione di una attività enzimatica-EMIT o DRI, interazione cinetica di microparticelle in soluzione KIMS, attivazione di un enzima per la formazione di un prodotto colorato CEDIA, ecc).

I metodi immunochimici di screening sono generalmente caratterizzati da costi contenuti, tempi di esecuzione rapidi, elevata o totale automazione ma, per contro, da ridotta specificità ed elevata inaccuratezza del risultato quantitativo, in particolare quando nel campione sono presenti più specie chimiche in grado di essere rilevate, ma non discriminate dal metodo (ad esempio composto immodificato e suoi metaboliti). Questi metodi, per le loro caratteristiche intrinseche, producono esclusivamente un risultato di tipo qualitativo, vale a dire la probabile positività (meglio definita come "non negatività") del campione rispetto a un analita, o più spesso a una classe di sostanze, relativamente a un valore di cut-off prestabilito.

Dal momento che l'esito negativo di un'analisi di screening è generalmente accettato come valido, è essenziale verificare che il metodo sia in grado di minimizzare il numero di falsi negativi. I test di screening vengono effettuati mediante l'impiego di reagenti e di calibratori direttamente forniti dalle ditte produttrici purché l'analisi sia eseguita secondo le indicazioni e il valore di cut-off definiti dal produttore. Le tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa tandem o all'analizzatore a tempo di volo, anche se meno veloci per lo screening di un gran numero di campioni, hanno il vantaggio di poter identificare simultaneamente in un'unica analisi una vasta gamma di analiti differenti. Tuttavia queste metodiche non sono frequentemente

a disposizione dei laboratori e richiedono una elevata expertise da parte del personale che opera in laboratorio.

*Raccomandazioni per le analisi di screening:*

- è necessario che i test di screening abbiano una sensibilità tale da rilevare le concentrazioni degli analiti (ad esempio metaboliti urinari delle principali sostanze d'abuso) rispetto ad un cut-off prestabilito. È auspicabile inoltre che il livello di imprecisione sia inferiore al 10%;
- la matrice urinaria non deve interferire con il test immunochimico;
- tutti i risultati positivi ai test di screening DEVONO essere confermati utilizzando una metodica specifica per l'analita ricercato, tipicamente una tecnica separativa cromatografica accoppiata ad una tecnica di rivelazione quale la spettrometria di massa. Un campione trovato positivo con un test di screening di tipo immunochimico, se non convalidato con un test di conferma, è privo di valore medico-legale.

#### 3.4 Analisi di conferma

I metodi di conferma debbono garantire l'identificazione certa ed eventualmente la quantificazione delle sostanze di interesse (sostanze parenti e/o loro metaboliti) con idonea sensibilità e specificità. Le analisi di conferma devono essere basate su tecniche in grado sia di identificare la struttura chimica dell'analita in esame che di distinguere un composto da un altro. Questo concetto include anche gli isomeri costituzionali (ad esempio le amfetamine e la fentermina) che hanno stessa formula molecolare, ma diversa formula di struttura (gli isomeri costituzionali sono composti aventi la stessa composizione molecolare, ma con atomi legati in modo differente).

La separazione e l'identificazione degli analiti di interesse si ottiene utilizzando metodi separativi cromatografici (cromatografia gassosa o liquida) accoppiati a un rivelatore a spettrometria di massa, che identifica i composti per il loro peso molecolare ed i frammenti tipici ottenuti, per collisione con fascio di elettroni ad energia nota o con un gas a pressione elevata, all'interno di una cella di collisione sotto vuoto.

Il valore soglia (cut-off) dei test di conferma deve essere posto ad una concentrazione più bassa rispetto a quello dei test immunochimici.

In Appendice F vengono illustrati i criteri di accettabilità di una analisi separativa cromatografica e successiva identificazione (e quantificazione) in spettrometria di massa; in Appendice G alcune POS come esempio di metodologie per l'analisi delle principali sostanze d'abuso in matrice urinaria.

I campioni in cui le concentrazioni di una determinata sostanza d'abuso risultino al di sotto dei cut-off stabiliti per le analisi di conferma devono essere considerati negativi per quella sostanza. Normalmente non si rendono necessarie ulteriori analisi e le aliquote del campione possono essere eliminate secondo le modalità stabilite dal laboratorio. I campioni che contengono le sostanze d'abuso e/o i loro metaboliti a concentrazioni uguali o superiori ai cut-off prestabiliti, sono considerati positivi. L'aliquota B (o la aliquota C) di un campione risultato positivo va conservata in apposito congelatore provvisto di chiave per un periodo concordato con chi richiede l'analisi (clinico, autorità amministrativa o giudiziaria) o secondo quanto previsto dalla legge. Tale periodo di conservazione deve essere riportato nelle POS.

### 3.5 Cut-off

Il cut-off rappresenta un limite di concentrazione definito in maniera convenzionale per stabilire la negatività o la positività di un campione.



**Tabella 2.** Concentrazioni soglia (cut-off) nei test di conferma riportate dal SAHMSA, dal Provvedimento 18/09/2008 riguardante le analisi su lavoratori con mansioni a rischio e dal Gruppo Tossicologi Forensi Italiani.

Analita	Cut-off SAHMSA (ng/ml)	Cut-off PROVVEDIMENTO 18/09/2008 MANSIONI A RISCHIO (ng/ml)	Cut-off GTFI (ng/ml)
Amfetamina	250	250	200
Metamfetamina	250	250	200
MDA	250	250	200
MDMA	250	250	200
MDEA	250	250	200
THC	-	15	-
THC-COOH	15	15	15
Cocaina	-	100	150
BEG	100	100	150
Morfina	2000	100	200
Codeina	2000	100	200
6-MAM	10	100	10
Metadone	-	100	100
EDDP	-	-	100
Buprenorfina	-	5	5
Norbuprenorfina	-	-	5

MDA: 3,4 metilendiossiamfetamina

MDMA: 3,4 metilendiossimetamfetamina

MDEA: 3,4-metilendiossi-N-etilamfetamina

THC: delta-9-tetraidrocannabinolo

THC-COOH: acido 11-nor-delta-9-THC-9-carbossilico

BEG: benzoilecgonina

6-MAM: 6-monoacetilmorfina

EDDP: 2-etiliden-1,5- dimetil-3, 3-difenilpirrolidina



---

## 4. Consegna dei risultati analitici

Il laboratorio di Analisi o il Servizio di Medicina di laboratorio dovrebbe poter disporre di uno specialista in tossicologia che possa rispondere a quesiti relativi al risultato analitico del test eventualmente posti dall'autorità, struttura o persona fisica che ha richiesto l'accertamento.

### 4.1 Comunicazione dei risultati analitici

Prima di essere consegnato, il referto delle analisi di laboratorio deve essere controllato ed approvato dal Direttore del laboratorio che ha eseguito le analisi. Il referto analitico deve contenere:

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

Inoltre, nel referto si devono riportare informazioni riguardanti:

- a) la matrice biologica analizzata (urine);
- b) il tipo di analisi eseguita;
- c) il metodo analitico utilizzato;
- d) il risultato delle analisi eseguite. Qualora le analisi di screening e di conferma abbiano rilevato la presenza di sostanze stupefacenti e/o metaboliti urinari al di sopra del valore soglia prestabilito, il referto deve contenere il nome della/e sostanza/e rilevata/e con le relative concentrazioni;
- e) i cut-off utilizzati;
- f) la firma del direttore di laboratorio (o di chi ne fa le veci).

## 4.2 Conservazione dei campioni

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze d'abuso in matrice urinaria devono conservare a -20°C l'aliquota B (o l'aliquota C) dei campioni di urine risultati positivi secondo quanto stabilito dalla legge (ad esempio Provvedimento 18 settembre 2008) o dalle circolari regionali che regolamentano le procedure per tali analisi.

Il laboratorio inoltre deve conservare e rendere disponibile tutta la documentazione relativa ai procedimenti analitici utilizzati.

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.



## 6. Assicurazione delle Qualità delle analisi

### 6.1 Assicurazione di qualità

I laboratori che effettuano analisi sulle sostanze stupefacenti o psicotrope 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 nelle urine da un organismo di certificazione ed accreditamento ufficialmente riconosciuto.

### 6.2 Validazione delle metodologie d'analisi

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

Ogni metodologia d'analisi utilizzata di routine dal laboratorio deve essere pertanto preventivamente validata secondo procedure condivise a livello nazionale e internazionale.

Per i metodi di screening più comunemente utilizzati non sono di solito necessarie procedure di validazione in quanto il metodo viene validato dalla ditta produttrice e, in ogni caso, il kit per le analisi è corredato da calibratori di controllo che, inseriti in ogni lotto di campioni da analizzare, verificano che l'accuratezza e la precisione delle analisi sia all'interno di un valore prestabilito.

Nel caso vengano apportate modifiche alle indicazioni fornite dalle case produttrici dei kit (ad esempio uso del kit per una matrice biologica differente da quella indicata dal produttore, variazione del limite di quantificazione, etc.), il laboratorio deve effettuare una validazione completa del metodo/kit modificato. Nell'utilizzo di un kit è auspicabile evitare ogni modifica rispetto a quanto indicato dal produttore e comunque la si dovrebbe effettuare solo nei casi in cui non si abbia la possibilità di utilizzare altre metodologie.

Una procedura di validazione completa di una metodologia di analisi in generale deve comprendere i seguenti parametri:

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

La metodologia d'analisi potrà essere utilizzata di routine dal laboratorio soltanto se i parametri di validazione calcolati rientrano

nei limiti stabiliti dalle direttive internazionali in materia (Guidance for Industry, Bioanalytical Method validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration:

[www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM128049.pdf](http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM128049.pdf);

[www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf);

European Medicines Agency, 2011:

[www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)).

In Appendice H 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 garantisce l'affidabilità dei risultati analitici e permette di evitare eventuali errori casuali che possono avvenire in fase analitica e/o pre o post analitica e che possono pregiudicare l'accuratezza del risultato.

Per i test di screening e per quelli di conferma si raccomanda di inserire quotidianamente, ed in ogni lotto (batch) analitico, i seguenti campioni di controllo:

- controllo negativo (drug-free);
- controllo con concentrazione degli analiti  $\leq 25\%$  rispetto il valore di cut-off;
- controllo con concentrazione degli analiti  $\geq 25\%$  rispetto il valore di cut-off;
- controllo con concentrazione degli analiti prossima a LOQ (solo per le analisi di conferma).

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 acquistati o preparati in matrice urinaria. È possibile utilizzare sia urine di controllo (prive di qualsiasi sostanza d'abuso) addizionate con gli analiti in esame con le concentrazioni adeguate agli scopi del controllo, sia campioni reali ottenuti da consumatori precedentemente analizzati da enti o strutture che possano fornire un certificato d'analisi. L'esito quotidiano del controllo di qualità interno è determinante per decidere se dare inizio o meno al processo analitico.

I calibratori ed i controlli devono riportare la concentrazione dell'analita e la 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 (se fornita dal produttore) o data di revisione (ad esempio in cui si controlla la titolazione della soluzione standard).

Le soluzioni madri degli standard (utilizzati per la preparazione dei campioni di controllo e per i punti della curva di calibrazione) 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 la sostanza in esame (se l'informazione è assente in

letteratura, è sempre possibile confrontare uno spettro ultravioletto, eseguito appena la soluzione madre è stata preparata o acquistata, con quello eseguito nel momento successivo di controllo di tale soluzione).

Tutti i dati acquisiti nelle varie fasi del controllo interno di qualità devono essere registrati in modo da facilitare la successiva interpretazione dei risultati di tali controlli, per individuare eventuali errori casuali o tendenze associate ad una certa variazione (errori sistematici), in modo da essere rilevati prima che siano superati i limiti di qualità prefissati. Se non si dispone di un archivio informatico, si raccomanda di conservare per almeno un anno tutta la documentazione cartacea raccolta mese per mese, in accordo con il Responsabile per la Gestione della Qualità (RGQ) e con quanto riportato nel manuale per la qualità del laboratorio.

### *6.3.1 Analisi di screening*

Qualora il laboratorio effettui analisi di screening, i test devono essere calibrati almeno una volta a settimana o tutte le volte che i risultati del controllo di qualità rilevano valori fuori controllo.

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 (es:  $\pm 2$  deviazioni standard o  $\pm 20\%$ ).

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 o una tendenza univoca (i valori tendono sempre a scendere o sempre a salire all'interno dell'intervallo di variabilità) nel tempo 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.

### 6.3.2 *Analisi di conferma*

Quelli che seguono sono i requisiti minimi per un appropriato controllo di qualità nelle analisi di conferma:

- verifica dell'idoneità del sistema prima di iniziare l'analisi dei campioni;
- la curva di calibrazione deve includere almeno cinque punti di calibrazione ed un bianco; i punti della curva devono includere la concentrazione del cut-off, che non deve coincidere con il punto più basso della curva;
- l'analisi quantitativa deve essere effettuata utilizzando uno standard interno; quando disponibile, è raccomandato l'utilizzo di uno standard interno deuterato;
- per ciascun gruppo di sostanze d'abuso, in ogni lotto analitico devono essere inseriti due campioni di controllo a concentrazione prossima al cut-off (ad esempio controllo  $\leq$  e  $\geq$  25% rispetto il valore di cut-off).
- i controlli sull'effetto di trascinamento (carry-over) devono essere effettuati ad intervalli appropriati all'interno di ogni lotto analizzato, per garantire l'assenza di risultati falsi positivi.

## 6.4 Valutazione Esterna di Qualità (VEQ)

Il laboratorio deve partecipare ad adeguati programmi di Valutazione Esterna della Qualità. Le performance analitiche al di fuori dei criteri stabiliti dal programma di VEQ devono essere prontamente corrette. La scelta di un programma o di un altro deve essere fatta sulla base del miglior riscontro scientifico ottenibile. La partecipazione può riguardare la identificazione delle classi di sostanze o delle singole sostanze e la quantificazione, nel caso delle analisi di conferma, secondo i cut-off di legge o stabiliti dall'ente gestore del programma.

Nel caso dei test di screening, l'espressione dei risultati è in genere in termini di "positivo" o "negativo". In caso di analisi di conferma, è necessario fornire non solo un dato qualitativo, ma anche uno quantitativo, ossia la concentrazione rilevata secondo una data curva di calibrazione per l'analita identificato come presente nel campione di urine.

È auspicabile, laddove possibile, la partecipazione a quei programmi dove possono essere valutati parametri urinari aggiuntivi che indichino una possibile diluizione o adulterazione del campione: peso specifico, pH, creatinina, osmolalità, etc.

I risultati della partecipazione alla VEQ costituiscono un possibile oggetto di riflessione tra il personale del laboratorio e il direttore dello stesso sulla performance del laboratorio. Nella eventualità di errori, è importante individuarne le cause e attuare delle azioni correttive che ne impediscano il ripetersi.

## 6.5 Analisi per conto terzi

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze d'abuso nelle urine dovrebbero svolgere tutta l'attività di laboratorio con personale e attrezzature propri. Qualora sia necessario affidare a terzi laboratori le analisi, questi devono essere accreditati da un organismo ufficialmente riconosciuto e devono comunque attenersi alle presenti linee guida. Le analisi effettuate presso laboratori in service 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 individua 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.

L'accertamento di primo livello avviene a cura del medico competente che contestualmente alla visita medica del soggetto sottoposto a controllo, effettua la raccolta delle urine. La raccolta del campione, per un volume compreso tra i 40 e 60 ml deve avvenire in appositi contenitori di plastica monouso sotto controllo del medico competente o di un operatore sanitario qualificato, introducendo misure atte ad evitare la possibilità di manomissione del campione stesso. Completata la raccolta del campione, il medico competente può effettuare il test di screening rapido o inviare il campione urinario ad un laboratorio autorizzato per il test di screening e, in caso di positività, anche per il test di conferma. Se il medico competente, effettuato il test di screening rapido, rileva un esito negativo deve provvedere all'immediata eliminazione del campione residuo. In caso di esito positivo del test, invece, il medico, in presenza della persona sottoposta all'accertamento analitico, procede alla suddivisione del campione residuo in due aliquote di almeno 20 ml in contenitori contrassegnati dalle lettere B ( aliquota per le analisi di conferma) e C (aliquota per le analisi di revisione) da inviare ,in appositi contenitori termici muniti di elemento refrigerante, al laboratorio individuato per le analisi di conferma o

di revisione, allegando il verbale di prelievo e la refertazione del test immunochimico rapido effettuato con stampa del risultato ottenuto.

Se il medico competente decide di non eseguire il test di screening rapido, deve inviare il campione di urine ad un laboratorio autorizzato, suddividendo tale campione in tre aliquote di 10-20 ml ciascuna (in ottemperanza alle varie circolari attuative regionali del provvedimento, laddove presenti), utilizzando contenitori idonei contrassegnati dalle lettere A (aliquota per lo screening immunochimico), B (aliquota per le analisi di conferma) e C (aliquota per eventuale analisi di revisione) da inviare in appositi contenitori termici muniti di elemento refrigerante, effettuando tutte le operazioni di catena di custodia, verbalizzazione delle operazioni e firma del consenso informato da parte del soggetto sottoposto all'accertamento analitico.

Al momento del ricevimento delle tre aliquote, il laboratorio di Analisi diviene responsabile della custodia e della conservazione di esse. È quindi fondamentale anche per tale laboratorio istituire una catena di custodia che documenti tutti i passaggi, dal ricevimento del campione fino alla refertazione del risultato delle analisi e allo smaltimento delle aliquote di urine secondo le normative vigenti.

Esiste la possibilità, da parte del medico competente, regolata da accordi e procedure opportunamente documentate, di avvalersi del laboratorio o Servizio Medicina di laboratorio (dove verranno eseguite le analisi) anche per la raccolta dei campioni di urina.

Se i risultati delle analisi di screening, eseguite su opportune apparecchiature, sull'aliquota A del campione avranno dato esito negativo, il laboratorio provvederà allo smaltimento delle aliquote B e C secondo la normativa vigente. In caso di risultato positivo al test di screening, il laboratorio, se non provvisto di strumentazione idonea, invierà le aliquote B e C di urine ad un laboratorio di analisi competente e fornito di strumentazione

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

---

idonea alla conferma dei risultati qualitativi, utilizzando, per il trasporto dei campioni di urina, un apposito contenitore termico dotato di adeguato elemento refrigerante. Qualora invece il laboratorio sia provvisto di strumentazione idonea (gas cromatografia o cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa), si occuperà anche di eseguire le analisi di conferma.

Il laboratorio dovrà comunicare, entro 10 giorni dalla consegna dei campioni, gli esiti delle analisi al medico competente.

La refertazione deve essere prodotta in forma scritta e consegnata solo a chi ha richiesto l'accertamento.

In caso di esito positivo al test di screening e di conferma, il lavoratore potrà richiedere una analisi di revisione (controanalisi) sull'aliquota contrassegnata dalla lettera C del campione urinario entro 10 giorni dalla comunicazione del risultato analitico. Il test di revisione deve essere effettuato entro 30 giorni dal recepimento della richiesta del lavoratore che potrà assistere o personalmente o tramite un proprio consulente tecnico all'esecuzione delle analisi.

In caso di risultato positivo per la presenza di una o più sostanze d'abuso e/o metaboliti nelle urine, il medico competente richiede un secondo livello di approfondimento diagnostico-accertativo che prevede un accertamento chimico-tossicologico, complementare all'accertamento clinico, mediante analisi per la ricerca delle sostanze d'abuso (e/o metaboliti) nelle urine e nella matrice cheratinica.



---

## **Appendice A**

*Organizzazione del personale del laboratorio*

## **Appendice B**

*Esempio di dichiarazione di consenso informato da parte della persona sottoposta ad accertamento analitico*

## **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 e parametri chimico-fisici che rendono inaccettabile il campione di urine da analizzare*

## **Appendice F**

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

## **Appendice G**

*Procedure Operative Standard (POS) per l'analisi delle principali sostanze d'abuso in matrice urinaria*

## **Appendice H**

*Parametri principali nella validazione di un metodo analitico per la ricerca di sostanze d'abuso nelle urine*

---





---

## 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 dello staff del laboratorio nel "manuale di qualità" del laboratorio.

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

**Direttore del laboratorio** - Il direttore è responsabile dell'attività professionale, organizzativa, amministrativa ed educativa 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 di screening 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 in campo tossicologico e profonda conoscenza
  - 1) delle procedure legate alla catena di custodia, al controllo di qualità e alle pratiche per la sua valutazione
  - 2) della teoria e della pratica 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 su campioni di urina);
- assicurare la competenza continuativa del personale di laboratorio, documentando la formazione in servizio, la competenza nelle analisi e rivalutando le prestazioni lavorative;

*segue*

- assicurare che il laboratorio disponga del manuale delle Procedure Operative Standard (POS) completo, aggiornato e disponibile alla consultazione da parte del personale che effettua le analisi;
- mantenere un programma di controllo interno della qualità per garantire la corretta esecuzione delle analisi e della loro refertazione in conformità alle POS;
- garantire la partecipazione con esito positivo ad appropriati programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ);
- mantenere performance 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.

**Personale di laboratorio** - Viene identificato come la persona che quotidianamente ha il compito di eseguire la seduta analitica, in osservanza delle POS e in tutta l'attività in programmazione per ciascuna giornata di lavoro.

### *Qualifiche:*

- appropriato ed adeguato livello di 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 giornalmente 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 riportate in maniera dettagliata 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;
- controllo 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 responsabile della qualità risponde direttamente alla direzione. Deve possedere nel proprio ambito la necessaria autorità, competenza e autonomia. Deve inoltre essere in possesso della formazione 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 la 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 delle 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 Organismi Scientifici Pubblici o da Società Scientifiche Nazionali e/o Internazionali (ad esempio SIBioC, SIMEL, etc.).

---

## Appendice B

### *Esempio di dichiarazione di consenso informato da parte della persona sottoposta ad accertamento analitico*

Confermo di aver consegnato un mio campione di urine al responsabile della raccolta. Ho potuto osservare che il campione prelevato è stata diviso in due (tre) pari aliquote denominate A, B e C (nel caso del Provvedimento sulle analisi per i lavoratori con mansioni a rischio) (Capitolo 7) e sigillate in appositi contenitori. Confermo che le informazioni contenute in questo modulo e sulle etichette dei contenitori sono corrette. Esprimo il mio consenso affinché contenitori sigillati contenenti le aliquote A, B e, se presente, C possano essere inviate al laboratorio e autorizzo il laboratorio ad effettuare analisi per la ricerca di sostanze d'abuso e/o loro metaboliti.

*Acconsento a tutto quanto sopra dichiarato*

*Nome e Cognome della persona sottoposta ad accertamento analitico*

---

*Firma della persona sottoposta ad accertamento analitico*

---

*Data*

---

*Identificativo della persona sottoposta ad accertamento analitico  
(codice a barre o codice alfa del campione)*

## Appendice C

### Esempio di un verbale di prelievo

#### DATI DELL'INCARICATO DEL PRELIEVO DEL CAMPIONE

#### DATI DEL PERSONA SOTTOPOSTA AD ACCERTAMENTO ANALITICO

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 giorni) e/o notizie cliniche

---



---



---



---



---



---



---



---

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 e parametri chimico-fisici che rendono inaccettabile il campione di urine da analizzare*

- Codici a barre assenti o non identici tra loro
- Campione senza documentazione allegata
- Assenza del consenso informato della persona sottoposta ad accertamento analitico
- Sigilli di sicurezza sui contenitori del campione o sul contenitore per il trasporto rotti o manomessi
- Assenza dei sigilli di sicurezza
- Ricezione di una sola aliquota
- Volume del campione insufficiente al completamento delle analisi
- Contenitori non integri con evidente perdita del campione
- Incongruità del campione urinario con il tipo di richiesta pervenuta (ad esempio verifica di attualità d'uso di sostanze d'abuso nel caso dell'articolo 187 del codice della strada "Guida in stato di alterazione psico-fisica per uso di sostanze stupefacenti")
- Creatinina <20 mg/dl
- Peso specifico <1003 mg/L o >1035 mg/l
- pH <3 o >10

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

In tutti i casi di ricusazione, il Direttore del laboratorio, o suo delegato, è tenuto a compilare lo specifico rapporto di "non conformità" che definisca dettagliatamente le cause di ricusazione del campione.



---

## Appendice F

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

#### **Criteri cromatografici**

Per la Gas-Cromatografia (GC) il tempo di ritenzione di un composto deve 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 deve presentare una variazione massima di  $\pm 6$  secondi rispetto al tempo di ritenzione dello standard di calibrazione.

#### **Criteri 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 eventuali composti endogeni) può essere utilizzato per la quantificazione, costruendo opportune curve di calibrazione, come riportato nella validazione delle metodologie di analisi.

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 urinaria, 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 incogniti.

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, nello stesso rapporto (10-15%) di abbondanze relative.

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 agli ioni 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% rispetto alle intensità relative degli stessi ioni negli standard di calibrazione.

## Appendice G

*Procedure Operative Standard (POS) per l'analisi delle principali sostanze d'abuso in matrice urinaria*

DETERMINAZIONE DI:  
**OPPIACEI, COCAINA, BENZOILECGONINA, BUPRENORFINA E METADONE NELLE URINE**

**URINA**

Prelevare 1 ml

Aggiungere 1 ml tampone fosfato 0.2 M pH 5,2

Aggiungere lo standard interno

50 µl di enzima β-glucuronidasi (Idrolisi enzimatica)

Incubare per 18 ore a 40°C

Raffreddare a Temperatura Ambiente

Vortexare

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

Attivazione della colonnina: 2 ml metanolo + 2 ml tampone fosfato 0.1 M pH 6  
**(NON mandare a secco la colonnina)**

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

*segue*

Lavaggio: 4 ml H<sub>2</sub>O bidistillata  
+  
3 ml di HCl 0.1 M  
+  
Vuoto per 5 minuti  
+  
4 ml di metanolo

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

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

**Derivatizzare** il campione con 50 µl di BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamide)  
+ 1% TMCS (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 120°C- x 1 minuto -----30°C-----10°C-----240°C-----290°C x 10 minuti

#### IONI DA MONITORARE

**COCA** m/z 82, 182, **303**

**BEG TMS** m/z 82, 240, **361**

**MORFINA 2TMS** m/z 401, 414, **429**

**6-MAM TMS** m/z 287, 340, **399**

**BUPRENORFINA TMS** m/z **450**, 482, 506

**METADONE** m/z **72**, 165, 223

**EDDP TMS** m/z **277**, 262, 276

**COCA** d<sub>3</sub> m/z 85, 185, **306**

**BEG TMS** d<sub>3</sub> m/z 85, 243, **364**

**MORFINA 2TMS** d<sub>3</sub> m/z 404, 417, **432**

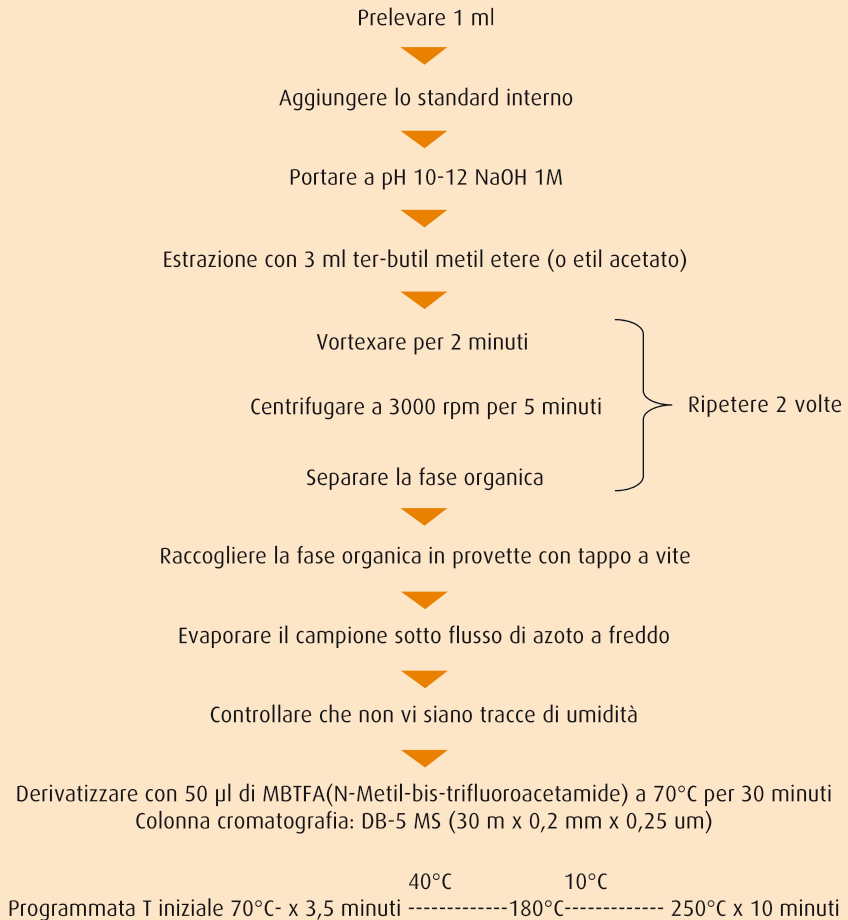
**6-MAM TMS** d<sub>3</sub> m/z 290, 343, **402**

**BUPRENORFINA TMS** d<sub>4</sub> m/z **454**, 484, 510

**METADONE** d<sub>3</sub> m/z **75**, 168, 226

**EDDP TMS** d<sub>3</sub> m/z **280**, 265, 279

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

DETERMINAZIONE DI: **AMFETAMINE NELLE URINE****URINA****IONI****A TFA** m/z 91, 118, **140****MA TFA** m/z 110, 118, **154****MDMA TFA** m/z 135, 145, **162****MDA TFA** m/z **135**, 162, 275**A TFA** d<sub>4</sub> m/z 95, 122, **144****MA TFA** d<sub>4</sub> m/z 114, 122, **158****MDMA TFA** d<sub>4</sub> m/z 139, 149, **166****MDA TFA** d<sub>4</sub> m/z **139**, 166, 279

DETERMINAZIONE DI:  
**11-NOR-9-CARBOSSI-DELTA-9-TETRAIDROCANNABINOLO NELLE URINE**

**URINA**



Prelevare 1 ml



Aggiungere lo standard interno



Acidificare il campione con HCL 1N (pH4)



Estrarre il campione con 4 ml di esano-etilacetato (9:1)



Portare a secco il campione sotto flusso di azoto



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

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

20°C

10°C

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

**IONI**

**THC-COOH** 2TMS m/z 371,473, 488

**THC-COOH** d<sub>3</sub> 2TMS m/z 374, 476, 491

---

## Appendice H

### *Parametri principali nella validazione di un metodo analitico per la ricerca di sostanze d'abuso nelle urine*

#### **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 supera 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 LLOD è la concentrazione a cui il segnale supera 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 preferire 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  $C_i$ ,  $C_m$  e  $C_s$ ).

### **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 in vivo.

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 in può di 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, etc.) 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, etc. 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 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 Procedure operative standard. 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

Amitava D. Critical Issue in Alcohol and Drugs of Abuse Testing, 2009 AACC Press, pag. 107.

Baselt R, Cravey R. "Disposition of Toxic Drug and Chemicals in Man", Fourth Ed., Chemical Toxicology Institute, Foster City, 1995.

Bush DM. The U.S. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs: current status and future considerations. Forensic Sci Int. 2008; 30: 174: 111-119.

Colucci AP, Galliano-Candela R. "Validità del dato analitico del laboratorio chimico clinico e tossicologico" Bollettino per le Farmacodipendenze e l'Alcolismo, 2004; XXVII, n° 3-4; 37-46.

Corcione S, Pichini S, Badia R, Segura J, de la Torre R. Quantitative aspects of drugs of abuse in urine samples: intercollaborative studies conducted in the European Union. Ther Drug Monit. 1999; 21: 653-660.

ELsohly MA. "Morphine and Codeine in biological fluids: approaches to source differentiation", Forensic Science Review, 1989; 1: 13-22.

Ferrara SD. Il Laboratorio di Farmacologia e Tossicologia Clinica, Ed. Medico Scientifiche, 1989.

GTFI - Gruppo Tossicologi Forensi Italiani, Linee Guida per i Laboratori di Analisi di Sostanze d'Abuso con Finalità Tossicologico-Forensi e Medico-Legal, marzo 2010; Rev. n° 3.

Huestis MA, Mitchell JM, Cone EJ. "Lowering the federally mandated cannabinoid immunoassay cut-off increases true-positive results", Clin Chem., 1994; 40: 729-733

Jolley ME. "Fluorescence Polarization Immunoassay for the determination of therapeutic drug levels in human plasma" J. Anal. Toxicol., 1981; 5, 236.

Linee Guida per la gestione dei programmi di Controllo di Qualità Interno, Documenti SIBioC, Biochimica Clinica, 2008; 32: 1032-121.

Linee Guida per la gestione dei programmi di Valutazione Esterna di Qualità, Documenti SIBioC, Biochimica Clinica, 2011; 35. 107-126.

Marchei E, Pellegrini M, Rotolo MC, Pichini S, Pacifici R. La catena di custodia e sua applicazione negli accertamenti tossicologici dei lavoratori con mansioni a rischio ( rassegna) Ligand Assay 2009; 14: 320-332.

Marchioro L, Trombin A, Castagna F, Maietti S, Plebani M. "Biochips e droghe d'abuso: valutazione del sistema Evidence in confronto con metodologia KIMS", Biochimica Clinica, 2007; 31: 197-204.

Marchioro L, Ponchia S, Plebani M. "Metodologia KIMS: valutazione dei reagenti di I° generazione per la misura di oppiacei e amfetamine e dei reagenti di II° generazione per metadone, cocaina e cannabinoidi su analizzatore Hitachi 912", *Biochimica Clinica*, 2007; 31: 191-196.

Moffat A, Jackson J, Moss M, Widdop B, Greenfield E. "Clarke's isolation and Identification of Drugs", Second Ed., The Pharmaceutical Press, London, 1986.

Luzzi V, Saunders AI N, Koenig JW, et al. "Analytical performance of immunoassays for drugs of abuse below established cutoffs values", *Clin Chem.*, 2004; 50: 717-722.

Palmi I, Pichini S, Pacifici R. Il decreto attuativo della normative sulla gestione delle mansioni a rischio ( rassegna) *Ligand Assay* 2009; 14: 315-319.

Plebani M. "Il referto in Medicina di Laboratorio" *RIMEL/IJLaM* 2005; 1 (Suppl) 57-59.

Phan HM, Yoshizuka K, Murry DJ, Perry PJ. Drug testing in the workplace. *Pharmacotherapy*. 2012; 32: 649-656.

Ropero-Miller JD, Goldberger BA. *Handbook of Workplace Drug Testing*, II ed. 2009 AACC Press, cap. 3: 61-98.

Ropero-Miller JD, Goldberger BA. *Handbook of Workplace Drug Testing*, II ed. 2009 AACC Press, cap. 4: 99-120.

Substance Abuse Mental Health Services (SAMHSA) website: <http://www.workplace.samhsa.gov>

Yalow RS, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 1959; 189A: 1648-9.

Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 1960; 39: 1157-75.





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

