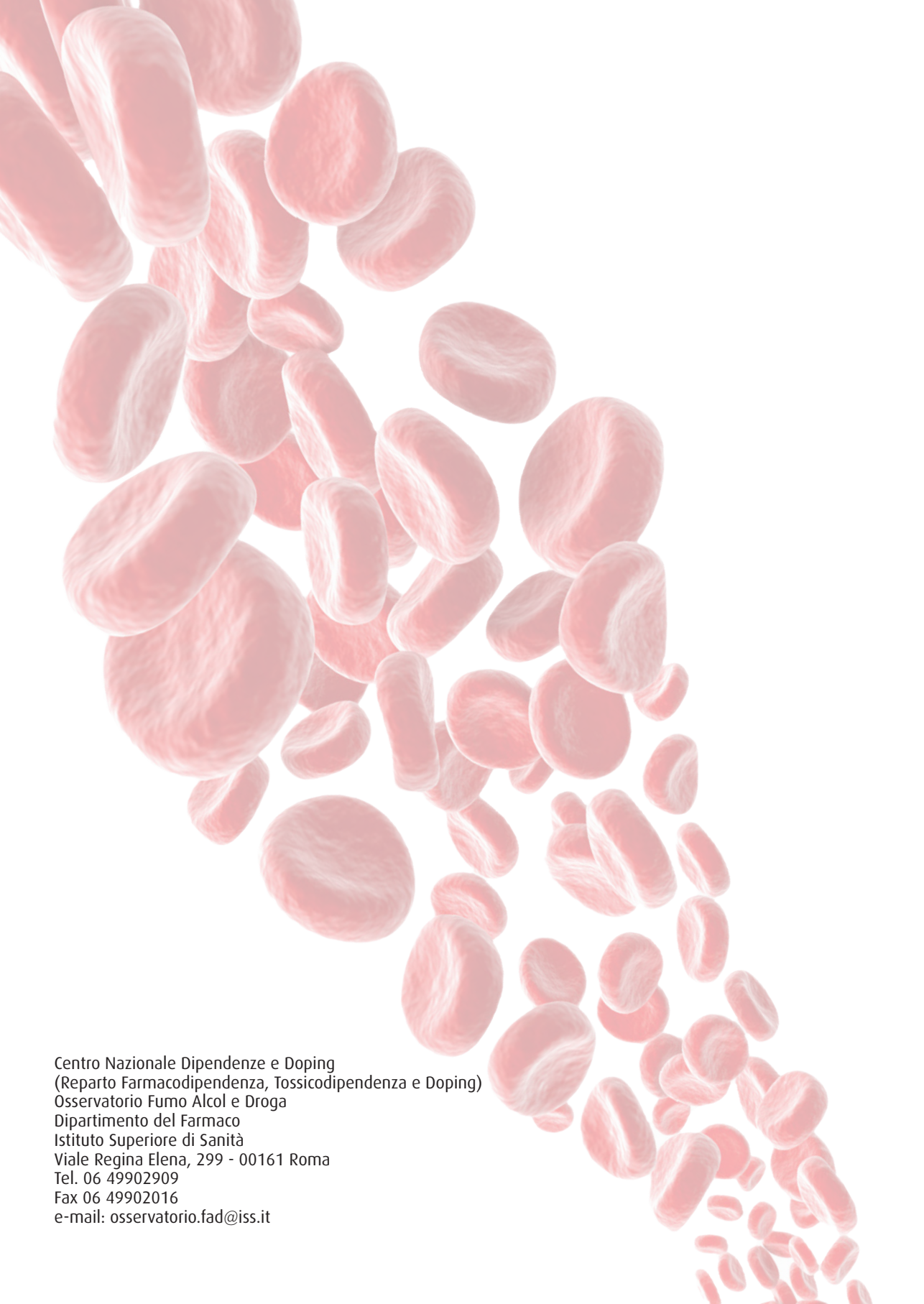


PROCEDURE OPERATIVE PER LA DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE

A cura di Simona Pichini, Paolo Bucchioni, Manuela Pellegrini e Roberta Pacifici





Centro Nazionale Dipendenze e Doping
(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

PROCEDURE OPERATIVE PER LA DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE D'ABUSO SU SANGUE

Autori

Simona Pichini, Paolo Bucchioni, Manuela Pellegrini, Roberta Pacifici

In collaborazione con

Antonella Bacosi
Simonetta Di Carlo
Paolo Franceschini
Patrizia Gori
Laura Martucci
Patrizia Martucci
Luisa Mastrobattista
Adele Minutillo
Claudia Mortali
Gianfranco Petricciani
Maria Concetta Rotolo
Isa Mavi Sbarbaro
Giacomo Toth

Si ringrazia per il loro contributo la dr.ssa Silvia Mengozzi e il Dr. Marco Vidali

INDICE

1. Generalità	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
2. Il prelievo del campione	p. 12
2.1 Introduzione	p. 12
2.2 Modalità di raccolta	p. 13
2.3 Moduli per il verbale di prelievo	p. 15
2.4 Kit per la raccolta del campione di sangue	p. 16
2.5 Moduli per la catena di custodia	p. 16
3. Procedure per le analisi di laboratorio	p. 17
3.1 Introduzione	p. 17
3.2 Ricezione del campione (Accettazione)	p. 18
3.3 Analisi di screening	p. 18
3.4 Analisi di conferma	p. 20
3.5 Cut-off	p. 21
4. Consegna dei risultati analitici	p. 26
4.1 Comunicazione dei risultati analitici	p. 26
4.2 Conservazione dei campioni	p. 27

5. Contestazione dei risultati	p. 28
6. Assicurazione della qualità delle analisi	p. 29
6.1 Assicurazione di qualità	p. 29
6.2 Validazione delle metodologie d'analisi	p. 29
6.3 Controllo di qualità interno	p. 31
6.3.1 <i>Analisi di screening</i>	p. 33
6.3.2 <i>Analisi di conferma</i>	p. 34
6.4 Valutazione esterna di qualità (VEQ)	p. 34
Appendice A Organizzazione del personale del Laboratorio	p. 39
Appendice B Esempio di dichiarazione di consenso informato da parte della persona sottoposta ad accertamento analitico	p. 43
Appendice C Esempio di un verbale di prelievo	p. 44
Appendice D Esempio di un modulo di catena di custodia	p. 45
Appendice E Alcuni esempi di non-conformità nella catena di custodia	p. 46
Appendice F Procedure operative standard (POS) per l'analisi delle principali sostanze d'abuso nel sangue	p. 47
Appendice G Criteri cromatografici e di spettrometria di massa per l'accettabilità del risultato	p. 51
Appendice H Parametri principali nella validazione di un metodo analitico	p. 53
Bibliografia	p. 57



1. Generalità

1.1 Introduzione

Il sangue è la matrice biologica di elezione per dimostrare l'attualità di consumo, idoneo per la determinazione di xenobiotici e/o delle sostanze d'abuso e/o metaboliti in campo clinico, per dimostrare l'assunzione durante la guida, nello svolgimento di mansioni lavorative a rischio e nell'ambito medico-legale. La concentrazione ematica e/o plasmatica della sostanza ricercata, infatti, consente di stabilire o di escludere la recente assunzione ed è direttamente correlabile allo status psicofisico del soggetto al momento del prelievo. Negli USA sono uscite nel 2008 le "Guidelines for research on drugged driving" con alcune indicazioni specifiche per il sangue, in Italia il Gruppo Tossicologi Forensi (GTFI) ha redatto nel 2010 le "Linee Guida" per i Laboratori di Tossicologia (aggiornate nel 2017).

Il documento in oggetto viene redatto sviluppando i concetti e le finalità già espresse dalle suddette procedure operative formulate dal GTF nelle recenti versioni e interpretando i requisiti previsti dalla norma UNI EN ISO 9001:2008 e quelli previsti nella norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura".

In Italia il sangue non è al momento contemplato quale matrice biologica nelle analisi per la ricerca delle sostanze d'abuso sul posto di lavoro. Per quanto riguarda invece il Nuovo Codice della strada i Protocolli Operativi per gli accertamenti richiesti dagli artt.186 e 187 del codice della strada, presentati alla Camera nel febbraio 2005, prevedono che il prelievo ematico possa essere effettuato presso le competenti strutture sanitarie solo con il consenso del conducente oppure in caso di rifiuto su disposizione dell'Autorità Giudiziaria. Non è stato ancora emanato un decreto attuativo sulle modalità di effettuazione di tali accertamenti e sui cut-off da utilizzare e pertanto

1.2 Obiettivi e campi d'applicazione

Lo scopo di questo documento è quello di mettere a disposizione dei laboratori di farmaco tossicologia e degli enti nazionali di accreditamento per tali laboratori, Procedure Operative condivise a livello nazionale che tengono conto di quanto prodotto a livello internazionale sulle migliori pratiche di laboratorio da seguire per effettuare analisi precise ed accurate di sostanze d'abuso sulla matrice sangue. Queste Procedure mirano a fornire un sostegno pratico ai laboratori che progettano di effettuare o che già effettuano le analisi di tali sostanze su tale matrice, in modo che essi possano far propri i requisiti necessari all'implementazione di un servizio di elevata qualità.

Schematizzando, le presenti procedure operative intendono:

- fornire un contesto operativo comune ai Laboratori che eseguono analisi per le sostanze d'abuso sulla matrice sangue a fini clinici e/o medico legali;
- promuovere ed armonizzare le procedure proponendo protocolli condivisi 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 sotto posti all'analisi ed assicurare la validità dei campioni prelevati;
- definire, per tutti i laboratori, criteri comuni per la definizione dei cut-off e degli strumenti che assicurino la qualità dell'esame attraverso un organismo esterno.

1.3 Procedure per la catena di custodia

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze d'abuso nella matrice ematica 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

2. Il prelievo del campione

2.1 Introduzione

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, il modulo della catena di custodia e far firmare il consenso informato.

E' essenziale predisporre delle Procedure Operative Standard (POS) relative alla raccolta, alla conservazione del campione, alla formazione del personale addetto al prelievo e alla spedizione 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 della persona sottoposta ad accertamento analitico;
- l'identità della persona sottoposta ad accertamento analitico;
- la sede e l'ora dove è avvenuto il prelievo;
- che non abbia avuto luogo alcuna falsificazione o manomissione del campione;
- che sia stato compilato in ogni sua parte il modulo del consenso informato da parte della persona sottoposta all'accertamento analitico (Appendice B);
- l'utilizzo da parte del persona sottoposta ad accertamento analitico di particolari medicinali (anche somministrati durante le prime fasi dell'eventuale soccorso stradale) 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

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

La raccolta del campione deve avvenire secondo una procedura che assicuri, nel rispetto della privacy della persona sottoposta ad accertamento analitico, l'identità, l'integrità e l'autenticità del campione stesso.

Il prelievo di sangue deve essere effettuato in locali dedicati esclusivamente alla raccolta nel rispetto delle norme sanitarie e di sicurezza e deve essere effettuato detergendo la cute con prodotti non alcolici.

Il dispositivo per la raccolta deve contenere un anticoagulante (es. sodio fluoruro/ossalato potassio) e deve essere in grado di raccogliere un volume noto e costante di sangue (almeno 5 ml).

Il campione raccolto con finalità medico-legali deve essere suddiviso in tre aliquote denominate A, B, C. L'aliquota A verrà utilizzata per la eventuale analisi di screening, l'aliquota B per l'analisi di conferma e l'aliquota C verrà conservata in congelatore a -20°C per eventuali analisi di revisione richieste dal soggetto sottoposto all'accertamento analitico.

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

Ai tre dispositivi deve essere apposto un sigillo antimanomissione per garantire l'integrità del campione.

Nel sigillo devono essere apposte le firme della persona sottoposta accertamento analitico e della persona che ha effettuato la raccolta del campione.

Nel caso in cui il soggetto interessato sia impossibilitato ad esprimere il consenso, i campioni biologici vengono comunque prelevati e conservati secondo le modalità previste, in attesa della possibilità di valida manifestazione dello stesso.

2.3 Moduli per il verbale di prelievo (Modulo di Campionamento)

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

- i dati relativi al responsabile del prelievo;
- i dati relativi alla persona sottoposta ad accertamento analitico (generalità, residenza, numero documento d'identità etc.). Se il soggetto non possiede un documento d'identità valido, sarà possibile procedere all'identificazione dello stesso mediante l'ausilio di un supervisore autorizzato o di un testimone con documento di identità. Se l'identità del soggetto non può essere accertata, il responsabile non potrà procedere al prelievo del campione;
- i dati relativi al prelievo per l'identificazione univoca del campione (codice di identificazione, struttura/reparto ove viene effettuato il prelievo etc.);
- l'elenco dei farmaci eventualmente assunti o somministrati alla persona sottoposta ad accertamento analitico nei giorni antecedenti la raccolta del campione;
- verrà infine apposta la firma sia di chi ha effettuato il prelievo sia della persona sottoposta ad accertamento analitico. 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 di sangue e una copia consegnata alla persona sottoposta ad accertamento analitico.

- nome e firma di tutte le persone che hanno avuto in custodia le aliquote del campione durante il viaggio dal luogo del prelievo sino alla destinazione finale (laboratorio di analisi);
- Un esempio di modulo di catena di custodia è riportato in (Appendice D).

3. Procedure per le analisi di laboratorio

3.1 Introduzione

Quando il campione giunge in laboratorio devono essere immediatamente effettuati i primi controlli sull'aspetto e la condizione dello stesso nonché sul rispetto della catena di custodia. Se il campione supera i controlli iniziali, l'aliquota A viene avviata ai test di screening per la ricerca di sostanze d'abuso. Se il risultato del test di screening è negativo, non è necessario procedere con ulteriori indagini. Al contrario, se i test di screening danno indicazione della possibile presenza nel campione di una sostanza d'abuso (risultato analitico al di sopra del cut-off prestabilito), si rende necessario procedere con i test di conferma con l'aliquota B, al fine di confermare o escludere la presenza della sostanza d'abuso.

Un risultato positivo ai soli test di screening è privo di valenza medico-legale.

metaboliti) nel sangue competono con un analita od un enzima presenti nel test di screening.

I metodi immunochimici di screening sono generalmente caratterizzati da 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 (es. 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 di numero 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 (TOF), anche se meno veloci per lo screening di un gran numero di campioni, hanno il vantaggio di poter identificare simultaneamente in un'unica analisi una vasta gamma di analiti differenti. Tuttavia queste metodiche analitiche non sono frequentemente a disposizione dei laboratori e richiedono una elevata expertise da parte del personale che opera in laboratorio.

Raccomandazioni per le analisi di screening:

- E' necessario che i test di screening abbiano una sensibilità tale da rilevare le concentrazioni degli analiti rispetto ad un cut-off prestabilito. E' auspicabile inoltre che il livello di imprecisione sia compreso nell'intervallo +20%;
- la matrice sangue non deve interferire con il test immunochimico;
- tutti i risultati positivi ai test di screening **devono** essere confermati utilizzando una metodica più specifica per l'analita ricercato, tipicamente una tecnica separativa cromatografica accoppiata ad una tecnica di rivelazione quale la spettrometria di massa;
- un campione trovato postumo con un test di screening di tipo immunochimico se non covalidato 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 e la quantificazione accurata 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.

La separazione e l'identificazione degli analiti di interesse si ottiene utilizzando metodi separativi cromatografici (cromatografia gassosa o liquida) accoppiati generalmente al 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 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. I campioni le cui concentrazioni per 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 ed il campione può essere eliminato secondo le modalità stabilite dalle normative vigenti.

In Appendice G si riportano esempi di Procedure Operative Standard (POS) per l'analisi delle principali sostanze d'abuso nelle matrici biologiche.

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 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.

Come riportato nei precedenti paragrafi, le tecniche analitiche di screening e di conferma devono essere in grado di rilevare una classe di sostanze (le prime) e di identificare e quantificare la sostanza parente e/o i suoi metaboliti (le seconde) assicurando un limite di quantificazione che presenti adeguata accuratezza e precisione e sia inferiore ai valori soglia- cut-off stabiliti.

per le sostanze d'abuso usate a scopo ricreazionale non sono presenti intervalli terapeutici, gli esperti suggerivano di utilizzare valori di cut-off pari al limite di rilevazione strumentale (LOD) o valori presenti nelle 24 ore seguenti una singola somministrazione della sostanza in esame.

Nel 2012, il Ministero dei Trasporti e delle Comunicazioni norvegese ha richiesto ad un gruppo di esperti nazionali di proporre limiti di concentrazione di legge per le sostanze d'abuso correlate corrispondenti ad una concentrazione di alcol nel sangue pari allo 0,02%, con l'obiettivo di ridurre la necessità di analisi sugli automobilisti e semplificando le procedure processuali. Gli esperti, utilizzando i dati nazionali degli anni 2010-2012 relativi "alla guida sotto l'influenza delle sostanze d'abuso" e gli studi epidemiologici presenti in letteratura, hanno suggerito i limiti di concentrazione per le sostanze d'abuso più comuni come riportato nella tabella 1 [Vindenes V, Jordbru D, et al.].

Nel 2013, però, un pannello di esperti britannici [Wolff K, Brimblecombe R et al.] ha eseguito una revisione bibliografica di tutti i dati analitici pubblicati a proposito delle concentrazioni delle più comuni sostanze d'abuso nel sangue di soggetti coinvolti in incidenti stradali nonché metanalisi di diversi studi europei sullo stesso tema ed ha quindi redatto un documento

in cui per la prima volta vengono utilizzati sia dati natura epidemiologica su base europea sia metanalisi. Come è possibile notare dalla tabella I, i valori di cut-off riportati in questo studio risultano più elevati rispetto a quelli riportati nelle altre due colonne della tabella relativi al Gruppo tossicologi forensi italiani e allo studio internazionale del 2008.

Nelle linee guida redatte 2014 il panel di esperti britannici ha notevolmente ridotto il valore di cut-off per le sostanze d'abuso nella matrice ematica.

Inoltre come è possibile vedere nella tabella per quanto riguarda l'Italia il GTFI ha introdotto la dicitura requisiti minimi di prestazione al posto di cut-off secondo i quali il laboratorio che intende svolgere accertamenti analitici di conferma per le sostanze psicotrope con valenza medico-legale deve essere in grado di assicurare la corretta quantificazione delle concentrazioni indicate o concentrazioni inferiori, raggiungibili comunemente con metodiche cromatografiche abbinate alla spettrometria di massa. Questi requisiti minimi secondo il GTFI non devono essere considerati cut-off interpretativi. Recentemente in Italia è stato inserito il reato di "omicidio stradale" (sez.589 bis della legge 41/16 del Codice della Strada) secondo il quale l'automobilista, che sotto l'effetto di sostanze stupefacenti

3. PROCEDURE PER LE ANALISI DI LABORATORIO

provoca incidente stradale con morto/i o ferito/i grave/, può subire un periodo di reclusione il cui numero di anni è variabile a seconda della gravità del reato. Pertanto, poiché questa legge inasprisce le pene per chi guida sotto l'effetto di sostanze psicoattive e provoca un incidente stradale grave, si ritiene di primaria importanza l'abilità di un laboratorio di farmacotossicologia a poter identificare e quantificare con la massima precisione ed accuratezza una quantità di sostanza parente ed eventuali metaboliti correlabili ad un effetto invalidante per la guida di un veicolo a motore piuttosto che quantificare la minima quantità possibile di sostanza psicoattiva nel sangue. In altre parole è importante che venga verificata in maniera inequivocabile l'attualità d'uso e non la presenza seppur minima di una sostanza psicoattiva. E' noto infatti che le concentrazioni di sostanza vicine o sovrapponibili al limite di quantificazione strumentale vengono misurate con una imprecisione ed una inaccuratezza superiori a quelle di valori maggiori a tale limite e quindi con una incertezza non compatibile con la richiesta di un dato di laboratorio inequivocabile a fini medico legali.

Tabella 1

Analita	Cut-off GTFI (2012) (ng/ml)	Cut-off Linee Guida Americane (2008) (ng/ml)	Cut-off Esperti norvegesi . (2012) ng/ml	Cut-off Linee guida Inglesi (2013) (µg/L= ng/ml)
Amfetamina	20	20	41	600 300*
Metamfetamina	20	20	45	200 100*
MDA	20	20		
MDMA	20	20	48	300 150*
MDEA	20	20		
MBDB	20	20		
Metadone	10	10	25	500 250*
THC	2	1	1.3	53*
11-OH-THC	2	1		
Morfina	10	10	9	80 40*
Codeina	10	10		
6-Acetil morfina	10	10		
Cocaina	10	10	24	80 40*
Cocaetilene	10	10		
BEG		50		500

MDA: 3, 4 metilendiossianfetamina

MDMA: 3,4 metilendiossimetanfetamina

MDEA:3,4-metilendiossi-N-etilanfetamina

MBDB: N-metil- 1,3 benzodioxolylbutanamina

THC: delta-9-tetraidrocannabinolo

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 essere un esperto di analisi di sostanze d'abuso e deve tener conto di tutte le osservazioni e informazioni riportate nel verbale di prelievo riguardo ad eventuali trattamenti farmacologici del soggetto.

4.1 Comunicazione dei risultati analitici

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

Il referto analitico deve contenere i seguenti dati identificativi:

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

Inoltre, nel referto si deve includere:

- A. la matrice biologica analizzata (sangue);
- B. il tipo di analisi eseguita;
- C. il metodo analitico utilizzato;
- D. il risultato delle analisi eseguite. Qualora le analisi di screening e di conferma abbiano rilevato la presenza di sostanze stupefacenti e/o metaboliti al di sopra del valore soglia prestabilito, il referto deve contenere il nome della/e sostanza/e rilevata/e con le relative concentrazioni;

- E. i cut-off utilizzati;
- F. i parametri di validazione in particolar modo precisione e accuratezza come stabilito nelle direttive internazionali in materia di validazione;
- G. la firma del responsabile del laboratorio (o di chi ne fa le veci).

Nel caso in cui le analisi abbiano rilevato la presenza di più sostanze il referto dovrà contenere i nomi delle sostanze rilevate, le relative concentrazioni ed i relativi cut-off.

ai fini della rilevazione della sostanza attiva nelle indagini relative all'art. 187 del tasso alcolemico in relazione all'art. 186 del CdS, è auspicabile un percorso preferenziale a livello di pronto soccorso affinché il paziente che ha provocato un incidente stradale possa essere sottoposto al prelievo delle matrici biologiche nel minor tempo possibile.

I commenti o altre informazioni che possono accompagnare il referto hanno lo scopo di rendere più comprensibile il dato analitico ottenuto soprattutto nel caso abbia valenza medico-legale. Qualora espressamente richiesto, il responsabile del laboratorio, sarà disponibile nel redigere una relazione scritta sui risultati ottenuti dall'analisi di laboratorio.

In calce al referto si apporrà la firma del responsabile di laboratorio che potrà avvenire anche digitalmente.

4.2 Conservazione dei campioni

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze d'abuso in matrice ematica devono conservare a -20°C l'aliquota C dei campioni di sangue risultati positivi secondo quanto stabilito dalle circolari regionali che regolamentano le procedure di analisi e comunque per un periodo di tempo non inferiore ad un anno come riportato anche nelle linee guida dei tossicologi forensi

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

La documentazione deve comprendere:

ricercate solamente le sostanze d'abuso risultate presenti nell'aliquota B del campione di sangue 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 sulle sostanze d'abuso nel sangue 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 UNI EN ISO 9001:2008 o UNI CEI EN ISO/IEC 17025 da un organismo esterno ufficialmente riconosciuto. Attualmente in Italia il D.L. n. 502 del 1992 (art.8) ha affidato alle Regioni il compito di disciplinare i procedimenti relativi all'autorizzazione e all'accreditamento delle strutture sanitarie

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 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 siano all'interno di un valore prestabilito. Tuttavia è necessario verificare se le caratteristiche metodologiche dichiarate dalla ditta sono rispettate.

Nel caso vengano apportate modifiche alle indicazioni fornite dalle case produttrici dei kit, (es. uso del kit per una matrice biologica differente da quella indicata dal produttore, variazione del limite di quantificazione, ecc.) il laboratorio deve effettuare una validazione completa del metodo/kit modificato. E' auspicabile evitare ogni modifica rispetto a quanto indicato dal produttore nell'utilizzo di un kit; le modifiche andrebbero effettuate 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 nel sangue;
- 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 (es. 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;

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).

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 eludere eventuali errori casuali che possono avvenire in fase analitica e/o pre o post-analitiche e che possono pregiudicare l'accuratezza del risultato.

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 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 valore prossimo a LOQ (solo per le analisi di conferma).

È sempre preferibile l'acquisto dei materiali di controllo da ditte certificate o specializzate nella loro 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 acquistati o preparati in matrice ematica. È possibile utilizzare sia sangue di controllo (priva di qualsiasi sostanza d'abuso) addizionata con gli analiti in esame con le concentrazioni adeguate agli scopi del controllo, sia campioni reali ottenuti da consumatori previamente 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 madre 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.

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 di qualità interno 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 il lotto che deve essere analizzato.

E' necessario che le prove 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 di stabiliti (es: ± 2 deviazioni standard o $\pm 15-20\%$).

E' 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 cut-off, che non deve coincidere con il punto più basso di tale 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 (es. sangue di controllo con concentrazione di analiti $\leq e \geq 25\%$ rispetto il valore di cut-off).
- controlli sul trascinamento (carry-over) devono essere effettuati ad intervalli appropriati all'interno di ogni seduta analitica, 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 deve essere fatta sulla base del

miglior riscontro scientifico ottenibile.

La partecipazione può riguardare l'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 sangue.

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. Nell'eventualità che un errore (errore totale ET) determinato da uno scostamento del valore singolo (stima) dal valore atteso, non sia accettabile, è essenziale individuare le cause e attuare delle azioni correttive che ne impediscano il ripetersi.

Il tempo di conservazione delle elaborazioni cartacee dei risultati è di tre anni.

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

Appendice F

Criteri cromatografici e di spettrometria di massa per l'accettabilità di un risultato

Appendice G

Procedure Operative Standard (POS) per l'analisi delle principali sostanze d'abuso nella saliva

Appendice H

Parametri principali nella validazione di un metodo analitico per la ricerca di sostanze d'abuso nella saliva

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 nel "manuale di qualità" del laboratorio come previsto dalle norme ISO.

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 di Tossicologia

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 loro raggiungimento. E' 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 di Laboratorio.

Qualifiche:

- Almeno una laurea nell'area biomedica o titolo equivalente (medicina, chimica, scienze biologiche o tecnologie biomediche) ed un percorso formativo che attesti formalmente la specifica competenza in diagnostica chimico-tossicologica;
- Formazione, esperienza e conoscenza delle procedure legate alla catena di custodia, al controllo di qualità e 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 sangue);
- 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 le analisi;

- Mantenere un programma di controllo interno della qualità per garantire la corretta esecuzione delle analisi 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 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 il personale 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:

- 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 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 IUNI EN ISO 9001:2008 o UNI CEI EN 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;
- Controllo che le attività di laboratorio siano conformi alle procedure operative 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 la organizzazione.

Tossicologo - E' 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 farmaco-tossicologica.

Qualifiche:

- Almeno una laurea o titolo equivalente in chimica, medicina, scienze biologiche o tecnologie biomediche; diploma di scuola di specialità o equivalente esperienza maturata in tossicologia analitica (documentata dal percorso formativo, dagli incarichi ricoperti, dall'aggiornamento e da pubblicazioni scientifiche pertinenti);
- 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, 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 (es. SIBioC, SIPMEL, ecc.).

Appendice B

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

Confermo che mi è stato prelevato un campione di sangue dal responsabile della raccolta. Ho potuto osservare che il sangue è stato raccolto in tre provette denominate aliquota A, aliquota B e aliquota C; confermo che le informazioni contenute in questo modulo e sulle etichette sono corrette. Esprimo il mio consenso affinché le aliquote A B e C (o campioni A, B e C) 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 nel campione di sangue. 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 persona sottoposta ad accertamento analitico

Nome e Cognome

Firma della persona sottoposta ad accertamento

Data

Appendice C

Esempio di un verbale di prelievo

CATENA DI CUSTODIA CAMPIONI RELATIVI POD e POA

Compilato da: () () Altri (indicare) _____
 Prot. n _____ Data _____ ora del prelievo _____
 Nome _____ Cognome _____
 Data di nascita _____ luogo di nascita _____
 Nazionalità _____ doc identità tipo _____
 N _____ Rilasciato da _____ il _____

Consenso informato per il prelievo

La persona sopraindicata è stata informata preventivamente ed esaurientemente delle modalità del prelievo e delle finalità dello stesso. Ha dichiarato di consentire al prelievo di:

SANGUE NO SI firma interessato
 URINE NO SI firma interessato
 SALIVA NO SI firma interessato

Non è stato possibile acquisire valido consenso perché la persona non era in grado di esprimerlo. Il prelievo delle aliquote di sangue necessarie all'analisi ed il relativo accertamento analitico () è stato effettuato su campioni biologici già prelevati per altre finalità diagnostiche o terapeutiche. I campioni sono conservati presso _____

() non è stato effettuato.

() somministrata morfina uso terapeutico

() somministrato () uso terapeutico

PRONTO SOCCORSO

LABORATORIO ANALISI

Selezione	Parametri analitici		Conservazione in laboratorio I Screening				Conservazione in laboratorio II Conferma				
	Etando	Droghe scf.	Fig1	Fig2	Fig3	Fig4	Altro	Fig1	Fig2	Fig3	Fig4

Solo Alcol

Campione urine 1													
Campione urine 2													
Campione urine 3													

Solo Droghe

Campione urine 1													
Campione urine 2													
Campione urine 3													
Campione sangue 1													
Campione sangue 2													
Campione sangue 3													
Campione saliva 1													
Campione saliva 2													

Alcool e Droghe

Campione urine 1													
Campione urine 2													
Campione urine 3													
Campione sangue 1													
Campione sangue 2													
Campione sangue 3													
Campione saliva 1													
Campione saliva 2													

Dichiarazione dell'interessato che assiste al campionamento
 Dichiaro che le etichette identificative sono correttamente compilate e da me confrontate.
 Tutto il materiale utilizzato per il campionamento risulta integro, chiuso/sigillato.
 I prelievi sono stati suddivisi, etichettati e sigillati in mia presenza.

Firma dell'interessato _____

Firma del supervisore al campionamento _____

(o del sanitario che ne assume la tutela in caso di impossibilità del soggetto)
 *** Conforme al modulo 3 e 2 al c. Art. 186/187 D.L. vo n° 285 del 30.04.199

Appendice D

Esempio di un modulo di catena di custodia

MODULO DI LABORATORIO I (SCREENING)

Consegna in laboratorio
Consegnato nel laboratorio.....
il..... Ora.....

Nome e firma di chi consegna

Nome e firma di chi riceve

Analisi dell'aliquota I di:
sangue codice campione
urine codice campione
saliva codice campione

TEST DI SCREENING METODICA CUT-OFF ESITO

Parametro analitico	Risultato	Cut-off	Metodica
Alcool			
Oppiacei			
Cocaïna			
Anfetamine ed analoghi			
Cannabinoidi			
MDMA, analoghi ed omologhi			
Metadone (al di fuori dell'uso terapeutico)			
Altro (specificare).....			

Firma del responsabile del Laboratorio

.....

MODULO DI LABORATORIO II (CONFERMA)

TRASFERIMENTO DEI CAMPIONI (aliquote II e III)

per conferma di
Consegnate nel laboratorio..... il
..... ore

Nome e firma di chi consegna

Nome e firma di chi riceve

TEST DI CONFERMA IN (indicare la tecnica strumentale):.....
Eseguito in data.....con esito in referto del L.I.S. conforme al modulo 7 art.
186/187 D.L.vo n° 285 del 30.04.1992

URINE		SANGUE		SALIVA	
Conservare fino a	smaltite	Conservare fino a	smaltite	Conservare fino a	smaltite
Aliquota II					
Aliquota III					

Firma del responsabile del Laboratorio

.....

***Conforme al modulo 5-6 e 3 alc.. Art. 186/187 D.L.vo n° 285 del 30.04.1992

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 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

Appendice F

Procedure operative standard (POS) per l'analisi delle principali sostanze d'abuso nel sangue

Determinazione: | Opiacei, Cocaine, Amfetamine, Metadone, Buprenorfina nel sangue intero

- Prelevare 1 ml di sangue intero
- Aggiungere lo standard interno
- Aggiungere 0.5 ml di Acetonitrile
- Vortex e lasciare a riposo per 10 minuti
- Centrifugare 5 minuti a 13000 rpm
- Trasferire il surnatante in provetta di vetro da 10 ml
- Aggiungere 5 ml di acetato di etile
- Vortex
- Evaporare sotto flusso di azoto a 40°C fino ad un volume di circa 2 ml
- Centrifugare 5 minuti a 3000 rpm
- Trasferire il surnatante in vial con tappo a vite da 2 ml
- Portare a secco sotto flusso d'azoto a 40°C
- Risospendere con 50 ul di opportuna miscela delle fasi mobili

Dati strumentali

Colonna: Poroshel 120 SB-C18 (2.1 X 75 mm / 2.7 µm)

Temperatura Colonna: 40 °C

Volume di iniezione: 5 microlitri

Rivelatore: spettrometro di massa tandem con interfaccia elettrospray

Flusso: 0.5 ml/min

Pressione min.: 0 bar

Pressione max: 600 bar

Fase Mobile A: H₂

Colonna: Poroshel 120 SB-C18 (2.1 X 75 mm / 2.7 µm)

Temperatura Colonna: 40 °C

Volume di iniezione: 5 microlitri

Rivelatore: spettrometro di massa tandem con interfaccia elettrospray

Flusso: 0.5 ml/min

Pressione min.: 0 bar

Pressione max: 600 bar

Fase Mobile A: H₂O + 5Mm Formiato + 0.01 % HCOOH

Fase Mobile B: MEOH + 0.01 % HCOOH

Modalità di separazione : gradiente (fase mobile B 0.00-0.5 minuti al 5%; tra 0.5-7.0 minuti dal 5% al 95%; tra 7.0-8.0 minuti mantenuto al 95%)

Parametri	Valore (+)	Valore (-)
Temp Gas (°C)	325	325
Flusso Gas (l/min)	12	12
Nebulizzatore (psi)	45	45
Capillare (V)	4000	3500

Analita	Ione precursore (MH ⁺) m/z	Ione prodotto (Transizione I) m/z	Ione prodotto (Transizione II) m/z	Standard Deuterato
6-monoacetilmorfina	328	211	165	6-monoacetilmorfina D3
Morfina	286	152	165	Morfina D3
Amfetamine	136	91	119	Amfetamine D5
Metamfetamine	150	65	91	Metamfetamine D5
MDA	180	105	163	MDA D5
MDEA	208	105	163	MDEA D5
MDMA	194	105	163	MDMA D5
Cocaina	304	182	82	Cocaina D3
Cocaetilene	318	82	196	Cocaetilene D3
Buprenorfina	468	55	396	Buprenorfina D4
Metadone	310	105	265	Metadone D3

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

Determinazione: | THC, THC-COOH, 10 OH-THC nel sangue intero

- Prelevare 1 ml di sangue intero
- Aggiungere lo standard interno deuterato
- Aggiungere 2 ml di acqua distillata
- Vortex
- Aggiungere 800 ul di acido acetico 10%
- Vortex
- Aggiungere 8 ml di una miscela 9:1 esano/ acetato di etile
- Tappare e mescolare per inversione per 30 minuti
- Centrifugare i campioni a 2800 rpm per 15 minuti
- Trasferire il surnatante in provetta pulita da 10 ml
- Portare a secco sotto flusso d'azoto a 40°C
- Risospendere con 50 ul di opportuna miscela delle fasi mobili

Dati strumentali

Colonna: Poroshel 120 SB-C18 (2.1 X 75 mm / 2.7 µm)

Temperatura Colonna: 40 °C

Volume di iniezione: 10 microlitri

Rivelatore: spettrometro di massa tandem con interfaccia elettrospray

Flusso: 0.5 ml/min

Pressione min.: 0 bar

Pressione max.: 600 bar

Fase Mobile A: H₂O + 5Mm Formiato + 0.01% HCOOH

Fase Mobile B: MEOH + 0.01% HCOOH

Modalità di separazione: gradiente (fase mobile B 7-10minuti al 95%; tra 10-10,5 minuti dal 95% al 40%;)

Parametri della sorgente

Parametri	Valore (+)	Valore (-)
Temp Gas (°C)	325	325
Flusso Gas (l/min)	12	12
Nebulizzatore (psi)	45	45
Capillare (V)	4000	3500

Analita	Ione precursore (MH ⁺) m/z	Ione prodotto (Transizione I) m/z	Ione prodotto (Transizione II) m/z	Standard Deuterato
THC	315	193	259	THC D3
THC-COOH	345	299	327	THC-COOH D3
10 OH-THC	331	313	193	10 OH-THC D3

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

Appendice G

Criteria cromatografici e di spettrometria di massa per l'accettabilità di un risultato.

Criteria cromatografici

Per la gas-cromatografia (GC) il tempo di ritenzione di un composto deve presentare una variazione massima di ± 3 secondi rispetto al tempo di ritenzione dello standard di calibrazione.

Per la cromatografia liquida (LC) il tempo di ritenzione di un composto deve presentare una variazione massima di ± 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. Lo 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 sangue, 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 (più o meno 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 a gli 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 H

Parametri principali nella validazione di un metodo analitico per la ricerca di sostanze d'abuso nel sangue

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 (es. 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 (es. 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 (es. 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 LLOD è la concentrazione a cui il segnale è maggiore di almeno 3 volte la 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 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 di 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. Ogni calibratore deve essere eseguito in triplicato. 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 (es. 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 (es. 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 es. 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 stabilite da ciascun laboratorio e poi riportate sulle proprie POS. In generale, la variazione di concentrazione dopo i processi sopra menzionati quando 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

- R.Pacifici, P.Gori, L.Martucci, S.Pichini Considerazioni sulle matrici biologiche idonee alla valutazione dell'attualità d'uso di sostanze illecite ai fini degli articoli 186 e 187 del nuovo Codice della Strada. *Biochimica clinica*, 2014, vol.38.n°1
- J.Michael Walsh, A.G. Verstraete, M.A. Huestis, and J. Morland.Guidelines for research on drugged driving . *Addiction*, Agosto 2008 103(8):1258-1268.
- Commissione Qualità GTFI. Linee Guida per le strutture dotate di laboratori per gli accertamenti di sostanze d'abuso con finalità tossicologico-forensi e medico-legali su campioni biologici prelevati da vivente revisione n°4 del 6 dicembre 2012 <http://www.simlaweb.com/component/kunena/12-tossicologia-forense/156-linee-guida-gtfi.html>
- HilaryJ.Burch, Elisabeth J.Clark, Alison M.Hubbard, Mich Scott-Ham. Concentration of drugs determined in blood samples collected from suspected drugged drivers in England and Wales. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 20 (2013) 278 - 289
- Articoli 186 e 187 del Nuovo Codice della Strada (GU Serie Generale n.114 del 18-5-1992 Suppl. Ordinario n. 74)
- M.R.Moeller,Thomas Kraemerf. Drugs of abuse monitoring in blood for control of driving under the influence of drugs. *Ther Drug Monit.* 2002 aprile; 24(2):210-21
- A.G.Verstracte. Detection times of drugs of abuse in blood, urine,and oral fluid.*Ther Drug Monit.* vol.26,n° 2 aprile 2004
- Substance Abuse and Mental Health Services Administration. Mandatory Guidelines for FederalWorkplace Drug Testing Programs at <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2008-11-25/pdf/E8-26726.pdf>
- Accordo, ai sensi dell'articolo 8, comma 2 dell'Intesa in materia di accertamento di assenza di tossicodipendenza, perfezionata nella seduta della Conferenza Unificata del 30 ottobre 2007 (Rep. Atti n. 99/CU), sul documento recante «Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi». (Rep. Atti n. 178/CSR)[http://www.workplace.samhsa.gov/DrugTesting/Level_1_Pages/Federal%20Register%20Notices%20\(Proposed%20Policies\).html](http://www.workplace.samhsa.gov/DrugTesting/Level_1_Pages/Federal%20Register%20Notices%20(Proposed%20Policies).html)
- Walsh J.M, Verstrate AG, Huestis MA, MorlandJ Guidelines for reserch on drugged driving *Addiction* 2008; 103: 1258-1268
- Vindenes V, Jordbru D, Knapskog AB, Kvan E, Mathisrud G, Slørdal L, Mørland J. Impairment based legislative limits for driving under the influence of non-alcohol drugs in Norway. *For Sci Int.* 2012; 219: 1-11
- Wolff K,Brimblecombe R, Forfar J.C, Forrest Ar, Gilvarry E,Johnston A, Morgan J, Osselton Md, Read L, Taylor D. Driving under the influence of drugs 2013www.gov.uk/dft
- www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM128049.pdf; 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).

