



RAPPORTI ISTISAN 26|8

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Linee di indirizzo per la determinazione delle sostanze d'abuso e nuove sostanze psicoattive nelle matrici biologiche

E. Marchei, M.C. Rotolo, P. Berretta,
C. Fraioli, S. Pichini, M. Pellegrini



EPIDEMIOLOGIA
E SANITÀ PUBBLICA

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Linee di indirizzo per la determinazione
delle sostanze d'abuso e nuove sostanze psicoattive
nelle matrici biologiche**

Emilia Marchei, Maria Concetta Rotolo, Paolo Berretta,
Chiara Fraioli, Simona Pichini, Manuela Pellegrini

Centro Nazionale Dipendenze e Doping

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
26/8

Istituto Superiore di Sanità

Linee di indirizzo per la determinazione delle sostanze d'abuso e nuove sostanze psicoattive nelle matrici biologiche.

Emilia Marchei, Maria Concetta Rotolo, Paolo Berretta, Chiara Fraioli, Simona Pichini, Manuela Pellegrini
2026, v, 59 p. Rapporti ISTISAN 26/8

Il documento definisce linee di indirizzo per la determinazione delle sostanze d'abuso e delle Nuove Sostanze Psicoattive (NSP) nelle principali matrici biologiche, quali sangue, saliva, urina e capelli. Vengono delineati gli obiettivi clinici, forensi ed epidemiologici delle analisi tossicologiche, evidenziando la necessità di approcci analitici sensibili e specifici in risposta alla continua evoluzione del mercato delle NSP. Per ciascuna matrice biologica sono descritte le procedure di raccolta, conservazione, gestione delle non conformità e analisi, insieme ai requisiti documentali, tra i quali il consenso informato, la catena di custodia e la refertazione. Il documento approfondisce le metodiche analitiche, distinguendo tra test di screening e analisi di conferma basate su tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa e riporta i valori soglia di riferimento. Ampio rilievo è dato alla validazione dei metodi, ai controlli di qualità interni ed esterni e alla corretta interpretazione dei risultati, con l'obiettivo di armonizzare le procedure di laboratorio e garantire affidabilità e valore medico-legale delle analisi.

Parole chiave: Matrici biologiche; Sostanze d'abuso; Nuove sostanze psicoattive; Tossicologia analitica

Istituto Superiore di Sanità

Recommended procedures for the determination of substances of abuse and new psychoactive substances in biological matrices.

Emilia Marchei, Maria Concetta Rotolo, Paolo Berretta, Chiara Fraioli, Simona Pichini, Manuela Pellegrini
2026, v, 59 p. Rapporti ISTISAN 26/8 (in Italian)

This document provides guidance on the determination of drugs of abuse and New Psychoactive Substances (NPS) in the main biological matrices, including blood, oral fluid, urine and hair. The clinical, forensic, and epidemiological objectives of toxicological analyses are outlined, highlighting the need for sensitive and specific analytical approaches to address the rapid evolution of the NPS market. For each biological matrix, the procedures for collection, storage, management of non-compliance, and analysis are described, together with documentation requirements, including informed consent, chain of custody, and reporting. The document details analytical methodologies, distinguishing between screening tests and confirmatory analyses based on chromatographic techniques coupled with mass spectrometry and provides reference *cut-off* values. Emphasis is placed on method validation, internal and external quality control, and the correct interpretation and communication of results. The overall aim is to harmonize laboratory procedures, ensuring consistency, reliability, and the medico-legal validity of analytical findings.

Key words: Biological matrices; Drugs of abuse; New psychoactive substances; Analytical toxicology

Per i preziosi suggerimenti forniti, che hanno contribuito in modo significativo al miglioramento e alla chiarezza del testo, si ringraziano: Francesco Paolo Busardò, Dipartimento di Scienze Biomediche e Sanità Pubblica, Università Politecnica delle Marche - Ancona; Enrico Gerace, Centro Avanzato di Diagnostica "A. Bertinaria", Laboratorio di Tossicologia Forense, Orbassano - Torino; Emanuela Locci, Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Sezione di Medicina Legale, Università degli Studi di Cagliari - Cagliari; Luca Morini, Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Unità di Medicina Legale, Università degli Studi di Pavia - Pavia; Valeria Ottaviani, Membro di *The International Association of Forensic Toxicologists* e del Gruppo Tossicologi Forensi Italiani; Jennifer Pascali, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Unità di Medicina Legale, Università di Bologna - Bologna; Alberto Salomone, Dipartimento di Chimica, Università di Torino - Torino.

Per informazioni su questo documento scrivere a: paolo.berretta@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it

Citare questo documento come segue:

Marchei E, Rotolo MC, Berretta P, Fraioli C, Pichini S, Pellegrini M. *Linee di indirizzo per la determinazione delle sostanze d'abuso e nuove sostanze psicoattive nelle matrici biologiche*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2026. (Rapporti ISTISAN 26/8)

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Rocco Bellantone*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Antonio Mistretta*

Redazione: *Sandra Salinetti, Annalisa D'Angelo*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Presentazione	iii
Abbreviazioni	v
Introduzione	1
1. Matrici biologiche	3
1.1 Matrice ematica.....	3
1.1.1 Modalità di raccolta.....	3
1.1.2 Modalità di conservazione.....	5
1.1.3 Non conformità.....	6
1.2 Saliva.....	6
1.2.1 Modalità di raccolta.....	7
1.2.2 Modalità di conservazione.....	7
1.2.3 Non conformità.....	8
1.3 Urina.....	8
1.3.1 Modalità di raccolta.....	9
1.3.2 Modalità di conservazione.....	9
1.3.3 Non conformità.....	10
1.4 Matrice cheratinica.....	11
1.4.1 Modalità di raccolta.....	11
1.4.2 Modalità di conservazione.....	12
1.4.3 Non conformità.....	13
2. Attualità d'uso e consumo pregresso e continuativo di etanolo	14
2.1 Attualità d'uso: etanolemia.....	14
2.2 Consumo recente: etanolo, etilglucuronide ed etilsolfato nelle urine.....	16
2.3 Consumo pregresso e continuativo.....	17
2.3.1 hEtG.....	17
2.3.2 FAEE nei capelli.....	17
2.3.3 PEth nel sangue.....	18
2.3.4 Biomarcatori indiretti del consumo cronico di etanolo.....	18
3. Documentazione	19
3.1 Consenso informato.....	19
3.2 Informativa e consenso privacy ai sensi Regolamento (UE) 679/2016.....	19
3.3 Verbale di prelievo.....	20
3.4 Catena di custodia.....	20
3.5 Refertazione.....	21
4. Metodi analitici: analisi di screening e di conferma	22
4.1 Metodi di screening.....	22
4.2 Metodi di conferma.....	23
5. Validazione dei metodi analitici	26

6. Valutazione interna ed esterna di qualità	28
7. Refertazione e comunicazione dei risultati	29
Conclusioni.....	30
Bibliografia.....	31
Appendice A	
Procedure operative standard consigliate	39
Appendice B	
Esempi di modulistica	53

PRESENTAZIONE

La determinazione delle sostanze d'abuso e delle nuove sostanze psicoattive nelle matrici biologiche rappresenta oggi una delle sfide più complesse e rilevanti nell'ambito della tossicologia clinica e forense.

L'evoluzione dei modelli di consumo, la rapida comparsa di nuove molecole e l'ampliamento dei contesti in cui è necessario accertare l'uso di sostanze (clinici, sanitari, assistenziali, lavorativi e giudiziari) richiedono strumenti analitici rigorosi e procedure condivise, in grado di garantire affidabilità, comparabilità e validità medico-legale dei risultati.

Grazie ai progressi scientifici, è oggi possibile condurre indagini mirate per la ricerca di sostanze illecite su diverse matrici biologiche, che consentono di stabilire se vi sia stato un consumo di sostanze d'abuso, di identificarne la tipologia, sia tradizionale sia emergente, e di ricostruirne la tempistica e la durata dell'assunzione.

Questo volume della serie *Rapporti ISTISAN*, edita dall'Istituto Superiore di Sanità, nasce con l'obiettivo di offrire agli operatori sanitari e ai professionisti del settore un riferimento chiaro, aggiornato e scientificamente fondato per la gestione dell'intero percorso analitico: dalla scelta della matrice biologica alla raccolta dei campioni, dalla loro conservazione alla refertazione, fino all'impiego integrato di metodiche di screening e di conferma secondo standard internazionali.

Il documento integra conoscenze tecniche, aspetti normativi e indicazioni operative, proponendo procedure adattabili ai differenti contesti clinici e forensi. La crescente complessità del mercato delle sostanze psicoattive e la continua introduzione di nuove molecole richiedono una risposta basata su competenze multidisciplinari, metodiche avanzate e protocolli armonizzati.

L'auspicio è che queste linee di indirizzo contribuiscano a supportare il lavoro quotidiano dei professionisti, garantendo qualità, trasparenza e tracciabilità del processo analitico e favorendo un approccio uniforme su tutto il territorio nazionale.

L'accuratezza dei risultati e la loro corretta interpretazione non rappresentano soltanto un requisito tecnico, ma un elemento essenziale per la tutela della salute pubblica, la sicurezza dei cittadini e la corretta amministrazione della giustizia.

ABBREVIAZIONI

11-OH THC	11-Hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
6-MAM	6-Monoacetylmorphine
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
BEG	Benzoylecgonine
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CBD	Cannabidiol
CDT	Carbohydrate-deficient transferrin
CV%	Coefficient of variation (%)
DBS	Dried Blood Spots
DFC	Drug-Facilitated Crime
DSS	Dried Saliva Spots
DUS	Dried Urine Spots
EDDP	2-Ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine
EQA	External Quality Assessment
EtG	Ethyl glucuronide
EtPa	Ethyl palmitate
EtS	Ethyl sulfate
EWDTs	European Workplace Drug Testing Society
GC	Gas chromatography
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
GDPR	General Data Protection Regulation
GTFI	Gruppo Tossicologi Forensi Italiani
HCl	Hydrochloric acid
HRMS	High-resolution mass spectrometry
HS-GC	Headspace gas chromatography
IQC	Internal Quality Control
LC	Liquid chromatography
LC-HRMS	Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MBDB	3,4-Methylenedioxy-N-methyl- α -ethylphenethylamine
MBTFA	N-Methyl-bis(trifluoroacetamide)
MCV	Mean corpuscular volume
MDA	3,4-Methylenedioxyamphetamine
MDEA	3,4-Methylenedioxy-N-ethylamphetamine
MDMA	3,4-Methylenedioxymethamphetamine
MS	Mass spectrometry
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
NaOH	Sodium hydroxide
NSP	New Psychoactive Substances
PEth	Phosphatidylethanol
PLD	Phospholipase D
PTCA	1H-Pyrrole-2,3,5-tricarboxylic acid
PTeCA	1H-Pyrrole-2,3,4,5-tetracarboxylic acid
QC	Quality Control
SoHT	Society of Hair Testing
SOP	Standard Operating Procedure(s)
THC	TetraHydroCannabinol
THC-COOH	11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol

INTRODUZIONE

La crescente diffusione dell'utilizzo di sostanze psicoattive costituisce una sfida rilevante per la salute pubblica e la società moderna. La storia delle sostanze d'abuso mostra una continua evoluzione che riflette cambiamenti culturali, sociali e scientifici, dalle antiche culture che utilizzavano sostanze naturali per scopi rituali e terapeutici fino alla sintesi in laboratorio di principi attivi sempre più potenti e diversificati (1-4).

In particolare, il mercato delle Nuove Sostanze Psicoattive (NSP) ha registrato, negli ultimi decenni, un incremento senza precedenti, caratterizzato dall'introduzione di composti di sintesi dalla struttura chimica variabile, spesso non documentati e difficilmente rilevabili con metodi convenzionali (4-10). Questi scenari impongono alle strutture sanitarie, forensi e istituzionali lo sviluppo di strategie analitiche innovative, capaci di garantire sensibilità, specificità e accuratezza nell'identificazione delle sostanze in diverse matrici biologiche (5, 10, 11).

La continua variabilità delle NSP e dei comportamenti di consumo, associata alla rapidità con cui nuovi composti vengono immessi sul mercato, richiedono una costante formazione degli operatori, la condivisione di dati tra laboratori e l'adozione di protocolli metodologici rigorosi e standardizzati (12-16).

Generalmente, le analisi per le sostanze psicoattive vengono eseguite su matrici biologiche di elezione, come il sangue, l'urina, la saliva e i capelli. Queste matrici non sono equivalenti, ma forniscono informazioni complementari relative all'assunzione e al metabolismo delle sostanze, consentendo di valutare differenti finestre temporali di esposizione, dall'acuta (come sangue e saliva) alla cronica/pregressa (capelli) (17-19). La complessità chimico-fisica delle matrici, unita all'ampia variabilità dovuta ai diversi comportamenti di consumo individuale, richiedono l'adozione di strategie analitiche avanzate. Queste si basano sull'impiego di tecniche di separazione e rilevazioni ad elevata sensibilità e specificità, quali la cromatografia liquida e/o gassosa accoppiata alla spettrometria di massa, e sull'adesione rigorosa a protocolli di validazione che devono essere strettamente conformi agli standard internazionali (17-24).

Il presente documento è volto a delineare un quadro metodologico condiviso e scientificamente rigoroso per l'analisi delle sostanze d'abuso classiche e delle NSP. L'obiettivo è fornire indicazioni operative dettagliate dell'iter analitico: dalla corretta selezione della matrice biologica, alle modalità di campionamento e conservazione, passando per la catena di custodia e preparazione del campione, l'esecuzione dell'analisi e l'interpretazione dei risultati.

Attraverso questa standardizzazione, l'intento è duplice: promuovere l'armonizzazione dei metodi analitici adottati a livello nazionale e migliorare significativamente la comparabilità interlaboratorio.

L'applicazione di queste linee di indirizzo è essenziale per sostenere la qualità scientifica e tecnico-operativa delle attività di monitoraggio e ricerca nel campo della tossicologia analitica.

Il crescente utilizzo di sostanze psicoattive ha determinato un incremento significativo della richiesta di accertamenti analitici nelle diverse matrici biologiche. Le indagini tossicologiche finalizzate alla rilevazione di sostanze psicoattive costituiscono uno strumento essenziale sia in ambito clinico sia in quello forense, consentendo di identificare, quantificare e monitorare l'assunzione di droghe e nuove NSP nelle diverse matrici biologiche. L'intelligenza artificiale, e in particolare il machine learning, una disciplina che permette ai sistemi di apprendere dai dati e identificare pattern senza istruzioni esplicite, sta emergendo come strumento prezioso nell'identificazione e caratterizzazione delle sostanze d'abuso e delle NSP facilitando in questo modo l'aggiornamento continuo delle metodiche analitiche in risposta alla rapida evoluzione del mercato delle droghe (25, 26).

L'analisi tossicologica delle sostanze d'abuso e delle NSP nelle matrici biologiche trova applicazione in vari contesti, con obiettivi differenziati a seconda del campo di indagine che può essere clinico, forense o finalizzato al monitoraggio della salute pubblica. Questa metodologia permette di identificare e quantificare l'assunzione di sostanze in modo preciso e affidabile, contribuendo sia alla gestione terapeutica dei pazienti, sia alle indagini giudiziarie e alle strategie di prevenzione sociale. In Tabella 1 vengono sintetizzati i principali obiettivi di tali analisi in diverse aree di applicazione.

Tabella 1. Obiettivi principali dell'analisi tossicologica delle sostanze d'abuso e delle nuove sostanze psicoattive su vivente

Obiettivi	Descrizione	Azione
Clinici	Diagnosi di intossicazione acuta	Identificare rapidamente la sostanza o le sostanze responsabili di un quadro sintomatologico acuto (overdose, avvelenamento, stato confusionale). Ciò è cruciale per impostare il trattamento di supporto o l'antidototerapia specifica, se disponibile.
	Monitoraggio terapeutico	Valutare la compliance del paziente in programmi di trattamento farmacologico (es. terapie sostitutive per la tossicodipendenza) o in programmi di riabilitazione.
	Valutazione della gravità e prognosi	Correlare la concentrazione della sostanza (o del metabolita attivo) nel sangue con l'entità dell'intossicazione e il rischio di complicanze, aiutando a definire la prognosi.
	Indagini su eventi avversi	Determinare se l'uso di sostanze d'abuso possa aver contribuito a traumi, incidenti, o decessi apparentemente naturali in un ambiente ospedaliero.
Forensi e medico-legali	Accertamento di idoneità alla guida	Determinare l'eventuale assunzione di sostanze che possano aver compromesso le capacità psicofisiche in relazione alla guida (art. 187 Codice della Strada).
	Accertamento di uso/abuso di sostanze	In casi di affidamento di minori o di adozioni internazionali.
	Prove in contesti giudiziari	Rilevare sostanze in campioni biologici prelevati da vittime o sospettati per indagare su reati come violenza sessuale o somministrazione coatta.
Sanità pubblica e monitoraggio	Sorveglianza	Epidemiologica: Raccogliere dati sul consumo di sostanze (in particolare le NPS e i loro schemi di diffusione) per comprendere le tendenze emergenti e supportare la pianificazione di interventi sanitari e legislativi.
	Monitoraggio ambientale	Sebbene non direttamente in matrici biologiche, il monitoraggio delle acque reflue (tossicologia wastewater-based) è spesso correlato ai dati clinici e serve a stimare il consumo su larga scala di una comunità.
Medicina del lavoro e sicurezza	Lavoro e sicurezza	Verificare l'assenza di sostanze d'abuso nei lavoratori che svolgono mansioni a rischio per la sicurezza, secondo le normative vigenti

1. MATRICI BIOLOGICHE

Le matrici biologiche rappresentano strumenti fondamentali per l'analisi e la rilevazione delle sostanze d'abuso e delle NSP. La scelta del campione biologico deve essere strettamente legata alle informazioni che si intendono ottenere e/o al quesito che genera l'indagine. Pertanto, la matrice biologica utilizzata varierà in base all'obiettivo dell'indagine: ad esempio, per valutare lo stato psico-fisico di un individuo in un determinato momento, si ricorrerà a campioni diversi rispetto a quelli impiegati per accertare una eventuale dipendenza da specifiche sostanze.

Una delle principali differenze tra i vari campioni riguarda la finestra temporale durante la quale è possibile rilevare la presenza della sostanza, che viene solitamente indicata in termini di ore per sangue e saliva, giorni per le urine fino a diversi mesi per le matrici cheratiniche (capelli e peli). Nella scelta del campione vanno considerati anche la facilità e l'invasività del prelievo, i costi delle analisi, l'affidabilità e la riproducibilità dei risultati, la presenza di possibili interferenze e le eventuali difficoltà analitiche.

La conoscenza delle caratteristiche specifiche di ciascuna matrice è fondamentale per l'applicazione appropriata delle linee guida, assicurando risultati affidabili e confrontabili nelle analisi tossicologiche.

In Tabella 2 vengono sintetizzate le principali matrici biologiche impiegate nell'analisi tossicologica, classificandole in funzione della loro capacità di rilevare l'attualità d'uso, il consumo recente e il consumo cronico o pregresso delle sostanze d'abuso e delle NSP.

Tabella 2. Classificazione delle principali matrici biologiche utilizzate nelle analisi tossicologiche

Categoria	Matrice biologica	Finalità delle analisi tossicologiche
Attualità d'uso	Matrice ematica / Saliva	Valutazione dell'attualità di consumo e la correlazione con lo stato psicofisico
Consumo recente	Urina	Valutazione di sostanze e metaboliti con finestra di rilevazione in giorni
Consumo cronico o pregresso	Matrice cheratinica (capelli e peli)	Ricostruzione temporale dell'assunzione e la valutazione di consumi cronici

1.1 Matrice ematica

La matrice ematica (sangue e plasma), ha un ruolo fondamentale nell'analisi tossicologica, sia in ambito clinico che forense (27). L'utilizzo di questa matrice consente di rilevare la presenza di sostanze d'abuso e/o NSP in tempi molto ravvicinati rispetto all'assunzione, fornendo indicazioni precise sull'attualità del consumo e sull'eventuale presenza di effetti farmacologici attivi.

1.1.1 Modalità di raccolta

Il prelievo di campioni di sangue (Tabella 3), eseguito esclusivamente da personale qualificato e autorizzato, è una procedura fondamentale nella diagnostica clinica, nella ricerca e nella tossicologia forense. Una tecnica corretta e il rispetto delle linee di indirizzo sono essenziali per garantire la qualità del campione, la sicurezza del paziente e l'affidabilità dei risultati di laboratorio (28-31).

I passaggi chiave includono la fase di preparazione al campionamento (identificazione del paziente, consenso informato), la procedura di campionamento (selezione del sito, utilizzo di sistemi di raccolta chiusi, ordine di prelievo) e la gestione post-campionamento (etichettatura, trasporto, catena di custodia). Si raccomanda per la disinfezione cutanea, l'uso di soluzioni non alcoliche soprattutto se si eseguono prelievi per la determinazione dell'alcolemia, al fine di evitare qualsiasi dubbio legale o contestazione (12, 13) nonostante l'assenza di contaminazione dimostrata (32). La scelta della provetta di raccolta (con codice colore per test specifici) e la corretta miscelazione sono fondamentali per prevenire la coagulazione o la contaminazione.

La quantità di sangue richiesta può variare in base al protocollo analitico e alle esigenze dell'esame, ma in genere si raccolgono almeno 5-10 mL di sangue intero, in doppia provetta nel caso di accertamenti a finalità forense.

Tabella 3. Tipi di prelievo di sangue per analisi di sostanze psicoattive

Tipo di prelievo	Vantaggi	Svantaggi	Raccomandazioni
Venipuntura	Fornisce il volume maggiore, essenziale per eseguire analisi di screening, di conferma e l'aliquota di revisione.	Rischio di contaminazione esterna, ad esempio, per uso improprio di disinfettanti a base alcolica (es. etanolo) prima del prelievo.	Disinfettare solo con prodotti non alcolici (es. clorexidina acquosa).
Prelievo capillare	Non invasivo. Utile in situazioni di emergenza o per pazienti critici (neonati, ustionati).	Raccolta di volume limitato. La concentrazione di alcuni analiti (es. etanolo) può variare rispetto al sangue venoso.	Disinfettare la zona di puntura. Utilizzare solo lancette pungidito e materiali di raccolta (capillari o cartoncini DBS) idonei.

DBS: *Dried Blood Spots*

Nello specifico, il kit di prelievo per la determinazione delle sostanze d'abuso e NSP deve contenere:

- contenitori (provette) per la raccolta del sangue in aliquote per le analisi di screening, di conferma e di revisione (rispettivamente A, B, e C), con volumi noti e costanti (almeno 5 mL) per campione e anticoagulante. Per l'alcolemia, è obbligatorio l'uso di provette dedicate con anticoagulante (potassio ossalato) e conservante/stabilizzante (sodio fluoruro) per prevenire la degradazione/neoformazione dell'etanolo soprattutto se le provette devono essere conservate per un periodo di tempo lungo;
- verbale di prelievo, che documenta i dati del responsabile del prelievo, della persona sottoposta ad accertamento analitico, l'identificazione univoca del campione, l'elenco dei farmaci assunti o somministrati alla persona sottoposta ad accertamento e le firme di entrambi;
- modulo per la catena di custodia, che registra ogni spostamento del campione e il nome/firma di tutte le persone che ne hanno avuto la custodia, specificando luogo, data e ora del prelievo;
- modulo del consenso informato firmato dalla persona sottoposta ad accertamento;
- informativa e consenso privacy ai sensi Regolamento (UE) 679/2016 (*General Data Protection Regulation, GDPR*);
- etichette adesive con codice alfanumerico o a barre, identiche per il verbale e i contenitori, per l'identificazione univoca;
- sigilli antimanomissione.

Il Codice della Strada e la legge sull'omicidio stradale (Legge 41/2016) hanno introdotto la possibilità di effettuare, in caso di rifiuto dell'accertamento da parte del conducente, e dopo aver informato l'ufficiale di polizia giudiziaria, prelievi coattivi di sangue disposti dall'Autorità Giudiziaria anche oralmente.

Nel caso in cui il soggetto interessato sottoposto ad accertamento sia impossibilitato ad esprimere il consenso al prelievo, i campioni biologici vengono comunque raccolti dal personale sanitario demandando poi all'autorità giudiziaria la valutazione della loro legittimità e utilizzabilità (12, 13, 27).

1.1.2 Modalità di conservazione

La corretta conservazione dei campioni di sangue (Tabella 4) deve essere garantita al fine di preservare l'integrità degli analiti e assicurare l'affidabilità dei risultati analitici nelle applicazioni cliniche, di ricerca e forensi. Le condizioni di conservazione, in particolare temperatura, durata e modalità di conservazione, influenzano in modo diretto la stabilità delle sostanze, incidendo sulla qualità e sulla riproducibilità delle determinazioni analitiche.

Tabella 4. Effetti della temperatura sulla stabilità delle sostanze d'abuso e NSP nel sangue

Condizione di conservazione	Effetto sulla stabilità	Note
Congelamento (-20°C o inferiore)	Minimizza la degradazione per lunghi periodi.	Metodo standard per la conservazione a lungo termine e per l'aliquota di revisione legale.
Refrigerazione (4°C)	Rallenta la degradazione, ma è meno efficace del congelamento.	Adatta solo per lo stoccaggio a breve termine (es. trasporto immediato o analisi entro 2-3 giorni).
Temperatura ambiente	Degrada rapidamente (instabilità elevata).	Da evitare per la conservazione; inaccettabile in ambito forense.
<i>Dried Blood Spot</i> (DBS)	Buona stabilità a lungo termine a temperatura ambiente.	Comodo per raccolta e trasporto; consigliabile conservarli al buio e in ambiente secco; utili per conservazione lungo termine.

Studi di stabilità hanno dimostrato che la conservazione dei campioni di sangue a temperatura ambiente comporta una degradazione significativa degli analiti, mentre il mantenimento a -20°C o -80°C ne preserva la stabilità per diversi mesi (33-39).

La presenza di additivi, come il fluoruro di sodio al 2% p/v, è fondamentale per prevenire la proliferazione microbica (37, 39). Per impedire la coagulazione del sangue nelle provette destinate alla raccolta di campioni per analisi tossicologiche, vengono inoltre impiegati anticoagulanti, come l'ossalato di potassio, presente, da solo o in combinazione con il fluoruro di sodio.

La conservazione del campione di sangue è un passaggio critico della catena di custodia e deve essere gestita in ambienti con accesso limitato. Le aliquote B e C dei campioni risultati positivi alle analisi di screening (aliquota A), in un contesto medico-legale, devono essere conservate a -20°C per un periodo minimo di 12 mesi.

È inoltre fondamentale che la documentazione (come la registrazione dei dati della catena di custodia) relativa alla conservazione dei campioni sia mantenuta per un periodo di tempo non

inferiore ai tre anni o secondo quanto stabilito dalla normativa vigente. I documenti e i campioni devono essere custoditi in armadi, frigoriferi o congelatori chiusi a chiave, con monitoraggio costante della temperatura per la conservazione dei campioni.

La tecnologia DBS, utilizzata finora soprattutto in ambito di ricerca, permette di conservare in modo stabile i campioni a temperatura ambiente o in refrigerazione per periodi lunghi (settimane o anni) con minima degradazione degli analiti. L'utilizzo dei DBS risulta particolarmente utile per il trasporto e per la riduzione del rischio biologico (40-42).

1.1.3 Non conformità

Le non conformità (Tabella 5) che rendono un campione di sangue non idoneo o non accettabile per le analisi tossicologico-forensi e medico-legali riguardano principalmente la compromissione dell'integrità e dell'autenticità del campione, il mancato rispetto della catena di custodia e del freddo, lo scarso quantitativo disponibile. I campioni di sangue devono presentarsi integri e privi di alterazioni, in particolare senza segni di emolisi, coagulazione o contaminazione. La loro raccolta, conservazione e manipolazione devono essere eseguite nel pieno rispetto di procedure operative standard (*Standard Operating Procedure, SOP*), con particolare attenzione alla scelta dei contenitori, degli anticoagulanti e delle condizioni di conservazione (Appendice A).

Qualsiasi non conformità in una di queste fasi può compromettere l'affidabilità analitica del campione, determinando risultati alterati, non riproducibili o non validi.

Tabella 5. Principali non conformità che rendono i campioni di sangue inaccettabili ai fini analitici

Non conformità	Impatto sull'analisi
Emolisi	Interferenze analitiche e risultati inaccurati
Volume insufficiente	Analisi incompleta, non valida o non ripetibile
Contenitore o additivo errato	Incompatibilità con il test, campione da rigettare
Coagulazione	Perdita di analiti e quantificazione non valida
Contaminazione	Risultati falsati o interferenze strumentali
Conservazione o manipolazione inadeguata	Degradazione degli analiti, falsi negativi

1.2 Saliva

La saliva rappresenta una matrice biologica di crescente interesse nell'analisi tossicologica per la determinazione delle sostanze d'abuso e delle NSP (17). Il suo prelievo non invasivo, semplice e rapido, la rende particolarmente adatta per le analisi di screening, controlli su strada, ambienti lavorativi o contesti clinico e forensi in cui si voglia accertare l'attualità di consumo di sostanze (43). In molti casi, la concentrazione dei principi attivi nella saliva risulta correlata e talvolta comparabile a quella rilevabile nel sangue, consentendo una valutazione tempestiva sulla presenza di specifici analiti entro poche ore dall'assunzione (44-46). Il risultato dipende tuttavia da diversi fattori, tra cui la dose, il tempo trascorso dall'assunzione e lo stato fisico dell'individuo.

1.2.1 Modalità di raccolta

La raccolta della saliva, che deve essere effettuata da personale qualificato e autorizzato rappresenta una fase critica del processo analitico in quanto la qualità del campione e l'affidabilità dei risultati analitici dipendono in misura determinante dal metodo di prelievo e dal dispositivo utilizzato.

Per tale motivo, i campioni devono essere ottenuti esclusivamente tramite dispositivi certificati, come tamponi o collettori con indicatore di volume, conformi alle normative vigenti e validati per applicazioni tossicologiche (47, 48).

La scelta del metodo (Tabella 6) e del dispositivo per la raccolta del fluido orale è fondamentale per l'affidabilità dei test antidroga.

Tabella 6. Tipi di prelievo della saliva per analisi di sostanze psicoattive

Metodo di raccolta	Vantaggi	Svantaggi	Raccomandazioni
Raccolta diretta (stimolata/non stimolata)	Consente valutazione fisiologica del fluido orale.	Rischio di contaminazione; difficoltà di standardizzazione del volume.	Evitare stimolanti salivari e disinfettanti prima del campionamento.
Tamponi assorbenti	Non invasivo, facile da usare, raccolta rapida.	Volume limitato; possibile adsorbimento della sostanza sul materiale del tampone.	Utilizzare solo dispositivi certificati; evitare contaminazioni da bevande o fumo.
Dispositivi con stabilizzante	Migliora la stabilità degli analiti; facilita il trasporto.	Possibile diluizione del campione; interferenze del tampone con alcuni test immunochimici.	Registrare volume esatto di saliva e tipo di buffer.

Un campione raccolto con finalità medico-legali deve essere suddiviso in due aliquote denominate A (per le analisi di screening e, in caso di positività, per le analisi di conferma) e B (per eventuali analisi di revisione richieste dal soggetto) (16, 49).

1.2.2 Modalità di conservazione

La corretta conservazione dei campioni di saliva è essenziale per preservare l'integrità degli analiti e garantire risultati affidabili. Le condizioni di temperatura e di tempo tra raccolta e analisi influenzano significativamente la stabilità di molte sostanze psicoattive, in particolare cocaina, catinoni sintetici e cannabinoidi.

La presenza di soluzioni stabilizzanti nei kit commerciali può prolungare la stabilità degli analiti (Tabella 7), ma le condizioni di conservazione devono sempre essere conformi alle indicazioni del produttore (50-53).

Tabella 7. Effetti della temperatura sulla stabilità delle sostanze psicoattive nella saliva

Condizione di conservazione	Effetto sulla stabilità	Note
Congelamento (-20°C o inferiore)	Massima stabilità; degradazione minima per settimane/mesi.	Metodo preferenziale per conservazione prolungata e revisione legale.
Refrigerazione (4°C)	Moderata stabilità per analisi entro pochi giorni.	Adatta solo per trasporto o analisi rapide.
Temperatura ambiente	Degradazione rapida; rischio di falsi negativi.	Inaccettabile per finalità forensi.
<i>Dried Saliva Spots</i> (DSS)	Buona stabilità a lungo termine a temperatura ambiente per molti analiti, riducendo la necessità di refrigerazione.	Comodo per raccolta e trasporto; utili per conservazione lungo termine.

1.2.3 Non conformità

I campioni di saliva destinati alla determinazione delle sostanze psicoattive devono essere raccolti, conservati e manipolati secondo protocolli standardizzati, garantendo la rappresentatività e la stabilità del campione. Le principali non conformità, riportate in Tabella 8, che possono compromettere l'affidabilità analitica includono contaminazioni alimentari o ambientali, volume insufficiente, uso di dispositivi non validati o conservazione impropria.

Tabella 8. Principali non conformità che rendono i campioni di saliva inaccettabili ai fini analitici

Non conformità	Impatto sull'analisi
Volume insufficiente di campione	Analisi incompleta o non valida.
Dispositivo non idoneo o privo di validazione	Incompatibilità con il test, rischio di inidoneità.
Mancata aggiunta del tampone stabilizzante	Degradazione degli analiti, falsi negativi.
Conservazione inadeguata (temperatura o tempi non conformi)	Alterazione chimica o microbiologica del campione.
Manipolazione impropria o contaminazione incrociata	Risultati distorti, perdita di tracciabilità.

1.3 Urina

L'urina è la matrice biologica più utilizzata per il rilevamento di sostanze psicoattive in ambito forense, clinico e lavorativo. La sua ampia finestra di rilevamento, la facilità di raccolta e l'elevata concentrazione di metaboliti la rendono particolarmente adatta al monitoraggio del consumo di tali sostanze (54, 55).

A differenza di sangue e saliva, l'urina riflette principalmente l'eliminazione delle sostanze e dei loro metaboliti, fornendo informazioni su un'assunzione avvenuta nelle ore o nei giorni precedenti al prelievo, senza tuttavia consentire una determinazione accurata del tempo esatto di consumo. Nonostante i vantaggi, rimangono criticità legate alla possibile adulterazione del campione, alle variazioni di pH e densità e alla stabilità degli analiti.

Tali fattori richiedono un'interpretazione prudente dei risultati e una consapevolezza dei limiti intrinseci della matrice urinaria, nonché della variabilità metabolica individuale (56).

La complessità aumenta ulteriormente nel caso delle NSP, spesso caratterizzate da rapida evoluzione strutturale, metaboliti poco noti e scarsa disponibilità di standard analitici. Queste peculiarità rendono l'urina una matrice utile per il rilevamento delle sostanze psicoattive, ma al contempo impongono l'impiego di metodiche sensibili e costantemente aggiornate (24, 57).

1.3.1 Modalità di raccolta

La raccolta dell'urina (Tabella 9) è una procedura consolidata, ma richiede attenzione per garantire l'integrità del campione e prevenire eventuali manipolazioni (58). I campioni devono essere raccolti in contenitori sterili, sigillati e conformi alle normative vigenti. È raccomandata la supervisione diretta del prelievo o l'uso di sistemi di controllo per ridurre il rischio di adulterazione o diluizione del campione, sempre mantenendo il rispetto della privacy, affiancando eventualmente ulteriori verifiche come la valutazione della creatinina urinaria, dell'osmolarità, della densità e l'immediata misurazione della temperatura, al fine di garantire l'affidabilità del risultato analitico (56, 59, 60).

La standardizzazione dei protocolli di raccolta è essenziale per assicurare risultati affidabili e riproducibili. Ad esempio, un campione di urine raccolto a scopo medico-legale deve essere suddiviso in tre aliquote distinte: l'aliquota A, destinata agli esami di screening preliminare; l'aliquota B, riservata agli accertamenti di conferma; e l'aliquota C, conservata per eventuali analisi di revisione o controllo.

Tabella 9. Tipi di prelievo dell'urina per analisi di sostanze psicoattive

Metodo di raccolta	Vantaggi	Svantaggi	Raccomandazioni
Raccolta individuale non controllata	Non invasiva, semplice, consente analisi mirate.	Rischio di adulterazione, finestra di rilevamento breve, problemi di privacy.	Utilizzare contenitori certificati; verificare temperatura e creatinina per autenticità.
Raccolta individuale controllata	Non invasiva, semplice; Riduce il rischio di sostituzione o adulterazione; garantisce tracciabilità.	Intrusiva, problematiche etiche e logistiche.	Applicare solo in contesti ad alto rischio e nelle indagini forensi; rispettare protocolli di privacy e consenso.
Campionamento aggregato (Pooled Sampling)	Maggiore concentrazione di analiti (meno diluizione), anonimo, consente monitoraggio di gruppi.	Non identifica i singoli; possibile bias di genere; dati qualitativi.	Usare per sorveglianza di popolazione (es. festival, eventi pubblici); definire periodo di raccolta.

1.3.2 Modalità di conservazione

La corretta conservazione dei campioni di urina è fondamentale per garantire l'accuratezza delle analisi, poiché molte sostanze d'abuso e i loro metaboliti possono degradarsi rapidamente in condizioni non ottimali (Tabella 10). Fattori quali temperatura, pH e tempi di conservazione influenzano significativamente la stabilità degli analiti, rendendo necessario mantenere condizioni controllate. In particolare, il controllo del pH o l'impiego di conservanti può contribuire a ridurre la perdita di composti particolarmente labili (24).

Tra le modalità di conservazione, il congelamento rappresenta la procedura più efficace per preservare l'integrità della maggior parte delle sostanze e dei loro metaboliti, mentre la refrigerazione è adatta solo per brevi periodi (17, 61-63). Per facilitare il trasporto e la conservazione dei campioni, si stanno inoltre diffondendo, soprattutto in ambito di ricerca, formati alternativi, come i *Dried Urine Spots* (DUS) (64) sebbene ciò richieda ulteriori valutazioni riguardo alla loro stabilità a lungo termine.

Queste informazioni evidenziano l'importanza di implementare protocolli di conservazione rigorosi e adeguati, fondamentali per assicurare l'affidabilità dei risultati analitici e la loro sostenibilità forense.

Tabella 10. Effetti delle condizioni di conservazione sulla stabilità delle sostanze psicoattive nell'urina

Condizione di conservazione	Effetto sulla stabilità	Note
Congelamento (-20°C o inferiore)	Massima stabilità; degradazione minima fino a 12 mesi.	Raccomandato per conservazione prolungata e revisione legale.
Refrigerazione (4°C)	Stabilità moderata per analisi entro 14 giorni.	Controllare pH; aggiungere conservanti per composti labili.
Temperatura ambiente	Degradazione rapida; rischio di falsi negativi.	Non raccomandata per finalità forensi.
<i>Dried Urine Spots</i> (DUS)	Buona stabilità a breve termine (24 h) a temperatura ambiente.	Utile per campionamento, la conservazione e il trasporto a breve termine.

1.3.3 Non conformità

Diversi fattori possono compromettere l'integrità del campione di urina o la validità dei risultati (Tabella 11). Tra le principali criticità vi sono raccolta impropria, contaminazione, volume insufficiente, conservazione inadeguata, il mancato rispetto della catena di custodia e variabili fisiologiche che influenzano la concentrazione delle sostanze e loro metaboliti (12, 13, 15, 57). È quindi fondamentale rispettare rigorosamente i protocolli di raccolta, manipolazione e analisi al fine di garantire determinazioni affidabili. La corretta gestione del campione riduce il rischio di risultati inaffidabili o di campioni dichiarati non accettabili, assicurando validità e riproducibilità delle analisi tossicologiche eseguite.

Tabella 11. Principali non conformità che rendono i campioni di urina inaccettabili ai fini analitici

Non conformità	Impatto sull'analisi
Contaminazione (es. acqua, detersivi, sostanze estranee)	Diluzione o mascheramento delle sostanze; falsi negativi.
Volume insufficiente	Analisi incompleta o impossibilità di ripetere il test.
Contenitore non idoneo o privo di validazione	Rischio di false identificazioni del campione e contestazioni legali.
Conservazione inadeguata	Degradazione degli analiti; risultati non affidabili.
Manipolazione impropria o contaminazione incrociata	Risultati non affidabili, perdita di tracciabilità.

1.4 Matrice cheratinica

Le matrici cheratiniche, in particolare i capelli, sono ampiamente utilizzate in tossicologia clinica e forense per l'identificazione di farmaci, composti tossici, narcotici, sostanze psicotrope e diversi biomarcatori, tra cui quelli indicativi del consumo di etanolo. L'analisi dei capelli risulta particolarmente utile in quanto consente di estendere significativamente la finestra temporale di rilevabilità di una sostanza nei mesi precedenti, rispetto alle altre matrici biologiche (65-67).

Inoltre, l'analisi segmentale del campione consente, seppur con un margine di incertezza, di ricostruire la storia e la tipologia del consumo sulla base della velocità media di crescita dei capelli, stimata in circa 1 cm al mese. La porzione prossimale del capello, vicina alla cute, riflette un'esposizione recente, mentre spostandosi verso la parte distale è possibile individuare assunzioni risalenti a periodi più lontani (66, 68).

Questo rende i capelli particolarmente utili per documentare un uso cronico o pregresso di sostanze, confermare le anamnesi auto-riferite e supportare indagini di natura clinica o forense. (24, 68-71). L'analisi delle matrici pilifere provenienti da altre aree del corpo, come ascelle, torace o pube, può essere utile per documentare un uso o un'esposizione pregressa a sostanze, sebbene non consenta di effettuare valutazioni cronologiche segmentate (67, 72, 73).

Nel caso dei peli pubici l'interpretazione dei risultati richiede particolare attenzione, poiché la presenza di sostanze d'abuso o dei relativi metaboliti potrebbe essere influenzata da contaminazione dovuta alle urine del soggetto stesso. In questo contesto, la valutazione quantitativa risulta più complessa e deve essere accompagnata da un'analisi approfondita delle condizioni di prelievo e delle possibili fonti di contaminazione (74).

1.4.1 Modalità di raccolta

La raccolta di campioni di capelli per l'analisi di sostanze psicoattive, come per tutte le matrici di interesse clinico forense, è una fase critica poiché influisce direttamente sull'affidabilità e l'interpretabilità dei risultati. La raccolta, la manipolazione e la documentazione del campione rappresentano fattori fondamentali per prevenire contaminazioni e garantire un'analisi accurata delle sostanze.

I campioni di capelli vengono generalmente prelevati dalla regione del vertice posteriore, preferita per l'uniformità della crescita e la ridotta variabilità intra-individuale, permettendo una più accurata correlazione tra lunghezza del campione e periodi di esposizione. Almeno 200 mg di capelli vengono prelevati il più vicino possibile al cuoio capelluto, con l'estremità prossimale opportunamente contrassegnata per consentire ricostruzioni cronologiche.

La quantità di campione prelevata deve essere sufficiente ad effettuare sia le analisi di screening che le analisi di conferma (aliquota A) nonché conservare una parte del campione per una eventuale analisi di verifica (controanalisi, aliquota B). In assenza di capelli possono essere impiegati peli provenienti da altre regioni corporee, previo accurato rispetto della privacy del soggetto sottoposto a controllo (14, 75, 76). In Figura 1 si riporta un esempio di prelievo di matrice cheratinica.

Quando l'analisi dei capelli viene richiesta per accertare un crimine facilitato dal consumo inconsapevole di droghe o farmaci da parte della vittima (*Drug-Facilitated Crime*, DFC) (77-81), la raccolta del campione deve seguire le raccomandazioni generali, integrandole con i punti chiave aggiuntivi riportati nella Tabella 12.



Arrotolare e fissare con uno spago una ciocca di capelli dello spessore di una matita (oppure più ciocche sottili dal vertice posteriore della testa).



Tagliare i capelli immediatamente sopra la cute, il più vicino possibile al cuoio capelluto, e annotare la lunghezza della ciocca.



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



Ripiegare ciascun foglio di alluminio come mostrato in figura.



Inserire il foglio di alluminio nell'apposita busta-contenitore. La busta-contenitore deve essere sigillata.



Accompagnare la busta con: verbale del prelievo, modulo di consenso informato e modulo di catena di custodia.

Figura 1. Modalità di prelievo della matrice cheratinica (75)

Tabella 12. Raccomandazioni per la raccolta del campione di capelli nel caso di DFC

Aspetto	Dettagli e raccomandazioni
Raccolta	Il campione di capelli deve essere raccolto tra i 30 e i 45 giorni dopo il presunto crimine. Questo periodo è adeguato a garantire che il fusto del capello, incorporando il farmaco, emerga dall'area del bulbo nel follicolo ad un'altezza sufficiente per la raccolta al di sopra della superficie cutanea.
Numero di campioni	È raccomandata la raccolta di un campione quantitativamente adeguato da suddividere per eventuali analisi di conferma in caso di positività.
Analisi	L'analisi segmentale è consigliata a causa della possibile differenziazione della concentrazione della sostanza lungo il fusto del capello.
Cura dei capelli	La vittima deve evitare trattamenti cosmetici o tagli di capelli dal momento dell'evento criminoso fino al momento del prelievo.

1.4.2 Modalità di conservazione

Per garantire l'affidabilità delle analisi (Tabella 13), è fondamentale adottare, come per tutte le matrici utilizzate in ambito clinico-forense, procedure di conservazione adeguate. I campioni di capelli devono essere conservati in un ambiente asciutto e buio a temperatura ambiente. Deve

essere evitata l'esposizione diretta alla luce solare. La conservazione a basse temperature e ambienti umidi è sconsigliata, poiché può causare rigonfiamento dei capelli, crescita di muffe e perdita di sostanze. La conservazione in sacchetti di plastica potrebbe influenzare i risultati analitici in quanto alcuni materiali plastici contengono additivi che possono essere assorbiti dal campione; inoltre, la plastica potrebbe estrarre sostanze dalle caratteristiche lipofile. Si consiglia pertanto, ove possibile, di preferire altre tipologie di materiale. Una semplice procedura di conservazione consiste nell'avvolgere il campione di capelli in un foglio di alluminio e sigillarlo in una busta di carta.

Tabella 13. Effetti delle condizioni di conservazione sulla stabilità delle sostanze psicoattive nella matrice cheratinica

Condizione di conservazione	Effetto sulla stabilità	Note
Congelamento (-20°C o inferiore)	Può causare rigonfiamento dei capelli, crescita di muffe e perdita della sostanza.	Conservazione sconsigliata.
Refrigerazione (4°C)	Col tempo può causare rigonfiamento dei capelli, crescita di muffe e perdita della sostanza.	Non raccomandata.
Temperatura ambiente	Mantiene buona stabilità se conservato in modo adeguato.	Evitare luce solare diretta; avvolgere in foglio di alluminio e riporre in busta di carta.

1.4.3 Non conformità

Le principali non conformità (Tabella 14) che rendono i campioni di matrice cheratinica (capelli) non accettabili per l'analisi di sostanze psicoattive riguardano principalmente la contaminazione esterna, i trattamenti cosmetici o chimici e la degradazione della matrice. Trattamenti per capelli fortemente ossidativi come decolorazione e talune tinture, l'uso di sostanze come bicarbonato di sodio o acido salicilico possono ridurre significativamente le concentrazioni di sostanze psicotrope nei capelli senza danneggiare visibilmente la matrice cheratinica, complicando l'interpretazione e potenzialmente portando a falsi negativi (60).

Inoltre, una quantità di campione insufficiente, una raccolta impropria o la degradazione dovuta all'esposizione ambientale possono compromettere l'integrità del campione stesso. Si consiglia di includere nella refertazione informazioni in merito ad elementi utili a identificare possibili trattamenti adulteranti (es. colorazione della soluzione estraente, positività all'acido 1H-pirrolo-2,3,5-tricarbossilico (PTCA) e l'acido 1H-pirrolo-2,3,4,5-tetracarbossilico (PTeCA).

Tabella 14. Principali non conformità che rendono i campioni di matrice cheratinica inaccettabili ai fini analitici

Non conformità	Impatto sull'analisi
Prelievo improprio (quantità insufficiente, area non adeguata, contaminazione)	Impossibilità di effettuare analisi, risultati inaccurati o non rappresentativi.
Conservazione non idonea (luce, umidità, plastica, basse temperature)	Degradazione o perdita della sostanza, alterazione del profilo analitico, risultati non attendibili.

2. ATTUALITÀ D'USO E CONSUMO PREGRESSO E CONTINUATIVO DI ETANOLO

Il consumo di etanolo rappresenta un problema di sanità pubblica, essendo associato a un'ampia gamma di effetti avversi a livello epatico, cardiovascolare, neurologico e psicosociale (82). La valutazione dell'assunzione di etanolo in ambito clinico e tossicologico-forense richiede l'impiego combinato di biomarcatori diretti e indiretti, ciascuno caratterizzato da specifiche finestre temporali di rilevazione e differenti significati interpretativi (Tabella 15). L'obiettivo è distinguere tra:

- attualità d'uso (assunzione nelle ultime ore);
- consumo recente (ultimi giorni);
- consumo pregresso e/o continuativo (settimane/mesi).

Tabella 15. Valutazione del consumo di etanolo

Obiettivo clinico/forense	Biomarcatori principali	Finestre temporali
Attualità d'uso	Etanolo sangue/aria espirata/urine + questionari/interviste	Ore
Uso recente	EtG/EtS in urina + questionari/interviste	1-3 giorni (fino a ~80 h)
Uso pregresso	PEth in sangue + questionari/interviste	2-4 settimane
Consumo cronico	hEtG, FAEE, storia clinica + questionari/interviste	Mesi/anni

Abbreviazioni: EtG: Ethylglucuronide; EtS: EthylSulfate; FAEE: Fatty Acid Ethyl Esters; hEtG: hair ethylglucuronide; PEth: Phosphatidylethanol

Sebbene il sangue rimanga la matrice più utilizzata per le analisi di laboratorio nella pratica clinica e nelle cure primarie (83), la scelta delle matrici e dei relativi biomarcatori (84-86) è, comunque, definita da esigenze normative (es. Codice della Strada, mansioni a rischio), cliniche (monitoraggio terapeutico, follow-up) e forensi (accertamento di idoneità, procedimenti amministrativi e penali). Infine, per una corretta valutazione clinico forense dell'uso di etanolo è utile integrare questionari/interviste, informazioni anamnestiche e biomarcatori.

2.1 Attualità d'uso: etanolemia

Il sangue intero costituisce la matrice di riferimento per la determinazione dell'etanolemia ai fini tossicologico-forensi, in quanto riflette in modo diretto e attendibile lo stato psicofisico del soggetto al momento del prelievo. La determinazione dell'etanolo deve essere eseguita nel rispetto di procedure rigorose, finalizzate a garantire la validità analitica e medico-legale del risultato (12, 13).

La misurazione dell'etanolo a scopi forensi deve essere effettuata esclusivamente su sangue intero; l'analisi di derivati ematici quali plasma o siero non è ammessa in contesti regolamentati, in quanto comporta una sovrastima sistematica dei valori, mediamente compresa tra il 12 e il 18%. Tali determinazioni possono essere utilizzate esclusivamente a fini diagnostico-clinici e non devono essere impiegate per valutazioni normative (12, 13).

Il prelievo ematico deve essere preceduto dalla disinfezione cutanea mediante prodotti privi di alcol etilico e deve essere eseguito mediante singola venipuntura, raccogliendo contestualmente almeno due aliquote di sangue (campioni A e B) in provette sottovuoto separate. Le provette devono contenere un conservante e un anticoagulante adeguati e devono essere conformi ai requisiti della catena di custodia. In particolare:

- le provette devono contenere fluoruro di sodio come conservante e ossalato di potassio come anticoagulante;
- le provette devono essere dotate di sistemi antieffrazione e di adeguata etichettatura identificativa;
- i campioni devono essere invertiti più volte dopo il prelievo per prevenire la separazione del siero;
- i campioni devono essere conservati, insieme al contro-campione, secondo le modalità di tempo e temperatura previste dai protocolli di riferimento.

Durante le fasi preanalitiche devono essere prevenuti i principali fattori di interferenza, in particolare:

- contaminazione del campione dovuta all'impiego di disinfettanti cutanei contenenti alcol etilico;
- neoformazione di etanolo *in vitro*;
- evaporazione dell'etanolo durante o dopo il prelievo.

La determinazione strumentale dell'etanolemia deve essere effettuata mediante metodi analitici validati, specifici e riproducibili. Il metodo di riferimento in ambito tossicologico-forense a tecnica d'elezione è rappresentato dalla gascromatografia con campionamento dello spazio di testa (*HeadSpace – Gas Chromatography*, HS-GC), accoppiata a rivelazione FID (*Flame Ionization Detector*) o MS (*Mass Spectrometry*) (12, 13). Il metodo analitico deve essere validato rispettando i criteri di accettazione riportati nella Tabella 16.

Tabella 16. Parametri di accettazione per la validazione del metodo di determinazione dell'etanolemia

Parametro	Requisito	Criterio di accettazione
Intervallo di calibrazione	Campo di validazione	0,05-3,0 g/L di etanolo
Precisione (CV%)	Ripetibilità	≤ 10%
Accuratezza (Bias, E%)	Errore sistematico	≤ 10%
Limite di rilevabilità (LOD)	Sensibilità del metodo	< 0,05 g/L

LOD: *Limit of detection*

Ai fini normativi, i valori di etanolemia¹ devono essere interpretati in riferimento ai limiti stabiliti dalla legislazione vigente (es. il Codice della Strada) e riportati nel referto analitico in modo chiaro, completo e tracciabile. Ai fini interpretativi, l'incertezza di misura deve essere sempre sottratta al valore determinato quando questo viene confrontato con i diversi valori soglia previsti dall'art. 186 del Codice della Strada (87).

¹ Allegato 2 alla circolare prot. n. 11280 del 11/04/2025. Si considera come positivo il risultato degli accertamenti effettuati sui campioni biologici quando per l'alcolemia, si rilevano concentrazioni di alcol etilico uguali o superiori a quanto previsto dall'articolo 186, comma 2, lett. a), lett. b) e lett. c), Codice della Strada per le diverse fattispecie; superiori o uguali a 0,1 g/L relativamente all'articolo 186 bis del Codice della Strada.

La determinazione dell'etanolemia documenta esclusivamente l'assunzione recente di alcol e non consente una valutazione attendibile del consumo pregresso o delle abitudini di assunzione nel medio-lungo termine. Per una valutazione complessiva del comportamento alcolico del soggetto, deve essere considerata l'integrazione con altre matrici biologiche e biomarcatori specifici.

2.2 Consumo recente: etanolo, etilglucuronide ed etilsolfato nelle urine

Le urine rappresentano una matrice biologica di elezione per la valutazione del consumo recente di etanolo, consentendo l'identificazione dell'assunzione avvenuta nelle ore o nei giorni precedenti il prelievo, anche in assenza di etanolo rilevabile nel sangue. La determinazione dell'etanolo urinario è influenzata da variabili quali lo stato di idratazione, il tempo di svuotamento vescicale e la possibile contaminazione del campione. Inoltre, la presenza di etanolo nelle urine non consente una stima diretta della concentrazione ematica al momento dell'assunzione. In genere, l'etanolo urinario scende sotto il limite di rilevabilità entro circa 6,5 ore dall'assunzione (84, 88).

I metaboliti diretti dell'etanolo, etilglucuronide (EtG) ed etilsolfato (EtS), sono biomarcatori altamente specifici dell'assunzione di etanolo e risultano rilevabili nelle urine per un periodo più prolungato rispetto all'etanolo immodificato, generalmente fino a 24-72 ore dall'assunzione, in funzione della quantità ingerita e delle caratteristiche individuali del soggetto (88).

L'impiego combinato di EtG ed EtS è raccomandato in ambito clinico e tossicologico-forense in quanto:

- riduce il rischio di risultati falsamente negativi, poiché l'EtG può andare incontro a degradazione batterica nel campione urinario, ad esempio in presenza di infezioni delle vie urinarie, con possibile determinazione di falsi negativi, mentre l'EtS presenta una maggiore stabilità e non è soggetto a tali fenomeni, consentendo la conferma dell'assunzione di etanolo anche in assenza di EtG;
- riduce il rischio di risultati falsamente positivi, poiché consente di discriminare l'assunzione effettiva di etanolo dalla possibile neoformazione batterica di etanolo nel campione urinario, permettendo di distinguere il consumo reale dalla sintesi batterica *in vitro*;
- permette di identificare esposizioni involontarie all'etanolo o condizioni caratterizzate da effetti residui dell'assunzione di etanolo, anche in assenza di etanolemia positiva potenzialmente in grado di compromettere la sicurezza, in particolare nei contesti correlati alla guida e alle attività a rischio.

Tuttavia, l'interpretazione dei risultati deve essere prudente a causa dell'elevata variabilità interindividuale e dell'influenza di fattori esterni. La concentrazione urinaria può essere drasticamente ridotta da una diuresi forzata (ingestione di elevate quantità d'acqua), che abbassa i livelli di EtG e creatinina. Inoltre, positività a bassi livelli possono derivare dal consumo di cibi o bevande (88).

2.3 Consumo pregresso e continuativo

La valutazione del consumo pregresso e continuativo di etanolo richiede l'impiego di biomarcatori caratterizzati da una finestra temporale estesa, in grado di documentare abitudini di assunzione protratte nel tempo. In questo contesto, l'analisi dell'EtG nei capelli (*hair* EtG, hEtG) rappresenta, insieme ad altri biomarcatori diretti e indiretti, come ad esempio gli esteri etilici degli acidi grassi (*Fatty Acid Ethyl Esters*, FAEE) nei capelli, il fosfatidiletanolo (*PhosphatidylEthanol*, PEth) nel sangue e la transferrina carboidrato carente (*Carbohydrate-Deficient Transferrin*, CDT) nel siero, l'approccio di riferimento in ambito clinico e tossicologico-forense (86).

2.3.1 hEtG

I capelli costituiscono una matrice biologica privilegiata per la valutazione retrospettiva del consumo di etanolo, in quanto consentono di ricostruire l'assunzione avvenuta nel corso di settimane o mesi, in funzione della lunghezza del segmento analizzato. L'EtG, metabolita diretto e specifico dell'etanolo, viene incorporato nel fusto del capello durante la fase di crescita, risultando relativamente stabile nel tempo (89, 90).

L'analisi è generalmente condotta su un segmento di 0-3 cm, corrispondente a un periodo di osservazione di circa tre mesi. L'interpretazione dei risultati si basa su *cut-off* condivisi a livello internazionale (91), che consentono di distinguere:

- astensione o consumo occasionale (hEtG \leq 5,0 pg/mg);
- consumo moderato ($5,0 <$ hEtG $<$ 30,0 pg/mg);
- consumo cronico eccessivo (hEtG \geq 30,0 pg/mg).

È fondamentale considerare fattori potenzialmente interferenti, quali trattamenti cosmetici aggressivi (es. decolorazioni), caratteristiche individuali del capello e correttezza delle procedure di campionamento (84).

2.3.2 FAEE nei capelli

I FAEE sono biomarcatori diretti dell'etanolo prodotti per via non ossidativa attraverso la reazione dell'etanolo con acidi grassi endogeni o trigliceridi. Tra i principali composti monitorati, l'etil palmitato (*Ethyl Palmitate*, EtPa) è considerato il riferimento analitico più rilevante (91). In Tabella 17 i valori di *cut-off* riportati condivisi a livello internazionale.

Tabella 17. Cut-off dell'etil palmitato (EtPa) (in pg/mg) nei segmenti di capelli: 0-3 cm e 0-6 cm

Segmento di capelli	Astinenza	Consumo ripetuto	Consumo cronico eccessivo
0-3 cm	\leq 120	$>$ 120	\geq 350
0-6 cm	\leq 150	$>$ 150	\geq 450

La determinazione dei FAEE nei capelli è indicata soprattutto per l'identificazione di un consumo cronico ed eccessivo di etanolo e quando possibile, essere supportata da EtG e da altri dati clinici/forensi (86).

2.3.3 PEth nel sangue

Il PEth è un biomarcatore diretto del consumo di alcol che si forma esclusivamente in presenza di etanolo nelle membrane dei globuli rossi, attraverso una reazione mediata dalla fosfolipasi D (86). I diversi omologhi del PEth differiscono per la composizione degli acidi grassi; tra questi, il PEth 16:0/18:1 è il più abbondante ed è quello di riferimento per l'interpretazione clinico-forense.

Il PEth si forma rapidamente dopo l'assunzione di etanolo, raggiungendo il picco plasmatico entro circa 8 ore, e si degrada lentamente, rendendolo un indicatore affidabile del consumo etanologico pregresso. È rilevabile nel sangue per 3-12 giorni dopo una singola assunzione e presenta una finestra di rilevamento di 2-4 settimane, con persistenza media fino a 28 giorni in caso di consumo moderato o ripetuto (85, 92-94). La sua formazione esclusiva in presenza di etanolo ne conferma l'elevata specificità come biomarcatore diretto, in assenza di falsi positivi noti (86).

L'interpretazione dei risultati avviene seguendo specifiche soglie:

- Astinenza o consumo basso: concentrazioni di PEth 16:0/18:1 inferiori a 20 ng/mL.
- Consumo moderato o sociale: valori compresi tra 20 e 200 ng/mL.
- Consumo cronico eccessivo: valori superiori a 200 ng/mL, che suggeriscono un'esposizione cronica definita come un consumo medio giornaliero uguale o superiore a 60 g. di etanolo per gli uomini e 40 g. per le donne.

Nel contesto della valutazione clinico-forense del consumo etanologico, il PEth nel sangue rappresenta un complemento ideale all'analisi dell'EtG nei capelli e ai biomarcatori indiretti, contribuendo a una valutazione integrata e più robusta del consumo pregresso e continuativo (86).

2.3.4 Biomarcatori indiretti del consumo cronico di etanolo

I biomarcatori indiretti riflettono le conseguenze biologiche dell'assunzione prolungata di etanolo piuttosto che la presenza diretta della sostanza o dei suoi metaboliti. Tra i più utilizzati si annoverano:

- CDT;
- γ -glutamyltransferasi (γ -GT);
- aspartato aminotransferasi (AST) e alanina aminotransferasi (ALT);
- volume corpuscolare medio (*Mean Corpuscular Volume*, MCV).

La CDT è il biomarcatore più consolidato per l'identificazione di un consumo cronico di etanolo. Viene utilizzata in ambito clinico e forense, ad esempio per la valutazione dell'idoneità alla guida o a mansioni a rischio, e per procedure di affidamento o contenziosi civili (86). La CDT è standardizzata a livello internazionale (IFCC), con *cut-off* clinici definiti: 1,7 % (CDT% rispetto alla transferrina totale) in ambito clinico e 2,0 % (CDT% rispetto alla transferrina totale) in contesti forensi (95). Può essere determinata tramite LC/HPLC o elettroforesi capillare (CE), tecniche che consentono di distinguere le diverse glicoforme della transferrina e migliorano la specificità rispetto ai metodi immunochimici (96, 97).

I biomarcatori indiretti presentano sensibilità e specificità diagnostiche inferiori ai biomarcatori diretti, in quanto possono risultare alterati anche in presenza di patologie epatiche, condizioni metaboliche o assunzione di farmaci. Pertanto, il loro impiego è raccomandato esclusivamente in un'ottica integrativa, a supporto dei biomarcatori diretti di etanolo, in particolare nei casi in cui la matrice cheratinica non sia disponibile o risulti non idonea.

3. DOCUMENTAZIONE

La documentazione necessaria per una corretta determinazione delle sostanze d'abuso e delle NSP nelle matrici biologiche comprende moduli fondamentali quali il consenso informato per l'esecuzione di accertamenti analitici, informativa e consenso privacy ai sensi Regolamento (UE) 679/2016, il verbale di prelievo per l'identificazione e prelievo dei campioni, la catena di custodia e il modulo di refertazione. A questa si affiancano informazioni dettagliate sui metodi analitici validati, sulle procedure di preparazione del campione e sulle condizioni di conservazione. L'intero insieme documentale, supportato da protocolli analitici aggiornati e conformi agli standard, garantisce la qualità, la tracciabilità e l'affidabilità e la valenza medico-legale del processo analitico (12-16, 27, 49, 75, 98).

3.1 Consenso informato

Il modulo per l'espressione del consenso informato costituisce un documento fondamentale e indispensabile, in quanto consente di formalizzare la volontà consapevole e affermativa del paziente di accettare in piena coscienza le procedure di prelievo e le successive analisi alle quali deve essere sottoposto, tutelando al contempo gli aspetti etici e legali connessi.

Il modulo deve informare in modo chiaro e comprensibile sul tipo di matrice biologica prelevata (sangue, urine, saliva, capelli, ecc.), sulle finalità dell'analisi, sui potenziali rischi, nonché sulle implicazioni dei risultati, inclusa la possibile trasmissione e comunicazione dei dati a terzi in ambito medico-legale o giudiziario.

In presenza di minori, il consenso informato deve essere espresso dai genitori, da chi esercita la responsabilità genitoriale o dal tutore, tenendo comunque conto della volontà del minore in relazione all'età e al grado di maturità raggiunto. Poiché tali indagini sono sempre accompagnate da una specifica richiesta con relativo quesito medico-legale, in caso di mancata prestazione del consenso è necessario informare tempestivamente il latore della richiesta per la corretta gestione della criticità; per lo stesso motivo, è necessario acquisire preventivamente anche il consenso alla trasmissione dei dati analitici al latore della richiesta.

La corretta e completa compilazione del modulo di consenso informato riveste un ruolo particolarmente rilevante nei contesti clinici e forensi, nei quali la validità legale, la tracciabilità del campione e l'affidabilità del risultato analitico sono elementi essenziali. Un esempio di modulo è riportato nell'Appendice B1.

3.2 Informativa e consenso privacy ai sensi Regolamento (UE) 679/2016

I dati personali e sanitari della persona interessata devono essere trattati nel rispetto del Regolamento (UE) 2016/679.

L'informativa deve avere, secondo le disposizioni, forma concisa, trasparente, intelligibile per l'interessato e facilmente accessibile. Dovrà quindi spiegare che dati e campioni saranno utilizzati esclusivamente per finalità sanitarie, diagnostiche o di ricerca, con modalità che garantiscono sicurezza, riservatezza e protezione delle informazioni. Inoltre, la conservazione dei dati e dei

campioni avverrà solo per il tempo necessario al raggiungimento delle finalità per cui sono stati raccolti, salvo obblighi di legge.

Andrà inoltre evidenziato che l'interessato avrà il diritto di accedere ai propri dati, richiederne la rettifica, la cancellazione o la limitazione del trattamento, nonché di revocare in qualsiasi momento il consenso prestato, senza pregiudicare la liceità del trattamento effettuato prima della revoca. Un esempio è riportato nell'Appendice B2.

3.3 Verbale di prelievo

Il verbale di prelievo, che deve essere redatto in triplice copia, rappresenta un documento essenziale per garantire la corretta raccolta, identificazione, tracciabilità e conservazione dei campioni biologici destinati alla determinazione delle sostanze d'abuso tradizionali e delle NSP.

Nel modulo devono essere riportati i dati relativi al responsabile del prelievo e quelli della persona sottoposta ad accertamento analitico (generalità, residenza, estremi del documento di identità); qualora il soggetto non sia in possesso di un documento di identità valido, l'identificazione può avvenire mediante un supervisore autorizzato o un testimone munito di documento di identità, mentre in assenza di una identificazione certa non è possibile procedere al prelievo del campione.

Il verbale deve inoltre contenere i dati necessari all'identificazione univoca del campione (codice identificativo, struttura o reparto in cui viene effettuato il prelievo), il tipo di matrice biologica utilizzata (sangue, urine, saliva, capelli, ecc.), l'orario di prelievo, le finalità dell'analisi, l'elenco dei farmaci eventualmente assunti o somministrati nei giorni precedenti la raccolta, nonché le informazioni relative alle modalità di raccolta, alle condizioni di conservazione e alle precauzioni adottate per prevenire contaminazioni o alterazioni del campione. Nel caso di DFC è necessario aggiungere la data e le modalità dell'evento criminoso.

Il modulo deve essere sottoscritto sia dall'operatore che ha effettuato il prelievo sia dalla persona sottoposta ad accertamento analitico, attestando anche la presenza del consenso informato, elemento imprescindibile soprattutto in ambito clinico e forense. Delle tre copie del verbale di prelievo, una viene trasmessa, insieme ai campioni e al modulo di catena di custodia, alla struttura incaricata dell'analisi, una viene conservata dalla struttura o dall'incaricato che ha effettuato il prelievo e una viene consegnata alla persona sottoposta ad accertamento analitico. Un esempio di modulo è riportato nell'Appendice B3.

3.4 Catena di custodia

Il modulo per la catena di custodia rappresenta un documento essenziale per garantire la tracciabilità di ogni spostamento del campione biologico, dal momento della raccolta fino all'arrivo nel laboratorio incaricato dell'analisi, prevenendo contaminazioni, manomissioni o scambi e assicurando la validità legale dei risultati, soprattutto in ambito clinico, forense e giudiziario. Il modulo deve documentare in modo dettagliato ogni fase della gestione del campione, includendo etichette adesive con codice a barre o codice alfanumerico identiche a quelle apposte sul verbale di prelievo e sui contenitori di raccolta delle tre aliquote, nonché informazioni relative al tipo di matrice biologica (sangue, urine, saliva, capelli, ecc.), all'identità del soggetto, al luogo, alla data e all'ora del prelievo ed eventuali annotazioni sul campione.

Devono inoltre essere riportati il nome, l'indirizzo, l'indirizzo e-mail e il numero di telefono del laboratorio di analisi, insieme al luogo, alla data e all'ora della presa in carico dei campioni

in laboratorio. Il modulo deve recare il nome e la firma di tutte le persone che hanno avuto in custodia le aliquote del campione durante il trasferimento dal luogo del prelievo alla destinazione finale, garantendo così la completa tracciabilità delle responsabilità. L'adozione di moduli standardizzati per la catena di custodia facilita la gestione dei campioni, riduce il rischio di errori o contestazioni legali e costituisce un requisito imprescindibile per l'accettazione e l'affidabilità dei dati analitici. Un esempio di modulo è riportato nell'Appendice B4.

3.5 Refertazione

Il modulo di refertazione deve fornire un quadro chiaro e completo dei risultati analitici, includendo il tipo di matrice biologica analizzata, le metodiche utilizzate, l'elenco delle sostanze ricercate, di quelle accertate e i rispettivi livelli di rilevabilità con idonea unità di misura (46). La refertazione deve inoltre includere informazioni sul contesto clinico o forense, la data e l'ora del prelievo, e la catena di custodia per garantire la validità legale dei risultati. L'uso di moduli standardizzati facilita la comunicazione tra laboratorio, clinici e autorità, migliorando l'accuratezza e la tempestività delle decisioni basate sui dati analitici.

Infine, la refertazione dovrebbe essere chiara e accessibile anche a non specialisti, per supportare efficacemente il trattamento medico o le indagini forensi. Un esempio è riportato nell'Appendice B5.

4. METODI ANALITICI: ANALISI DI SCREENING E DI CONFERMA

Il laboratorio deve utilizzare metodi analitici validati e descritti in procedure documentate che includano fasi operative, criteri di accettabilità e controllo qualità (12-16).

I risultati ottenuti mediante test di screening enzimatici o immunochimici devono sempre essere confermati tramite tecniche basate su principi chimico-fisici differenti, come spettrometria di massa combinata a tecniche cromatografiche quali la cromatografia in fase liquida o in fase gassosa.

Il processo analitico è supportato da procedure di controllo qualità, che includono l'analisi di campioni di controllo e una sequenza strutturata di iniezione per garantire assenza di interferenze e corretto funzionamento strumentale. Tutti i metodi devono essere validati prima dell'uso routinario e ogni modifica o revisione richiede una nuova validazione con risultati documentati, archiviati e conservati per garantire tracciabilità e conformità normative.

Infine, l'accreditamento ISO² per i laboratori che determinano sostanze d'abuso (test antidroga, tossicologia forense e clinica) è fondamentale per garantire l'accuratezza, la riproducibilità e la valenza legale dei risultati.

4.1 Metodi di screening

I metodi di screening sono utilizzati in tossicologia forense e clinica per analizzare rapidamente molti campioni a costi contenuti, principalmente mediante tecniche immunochimiche/enzimatiche o, in alcuni casi, cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa. I test immunochimici offrono rapidità e automazione, ma sono caratterizzati da ridotta specificità e scarsa accuratezza quantitativa, fornendo esclusivamente risultati presuntivi, espressi come negatività o "non negatività" rispetto a un valore valori di soglia o *cut-off* (Tabella 18).

Tabella 18. Valori soglia di screening per sostanze stupefacenti e psicotrope in diverse matrici biologiche definite per legge o società scientifiche

Classe di sostanze	Urina (ng/mL)		Saliva (ng/mL)	Capelli (ng/mg)
	DL.vo 81/2008*	EWDTs	EWDTs	EWDTs
Amfetamine	500	500	40	0,2
Cannabinoidi (THC)	50	50	10	0,1
Cocaina e metaboliti	300	150	30	0,5
Oppiacei	300	300	-	0,2
6-MAM	-	-	4	-
Morfina	-	-	40	-
Metadone (EDDP)	300	300 (100)	50	0,2
Buprenorfina	-	5	5	0,01
Ketamina	-	-	-	0,5

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

EWDTs: European Workplace Drug Testing Society

* Intesa stipulata il 30 ottobre 2007, Accordo tra Stato Regioni e Province autonome. Procedure per effettuare gli accertamenti di assenza di tossicodipendenza

² UNI CEI EN ISO/IEC 17025: Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura; UNI EN ISO 15189: Laboratori medici - Requisiti riguardanti la qualità e la competenza

Il rilevamento delle NSP rappresenta una sfida significativa per le metodiche di screening convenzionali: molte NSP non sono rilevabili con i test immunochimici tradizionali a causa della loro variabilità strutturale e della mancanza di anticorpi specifici (18). Pertanto, l'impiego di tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa è fortemente raccomandato, poiché permette l'identificazione simultanea di un ampio spettro di NSP, inclusi metaboliti, anche in assenza di kit commerciali specifici.

Un risultato positivo allo screening non ha validità forense se non viene confermato mediante spettrometria di massa accoppiata a tecniche cromatografiche, su una nuova aliquota di campione. I risultati di screening non devono essere riportati in forma quantitativa ma, come detto, espressi come "non negatività". Sebbene i risultati negativi siano generalmente accettati, è necessario garantire l'assenza di falsi negativi, anche attraverso conferme su campioni valutati negativi allo screening.

I valori di soglia o cut-off definiti dai produttori dei kit diagnostici non devono essere adottati incondizionatamente ma adattati allo scopo dell'analisi e, se modificati per esigenze del laboratorio, il metodo deve essere nuovamente validato mediante calibratori preparati specificatamente per lo scopo. Le tecniche cromatografiche permettono l'identificazione simultanea di numerosi analiti, incluse le NSP, ma richiedono strumentazione e competenze specifiche (13, 99). In ogni caso, solo i risultati confermati mediante tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa possono assumere valore tossicologico-forense o medico-legale.

I kit immunochimici commerciali per lo screening delle sostanze d'abuso sono principalmente convalidati per matrici biologiche convenzionali, quali urina e fluido orale. L'utilizzo di tali sistemi su matrici alternative risulta meno comune; tuttavia, sono disponibili kit specifici per la matrice ematica. Approcci analoghi possono essere applicati anche alla matrice cheratinica.

4.2 Metodi di conferma

Le analisi di conferma devono garantire l'identificazione certa e la quantificazione accurata delle sostanze di interesse, sia dei principi attivi che i loro metaboliti, con idonea sensibilità e specificità, producendo un risultato analitico indipendente da quello ottenuto nella fase di screening, soprattutto se quest'ultimo è stato effettuato con tecniche enzimatiche o immunochimiche. Per tale ragione è necessario impiegare metodi basati su principi chimico-fisici diversi da quelli utilizzati per lo screening, con selettività e sensibilità superiori, e un limite di quantificazione inferiore e idoneo allo scopo dell'analisi (es. sensibilità differenti DL.vo 81/2008 vs. DFC) (12-16).

In ambito tossicologico-forense, la separazione cromatografica è sempre necessaria e l'impiego della spettrometria di massa accoppiata a tecniche cromatografiche è riconosciuto come standard internazionale. È fondamentale l'uso di standard interni, preferibilmente deuterati, aggiunti prima della fase preparativa, per garantire l'affidabilità del dato analitico sia nella fase estrattiva sia in quella strumentale.

L'utilizzo della medesima tecnica cromatografica impiegata nello screening risulta accettabile esclusivamente qualora il metodo di rivelazione sia differente. Il valore soglia del test di conferma (Tabella 19) deve essere sempre inferiore a quello dello screening, e i campioni positivi devono essere conservati in aliquote dedicate per il periodo previsto dalle normative o concordato con chi richiede l'analisi, indicato nelle SOP in uso al laboratorio.

Tabella 19. Valori soglia di conferma per sostanze stupefacenti e psicotrope in diverse matrici biologiche definite per legge o società scientifiche

Sostanza	Urina (ng/mL)			Saliva (ng/mL)			Capelli (ng/mg)		
	DL.vo 81/2008*	EWDTs	Sibioc	DL.vo 81/2008	EWDTs	DL.vo 81/2008	EWDT S	SoHT	
Amfetamina	250	200	2	15	15	0,2	0,2	0,2	
Metamfetamina	250	200	2	15	15	0,2	0,2	0,2	
MDA	250	200	2	15	15	0,2	0,2	0,2	
MDMA	250	200	2	15	15	0,2	0,2	0,2	
MDEA	250	200	-	-	-	0,2	0,2	0,2	
THC	15	-	1	2	2	0,1	0,05	0,05	
THC-COOH	15	15	-	-	-	0,1	0,0002	0,0002	
Cocaina	100	-	2	8	8	0,5	0,5	0,5	
BEG	100	100	2	8	8	0,05	0,05	#	
Morfina	100	300	2	15	15	0,2	0,2	0,2	
Codeina	100	300	2	15	15	0,2	0,2	0,2	
6-MAM	100	10	2	2	2	0,2	0,2	0,2	
Metadone	100	250	2	20	20	0,2	0,2	0,2	
EDDP	-	75	2	20	20	-	0,05	**	
Buprenorfina	5	2	2	1	1	0,05	0,01	0,01	
Norbuprenorfina	-	2	2	1	-	-	0,01	***	
Ketamina	-	-	-	-	-	-	0,5	0,2	
Norketamina	-	-	-	-	-	-	0,1	-	

6-MAM: 6-monoacetilmorfina**BEG:** benzoilecgonina**EDDP:** 2-etilidene-1, 5-dimetil-3, 3-difenilpirrolidina**EWDTs:** European Workplace Drug Testing Society**MDA:** 3,4-metilendiossianfetamina**MDEA:** 3,4-metilendiossi-N-etilfetamina**MDMA:** 3,4-metilenediossimetanfetamina**Sibioc:** Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica - Medicina di Laboratorio**SoHT:** Society of Hair Testing (linee guida di consenso).**THC:** delta-9-tetraidrocannabinolo**THC-COOH:** 11-nor-9-carbossi-delta-9-tetraidrocannabinolo

* Intesa stipulata il 30 ottobre 2007, Accordo tra Stato Regioni e Province autonome. Procedure per effettuare gli accertamenti di assenza di tossicodipendenza

** La conferma di EDDP dimostra l'uso di metadone

*** La conferma di norbuprenorfina dimostra l'uso di buprenorfina

La presenza di benzoilecgonina, norcocaina, cocaetilene, idrossilcocaina o idrossibenzoilecgonina deve essere considerato per confermare l'uso di cocaina

Per quanto riguarda la matrice sangue si deve far riferimento ai “requisiti minimi di prestazione” (Tabella 20), ovvero le concentrazioni degli analiti che il laboratorio deve essere in grado di quantificare, con accuratezza del metodo analitico utilizzato, come indicato nelle “Linee guida per la determinazione di sostanze stupefacenti e psicotrope su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali” prodotte dal Gruppo Tossicologi Forensi Italiani³ (100).

³ I requisiti minimi di prestazione e i valori di concentrazione adottati dal Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI), nonché i *cut-off* di screening e di conferma previsti dai principali riferimenti tecnico-normativi nazionali e internazionali (DL.vo 81/2008, EWDTs, SoHT), sono riportati nelle tabelle della versione integrale delle “Linee guida per la determinazione di sostanze stupefacenti e psicotrope su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali”.

Tabella 20. Valori soglia dei test di conferma relativi alle sostanze d'abuso per la matrice Sangue

Sostanza	Concentrazioni relative ai requisiti minimi di prestazione (ng/mL)
Amfetamina	2
Metamfetamina	2
MDMA	2
MDA	2
MDEA	2
MBDB	2
THC	1
11-OH-THC	0,1
THC-COOH	2
Cocaina	2
BEG	2
Cocaetilene	2
Norcocaina	2
Morfina	2
Codeina	2
6-MAM	2
Metadone	2
EDDP	2
Buprenorfina	2
Norbuprenorfina	2

11-OH-THC: 11-idrossi-delta-9-tetraidrocannabinolo

6-MAM: 6-monoacetilmorfina

BEG: benzoilecgonina

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

MBDB: 3,4-metilendiossi-N-metil- α -etilfenilettilammina

MDA: 3,4-metilendiossianfetamina

MDEA: 3,4-metilendiossi-N-etilfetamina

MDMA: 3,4-metilenediossimetanfetamina

THC: delta-9-tetraidrocannabinolo

THC-COOH: '11-nor-9-carbossi-delta-9-tetraidrocannabinolo

5. VALIDAZIONE DEI METODI ANALITICI

La validazione di un metodo analitico consiste nel dimostrare che il metodo è idoneo allo scopo e produce risultati precisi, accurati e riproducibili nelle condizioni operative previste. Ogni metodologia analitica impiegata routinariamente dal laboratorio deve essere sottoposta a una preventiva validazione, in conformità a procedure e criteri riconosciuti a livello nazionale e internazionale (101-107).

Generalmente i metodi di screening immunoenzimatici sono validati dal produttore e non richiedono ulteriori procedure di validazione. Tuttavia, qualsiasi modifica alle condizioni d'impiego indicate dal produttore richiede una validazione completa del metodo o del kit, da effettuare solo in assenza di metodologie alternative (13).

La procedura di validazione dei metodi analitici adottata dai laboratori deve considerare una serie di parametri fondamentali che ne garantiscano l'affidabilità, la riproducibilità e l'idoneità all'uso previsto (Tabella 21).

Tabella 21. Aspetti fondamentali della validazione dei metodi bioanalitici

Parametro	Descrizione	Criteri di accettazione
Selettività	Capacità del metodo di distinguere l'analita da interferenti endogeni	-
Accuratezza (<i>bias</i>)	Accordanza tra valore misurato e valore vero	$\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ al LOQ)
Precisione (CV%)	Riproducibilità delle misure	$\leq 15\%$ ($\leq 20\%$ al LOQ)
LOD	Minima quantità rilevabile	Definito sperimentalmente
LOQ	Minima quantità quantificabile	<i>bias</i> $\pm 20\%$; CV $\leq 20\%$
Curva di calibrazione	Relazione concentrazione/risposta	-
Linearità	Proporzionalità risposta/concentrazione	Dimostrata nell'intervallo di calibrazione validato
Effetto matrice	Influenza dei componenti della matrice	<i>bias</i> $\pm 15\%$; CV $\leq 15\%$
<i>Carryover</i>	Trascinamento tra campioni	$\leq 20\%$ LOQ (analita); $\leq 5\%$ IS
Recupero	Efficienza estrazione	Riproducibile e consistente (non richiesto valore percentuale fisso)

IS: *Internal Standard*

Tra questi parametri fondamentali per la validazione dei metodi bioanalitici rientrano l'esattezza, che indica il grado di vicinanza dei risultati al valore vero; la precisione, che valuta la ripetibilità e la riproducibilità delle misurazioni; i limiti di rilevabilità (*Limit of Detection*, LOD) e di quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ), che definiscono rispettivamente la minima quantità di analita rilevabile e quella quantificabile con affidabilità; la linearità nel range di calibrazione, che descrive la proporzionalità della risposta analitica alla concentrazione dell'analita; e l'effetto matrice, che consente di identificare eventuali interferenze dovute ai componenti della matrice biologica.

Altri parametri essenziali sono il *carryover*, il recupero dell'analita durante l'estrazione, la stabilità dei campioni durante conservazione e manipolazione, e l'integrità della diluizione,

necessaria quando i campioni devono essere diluiti in quanto la concentrazione dell'analita eccede dal range di calibrazione. La valutazione di questi parametri permette di definire criteri di accettazione chiari e uniformi, assicurando che il metodo possa fornire risultati affidabili in diverse condizioni operative. I valori specifici e i limiti accettabili per ciascun parametro possono essere sintetizzati in una tabella di riferimento, utile per il monitoraggio della qualità e per la documentazione delle validazioni effettuate.

6. VALUTAZIONE INTERNA ED ESTERNA DI QUALITÀ

Il controllo di qualità interno (CQI) e la valutazione esterna di qualità (VEQ) costituiscono il fondamento del sistema di assicurazione della qualità nei laboratori di tossicologia clinica e forense (Tabella 22), garantendo l'affidabilità, la correttezza e l'uniformità del dato analitico in un contesto critico come la determinazione di sostanze d'abuso tradizionali, le NSP e i biomarcatori dell'uso di etanolo nelle matrici biologiche (13, 106).

Un CQI è l'insieme delle procedure che il laboratorio utilizza per monitorare in modo continuo l'esecuzione e l'affidabilità delle proprie analisi. Nel contesto delle sostanze psicoattive in matrici biologiche, il CQI garantisce che ogni batch analitico venga verificato mediante controlli a concentrazione nota, campione bianco (matrice priva dell'analita o degli analiti di interesse) e standard indipendenti, assicurando la stabilità delle prestazioni strumentali e metodologiche. In questo modo, il laboratorio può confermare nel tempo la riproducibilità dei risultati, individuare tempestivamente eventuali deviazioni e applicare le necessarie azioni correttive, mantenendo così elevati standard di accuratezza e conformità.

La VEQ è la valutazione periodica delle prestazioni del laboratorio rispetto ad altri partecipanti, attraverso l'analisi di campioni sconosciuti forniti da un Ente Organizzatore indipendente e/o accreditato. La VEQ è fondamentale per:

- determinare l'accuratezza (esattezza o *bias*) del laboratorio in un confronto inter-laboratorio;
- assicurare la tracciabilità metrologica del risultato, essenziale per la sua validità in ambito medico-legale e forense;
- promuovere l'armonizzazione delle metodiche tra i laboratori.

Tabella 22. Sintesi delle procedure di qualità interna ed esterna nei processi analitici

Sistema di Qualità	Ruolo principale	Metodologia e materiali	Obiettivo
Valutazione interna	Monitoraggio quotidiano della stabilità del processo	Controlli di Qualità Interni e Calibratori tracciabili	Garantire la precisione, l'accuratezza e la robustezza analitica per la singola serie di analisi
Valutazione esterna	Confronto periodico e verifica dell'accuratezza rispetto al consensus	Campioni di controllo commutabili forniti da un Ente terzo	Assicurare l'accuratezza e la tracciabilità metrologica del risultato

L'obiettivo della partecipazione ai programmi di VEQ è il conseguimento di un'assicurazione della qualità totale, finalizzata al mantenimento continuo della validazione e della verifica dei metodi analitici adottati. Il perseguimento di tali obiettivi consente di ottenere risultati affidabili, tecnicamente solidi e difendibili in sede legale, in conformità con i requisiti e gli standard internazionali di accreditamento applicabili ai laboratori di tossicologia clinica e forense.

Il laboratorio è tenuto a conservare la documentazione relativa a CQI e VEQ per tutte le linee analitiche per almeno tre anni al fine di garantire la tracciabilità e la qualità analitica delle prestazioni.

7. REFERTAZIONE E COMUNICAZIONE DEI RISULTATI

La refertazione, ossia la produzione di un rapporto analitico che deve contenere i risultati delle analisi effettuate dal laboratorio, e la comunicazione dei risultati analitici costituiscono fasi fondamentali del processo diagnostico in tossicologia clinica e forense, in quanto rappresentano il punto di interfaccia tra il laboratorio e il soggetto richiedente.

Il referto deve essere redatto, nel contesto della determinazione di sostanze d'abuso tradizionali e NSP su matrici biologiche, secondo criteri di chiarezza, completezza e conformità agli standard di qualità. È essenziale distinguere i risultati di screening da quelli di conferma, riportare le metodologie impiegate e indicare i limiti analitici del metodo. Qualora le analisi di screening e conferma rilevino la presenza di sostanze stupefacenti o psicotrope e/o dei relativi metaboliti a concentrazioni superiori alle soglie analitiche definite, il referto deve includere: l'identificazione della/e sostanza/e rilevata/e, i corrispondenti risultati quantitativi, i *cut-off* applicati, al fine di garantire l'accuratezza, la tracciabilità e il valore probatorio dei dati riportati. Nei contesti forensi, il documento deve essere verificabile e difendibile in sede legale, con piena tracciabilità delle procedure adottate.

La comunicazione dei risultati deve avvenire in tempi appropriati e attraverso canali sicuri, nel rispetto della normativa sulla riservatezza dei dati. In caso di risultati positivi o di particolare rilevanza clinica o medico-legale, è richiesta una trasmissione tempestiva, accompagnata da note interpretative che ne facilitino la comprensione. È ammessa la consegna cartacea al richiedente (o a persona delegata) e, previo consenso scritto, l'invio elettronico mediante sistemi che garantiscano integrità e sicurezza del documento. Nei contesti forensi, il referto deve essere verificabile e difendibile in sede legale, con piena tracciabilità delle procedure adottate.

La comunicazione dei risultati deve avvenire in tempi appropriati e attraverso canali sicuri, nel rispetto della normativa sulla riservatezza dei dati. Per i risultati positivi o di particolare rilevanza clinica o medico-legale, è richiesta una trasmissione tempestiva, accompagnata da note interpretative che ne facilitino la comprensione. È ammessa la consegna cartacea al richiedente o persona delegata e, previo consenso scritto, o l'invio elettronico con sistemi che garantiscano integrità e sicurezza.

CONCLUSIONI

Le determinazioni analitiche delle sostanze stupefacenti e psicotrope nelle matrici biologiche non sono solo procedure tecniche: rappresentano strumenti fondamentali per la tutela della salute pubblica e per la giustizia.

In contesti medico-legali, amministrativi e penali, ogni dato prodotto deve essere affidabile, accurato e pienamente difendibile, poiché può avere conseguenze dirette su decisioni cliniche, procedimenti legali e responsabilità individuali.

Le procedure descritte in questo rapporto mirano a promuovere uniformità, trasparenza e qualità nelle attività dei laboratori forensi⁴, fornendo procedure operative condivisibili al fine di garantire risultati coerenti, tracciabili e interpretabili.

Il rispetto rigoroso di questi principi non è solo una buona pratica ma è anche un imperativo etico e professionale.

Solo attraverso standard elevati e procedure consolidate è possibile assicurare che i dati analitici producano valore reale, affidabilità e prova forense.

⁴ Non si deve dimenticare che anche i casi clinici possono diventare di interesse legale (incidenti stradali, incidenti sul lavoro, somministrazione subdola di sostanze, ecc.) perciò tutti i casi che mirano alla ricerca di xenobiotici devono essere trattati come potenziali casi forensi.

BIBLIOGRAFIA

1. Miller MJ, Albarracin-Jordan J, Moore C, Capriles JM. Chemical evidence for the use of multiple psychotropic plants in a 1,000-year-old ritual bundle from South America. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(23):11207-12.
2. Tanasi D, van Oppen de Ruiter BF, Florian F, Pavlovic R, Chiesa LM, Fochi I, Stani C, Vaccari L, Chaput D, Samorini G, Pallavicini A, Semeraro S, Gaetano AS, Licen S, Barbieri P, Greco E. Multianalytical investigation reveals psychotropic substances in a ptolemaic Egyptian vase. *Sci Rep*. 2024;14(1):27891.
3. Madras BK. The growing problem of New Psychoactive Substances (NPS). *Curr Top Behav Neurosci*. 2017;32:1-18.
4. Simão AY, Antunes M, Cabral E, Oliveira P, Rosendo LM, Brinca AT, Alves E, Marques H, Rosado T, Passarinha LA, Andraus M, Barroso M, Gallardo E. An update on the implications of New Psychoactive Substances in Public Health. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(8):4869.
5. Shafī A, Berry AJ, Sumnall H, Wood DM, Tracy DK. New psychoactive substances: a review and updates. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2020;10:2045125320967197.
6. Awuchi C, Aja M, Mitaki N, Morya S, Amagwula I, Echeta C, Igwe V. New psychoactive substances: major groups, laboratory testing challenges, public health concerns, and community-based solutions. *Journal of Chemistry*. 2023;5852315, 36 pages.
7. United Nations Office on Drugs and Crime. *UNODC early warning advisory on new psychoactive substances*. Vienna: UNODC; 2013. Disponibile all'indirizzo: <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS>; ultima consultazione 30/01/26.
8. European Union Drugs Agency. *EU Drug Market: New psychoactive substances — In-depth analysis*. Lisbon: EUDA; 2024. Disponibile all'indirizzo: <https://www.euda.europa.eu/system/files/documents/2025-05/2025-edmr-nps-full-pdf-31800-book.pdf>; ultima consultazione 30/01/26.
9. Sajwani HS. The dilemma of new psychoactive substances: a growing threat. *Saudi Pharm J*. 2023;31(3):348-50.
10. Berretta P, Minutillo A, Vari MR, Graziano S, Rotolo MC, Pellegrini M, Cassano T. New psychoactive substances: a descriptive review. *Biochim Clin*. 2022;46(4):283-91.
11. Marandiuc IM, Docea AO, Hîrjău AC, Avram OR, Matei CŞ, Tsatsakis A, Arsene AL. New psychoactive substances: a multidisciplinary review of challenges and their diverse character. *Daru*. 2025;33(2):29.
12. Strano Rossi S, Frison G, Chericoni S, Bertol E, Favretto D, Pichini S, Salomone A, Tagliaro F, Vignali C. Linee guida per la determinazione di sostanze stupefacenti e psicotrope su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali. *Riv Ital Med Lab*. 2023;19:192-205.
13. Bucchioni P, Aquilina V, Berretta P, Busardò FP, Francheschini P, Minutillo A, Pichini S, Pellegrini M. Standard operating procedures for the determination of abuse substances in biological matrices. *Biochim Clin*. 2025;49(2):191-206.
14. Salomone A, Tsanaclis L, Agius R, Kintz P, Baumgartner MR. European guidelines for workplace drug and alcohol testing in hair. *Drug Test Anal*. 2016;8(10):996-1004.
15. Taskinen S, Beck O, Bosch T, Brčak M, Carmichael D, Fucci N, George C, Piper M, Salomone A, Schielen W, Steinmeyer S, Weinmann W. European guidelines for workplace drug testing in urine. *Drug Test Anal*. 2017;9(6):853-65.

16. Bræk M, Beck O, Bosch T, Carmichael D, Fucci N, George C, Piper M, Salomone A, Schielen W, Steinmeyer S, Taskinen S, Weinmann W. European guidelines for workplace drug testing in oral fluid. *Drug Test Anal.* 2018;10(3):402-15.
17. de Campos EG, da Costa BRB, Dos Santos FS, Monedeiro F, Alves MNR, Santos Junior WJR, De Martinis BS. Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. *Forensic Toxicol.* 2022;40(1):1-18.
18. Graziano S, Anzillotti L, Mannocchi G, Pichini S, Busardò FP. Screening methods for rapid determination of new psychoactive substances (NPS) in conventional and non-conventional biological matrices. *J Pharm Biomed Anal.* 2019;163:170-9.
19. Scanferla DTP, Lini RS, Marchioni C., Mossini SAG. Drugs of abuse: a narrative review of recent trends in biological sample preparation and chromatographic techniques. *Forensic Chem.* 2022;30:100442.
20. Panuwet P, Hunter RE Jr, D'Souza PE, Chen X, Radford SA, Cohen JR, Marder ME, Kartavenka K, Ryan PB, Barr DB. Biological matrix effects in quantitative tandem mass spectrometry-based analytical methods: advancing biomonitoring. *Crit Rev Anal Chem.* 2016;46(2):93-105.
21. Navarro-Tapia E, Codina J, Villanueva-Blasco VJ, García-Algar Ó, Andreu-Fernández V. Detection of the synthetic cannabinoids AB-CHMINACA, ADB-CHMINACA, MDMB-CHMICA, and 5F-MDMB-PINACA in biological matrices: a systematic review. *Biology (Basel).* 2022;11(5):796.
22. Birk L, Santos SO, Eller S, Merib J, Oliveira T. Determinations of new psychoactive substances in biological matrices with focus on microextraction techniques: a review of fundamentals and state-of-the-art extraction methods. *Forensic Toxicol.* 2021;39:350-67.
23. Rivai SN, Kristianto S, Putri RE, Fatiqin A, Abidin MHZ. Modification of the QuEChERS method for drug analysis in biological sample: a review. *J Multidiscip Appl Nat Sci.* 2025;5(2):523-35.
24. Wagmann L, Jacobs CM, Meyer MR. New psychoactive substances: which biological matrix is the best for clinical toxicology screening? *Ther Drug Monit.* 2022;44(5):599-605.
25. El Bèze N, Hamzi K, Henry P, Trimaille A, El Ouahidi A, Zakine C, Nallet O, Delmas C, Aboyans V, Goralski M, Albert F, Bonnefoy-Cudraz E, Bochaton T, Schurtz G, Lim P, Lequipar A, Gonçalves T, Gall E, Pommier T, Lemarchand L, Meune C, Azzakani S, Bouleti C, Amar J, Dillinger JG, Steg PG, Vicaut E, Toupin S, Pezel T. ADDICT-ICCU investigators. Machine learning to detect recent recreational drug use in intensive cardiac care units. *Arch Cardiovasc Dis.* 2025;118(5):277-86.
26. Di Giorgi A, Pichini S, Busardò FP, Basile G. Artificial intelligence (AI) in New Psychoactive Substances (NPS) analysis: state-of-art and future perspectives. *J Anal Toxicol.* 2025;bkaf071. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaf071>.
27. Pichini S, Bucchioni P, Pellegrini M, Pacifici R. *Procedura operativa per la determinazione delle sostanze d'abuso su sangue*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; Anno 2017. Disponibile all'indirizzo: <https://www.iss.it/documents/20126/0/PROCEDURE-OPERATIVE-sangue.pdf/7d0a5216-ded9-7e23-6609-1deed0df14e1?t=1576349808583>; ultima consultazione 30/01/26.
28. Lima-Oliveira G, Lippi G, Salvagno GL, Picheth G, Guidi GC. Laboratory diagnostics and quality of blood collection. *J Med Biochem* 2015;34(3):288-94.
29. Simundic AM, Bölenius K, Cadamuro J, Church S, Cornes MP, van Dongen-Lases EC, Eker P, Erdeljanovic T, Grankvist K, Guimaraes JT, Hoke R, Ibarz M, Ivanov H, Kovalevskaya S, Kristensen GBB, Lima-Oliveira G, Lippi G, von Meyer A, Nybo M, De la Salle B, Seipelt C, Sumarac Z, Vermeersch P. Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE), of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) and Latin American Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE-LATAM) of the Latin America Confederation of Clinical Biochemistry (COLABIOCLI). Joint EFLM-COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med.* 2018;56(12):2015-38.

30. Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol*. 2021;43(4):571-80.
31. Hoffman MSF, McKeage JW, Xu J, Ruddy BP, Nielsen PMF, Taberner AJ. Minimally invasive capillary blood sampling methods. *Expert Rev Med Devices*. 2023;20(1):5-16.
32. Kılıç D, Aksoy A, Sivil R, Kılıç T, Avcı A, Keşaplı M, Aykal G. Does cleaning of venipuncture site with alcohol affect blood ethanol concentration? *Heliyon*. 2024;10(10):e31517.
33. Busardò FP, Kyriakou C, Tittarelli R, Mannocchi G, Pantano F, Santurro A, Zaami S, Baglio G. Assessment of the stability of mephedrone in ante-mortem and post-mortem blood specimens. *Forensic Sci Int*. 2015;256:28-37.
34. Glicksberg L, Kerrigan S. Stability of synthetic cathinones in blood. *J Anal Toxicol*. 2017;41(9):711-9.
35. Adamowicz P, Malczyk A. Stability of synthetic cathinones in blood and urine. *Forensic Sci Int*. 2019;295:36-45.
36. Truver MT, Swortwood-Gates MJ. Long-term stability of novel synthetic opioids in blood. *Forensic Sci Int*. 2020;308:110175.
37. Huertas T, Jurado C, Salguero M, Soriano T, Gamero J. Stability of cocaine compounds in biological fluids during post-analytical sample storage. *J Anal Toxicol*. 2020;44(8):864-70.
38. Banaszkiwicz L, Woźniak MK, Domagalska E, Kalisz M, Kot-Wasik A. Long-term stability of benzodiazepines and z-hypnotic drugs in blood samples stored at varying temperatures. *J Anal Toxicol*. 2023;46(9):1073-8.
39. Aldubayyan AA, Castrignanò E, Elliott S, Abbate V. Influence of long-term storage temperatures and sodium fluoride preservation on the stability of synthetic cathinones and dihydro-metabolites in human whole blood. *Forensic Toxicol*. 2023;41(1):81-93.
40. Sadler Simões S, Castañera Ajenjo A, Dias MJ. Dried blood spots combined to an UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of drugs of abuse in forensic toxicology. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;147:634-44.
41. Massano M, Incardona C, Gerace E, Negri P, Alladio E, Salomone A, Vincenti M. Development and validation of a UHPLC-HRMS-QTOF method for the detection of 132 new psychoactive substances and synthetic opioids, including fentanyl, in dried blood spots. *Talanta*. 2022;241:123265.
42. Vitrano A, Di Giorgi A, Abbate V, Basile G, La Maida N, Pichini S, Di Trana A. Evaluation of short-term stability of different nitazenes psychoactive opioids in dried blood spots by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Int J Mol Sci*. 2024;25(22):12332.
43. Nguyen TA, Chen RH, Hawkins BA, Hibbs DE, Kim HY, Wheate NJ, Groundwater PW, Stocker SL, Alffenaar JC. Can we predict drug excretion into saliva? a systematic review and analysis of physicochemical properties. *Clin Pharmacokinet*. 2024;63(8):1067-87.
44. Schramm W, Smith RH, Craig PA, Kidwell DA. Drugs of abuse in saliva: a review. *J Anal Toxicol*. 1992;16(1):1-9.
45. Langel K, Gjerde H, Favretto D, Lillsunde P, Øiestad EL, Ferrara SD, Verstraete AG. Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. *Drug Test Anal*. 2014;6(5):461-71.
46. Bakke E, Høiseth G, Furuhaugen H, Berg T, Arnestad M, Gjerde H. Oral fluid to blood concentration ratios of different psychoactive drugs in samples from suspected drugged drivers. *Ther Drug Monit*. 2020;42(5):795-800.
47. Sobczak Ł, Goryński K. Evaluation of swabs from 15 commercially available oral fluid sample collection devices for the analysis of commonly abused substances: doping agents and drugs of abuse. *Analyst*. 2020;145(22):7279-88.

48. Bellagambi F, Lomonaco T, Salvo P, Vivaldi F, Hangouët M, Ghimenti S, Biagini D, Di Francesco F, Fuoco R, Errachid A. Saliva sampling: methods and devices. An overview. *TrAC Trends Anal Chem.* 2020;124:115781.
49. Pichini S, Pacifici R, Mortali C, Gori P, Marchei E, Martucci L, Palmi I, Pellegrini M, Rotolo MC. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella saliva. Roma: Istituto Superiore di Sanità; Anno 2013. Disponibile all'indirizzo: [https://www.iss.it/documents/20126/1915304/02_Linee_Guida_Saliva.pdf/10d8034d-361b-c1f2-072b-fb84a3d83631?version=1.2&t=1576445439440&download=true](https://www.iss.it/documents/20126/1915304/02_Linee_Guida_Saliva.pdf/10d8034d-361b-c1f2-072b-fb84a3d83631?version=1.2&t=1576445439440&download=true;); ultima consultazione 30/01/26.
50. Riggio M, Dave KA, Koscak B, Blakey M, Appleton C. Impact of quantisal® oral fluid collection device on drug stability. *Front Toxicol.* 2021;3:670656.
51. Marchei E, Malaca S, Graziano S, Gottardi M, Pichini S, Busardò FP. Stability and degradation pathways of different psychoactive drugs in neat and in buffered oral fluid. *J Anal Toxicol.* 2020;44(6):570-9.
52. Almeida E, Soares S, Gonçalves J, Rosado T, Fernández N, Rodilla JM, Passarinha LA, Barroso M, Gallardo E. Stability of cocaine, opiates, and metabolites in dried saliva spots. *Molecules.* 2022;27(3):641.
53. Gameiro C, Gonçalves J, Soares S, Rosado T, Araujo ARTS, Passarinha LA, Barroso M, Gallardo E. Evaluation of antipsychotic drugs' stability in oral fluid samples. *Molecules.* 2023;28(5):2030.
54. Dolan K, Rouen D, Kimber J. An overview of the use of urine, hair, sweat and saliva to detect drug use. *Drug Alcohol Rev.* 2004;23(2):213-7.
55. Tamama K. Advances in drugs of abuse testing. *Clin Chim Acta.* 2021;514:40-7.
56. Ciancio GM, Pellegrini M, Berretta P, et al. L'utilizzo della matrice urinaria in tossicologia forense. *Biochim Clin.* 2023;47(Suppl 1):S119-S126.
57. Vaccaro G, Massariol A, Guirguis A, Kirton SB, Stair JL. NPS detection in prison: a systematic literature review of use, drug form, and analytical approaches. *Drug Test Anal.* 2022;14(8):1350-67.
58. Owen GT, Burton AW, Schade CM, Passik S. Urine drug testing: current recommendations and best practices. *Pain Physician.* 2012;15(3):ES119-33.
59. Bijlsma L, Celma A, Castiglioni S, Salgueiro-González N, Bou-Iserte L, Baz-Lomba JA, Reid MJ, Dias MJ, Lopes A, Matias J, Pastor-Alcañiz L, Radonić J, Turk Sekulic M, Shine T, van Nuijs ALN, Hernandez F, Zuccato E. Monitoring psychoactive substance use at six European festivals through wastewater and pooled urine analysis. *Sci Total Environ.* 2020;725:138376.
60. Al-Asmari AI. A critical review of workplace drug testing methods for old and new psychoactive substances: gaps, advances, and perspectives. *Saudi Pharm J.* 2024;32(5):102065.
61. Aldubayyan AA, Castrignanò E, Elliott S, Abbate V. Short- and long-term stability of synthetic cathinones and dihydro-metabolites in human urine samples. *Forensic Toxicol.* 2024;42(2):172-180.
62. Yang FS, Lee HH, Tseng LP, Lee YH, Lan YS, Lee YC, Chou YC, Lin YC. Simultaneous Determination and stability analysis of ten new psychoactive substances including synthetic cathinones, phenethylamines, and ketamine substitutes in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int J Anal Chem.* 2023;2023:9895595.
63. Rotter M, Brandmaier S, Prehn C, Adam J, Rabstein S, Gawrych K, Brüning T, Illig T, Lickert H, Adamski J, Wang-Sattler R. Stability of targeted metabolite profiles of urine samples under different storage conditions. *Metabolomics.* 2017;13(1):4.
64. Moretti M, Freni F, Carelli C, Previderé C, Grignani P, Vignali C, Cobo-Golpe M, Morini L. Analysis of cannabinoids and metabolites in Dried Urine Spots (DUS). *Molecules.* 2021;26(17):5334.
65. Henderson GL. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci Int.* 1993;63(1-3):19-29.

66. Kintz P. Hair analysis in forensic toxicology: an updated review with a special focus on pitfalls. *Curr Pharm Des.* 2017;23(36):5480-6.
67. Cuypers E, Flanagan RJ. The interpretation of hair analysis for drugs and drug metabolites. *Clin Toxicol (Phila).* 2018;56(2):90-100.
68. Florou VA, Manaprasertsak A, Slyusarenko M, Amend SR, Kazi JU, Hammarlund EU, Pienta KJ. Human hair as a diagnostic tool in medicine. *Biochem Biophys Rep.* 2025;43:102129.
69. Janousch C, Eggenberger L, Steinhoff A, Johnson-Ferguson L, Bechtiger L, Loher M, Ribeaud D, Eisner M, Baumgartner MR, Binz TM, Shanahan L, Quednow BB. Words versus strands: reliability and stability of concordance rates of self-reported and hair-analyzed substance use of young adults over time. *Eur Addict Res.* 2025;31(1):60-74.
70. Rotolo MC, Pacifici R, Pellegrini M, Cardullo S, Pérez LJG, Cuppone D, Gallimberti L, Madeo G. Hair testing for classic drugs of abuse to monitor cocaine use disorder in patients following transcranial magnetic stimulation protocol treatment. *Biology (Basel).* 2021;10(5):403.
71. García-Caballero C, Martínez-González MA. Children victims of drug abuser parents: hair testing as a forensic tool to assess exposure—a cohort of 37 cases from Spain. *Drug Test Anal.* 2023;15(9):941-52.
72. Kuwayama K, Miyaguchi H, Kanamori T, Tsujikawa K, Yamamuro T, Segawa H, Okada Y, Iwata YT. Distribution profiles of diphenhydramine and lidocaine in scalp, axillary, and pubic hairs measured by micro-segmental hair analysis: good indicator for discrimination between administration and external contamination of the drugs. *Forensic Toxicol.* 2022;40(1):64-74.
73. Tzatzarakis MN, Alegakis AK, Kavvalakis MP, Vakonaki E, Stivaktakis PD, Kanaki K, Vardavas AI, Barbounis EG, Tsatsakis AM. Comparative evaluation of drug deposition in hair samples collected from different anatomical body sites. *J Anal Toxicol.* 2017;41(3):214-23.
74. Lee S, Han E, In S, Choi H, Chung H, Chung KH. Analysis of pubic hair as an alternative specimen to scalp hair: a contamination issue. *Forensic Sci Int.* 2011;206(1-3):19-21.
75. Pichini S, Pacifici R, Gori P, Marchei E, Martucci L, Mastrobattista L, Palmi I, Pellegrini M, Rotolo MC. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera. Roma: Istituto Superiore di Sanità; Anno 2013 Disponibile all'indirizzo: https://www.iss.it/documents/20126/1915304/Linee_Guida_Capelli_xweb.pdf/88ffd26a-f665-6eab-2742-fb6f63617161?t=1576445692472; ultima consultazione 30/01/26.
76. United Nations Office on Drugs and Crime. *Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and oral fluid.* New York: United Nations; 2014 Disponibile all'indirizzo: https://www.unodc.org/documents/scientific/ST_NAR_30_Rev.3_Hair_Sweat_and_Oral_Fluid.pdf; ultima consultazione 30/01/26.
77. Ji JJ, Xu D, Yan H, Xiang P, Shen M. Micro-segmental analysis of the entry pathway and distribution of zolpidem in hair from different scalp regions after a single dose. *Front Chem.* 2023;11:1115247.
78. Xiang P, Shen M, Drummer OH. Review: drug concentrations in hair and their relevance in drug facilitated crimes. *J Forensic Leg Med.* 2015;36:126-35.
79. Wang X, Johansen SS, Nielsen MKK, Linnet K. Hair analysis in toxicological investigation of drug-facilitated crimes in Denmark over a 8-year period. *Forensic Sci Int.* 2018;285:e1-e12.
80. Melchior SE, Nielsen MKK, Oropeza AR, Banner J, Johansen SS. Detection of scopolamine in urine and hair in a drug-facilitated sexual assault. *Forensic Sci Int.* 2023;347:111678.
81. Sasaki K, Shima N, Kamata T, Ishikawa A, Nitta A, Wada M, Nakano-Fujii S, Kakehashi H, Sato T, Katagi M. Incorporation of five common hypnotics into hair after a single dose and application to a forensic case of drug facilitated crimes. *Forensic Sci Int.* 2021;325:110881.

82. Marchei E, Gomez-Ruiz LM, Acosta-López A, Ramos-Gutiérrez RY, Varela-Busaka MB, Lombroni C, Andreu-Fernandez V, Pichini S, Garcia-Algar O. Assessment of alcohol consumption in Mexican pregnant women by hair testing of ethyl glucuronide. *Alcohol*. 2023;111:59-65.
83. Harris JC, Leggio L, Farokhnia M. Blood biomarkers of alcohol use: a scoping review. *Curr Addict Rep*. 2021;8(4):500-8.
84. Jones AW. Brief history of the alcohol biomarkers CDT, EtG, EtS, 5-HTOL, and PEth. *Drug Test Anal*. 2024;16(6):570-580.
85. Tawiah KD, Riley SB, Budelier MM. Biomarkers and clinical laboratory detection of acute and chronic ethanol use. *Clin Chem*. 2022;68(5):635-45.
86. Morini L, Casati S, Favretto D, Porpiglia N, Tagliaro F, Vincenti M. *Accertamenti tossicologico-forensi di uso progressivo e/o continuativo a rischio di alcol etilico Biomarcatori del consumo alcolico, procedure analitiche, aspetti interpretativi. Documento di consenso*. Associazione Scientifica Tossicologi Forensi Italiani; 2024. Disponibile all'indirizzo: https://www.gtfi.it/wp-content/uploads/2026/03/DocumentoConsensoGTFI-Biomarcatori-consumo-alcolico_rev00-09nov2024.pdf ; ultima consultazione 04/02/26.
87. Italia. Testo aggiornato del decreto legislativo 30 aprile 1992, n. 285, recante il nuovo codice della strada. Art. 186 (Guida sotto l'influenza dell'alcool). *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n.67 del 22 marzo 1994 - Suppl. Ordinario n. 49.
88. Mercurio I, Politi P, Mezzetti E, Agostinelli F, Troiano G, Pellegrino A, Gili A, Melai P, Rettagliata G, Mercurio U, Sannicandro D, Lancia M, Bacci M. Ethyl glucuronide and ethyl sulphate in urine: caution in their use as markers of recent alcohol use. *Alcohol Alcohol*. 2021;56(2):201-9.
89. Biondi A, Freni F, Carelli C, Moretti M, Morini L. Ethyl glucuronide hair testing: a review. *Forensic Sci Int*. 2019;300:106-19.
90. Skopp G, Schmitt G, Pötsch L, Dröner P, Aderjan R, Mattern R. Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol Alcohol*. 2000;35(3):283-5.
91. Society of Hair Testing. *Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption*. Strasbourg: SoHT; 2019. Disponibile all'indirizzo: https://www.soht.org/images/pdf/Alcohol%20consensus_final_aug19.pdf; ultima consultazione 04/02/26.
92. Schröck A, Thierauf-Emberger A, Schürch S, Weinmann W. Phosphatidylethanol (PEth) detected in blood for 3 to 12 days after single consumption of alcohol-a drinking study with 16 volunteers. *Int J Legal Med*. 2017;131(1):153-60.
93. Dumitrascu C, Gys C, Wille SMR, Del Mar Ramírez-Fernandéz M, D'Hondt D, Van Goethem A, Van Rafelghem B, Baetens E, Jacobs W, Neels H, Covaci A, van Nuijs ALN. The complementarity of phosphatidylethanol in whole blood and ethyl glucuronide in hair as biomarkers for the monitoring of alcohol use. *Drug Test Anal*. 2024;16(4):398-405.
94. Ashiru S, Banham J, Webster E, Saskoy L, Trotter G, Wade M, Rooney B. Evaluation and comparison of sensitivity of alcohol biomarkers PEth, EtG and EtPa in civil cases in England 2022-2023. *Forensic Sci Int*. 2024;363:112173.
95. Schellenberg F, Wienders J, Anton R, Bianchi V, Deenmamode J, Weykamp C, Whitfield J, Jeppsson JO, Helander A. IFCC approved HPLC reference measurement procedure for the alcohol consumption biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT): Its validation and use. *Clin Chim Acta*. 2017;465:91-100.
96. Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem*. 2003;49(11):1881-90.
97. Lanz C, Kuhn M, Deiss V, Thormann W. Improved capillary electrophoresis method for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in patient sera. *Electrophoresis*. 2004;25(14):2309-18.

98. Pichini S, Pacifici R, Gori P, Marchei E, Marchioro L, Martucci L, Mastrobattista L, Palmi I, Pellegrini M, Rotolo MC. *Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nelle urine*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; Anno 2014. Disponibile all'indirizzo: https://www.iss.it/documents/20126/1915304/Linee_Guida_Urine_xweb.pdf/644c57ab-deff-451e-6e98-d281a5a5039e?t=1576445696204; ultima consultazione 30/01/26.
99. Cieri G, Mohr ALA, Mastrovito R, Logan BK. Evaluating cross-reactivity of new psychoactive substances (NPS) in human whole blood by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Anal Toxicol*. 2024;48(3):191-6.
100. Associazione Scientifica Tossicologi Forensi Italiani. *Linee guida per la determinazione di sostanze stupefacenti e psicotrope su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali*. GTFI; 2022. Disponibile all'indirizzo: <https://www.gtfi.it/wp-content/uploads/2026/03/LineeGuidaGTFI-MaterialeBiologico-rev06-08giu2022.pdf>; ultima consultazione 16/02/26.
101. European Medicines Agency. *ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis*. Amsterdam: EMA; 2023. Disponibile all'indirizzo: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf; ultima consultazione 30/01/26.
102. European Medicines Agency. *ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures*. Disponibile all'indirizzo: Amsterdam: EMA; 2023. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf; ultima consultazione 30/01/26.
103. Food and Drug Administration. *M10 bioanalytical method validation and study sample analysis*. Silver Spring, Maryland: FDA; 2022. Disponibile all'indirizzo: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/m10-bioanalytical-method-validation-and-study-sample-analysis>; ultima consultazione 30/01/26.
104. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
105. American Academy of Forensic Sciences. *Standard practices for method validation in forensic toxicology*. Colorado Springs: AAFS; 2019. Disponibile all'indirizzo: https://www.aafs.org/sites/default/files/media/documents/036_Std_e1.pdf; ultima consultazione 30/01/26.
106. Favretto D, Pichini S, Bucchioni P, Pacifici R. Linee Guida in materia di analisi su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali. Documento di Consenso Gruppo Tossicologi Forensi – Gruppo di Studio di Farmacotossicologia e Doping SIBioC sulle Indagini di Laboratorio per la determinazione delle Sostanze d'Abuso. *Biochim Clin*. 2019;43(4) 449-452.
107. D'Avolio A, Cantù M, Gervasoni J, Artusi C, Marinova M, Nonnato A, Cangemi G, Persichilli S. Validazione dei metodi quantitativi bioanalitici in spettrometria di massa: regole e protocolli sperimentali. *Biochim Clin*. 2018;42(2):149-161.

APPENDICE A
Procedure operative standard consigliate

Introduzione

Le SOP forniscono esempi pratici per l'analisi quali-quantitativa di sostanze psicoattive in diverse matrici biologiche, tra cui sangue, saliva, urina e matrici cheratiniche e delineano protocolli specifici applicabili in contesti clinici e forensi.

Queste SOP hanno carattere orientativo e devono essere adattate dal personale di laboratorio qualificato in funzione delle caratteristiche del campione, delle tecnologie disponibili e delle risorse operative. Eventuali modifiche ai protocolli proposti, necessarie per esigenze specifiche, non dovrebbero compromettere la validità dei risultati, che devono sempre rispettare requisiti di accuratezza, riproducibilità e tracciabilità.

Ogni laboratorio è responsabile della validazione e/o verifica dei metodi analitici prima del loro impiego routinario. L'obiettivo principale è standardizzare le procedure analitiche e organizzative in modo da garantire risultati affidabili e difendibili in ambito medico-legale e fornire strumenti metodologici per le applicazioni cliniche, forensi e di ricerca.

Operazioni preliminari

Le seguenti operazioni descrivono in modo sistematico le fasi di preparazione e analisi dei campioni necessarie per l'esecuzione di un metodo analitico qualitativo e quantitativo in matrice biologica. Tali procedure comprendono l'allestimento delle soluzioni di riferimento e dei campioni di controllo qualità, la preparazione dei calibratori in matrice e l'analisi dei campioni incogniti, garantendo tracciabilità, accuratezza e riproducibilità dei risultati. L'applicazione delle condizioni operative descritte è essenziale per assicurare l'affidabilità della curva di calibrazione, la correttezza della quantificazione e la validità complessiva del metodo analitico. Nel dettaglio:

- Preparare le soluzioni di lavoro, dei calibratori in matrice e dei controlli qualità (alta, media e bassa concentrazione) a partire dalle soluzioni madri.
- Conservare le soluzioni di lavoro a -20°C fino all'uso.
- Preparare un campione bianco (campione biologico in cui è certa l'assenza dell'analita o degli analiti di interesse e dello standard interno), un campione negativo (campione biologico in cui è certa l'assenza dell'analita o degli analiti di interesse e in cui è presente lo standard interno), calibratori e controlli qualità in matrice biologica secondo procedura, possibilmente analoga a quella del campione incognito.
- Aggiungere lo standard interno al campione bianco, al negativo, ai calibratori, ai controlli qualità e ai campioni incogniti nella stessa quantità.
- Eseguire l'estrazione del campione bianco, del campione negativo, dei calibratori, dei controlli qualità e campioni incogniti secondo procedura validata.
- Analizzare i campioni in un'unica sequenza comprendente: bianco strumentale, bianco di matrice, negativo, calibratori in ordine crescente, controlli qualità e, dopo lavaggio strumentale per evitare fenomeni di *carryover*, i campioni incogniti.
- Registrare e archiviare i dati analitici in conformità ai requisiti di integrità dei dati.

Determinazioni delle sostanze psicoattive nelle matrici biologiche

Di seguito vengono consigliate alcune SOP per la determinazione delle sostanze psicoattive nelle diverse matrici biologiche, elaborate sulla base delle evidenze scientifiche e delle buone pratiche in ambito tossicologico.

I diagrammi di flusso riportati in allegato all'Appendice A descrivono, in forma sintetica e operativa, un esempio delle principali fasi dei procedimenti analitici impiegati per la determinazione delle sostanze

psicoattive nelle diverse matrici biologiche. Ciascun diagramma rappresenta in modo schematico le tappe essenziali del flusso di lavoro analitico, comprendenti il pretrattamento del campione, le fasi di estrazione, l'eventuale derivatizzazione, la risospensione e l'analisi strumentale finale. L'obiettivo è fornire agli operatori uno strumento di supporto immediato e di agevole consultazione, utile a identificare rapidamente la sequenza delle operazioni, nonché i punti critici del processo, al fine di garantire uniformità procedurale, riproducibilità dei risultati e tracciabilità dell'intero iter analitico.

Particolare rilievo è attribuito alle NSP, un gruppo estremamente eterogeneo che comprende numerose classi chimiche. La rapida evoluzione di questo fenomeno, la facilità di modificazione strutturale e la continua immissione sul mercato di nuove molecole rendono le NSP particolarmente difficili da rilevare mediante metodiche analitiche convenzionali. Tale contesto impone l'adozione di protocolli altamente sensibili e selettivi, il costante aggiornamento delle librerie spettrali e l'impiego di tecniche cromatografiche e spettrometriche avanzate, spesso indispensabili per l'identificazione di sostanze non ancora completamente caratterizzate dal punto di vista chimico e tossicologico.

Si consiglia, infine, la consultazione periodica della letteratura scientifica nazionale e internazionale al fine di garantire l'aggiornamento continuo delle conoscenze sulle caratteristiche chimiche, sulle criticità analitiche e sulle metodologie più appropriate per la determinazione delle sostanze d'abuso e delle NSP (1-27).

Analisi quantitativa dei dati

L'analisi quantitativa dei dati consente di elaborare i segnali strumentali ottenuti durante le analisi al fine di determinare in modo accurato la concentrazione degli analiti nei campioni esaminati. Tale processo si basa sulla costruzione e validazione della curva di calibrazione, sull'applicazione di modelli di regressione appropriati e sulla verifica di specifici criteri di accettabilità, indispensabili per garantire l'affidabilità e la robustezza dei risultati analitici.

- a) Costruzione della curva di calibrazione:
 - Elaborare un grafico cartesiano riportando sull'asse delle ascisse (X) le concentrazioni calcolate dei calibratori e sull'asse delle ordinate (Y) il rapporto tra il segnale analitico di ciascun analita e quello del relativo standard interno.
 - Costruire una curva di calibrazione distinta per ciascun analita oggetto di studio.
 - Valutare il modello di regressione più idoneo, al fine di ottenere una relazione lineare tra concentrazione e risposta strumentale.
 - Determinare l'equazione della curva di calibrazione per ciascun analita.
- b) Quantificazione degli analiti mediante curva di calibrazione:
 - Determinare la concentrazione dell'analita o degli analiti di interesse nei campioni incogniti applicando l'equazione della curva di calibrazione corrispondente.
- c) Verifica e validazione dei risultati analitici. Affinché i risultati possano essere considerati validi, è necessario accertare:
 - La presenza dello standard interno in tutti i campioni analizzati.
 - L'assenza degli analiti nel/i campione/i negativo/i.
 - La presenza e corretta concentrazione di tutti gli analiti nei calibratori e nei campioni di controllo qualità.
- d) Un campione può essere considerato positivo per uno specifico analita solo se sono soddisfatti i seguenti criteri:
 - Presenza di un picco cromatografico relativo a ciascuno degli ioni selezionati al tempo di ritenzione corrispondente a quello osservato nei calibratori, con una tolleranza di $\pm 0,5\%$.
 - Segnale analitico superiore al LOD per l'analisi qualitativa o al LOQ per l'analisi quantitativa del metodo.
 - Corrispondenza del rapporto tra i segnali analitici degli ioni selezionati per ciascun analita con quelli ottenuti nei calibratori o nei campioni di controllo qualità, entro una tolleranza di $\pm 20\%$.

Per ulteriori approfondimenti si rimanda alla DECISIONE 2002/657/CE 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (21).

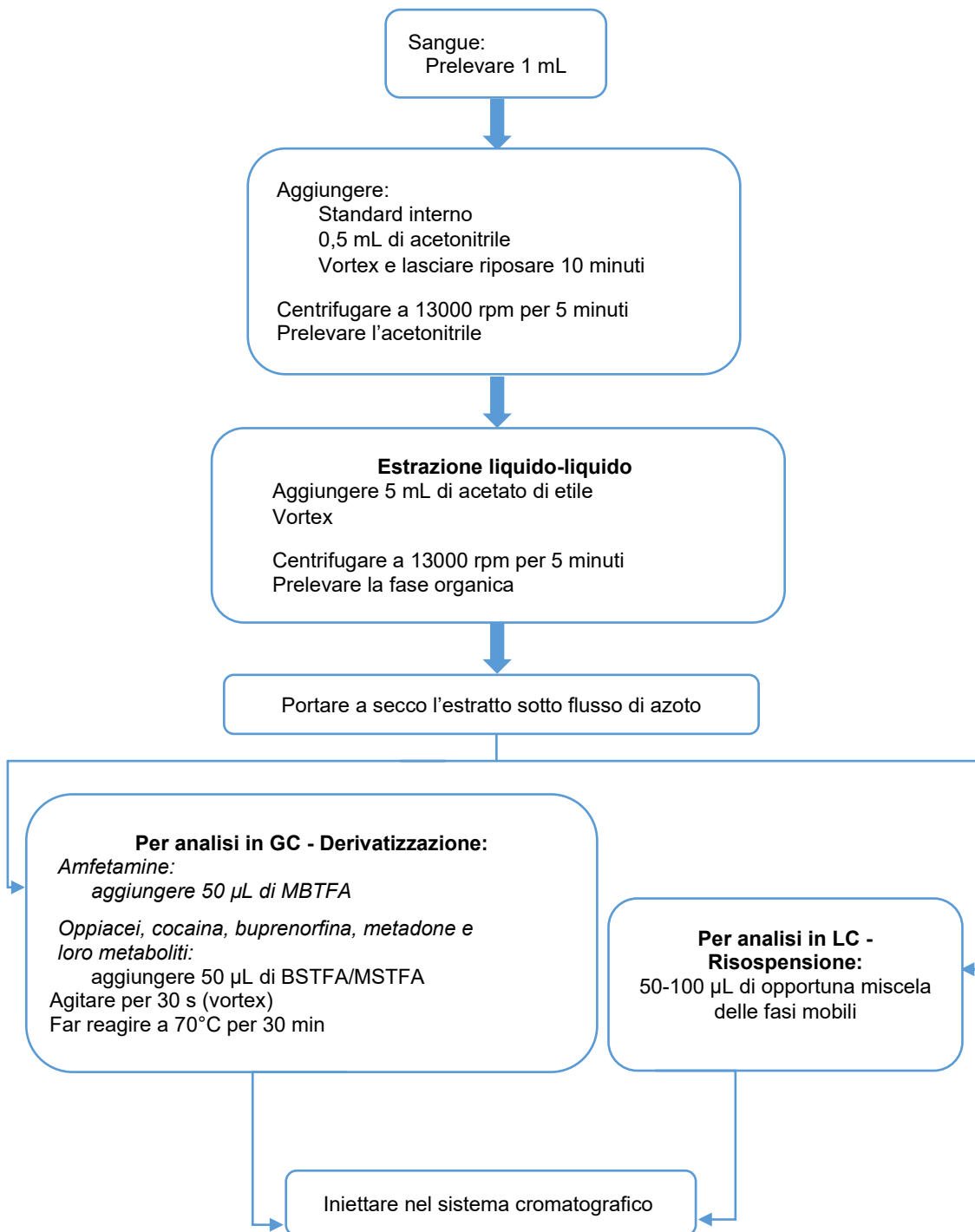
Bibliografia

1. Świątek S, Czyrski A. Analytical methods for determining psychoactive substances in various matrices: a review. *Crit Rev Anal Chem.* 2026;56(1):76-102.
2. Mannocchi G, Di Trana A, Tini A, Zaami S, Gottardi M, Pichini S, Busardò FP. Development and validation of fast UHPLC-MS/MS screening method for 87 NPS and 32 other drugs of abuse in hair and nails: application to real cases. *Anal Bioanal Chem.* 2020;412(21):5125-45.
3. Cláudia M, Pedro A, Tiago R, Francisco CR, Eugenia G. Determination of new psychoactive substances in whole blood using microwave fast derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2020;44(1):92-102.
4. Giorgetti A, Barone R, Pelletti G, Garagnani M, Pascali J, Haschimi B, Auwärter V. Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for the detection of 182 novel psychoactive substances in whole blood. *Drug Test Anal.* 2022;14(2):202-23.
5. 112. Lee S, Lee J, Ok H, Ryu E, Koo W, Lee YH, Pyo J, Lim NY, Kwon CH, Park SJ, Jung K, Eom Y, Chon Y, Song MK, Hong Y, Han E. Multi-residue screening method of 195 drugs of abuse and metabolites in whole blood using LC-MS/MS and application to real blood samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2025;266:117096.
6. Pereira JRP, Antunes M, Neng NR, Mustra C, Franco J, Fonseca S. Development and validation of a simple and fast method for routine analysis of new synthetic opioids and hallucinogens in whole blood using protein precipitation and UHPLC-MS/MS. *Forensic Sci Int.* 2026;378:112713.
7. Di Corcia D, Lisi S, Pirro V, Gerace E, Salomone A, Vincenti M. Determination of pharmaceutical and illicit drugs in oral fluid by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013;927:133-41.
8. Borges GR, Dos Santos BP, de Gouveia GC, Dalanhó CS, Scherer JN, Eller S, de Oliveira TF. Determination of drugs of abuse in oral fluid using dried oral fluid spot assisted by 24-well plate and LC-MS/MS. *Bioanalysis.* 2025;17(9):595-605.
9. 116. Zheng Y, Axelsson MAB, Andresen Bergström M. Validation of an LC-MS-MS method for analysis of 58 drugs of abuse in oral fluid and method comparison with an established LC-HRMS method. *J Anal Toxicol.* 2025;49(1):14-25.
10. Florou D, Orfanidis A, Boumba VA. Development and validation of a 'dilute and shoot' LC-MS/MS method in urine suitable for screening and confirmation analyses in a clinical setting. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2025;1265:124750.
11. Rossi B, Freni F, Vignali C, Ortu S, Morini L. Short-term stability evaluation of synthetic opioids, cathinones and ketamine in dried urine spots. Method validation and application to real cases. *Forensic Sci Int.* 2025;377:112622.
12. Czarny J, Musiał J, Powierska-Czarny J, Raczkowski M, Galant N, Buszewski B, Gadzała-Kopciuch R. Determination of 465 psychoactive substances, drugs and their metabolites in urine by LC-MS/MS. *Anal Methods* 2024;16(31):5426-32.
13. Dos Santos BP, Birk L, Pôrto VC, Nascimento SN, Sebben VC, Eller S, de Oliveira TF. A sensitive and comprehensive lc-ms/ms method for the analysis of hallucinogens, synthetic cathinones, and synthetic cannabinoids in urine samples. *J Mass Spectrom.* 2025;60(10):e5178.
14. Gerace E, Bakanova SP, Di Corcia D, Salomone A, Vincenti M. Determination of cannabinoids in urine, oral fluid and hair samples after repeated intake of CBD-rich cannabis by smoking. *Forensic Sci Int.* 2021;318:110561.
15. Marchei E, Rotolo MC, Mannocchi G, Capomassi A, Gómez-Ruiz LM, Acosta-López A, Ramos-Gutiérrez RY, Varela-Busaka MB, Pichini S, García-Algar Ó. Assessment of licit and illicit drugs consumption during pregnancy by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass

- Spectrometry (UHPLC-HRMS) target screening in Mexican women hair. *J Pharm Biomed Anal.* 2022;211:114607.
16. Marchei E, Ferri MA, Torrens M, Farré M, Pacifici R, Pichini S, Pellegrini M. Ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and high-sensitivity gas chromatography-mass spectrometry screening of classic drugs and new psychoactive substances and metabolites in urine of consumers. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):4000.
 17. Trana AD, Mannocchi G, Pirani F, Maida N, Gottardi M, Pichini S, Busardò FP. A comprehensive hplc-ms screening method for 77 new psychoactive substances, 24 classic drugs and 18 related metabolites in blood, urine and oral fluid. *J Anal Toxicol.* 2020;44(8):769-83.
 18. Dimić D. Emerging novel psychoactive substances (2020–2025): GC-MS approaches for separation, detection, and characterization. *Chemosensors.* 2025; 13(12):426.
 19. Al-Asmari AI. Analytical methods for the determination of diamorphine (Heroin) in biological matrices: a review. *Toxics.* 2025;13(10):867.
 20. Di Francesco G, Vincenti F, Montesano C, Bracaglia I, Croce M, Napoletano S, Lombardozzi A, Sergi M. Target and suspect screening of psychoactive substances in seizures and oral fluid exploiting retention time prediction and LC-MS/MS analysis. *Anal Chim Acta.* 2024;1303:342529.
 21. Europa. Decisione della Commissione del 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (2002/657/CE). *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 221, 17.8.2002

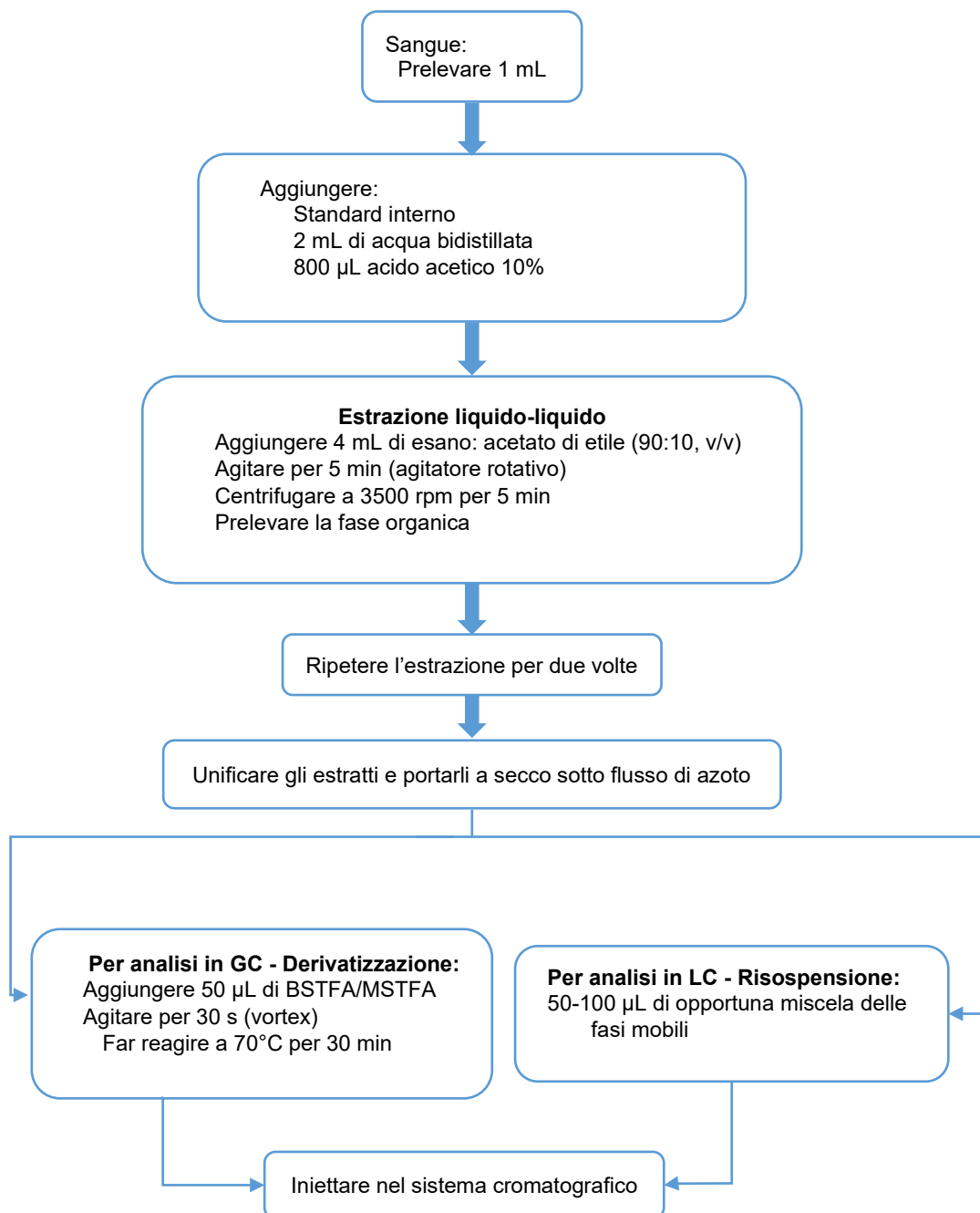
Allegato A1

Esempio di determinazione di oppiacei, cocaina, buprenorfina, metadone, amfetamine e loro metaboliti nel sangue



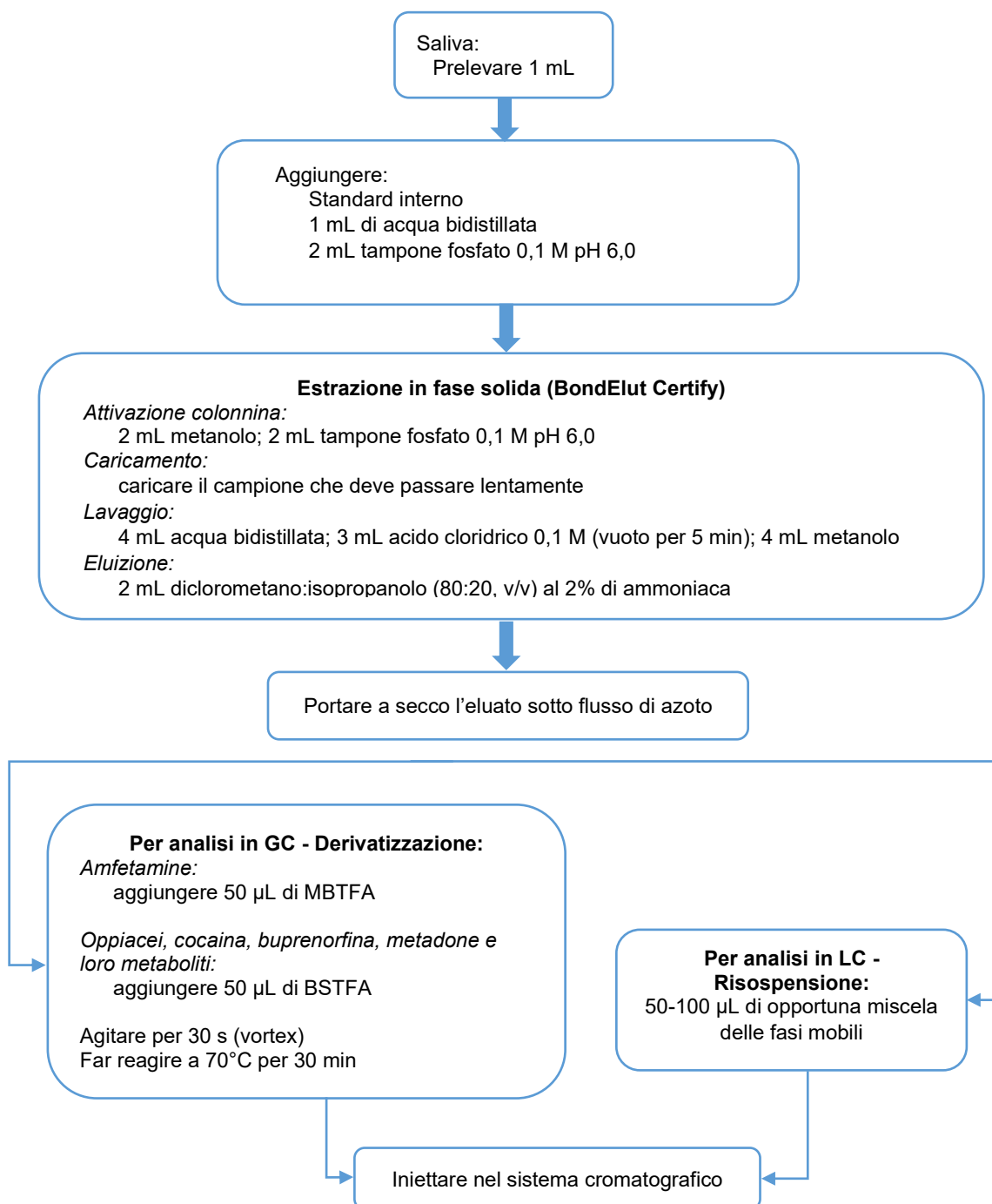
Allegato A2

Esempio di determinazione del delta-9-tetraidrocannabinolo (THC), 11-Nor-9-carbossi-delta-9-tetraidrocannabinolo (THC-COOH) e del 10-idrossi-delta-9-tetraidrocannabinolo (10-OH THC) nel sangue



Allegato A3

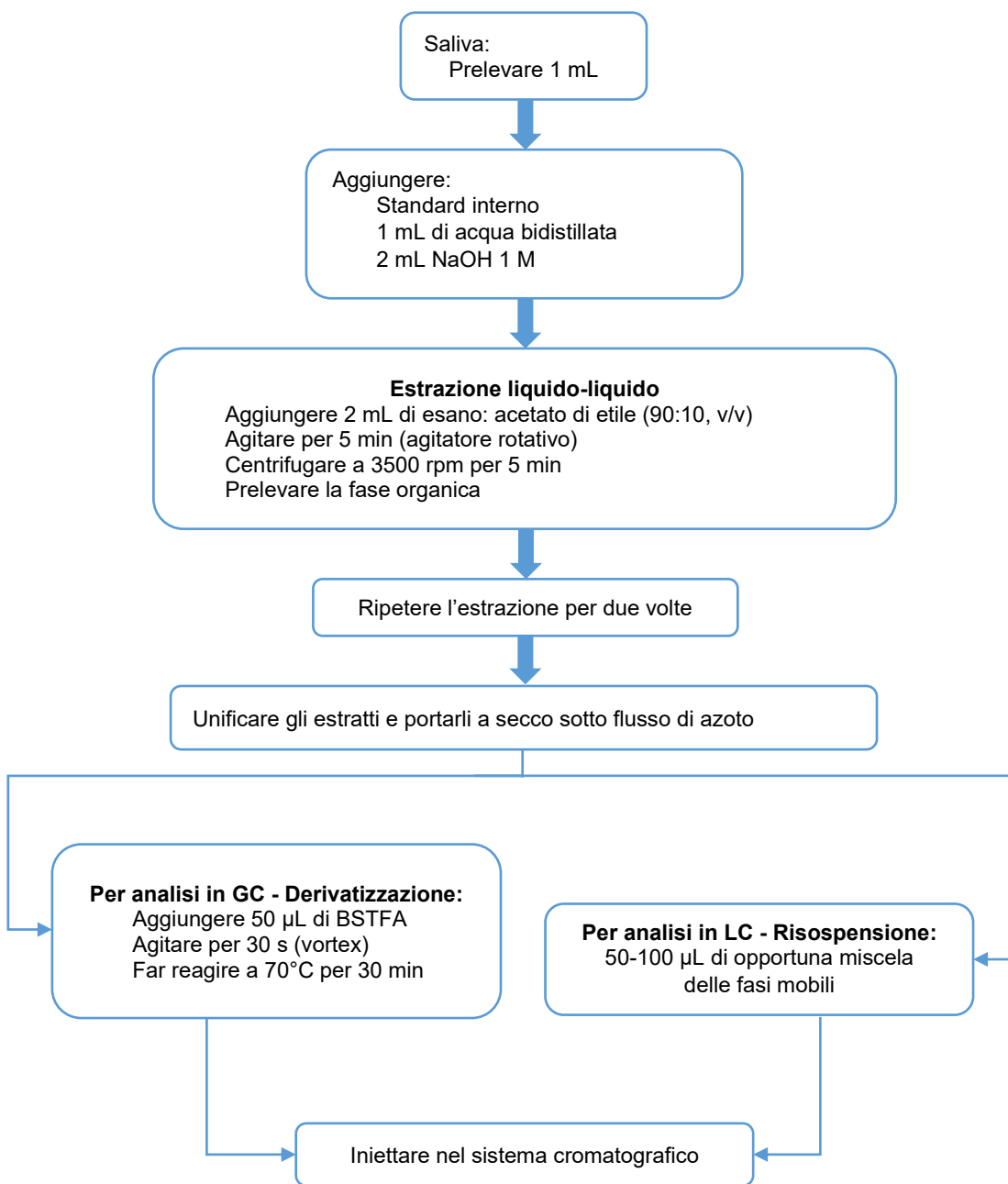
Esempio di determinazione di amfetamine, oppiacei, cocaina, buprenorfina, metadone e loro metaboliti nella saliva*



* Attualmente, numerose procedure analitiche in LC sono basate sull'approccio "dilute and shoot", che prevede la semplice diluizione del campione seguita dall'iniezione diretta nel sistema strumentale.

Allegato A4

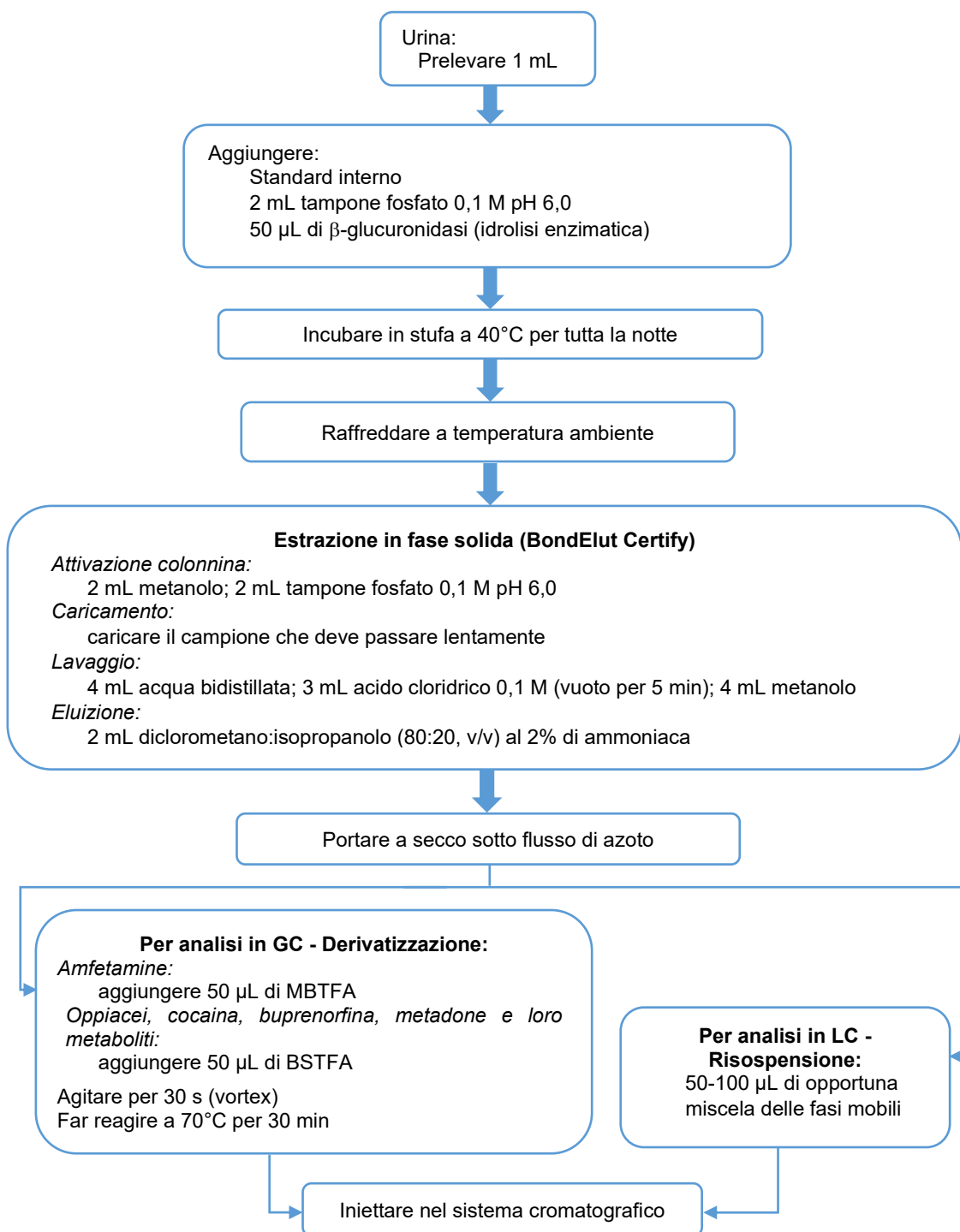
Esempio di determinazione del THC nella saliva*



* Attualmente, numerose procedure analitiche in LC sono basate sull'approccio "dilute and shoot", che prevede la semplice diluizione del campione seguita dall'iniezione diretta nel sistema strumentale.

Allegato A5

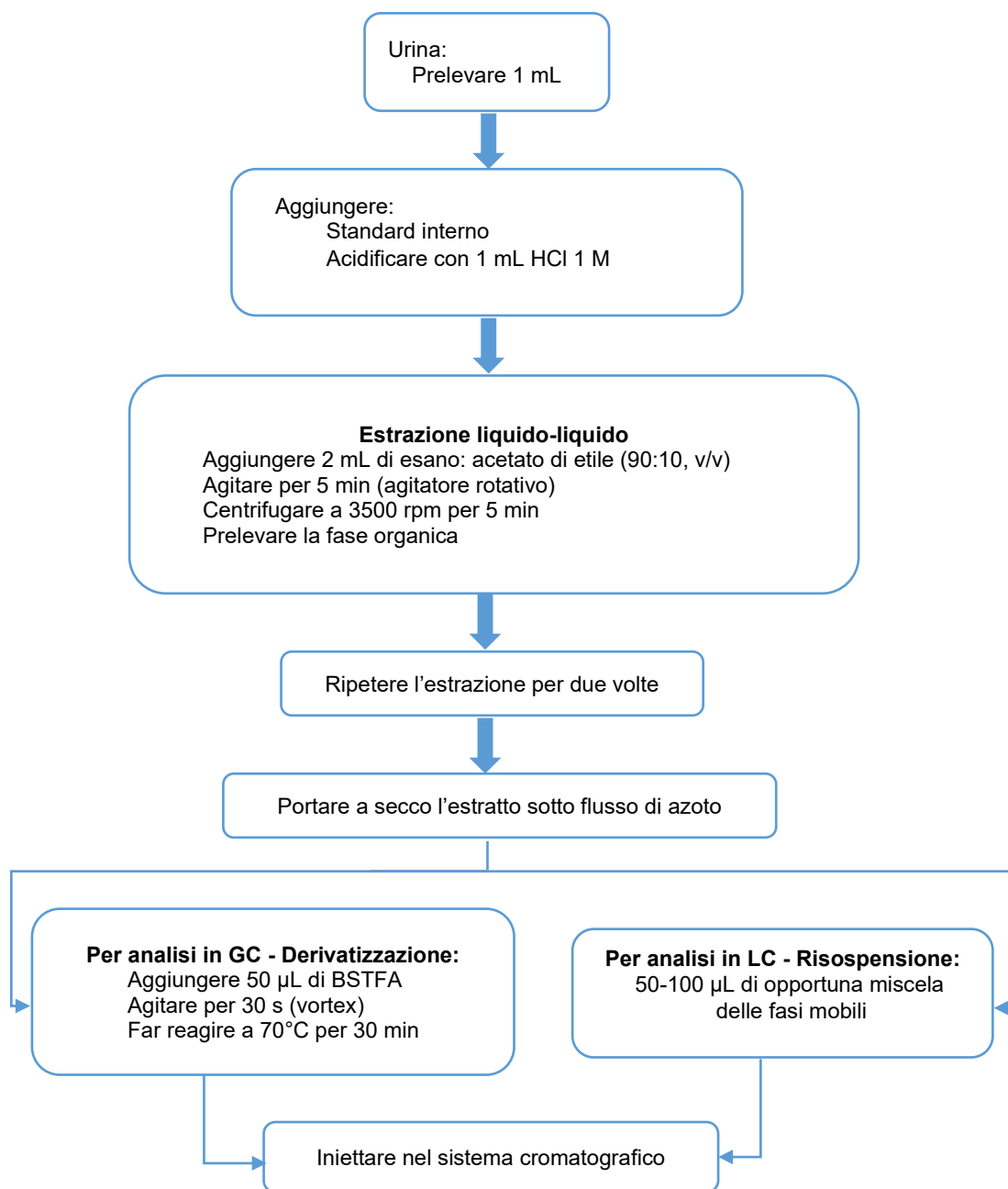
Esempio di determinazione di amfetamine, oppiacei, cocaina, buprenorfina, metadone e loro metaboliti nell'urina*



*Attualmente, numerose procedure analitiche in LC sono basate sull'approccio "dilute and shoot", che prevede la semplice diluizione del campione seguita dall'iniezione diretta nel sistema strumentale.

Allegato A6

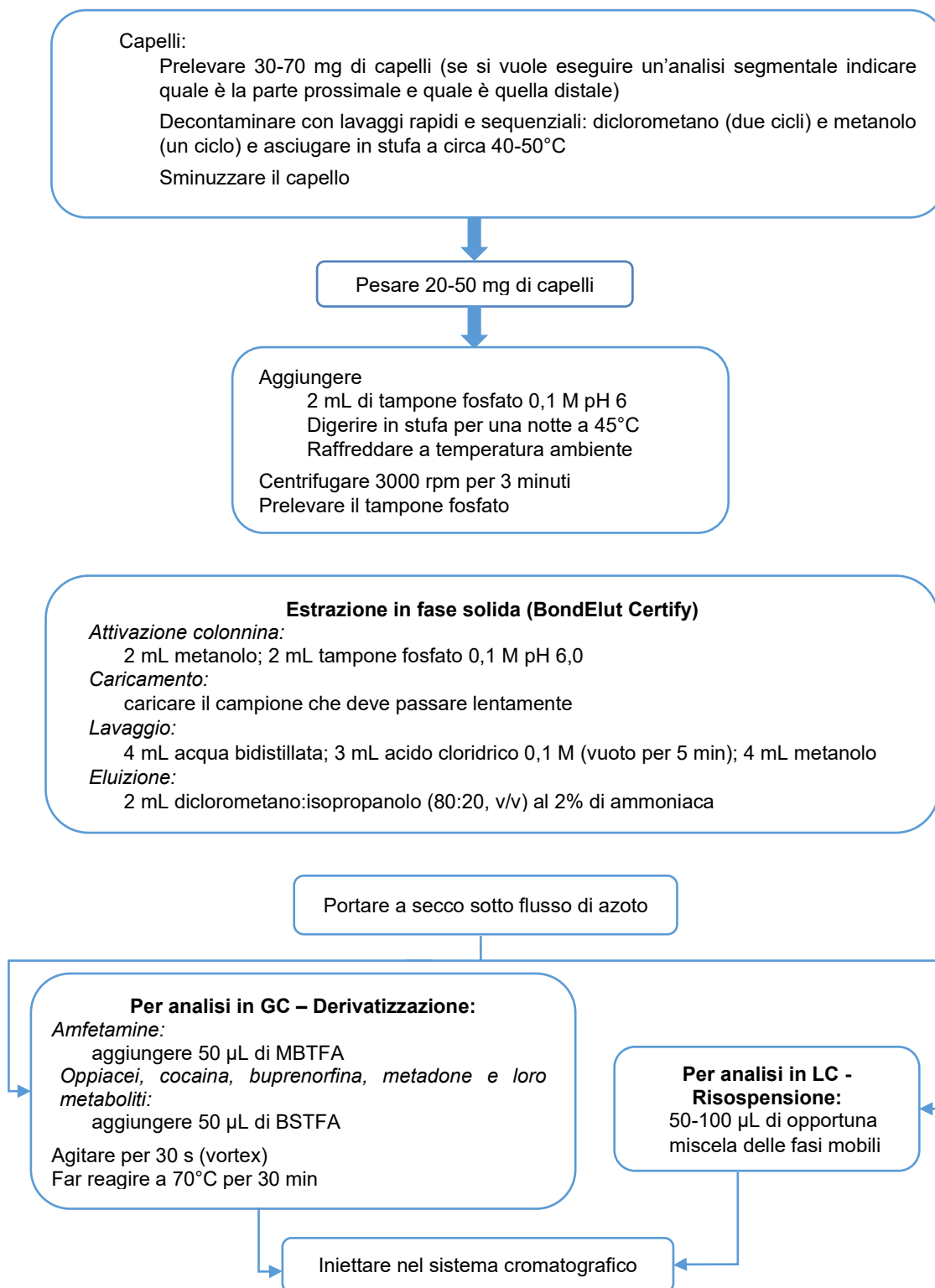
Esempio di determinazione del THC-COOH nell'urina*



*Attualmente, numerose procedure analitiche in LC sono basate sull'approccio "dilute and shoot", che prevede la semplice diluizione del campione seguita dall'iniezione diretta nel sistema strumentale.

Allegato A7

Esempio di determinazione di amfetamine, oppiacei, cocaina, buprenorfina, metadone e loro metaboliti nei capelli



Allegato A8

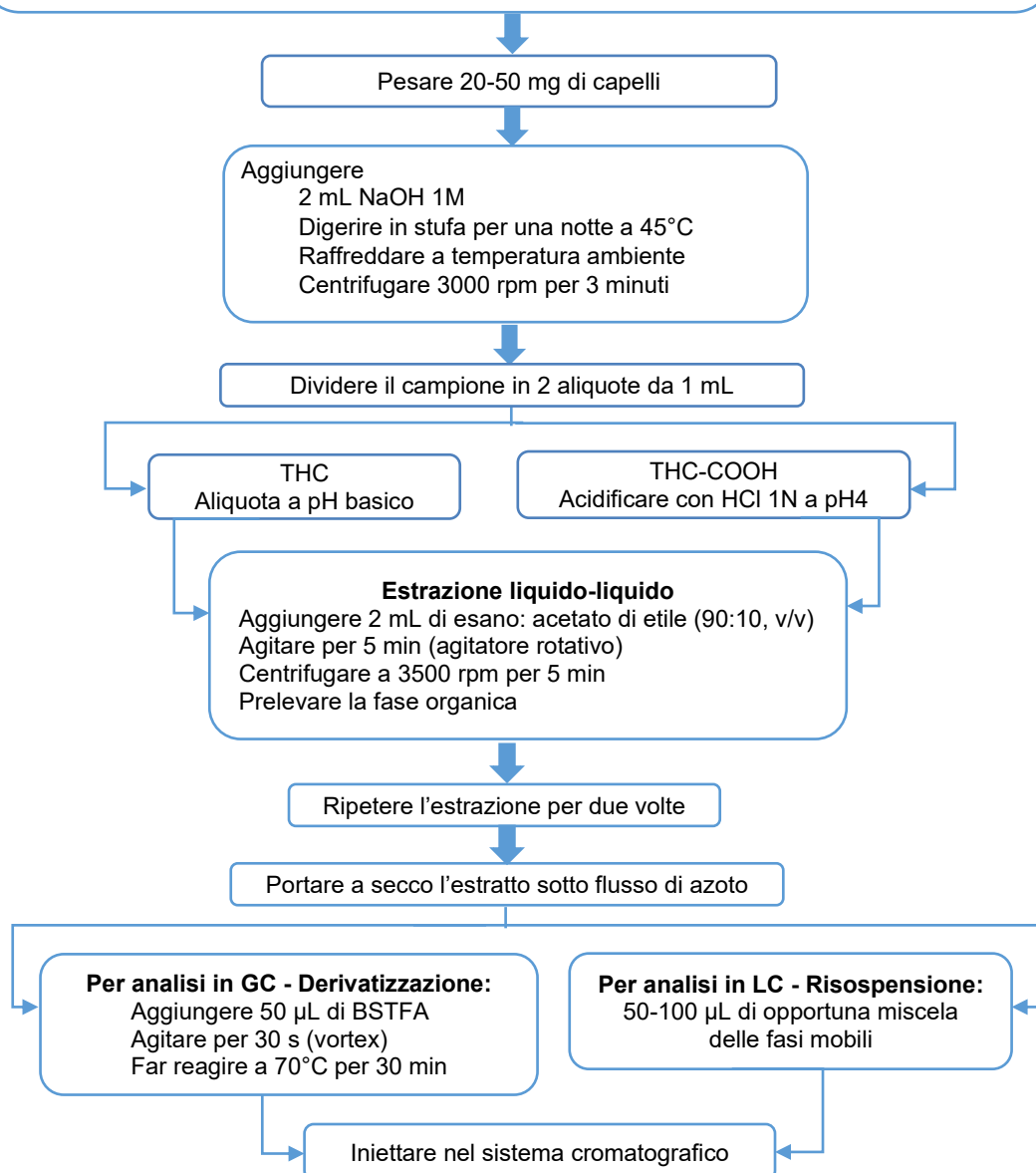
Esempio di determinazione del THC, THC-COOH e 11-OH THC nei capelli

Capelli:

Prelevare 30-70 mg di capelli (se si vuole eseguire un'analisi segmentale indicare quale è la parte prossimale e quale è quella distale)

Decontaminare con lavaggi rapidi e sequenziali: diclorometano (due cicli) e metanolo (un ciclo) e asciugare in stufa a circa 40-50°C

Sminuzzare il capello



APPENDICE B
Esempi di modulistica

B1. Esempio di modulo del consenso informato

MODULO DI CONSENSO INFORMATO Determinazione di sostanze d'abuso e nuove sostanze psicoattive (NPS) nelle matrici biologiche	
Dati della Struttura/Laboratorio: Nome: _____ Indirizzo: _____ Telefono/E-mail: _____	Dati dell'interessato/a Nome e cognome: _____ Data di nascita: _____ Documento di identità (tipo e numero): _____ Indirizzo: _____ E-mail: _____
Finalità dell'esame L'esame richiesto prevede l'analisi di una o più matrici biologiche (capelli, urine, sangue, saliva, altre) al fine di individuare l'eventuale presenza di sostanze d'abuso e/o nuove sostanze psicoattive (NPS). Tale esame può essere svolto per finalità: <ul style="list-style-type: none"> • <input type="checkbox"/> Cliniche • <input type="checkbox"/> Diagnostiche • <input type="checkbox"/> Forensi / medico-legali • <input type="checkbox"/> Amministrative / lavorative • <input type="checkbox"/> Altro (specificare): _____ 	
Descrizione della procedura Il prelievo sarà effettuato da personale sanitario qualificato, nel rispetto delle norme di buona pratica clinica e delle misure di sicurezza igienico-sanitarie. La quantità di campione prelevata sarà limitata al minimo necessario per l'esecuzione delle analisi. Tutti i campioni verranno etichettati, registrati e conservati secondo criteri idonei a garantirne integrità, tracciabilità e sicurezza.	
Possibili rischi e disagi I rischi associati alla procedura sono minimi: <ul style="list-style-type: none"> • nel caso del prelievo di sangue: lieve dolore, arrossamento o piccolo ematoma nel punto di puntura; • nel caso del prelievo di capelli: nessun rischio significativo; • nel caso della raccolta di urine o saliva: nessun rischio. 	
Riservatezza e trattamento dei dati I dati personali e i risultati analitici saranno trattati nel rispetto della normativa vigente (Regolamento Europeo UE 2016/679) in materia di protezione dei dati personali e utilizzati esclusivamente per le finalità indicate e potranno essere comunicati alle autorità competenti, se previsto dalla legge.	
Consenso Il sottoscritto dichiara: <ul style="list-style-type: none"> • di aver preso visione delle informazioni privacy sul trattamento dei dati personali (ex art. 13 Regolamento UE 2016/679 del Parlamento Europeo e del Consiglio), che ne ha compreso il contenuto e che ha avuto il tempo per riflettere al fine di esprimere la propria dichiarazione; • di essere stato informato in modo chiaro e comprensibile circa le finalità, le modalità e i rischi della procedura; • di aver compreso che il rifiuto a fornire il campione può comportare conseguenze legali o amministrative nei casi previsti dalla normativa vigente. e di acconsentire volontariamente: <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> alla raccolta e all'analisi delle matrici biologiche; <input type="checkbox"/> alla conservazione del campione per il tempo necessario alle verifiche analitiche; <input type="checkbox"/> alla comunicazione dei risultati agli enti/personale autorizzato indicati. 	
Firma dell'interessato/a Dichiaro di aver letto attentamente il presente modulo, di aver ricevuto spiegazioni esaurienti e di aver compreso i contenuti. Firma dell'interessato/a: _____ Data: ___ / ___ / ___	In caso di soggetto minorenni o incapace Io sottoscritto/a _____, in qualità di (genitore/tutore/amministratore di sostegno), acconsento alla raccolta del campione biologico del minore/incapace _____ per le finalità sopra descritte. Firma del rappresentante legale: _____ Data: ___ / ___ / ___
Firma dell'operatore incaricato Nome e cognome: _____ Firma dell'operatore: _____ Data: ___ / ___ / ___	

B2. Esempio di modulo informativa e consenso privacy

MODULO INFORMATIVA E CONSENSO PRIVACY Determinazione di sostanze d'abuso e nuove sostanze psicoattive (NPS) nelle matrici biologiche	
Titolare del trattamento: Nome: _____ Indirizzo: _____ Telefono/E-mail: _____	
Finalità del trattamento: <input type="checkbox"/> Analisi cliniche e diagnostiche <input type="checkbox"/> Analisi medico/legali <input type="checkbox"/> Eventuale ricerca scientifica autorizzata <input type="checkbox"/> Monitoraggio della salute	
Tipologia di dati trattati: Dati dell'interessato/a <ul style="list-style-type: none">• Nome e cognome: _____	
Matrici biologiche prelevate: <ul style="list-style-type: none">• <input type="checkbox"/> Sangue• <input type="checkbox"/> Saliva• <input type="checkbox"/> Urine• <input type="checkbox"/> Matrici cheratiniche• <input type="checkbox"/> Altro (specificare): _____	
Modalità di trattamento: I dati saranno trattati in forma cartacea o digitale da personale autorizzato, garantendo riservatezza e sicurezza.	
Comunicazione dei dati: Solo a personale medico autorizzato, laboratori convenzionati o autorità sanitarie, se previsto dalla legge.	
Conservazione: I dati saranno conservati secondo la normativa vigente e solo per il tempo necessario.	
Diritti dell'interessato: Accesso, rettifica, cancellazione, limitazione o opposizione al trattamento, portabilità dei dati, revoca del consenso in qualsiasi momento.	
Consenso: Dichiaro di aver ricevuto e compreso l'informativa e acconsento al prelievo e al trattamento dei miei dati personali e delle matrici biologiche per le finalità indicate. <input type="checkbox"/> Sì, acconsento <input type="checkbox"/> No, non acconsento	
Luogo e data: _____ Firma del paziente: _____ Firma operatore responsabile: _____	

B3. Esempio di verbale di prelievo del campione biologico

MODULO DI PRELIEVO Determinazione di sostanze d'abuso e nuove sostanze psicoattive (NPS) nelle matrici biologiche	
Dati della Struttura/Laboratorio: Nome: _____ Indirizzo: _____ Telefono/E-mail: _____	Dati dell'interessato/a Nome e cognome: _____ Data di nascita: _____ Documento di identità (tipo e numero): _____ Indirizzo: _____ E-mail: _____
Tipo di matrice prelevata	
<input type="checkbox"/> Sangue Tipo di provetta: <input type="checkbox"/> EDTA <input type="checkbox"/> Eparina <input type="checkbox"/> Fluoruro/ossalato <input type="checkbox"/> Altro Volume raccolto: _____ mL Ora: _____ Data: _____	<input type="checkbox"/> Saliva Dispositivo utilizzato: _____ Ora: _____ Data: _____
<input type="checkbox"/> Urine Volume raccolto: _____ mL Temperatura alla consegna: _____ °C Ora: _____ Data: _____	<input type="checkbox"/> Capelli Sede del prelievo: _____ Lunghezza campione: _____ cm Quantità approssimativa (peso/ciocche): _____ Ora: _____ Data: _____
Eventuali anomalie osservate: _____ _____	
Conservazione e trasporto Numero di campione / etichetta: _____ Metodo di conservazione: <input type="checkbox"/> Temperatura ambiente <input type="checkbox"/> Refrigerato (4 °C) <input type="checkbox"/> Altro: _____ Laboratorio di destinazione: _____	
Note aggiuntive: _____ _____	
Firma dell'interessato/a Dichiaro che il prelievo è stato effettuato alla mia presenza e che i dati riportati corrispondono al vero. Firma dell'interessato/a: _____ Data: ___ / ___ / ___	In caso di soggetto minorenne o incapace Io sottoscritto/a _____, in qualità di (genitore/tutore/amministratore di sostegno), dichiaro che il prelievo effettuato sul minore/incapace è avvenuto alla mia presenza e che i dati riportati corrispondono al vero. Firma del rappresentante legale: _____ Data: ___ / ___ / ___
Firma dell'operatore incaricato Io sottoscritto, operatore incaricato del prelievo, dichiaro che il campione è stato raccolto secondo procedure standardizzate, garantendo tracciabilità, integrità e catena di custodia. Nome e cognome: _____ Firma dell'operatore: _____ Data: ___ / ___ / ___	

B4. Esempio di modulo di catena di custodia

MODULO DI CATENA DI CUSTODIA Determinazione di sostanze d'abuso e nuove sostanze psicoattive (NPS) nelle matrici biologiche					
Tipo di accertamento:					
<hr/>					
Tipo di matrice					
Tipo di matrice:					
<input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Urine <input type="checkbox"/> Saliva <input type="checkbox"/> Capelli <input type="checkbox"/> Altro: _____					
Codice univoco del campione: _____					
Data e ora del prelievo: ___/___/___ : ___					
Condizioni del campione al prelievo:					
<input type="checkbox"/> Integro <input type="checkbox"/> Non integro (specificare): _____					
Confezionamento:					
<input type="checkbox"/> Contenitore sterile <input type="checkbox"/> Busta di carta <input type="checkbox"/> Foglio di alluminio <input type="checkbox"/> Altro: _____					
<hr/>					
Attività	Data e ora	Consegna (nome, firma)	Ricevuta (nome, firma)	Condizioni campione	Note
Prelievo → Consegna 1					
Consegna 1 → Consegna 2					
Consegna 2 → Laboratorio					
Analisi interna					
Conservazione/archiviazione					
Smaltimento (se previsto)					
<hr/>					
Trasporto					
Modalità di trasporto:					
<input type="checkbox"/> Manuale <input type="checkbox"/> Corriere <input type="checkbox"/> Catena del freddo <input type="checkbox"/> Altro: _____					
Temperatura di trasporto (se applicabile): _____ °C					
Eventuali anomalie: _____					
<hr/>					
Note aggiuntive:					
<hr/>					
Firma operatore responsabile finale					
Dichiaro che tutte le operazioni relative al campione sono state effettuate nel rispetto delle procedure e che la tracciabilità è stata garantita in ogni fase.					
Nome e cognome: _____					
Firma dell'operatore: _____ Data: ___/___/___					

B5. Esempio di modulo per la refertazione

MODULO PER LA REFERTAZIONE				
Determinazione di sostanze d'abuso e nuove sostanze psicoattive (NPS) nelle matrici biologiche				
Dati della Struttura/Laboratorio:		Dati dell'interessato/a		
Nome: _____		Nome e cognome: _____		
Indirizzo: _____		Data di nascita: _____		
Responsabile del laboratorio: _____		Documento di identità (tipo e numero): _____		
Telefono/E-mail: _____		Indirizzo: _____		
		E-mail: _____		
Tipo di campione analizzato				
<input type="checkbox"/> Urine <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Saliva <input type="checkbox"/> Capelli <input type="checkbox"/> Sudore <input type="checkbox"/> Altro: _____				
Codice del campione: _____				
Data e ora del prelievo: ___/___/___ : ___				
Data e ora di ricezione in laboratorio: ___/___/___ : ___				
Metodologia analitica				
Tecnica utilizzata:				
<input type="checkbox"/> LC-MS/MS <input type="checkbox"/> GC-MS <input type="checkbox"/> GC-FID <input type="checkbox"/> Immunochimica <input type="checkbox"/> Altra: _____				
Metodo validato n.: _____				
Limite di rilevabilità (LOD): _____				
Limite di quantificazione (LOQ): _____				
Analiti ricercati				
(Elenco completo o selezionare categorie)				
<input type="checkbox"/> Oppioidi				
<input type="checkbox"/> Cocaina e metaboliti				
<input type="checkbox"/> Amfetamine / Metamfetamine				
<input type="checkbox"/> Cannabis (THC, THCA, metaboliti)				
<input type="checkbox"/> Benzodiazepine				
<input type="checkbox"/> Alcol / EtG / EtS				
<input type="checkbox"/> Nuove sostanze psicoattive (NPS): _____				
<input type="checkbox"/> Altro: _____				
Risultati dell'analisi				
(Indicare concentrazioni, unità di misura o esito qualitativo) Interpretazione preliminare:				
Analita	Risultato	Valore di riferimento / Cut-off	Unità di misura	Incertezza di misura
Interpretazione e conclusioni				
Indicare in modo chiaro l'esito dell'analisi.				
<input type="checkbox"/> Esito negativo: nessuna sostanza rilevata oltre il limite di rilevabilità.				
<input type="checkbox"/> Esito positivo: presenza di _____				
• Livelli rilevati coerenti con _____				
<input type="checkbox"/> Esito non interpretabile a causa di:				
<input type="checkbox"/> Campione insufficiente				
<input type="checkbox"/> Degradazione del campione				
<input type="checkbox"/> Interferenze analitiche				
<input type="checkbox"/> Altro: _____				
Firma dell'operatore incaricato				
Io sottoscritto, operatore incaricato del prelievo, dichiaro che il campione è stato raccolto secondo procedure standardizzate, garantendo tracciabilità, integrità e catena di custodia.				
Nome e cognome: _____				
Firma dell'operatore: _____ Data: ___/___/___				

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di aprile 2026, 4° Suppl.*

*Stampato in proprio
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, aprile 2026