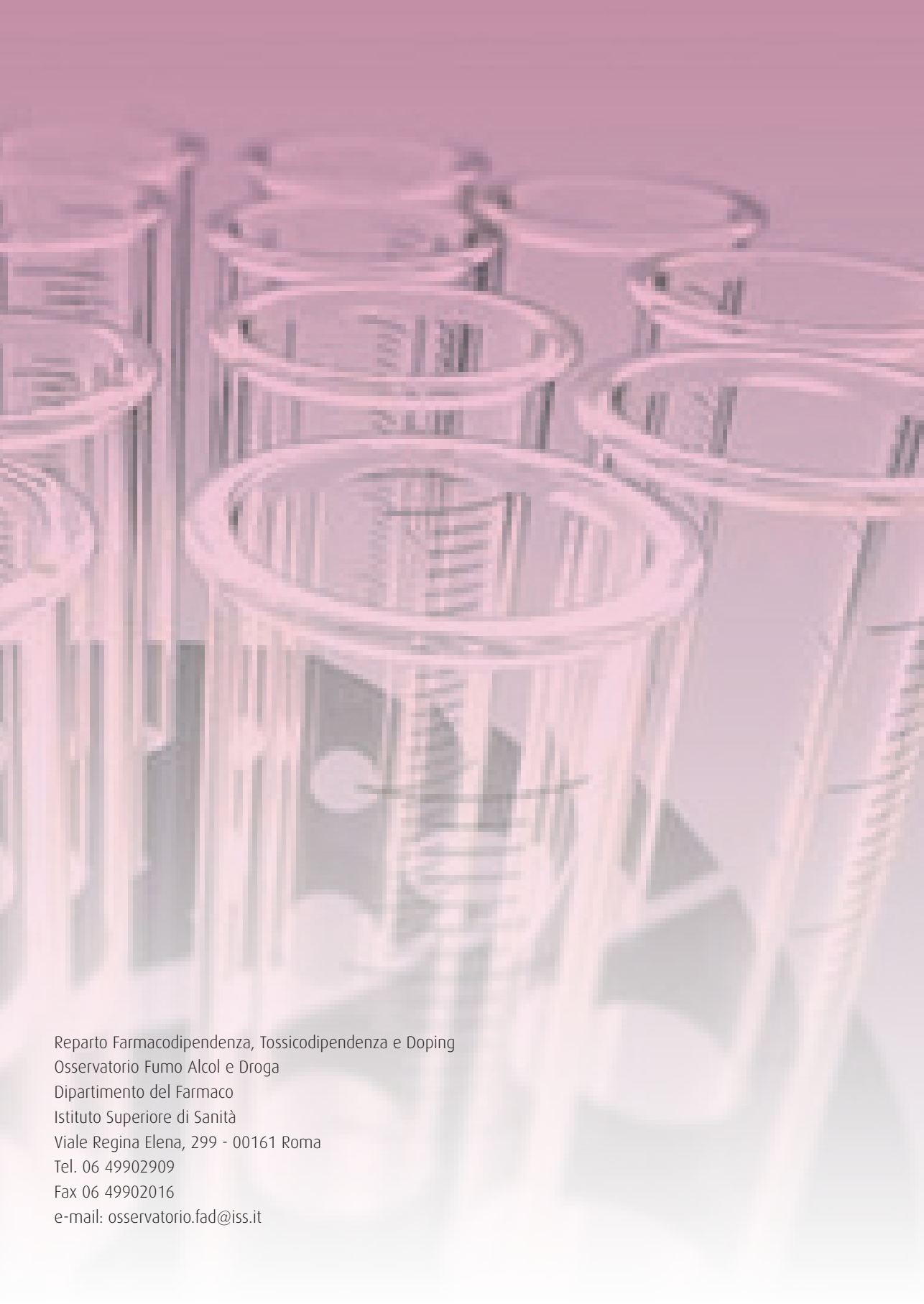


LINEE GUIDA PER LA **DETERMINAZIONE** DELLE **SOSTANZE D'ABUSO** NELLA **SALIVA**

A cura di Simona Pichini e Roberta Pacifici

SALIV





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

LINEE GUIDA PER LA DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE D'ABUSO NELLA SALIVA

Autori

Simona Pichini e Roberta Pacifici

In collaborazione con

Claudia Mortali

Patrizia Gori

Emilia Marchei

Laura Martucci

Ilaria Palmi

Manuela Pellegrini

Maria Concetta Rotolo

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



INDICE

1. Generalità	p. 9
1.1 Introduzione	p. 9
1.2 Obiettivi e campi d'applicazione	p. 10
1.3 Procedure per la catena di custodia	p. 11
1.4 Sicurezza del laboratorio	p. 11
1.5 Personale di laboratorio	p. 11
2. Il prelievo del campione	p. 13
2.1 Introduzione	p. 13
2.2 Modalità di raccolta	p. 14
2.3 Kit per la raccolta del campione di saliva	p. 15
2.4 Moduli per il verbale di prelievo	p. 16
2.5 Moduli per la catena di custodia	p. 17
3. Procedure per le analisi di laboratorio	p. 18
3.1 Introduzione	p. 18
3.2 Ricezione del campione (Accettazione)	p. 18
3.3 Analisi di screening	p. 19
3.4 Analisi di conferma	p. 20
3.5 Cut-off	p. 22

4. Consegna dei risultati analitici	p. 24
4.1 Comunicazione dei risultati analitici	p. 24
4.2 Conservazione dei campioni	p. 25
5. Contestazione dei risultati	p. 26
6. Assicurazione della Qualità delle analisi	p. 27
6.1 Assicurazione di qualità	p. 27
6.2 Validazione delle metodologie d'analisi	p. 27
6.3 Controllo di qualità interno	p. 29
6.3.1 <i>Analisi di screening</i>	p. 31
6.3.2 <i>Analisi di conferma</i>	p. 32
6.4 Valutazione Esterna di Qualità (VEQ)	p. 33
6.5 Analisi per conto terzi	p. 33

Appendice A

Organizzazione del personale del laboratorio p. 37

Appendice B

Esempio di dichiarazione di consenso informato da parte della persona sottoposta ad accertamento analitico p. 41

Appendice C

Esempio di un verbale di prelievo p. 42

Appendice D

Esempio di modulo di catena di custodia p. 43

Appendice E

Alcuni esempi di non-conformità nella catena di custodia p. 44

Appendice F

Criteri cromatografici e di spettrometria di massa per l'accettabilità di un risultato p. 45

Appendice G

Procedure Operative Standard (POS) per l'analisi delle principali sostanze d'abuso nella saliva p. 47

Appendice H

Parametri principali nella validazione di un metodo analitico per la ricerca di sostanze d'abuso nella saliva p. 50

Bibliografia

p. 51

Letteratura consigliata sulle analisi di sostanze d'abuso nella saliva

p. 56



1. Generalità

1.1 Introduzione

La saliva è una matrice biologica alternativa al sangue, idonea per la determinazione di xenobiotici e/o delle sostanze d'abuso e/o metaboliti in campo clinico, per dimostrarne l'attualità d'uso nella guida, nello svolgimento di mansioni lavorative particolari e nell'ambito medico-legale.

I principali vantaggi della saliva sono legati alla semplicità e non invasività nella raccolta del campione che può essere effettuata senza la necessità di disporre di luogo di raccolta dedicato né sotto osservazione di personale medico o paramedico. Inoltre il rischio di infezione è minore rispetto a quello che potrebbe avvenire durante il prelievo di sangue.

La saliva è una matrice biologica con un pH più acido rispetto a quello del sangue e pertanto tutte le sostanze psicoattive lipofile, con una natura di base debole, un basso peso molecolare ed un legame alle proteine del sangue inferiore al 50%, vengono preferenzialmente escrete nella saliva per diffusione passiva della frazione libera della sostanza nella sua forma ionizzata.

Generalmente la molecola parente è la principale sostanza (a volte unica) che può essere misurata nella saliva e la sua concentrazione è verosimilmente proporzionale alla frazione libera presente nel plasma. Tale misurazione rende quindi possibile la correlazione tra concentrazione della sostanza ed effetti farmacologici della stessa sull'individuo.

Le prime linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nella saliva furono proposte nel 2004 negli Stati Uniti dal "Substance Abuse and Mental Health Service Administration" (SAMHSA)¹ ed erano indirizzate soprattutto alle analisi effettuabili sul posto di lavoro per determinare l'eventuale uso di sostanze. Recentemente anche la "European Workplace Drug Testing Society (EWDTS)"² ha redatto delle linee guida europee, anch'esse orientate alle analisi sul posto di lavoro.

1.2 Obiettivi e campi d'applicazione

Schematizzando, le presenti linee guida intendono:

- fornire garanzie a tutela della dignità dei soggetti sottoposti all'analisi ed assicurare la validità dei campioni prelevati;
- definire, per tutti i laboratori, criteri comuni di assicurazione e controllo della qualità accreditabili da un organismo esterno.

1.3 Procedure per la catena di custodia

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze d'abuso nella matrice salivare, devono istituire una catena di custodia dei campioni al fine di documentare il controllo e la tracciabilità degli stessi dal momento del prelievo alla loro accettazione nel laboratorio che effettua le analisi, fino al completamento delle analisi, inclusi la refertazione del risultato, la conservazione e lo smaltimento finale del materiale residuo. La registrazione dei dati relativi alla catena di custodia dovrebbe essere conservata su carta o su supporto informatico, per un periodo di tempo non inferiore ai 5 anni salvo diverse disposizioni legislative.

1.4 Sicurezza del laboratorio

Il laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze d'abuso nella saliva e più in generale su matrici biologiche, devono disporre di un solido sistema di sicurezza tale da garantire il divieto di accesso al personale non autorizzato all'entrata nelle aree del laboratorio dove si svolgono le analisi e/o nelle aree in cui sono conservati i campioni e la documentazione.

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

1.5 Personale di laboratorio

Solamente il personale qualificato, la cui competenza sia stata formalmente riconosciuta, può lavorare all'interno del laboratorio. I ruoli, le qualifiche e le responsabilità sono descritte

2. Il prelievo del campione

2.1 Introduzione

La raccolta del campione deve essere effettuata da personale qualificato ed autorizzato, che deve spiegare la procedura di raccolta alla persona sottoposta ad accertamento analitico, deve compilare il verbale di prelievo, il modulo della catena di custodia e far firmare il consenso informato. È essenziale predisporre delle Procedure Operative Standard (POS) relative alla raccolta, alla conservazione del campione, alla formazione del personale addetto al prelievo e alla spedizione del campione al laboratorio che effettuerà l'analisi tossicologica. Tali procedure devono essere seguite scrupolosamente.

Occorre documentare accuratamente:

- il rispetto della privacy e della sicurezza della persona sottoposta ad accertamento analitico;
- l'identità della persona sottoposta ad accertamento analitico;
- la sede dove è avvenuto il prelievo;
- che non abbia avuto luogo alcuna falsificazione o manomissione del campione;
- che sia stato compilato in ogni sua parte il modulo del consenso informato da parte della persona sottoposta all'accertamento analitico (Appendice B);
- l'utilizzo da parte della persona sottoposta ad accertamento analitico di particolari medicinali che possano interferire con i risultati analitici;
- la tracciabilità del campione attraverso opportune registrazioni delle movimentazioni dello stesso, dal luogo del prelievo sino alla ricezione in laboratorio, incluse le registrazioni dell'identità del personale autorizzato alla sua manipolazione.

2.2 Modalità di raccolta

[illegible]

L'etichetta identificativa, emessa in fase di registrazione o accertazione del campione biologico, deve contenere i principali dati anagrafici della persona sottoposta accertamento analitico (nome e cognome, data di nascita e codice univoco di identificazione). Nell'etichetta devono essere apposte le firme della persona sottoposta accertamento analitico e della persona che ha effettuato la raccolta del campione.

Al soggetto sottoposto al controllo sarà chiesto di leggere e firmare il verbale di prelievo e il consenso informato. Il responsabile del prelievo conserverà il consenso informato firmato dal soggetto e invierà il modulo della catena di custodia, insieme al verbale di prelievo e ai campioni, alla struttura che effettuerà le analisi. Se i campioni non vengono spediti sul momento, il responsabile dovrà provvedere alla loro idonea conservazione e alle condizioni di sicurezza degli stessi.

2.3 Moduli per il verbale di prelievo

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

- i dati relativi al responsabile del prelievo;
- i dati relativi alla persona sottoposta ad accertamento analitico (generalità, residenza, numero documento d'identità, etc.) Se il soggetto non possiede un documento d'identità valido, sarà possibile procedere all'identificazione dello stesso mediante l'ausilio di un supervisore autorizzato o di un testimone con documento di identità. Se l'identità del soggetto non può essere accertata, il responsabile non potrà procedere al prelievo del campione;
- i dati relativi al prelievo per l'identificazione univoca del campione (codice di identificazione, struttura/reparto ove viene effettuato il prelievo, etc.);

- Verrà infine apposta la firma sia di chi ha effettuato il prelievo che della persona sottoposta ad accertamento analitico. Un esempio di modulo per il verbale di prelievo è riportato in Appendice C.

Delle tre copie del verbale di prelievo, una viene consegnata alla struttura che effettua l'analisi insieme ai campioni da analizzare e al modulo di catena di custodia, una copia viene conservata dalla struttura/incaricato che ha effettuato il prelievo di saliva e una copia viene consegnata alla persona sottoposta ad accertamento analitico.

Il kit per il prelievo del campione deve includere:

I campioni di saliva devono essere conservati a $+4^{\circ}$ - $+8^{\circ}\text{C}$ per un massimo di 24 ore, o per periodi di tempo superiori alle 24 ore a -20°C .

2.5 Moduli per la catena di custodia

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

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

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

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

3. Procedure per le analisi di laboratorio

3.1 Introduzione

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

3.2 Ricezione del campione (Accettazione)

Al laboratorio di analisi devono pervenire il contenitore termico contenente le aliquote A e B del campione di saliva, il corrispondente modulo della catena di custodia ed il verbale di prelievo. Nel momento in cui il campione viene accettato in laboratorio, occorre verificare:

- l’integrità dell’imballaggio, onde poter escludere la manomissione del campione durante il trasporto;
- che le informazioni apposte sopra i contenitori delle due aliquote del campione di saliva corrispondano a quelle annotate nel modulo per la catena di custodia.

In caso di non conformità delle aliquote A e B, il laboratorio è tenuto a redigere un apposito verbale che deve essere trasmesso alla struttura che ha richiesto l’accertamento analitico.

In Appendice E viene elencata una serie di non conformità nella catena di custodia che può essere utilizzata come guida. Queste non conformità comportano l'impossibilità a procedere alle analisi del campione e al rigetto dello stesso.

3.3 Analisi di screening

È possibile effettuare uno screening iniziale per la ricerca di classi di sostanze d'abuso utilizzando sia tecniche immunochimiche che siano state validate per la matrice salivare e siano vendute con tale indicazione, che tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa.

I test immunochimici comunemente utilizzati per lo screening di sostanze stupefacenti e/o metaboliti in saliva utilizzano sistemi di rivelazione differenti (polarizzazione della luce fluorescente-FPIA, inibizione di una attività enzimatica-EMIT o DRI, interazione cinetica di microparticelle in soluzione KIMS, attivazione di un enzima per la formazione di un prodotto colorato CEDIA, etc.), ma uno stesso principio di reazione antigene-anticorpo in cui gli analiti (sostanze stupefacenti e/o metaboliti) nella saliva competono con un analita od un enzima presenti nel test di screening.

I metodi immunochimici di screening sono generalmente caratterizzati da costi contenuti, tempi di esecuzione rapidi, elevata o totale automazione ma, per contro, da ridotta specificità ed elevata inaccuratezza del risultato quantitativo, in particolare quando nel campione sono presenti più specie chimiche in grado di essere rilevate, ma non discriminate dal metodo (ad esempio composto immodificato e suoi metaboliti).

Questi metodi, per le loro caratteristiche intrinseche, producono esclusivamente un risultato di tipo qualitativo, vale a dire la probabile positività (meglio definita come "non negatività") del campione rispetto a un analita, o più spesso a una classe di sostanze, relativamente a un valore di cut-off prestabilito.

Dal momento che l'esito negativo di un'analisi di screening è generalmente accettato come valido, è essenziale verificare che il metodo sia in grado di minimizzare il numero falsi negativi.

I test di screening vengono effettuati mediante l'impiego di reagenti e di calibratori direttamente forniti dalle ditte produttrici purché l'analisi sia eseguita secondo le indicazioni e il valore di cut-off definiti dal produttore.

Le tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa tandem o all'analizzatore a tempo di volo, anche se meno veloci per lo screening di un gran numero di campioni, hanno il vantaggio di poter identificare simultaneamente in un'unica analisi una vasta gamma di analiti differenti. Tuttavia queste metodiche analitiche non sono frequentemente a disposizione dei laboratori e richiedono una elevata expertise da parte del personale che opera in laboratorio.

Raccomandazioni per le analisi di screening:

- è necessario che i test di screening abbiano una sensibilità tale da rilevare le concentrazioni degli analiti rispetto ad un cut-off prestabilito. È auspicabile inoltre che il livello di imprecisione sia inferiore al 10%;
- la matrice salivare non deve interferire con il test immunochimico;
- tutti i risultati positivi ai test di screening devono essere confermati utilizzando una metodica per l'analita ricercato, tipicamente una tecnica separativa cromatografica accoppiata ad una tecnica di rivelazione quale la spettrometria di massa.

3.4 Analisi di conferma

I metodi di conferma debbono garantire l'identificazione certa e la quantificazione accurata delle sostanze di interesse (sostanze parenti e/o loro metaboliti) con idonea sensibilità e specificità.

Le analisi di conferma devono essere basate su tecniche in grado sia di identificare la struttura chimica dell'analita in esame che di distinguere un composto da un altro.

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

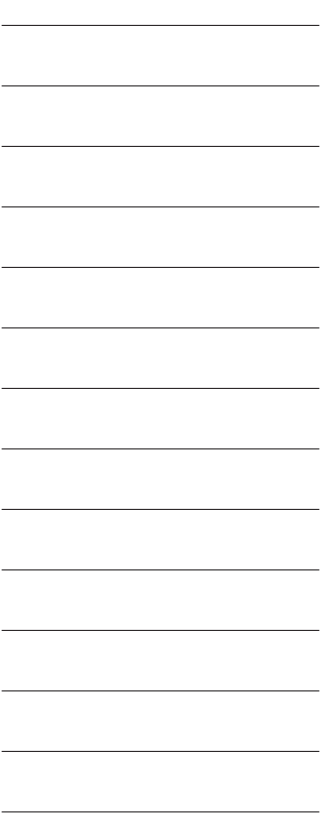
Il valore soglia (cut-off) dei test di conferma deve essere ad una concentrazione più bassa rispetto a quello dei test immunochimici.

In Appendice F vengono illustrati i criteri di accettabilità di una analisi separativa cromatografica e successiva identificazione e quantificazione in spettrometria di massa. I campioni le cui concentrazioni per una determinata sostanza d'abuso risultino al di sotto dei cut-off stabiliti per le analisi di conferma devono essere considerati negativi per quella sostanza. Normalmente non si rendono necessarie ulteriori analisi ed il campione può essere eliminato secondo le modalità stabilite dalle normative vigenti.

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

I campioni che contengono le sostanze d'abuso e/o i loro metaboliti a concentrazioni uguali o superiori ai cut-off prestabiliti, sono considerati positivi. L'aliquota B di un campione risultato positivo va conservata in apposito congelatore provvisto di chiave per un periodo concordato con chi richiede l'analisi (clinico, autorità amministrativa o giudiziaria) o secondo quanto previsto dalla legge. Tale periodo di conservazione deve essere riportato nelle POS.

3.5 Cut-off



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

Nelle Tabelle 1 e 2 vengono riportati i valori di cut-off per le analisi di screening e per le analisi di conferma nella ricerca di sostanze d’abuso nella saliva presenti nelle indicazioni per i test sul luogo di lavoro del “Substance Abuse and Mental Health Service Administration (SAHMSA) statunitense⁴, indicati dalla European Workplace Drug Testing Society (EWTS)² ed infine suggeriti nelle linee guida del Gruppo dei Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)⁵. Tali cut-off sono uguali nel caso di alcune sostanze, nel caso di altre differenti in quanto rispecchiano realtà di consumo diverse presenti nei due paesi, gli Stati Uniti e l’Italia. Non esistono al momento in Italia valori soglia stabiliti per legge.

Tabella 1. Concentrazioni soglia (cut-off) raccomandate dalla “Substance Abuse and Mental Health Service Administration (SAHMSA) statunitense, dalla European Workplace Drug Testing Society (EWTS)) e dal Gruppo dei Tossicologi Forensi Italiani (GTFI).

Classe di sostanza	Cut-off SAHMSA (ng/ml)	Cut-off EWTS (ng/ml)	Cut-off GTFI (ng/ml)
Amfetamine ed analoghi	50	40	50
Cannabinoidi	4	10	4
Cocaina e metaboliti	20	30	20
Oppiacei e metaboliti	40	40	40
Metadone	-	50	-
Buprenorfina	-	5	-

Tabella 2. Concentrazioni soglia (cut-off) raccomandate dalla “Substance Abuse and Mental Health Service Administration (SAHMSA) statunitense, dalla European Workplace Drug Testing Society (EWTS) e dal Gruppo dei Tossicologi Forensi Italiani (GTFI).

Analita	Cut-off SAHMSA (ng/ml)	Cut-off EWTS (ng/ml)	Cut-off GTFI (ng/ml)
Amfetamina	50	30	50
Metamfetamina	50	30	50
MDA	50	30	50
MDMA	50	30	50
MDEA	50	30	50
THC	2	2	2
Cocaina	8	8	8
BEG	8	8	8
Morfina	40	40	40
Codeina	40	40	40
6-MAM	4	4	4
Metadone	-	20	-
EDDP	-	20	-
Buprenorfina	-	5	-
Norbuprenorfina	-	5	-

MDA: 3,4 metilendiossiamfetamina

MDMA: 3,4 metilendiossimetamfetamina

MDEA: 3,4-metilendiossi-N-etilamfetamina

THC: delta-9-tetraidrocannabinolo

BEG: benzoilecgonina

6-MAM: 6-monoacetilmorfina

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

4. Consegna dei risultati analitici

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

4.1 Comunicazione dei risultati analitici

Prima di essere comunicato, il referto delle analisi di laboratorio deve essere controllato ed approvato dal responsabile di laboratorio. Il referto analitico deve contenere i seguenti dati identificativi:

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

Inoltre, nel referto si deve includere:

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

Non vanno aggiunti commenti o altre informazioni, a meno che l'autorità (o persona fisica) che ha ordinato il controllo richieda un parere o un'interpretazione sul dato analitico ottenuto.

Qualora espressamente richiesto, il responsabile del laboratorio, redigerà un parere scritto sui risultati ottenuti dall'analisi di laboratorio. In calce al referto si apporrà la firma del responsabile di laboratorio.

4.2 Conservazione dei campioni

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze d'abuso in matrice salivare devono conservare a -20°C l'aliquota B dei campioni di saliva risultati positivi secondo quanto stabilito dalla legge (o dalle circolari regionali che regolamentano l'analisi delle sostanze d'abuso nella saliva a fini medico-legali).

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

La documentazione deve comprendere:

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

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

5. Contestazione dei risultati

[illegible]

[illegible]

6. Assicurazione della Qualità delle analisi

6.1 Assicurazione di qualità

I laboratori che effettuano analisi sulle sostanze stupefacenti o psicotrope devono implementare un sistema di gestione in qualità che comprenda tutti gli aspetti del procedimento di analisi inclusi, ma non limitati a:

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

Le procedure per l'assicurazione della qualità devono essere progettate, implementate e periodicamente revisionate al fine di monitorare l'andamento di ciascuna fase all'interno del processo di analisi. Il laboratorio deve essere accreditato secondo le norme ISO/IEC 17025 per l'analisi delle sostanze d'abuso nella saliva da un organismo esterno ufficialmente riconosciuto.

6.2 Validazione delle metodologie d'analisi

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

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

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

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

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

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

La metodologia d'analisi potrà essere utilizzata di routine dal laboratorio soltanto se i parametri di validazione calcolati rientrano nei limiti stabiliti dalle direttive internazionali in materia

(ad esempio Guidance for Industry, Bioanalytical Method validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration:

www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM128049.pdf;

www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf;

European Medicines Agency, 2011:

www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf).

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

6.3 Controllo di qualità interno

L'impiego di un buon programma di qualità interno garantisce l'affidabilità dei risultati analitici e permette di eludere eventuali errori casuali che possono avvenire in fase analitica e/o pre o postanalitica che possono pregiudicare l'accuratezza del risultato.

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

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

È sempre preferibile l'acquisto dei materiali di controllo da ditte certificate o specializzate nella loro produzione.

I calibratori e i controlli devono essere preparati utilizzando sia materiali di riferimento che soluzioni standard certificati e ottenuti, dove possibile, da due distinti fornitori. I calibratori ed i controlli devono essere acquistati o preparati in matrice salivare. È possibile utilizzare sia saliva di controllo (priva di qualsiasi sostanza d'abuso) addizionata con gli analiti in esame con le concentrazioni adeguate agli scopi del controllo, sia campioni reali ottenuti da consumatori previamente analizzati da enti o strutture che possano fornire un certificato d'analisi. L'esito quotidiano del controllo di qualità interno è determinante per decidere se dare inizio o meno al processo analitico.

I calibratori ed i controlli devono riportare la concentrazione dell'analita e la data di scadenza. Tutti gli standard (ad esempio, i materiali di riferimento puri, le soluzioni madre dello standard, gli standard acquistati) devono riportare nell'etichetta le seguenti informazioni:

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

Le soluzioni madri degli standard (utilizzati per la preparazione dei campioni di controllo e per i punti della curva di calibrazione) vanno periodicamente analizzate per verificare la concentrazione nominale dell'analita tramite l'esecuzione di uno spettro ultravioletto, misurazione del valore al massimo dell'assorbanza e successivo calcolo dell'assorbanza molare di tale soluzione rispetto all'assorbanza molare fornita in letteratura per la sostanza in esame (se l'informazione è assente in letteratura, è sempre possibile confrontare uno spettro ultravioletto eseguito appena la soluzione madre è stata preparata o acquistata con quello eseguito nel momento successivo di controllo di tale soluzione).

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

6.3.1 Analisi di screening

Qualora il laboratorio effettui analisi di screening, i test devono essere calibrati almeno una volta a settimana o tutte le volte che i risultati del controllo di qualità rilevano valori fuori controllo. I campioni per il controllo di qualità devono rappresentare almeno il 5% del numero totale di campioni per il lotto che deve essere analizzato.

È necessario che le prove di calibrazione settimanali rispettino quanto specificato dalla ditta produttrice dei test di screening e che i campioni di controllo abbiano un valore misurato che si avvicini al valore atteso entro limiti stabiliti (ad esempio ± 2 deviazioni standard o $\pm 15-20\%$).

È possibile costruire delle carte di controllo dove riportare le concentrazioni misurate nei campioni utilizzati per il controllo interno dei test di screening. Tali carte devono riportare graficamente il valore nominale di ogni campione di controllo e l'intervallo di variabilità ritenuto accettabile. Le concentrazioni dei campioni di controllo devono oscillare all'interno di questo intervallo.

Qualora queste carte mostrino o valori fuori range o una tendenza univoca (i valori tendono sempre a scendere o sempre a salire all'interno dell'intervallo di variabilità), nel tempo, ad allontanarsi dai limiti di variabilità riconosciuti come accettabili

nella validazione del metodo analitico, è necessario procedere ad una revisione completa di tutte le varie fasi di esecuzione del test.

6.3.2 Analisi di conferma

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

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

6.4 Valutazione Esterna di Qualità (VEQ)

Il laboratorio deve partecipare ad adeguati programmi di valutazione esterna della qualità. Le performance analitiche al di fuori dei criteri stabiliti dal programma di VEQ devono essere prontamente corrette. La scelta di un programma o un altro deve essere fatta sulla base del miglior riscontro scientifico ottenibile.

La partecipazione può riguardare la identificazione delle classi di sostanze o delle singole sostanze e la quantificazione nel caso delle analisi di conferma secondo i cut-off di legge o stabiliti dall'ente gestore del programma.

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

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

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

6.5 Analisi per conto terzi

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

Appendice A

Organizzazione del personale del laboratorio

Appendice B

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

Appendice C

Esempio di un verbale di prelievo

Appendice D

Esempio di modulo di catena di custodia

Appendice E

Alcuni esempi di non-conformità nella catena di custodia

Appendice F

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

Appendice G

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

Appendice H

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

Appendice A

Organizzazione del personale del laboratorio

Tutte le fasi dell'attività di un laboratorio devono essere chiaramente descritte, come pure le funzioni attribuite a ciascun componente dello staff del laboratorio nel "manuale di qualità" del laboratorio.

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

Direttore del laboratorio - Il direttore è responsabile dell'attività professionale, organizzativa, amministrativa ed educativa del laboratorio da lui diretto.

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

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

Qualifiche:

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

Responsabilità:

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

segue

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

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

Qualifiche:

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

Responsabilità:

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

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

Qualifiche:

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

Responsabilità:

- preparazione del manuale di qualità del laboratorio, dove vengano riportate in maniera dettagliata tutte le attività svolte dal laboratorio, elencate tutte le POS utilizzate nel laboratorio e indicato il Personale che svolge mansioni nel laboratorio;
- monitoraggio dei programmi di Controllo Interno di Qualità in laboratorio e della partecipazione a Valutazioni Esterne di Qualità;
- controllo che le attività di laboratorio siano conformi alle linee guida o a quanto indicato nel manuale della qualità;
- verificare che siano messe in atto tutte le azioni correttive necessarie a mantenere a livelli soddisfacenti le attività e le performance di laboratorio.

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

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

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

Qualifiche:

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

Responsabilità:

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

Appendice B

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

Confermo di aver donato un mio campione di saliva al responsabile della raccolta. Ho potuto osservare che la saliva che ho raccolto nella apposita provetta è stata divisa in due aliquote denominate aliquota A e aliquota B e confermo che le informazioni contenute in questo modulo e sulle etichette sono corrette. Esprimo il mio consenso affinché la busta contenente le aliquote A e B (o campioni A e B) possano essere inviate al laboratorio e autorizzo il laboratorio ad effettuare analisi volte a determinare la presenza e la quantità di sostanze d'abuso e/o loro metaboliti e/o nel campione di saliva. Ho inoltre compreso che i risultati analitici saranno comunicati in maniera confidenziale anche all'autorità (o persona fisica) che ha richiesto le analisi..

☐ *Acconsento a tutto quanto sopra dichiarato*

Dati identificativi del soggetto sottoposto al controllo

Nome e Cognome del soggetto

Firma del soggetto sottoposto al controllo

Data

Appendice C

Esempio di un verbale di prelievo

DATI DELL'INCARICATO DEL PRELIEVO DELLA SALIVA

DATI DEL PERSONA SOTTOPOSTA AD ACCERTAMENTO ANALITICO

Cognome

Nome

Data di nascita

Sesso

Età

Documento di identità

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

Residenza

Comune

(Prov.)

Nazionalità

DATI RELATIVI AL PRELIEVO

Struttura/reparto di prelievo

Data del prelievo

Ora prelievo

Codice identificativo del campione

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

NOTE

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

Firma di chi esegue il prelievo

Firma del soggetto esaminato

Appendice D

Esempio di modulo di catena di custodia

INFORMAZIONI SUL CAMPIONE (a cura della struttura di provenienza)

Data della raccolta _____

Ora della raccolta _____

Struttura di provenienza _____

Codice campione _____

Codice identificativo del campione

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

Note:

Data _____

Firma _____

INFORMAZIONI SUL CAMPIONE (a cura della struttura di ricezione)

Contenuto del campione

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

NOTE SULL'INTEGRITÀ DEL CAMPIONE

Data _____

Firma di chi accetta il campione _____

CUSTODIA

Ricevuto da

Trasmesso a

Data e ora

Firma

Appendice E

Alcuni esempi di non-conformità nella catena di custodia

- Codici a barre assenti o non identici tra loro.
- Campione senza documentazione allegata.
- Assenza del consenso informato della persona sottoposta ad accertamento analitico.
- Sigilli di sicurezza sui contenitori del campione o sul contenitore per il trasporto rotti o manomessi.
- Assenza dei sigilli di sicurezza.
- Ricezione di una sola aliquota.
- Volume del campione insufficiente al completamento delle analisi.
- Contenitori non integri con evidente perdita del campione.

Appendice F

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

Criteri cromatografici

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

Per la cromatografia liquida il tempo di ritenzione di un composto deve presentare una variazione massima di ± 6 secondi rispetto al tempo di ritenzione dello standard di calibrazione.

Criteri di accettabilità specifici per la spettrometria di massa

Monitoraggio del singolo ione (Single Ion Monitoring SIM) (o equivalente)

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

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

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

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

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

Scansione totale

Il range della scansione non deve avere come limite inferiore un rapporto m/z inferiore a 50 e come limite superiore non deve superare il valore atteso per il peso molecolare dei composti

che si stanno analizzando o un suo derivato. Un range di scansione troppo ampio diminuisce la sensibilità dell'analisi.

Tutti gli ioni significativi presenti nello standard di calibrazione devono essere presenti anche nel campione, nello stesso rapporto (10-15%) di abbondanze relative.

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

Spettrometria di massa tandem

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

Appendice G

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

DETERMINAZIONE DI: **AMFETAMINE, OPIACEI, COCAINA E BENZOILECGONINA NELLA SALIVA**

Prelevare 1 ml di saliva



Diluire la saliva con 1 ml di H₂O



Aggiungere 2 ml tampone fosfato 0.1 M pH 6



Aggiungere lo standard interno



Estrazione del campione su colonnina Bondelut Certify (Varian):

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

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

Lavaggio:

2 ml H₂O bidistillata

+

1 ml di HCl 0.1 M

+

Vuoto per 5 minuti

+

2 ml di metanolo

Eluizione:

4 ml di una miscela così composta:

Diclorometano: isopropanolo (80:20)

+

2% di Ammoniaca



segue

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

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

Controllare che non vi siano tracce di umidità

Derivatizzare

Amfetamine

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

Oppiacei e benzoilecgonina

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

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

Programmata T iniziale 120°C- x 1 minuto -----30°C-----10°C-----240°C-----290°C x 10 minuti

IONI DA MONITORARE

A TFA m/z 91, 118, **140**

MA TFA m/z 91, 118, **140**

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

MDA-TFA m/z **135**, 162, 275

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

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

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

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

A TFA d₄ m/z 95, 122, **144**

MA TFA d₄ m/z 114, 122, **158**

MDMA-TFA d₄ m/z 139, 149, **166**

MDA-TFA d₄ m/z **139**, 166, 279

COCA d₃ m/z 85, 185, **306**

BEG TMS d₃ m/z 85, 243, **364**

MORFINA 2TMS d₃ m/z 404, 417, **432**

6-MAM TMS d₃ m/z 290, 343, **402**

In neretto gli ioni utilizzati per la quantificazione delle varie sostanze

DETERMINAZIONE DI: **THC NELLA SALIVA**

Prelevare 1 ml di saliva

Diluire la saliva con 1 ml di H₂O

Aggiungere 2 ml NaOH 1M



Aggiungere lo standard interno

**Estrazione**

2 ml Terbutil metiletere

Vortexare per 2 minuti

Centrifugare a 3000 rpm per 5 minuti

Separare la fase organica su ciascuna aliquota

} Ripetere 2 volte



Raccogliere la fase organica in provette con tappo a vite



Riunire le due fasi organiche di ciascuna aliquota



Evaporare i campioni sotto flusso di azoto



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

IONI**STANDARD INTERNO
DEUTERATO**

THC-TMS

303, 371, **386**306, 374, **389****In neretto, gli ioni utilizzati per la quantificazione delle varie sostanze***segue*

Appendice H

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

Accuratezza

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

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

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

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

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

Precisione

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

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

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

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

Recupero Analitico, effetto matrice ed efficienza del processo

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

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

Sensibilità

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

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

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

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

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

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

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

Linearità (o curva di calibrazione)

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

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

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

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

Selettività/Specificità

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

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

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

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

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

Stabilità

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

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

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

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

Bibliografia

1. Substance Abuse and Mental Health Services Administration. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs at <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2008-11-25/pdf/E8-26726.pdf>
2. Cooper G, Moore C, George C, Pichini S. Guidelines for European workplace drug testing in oral fluid. *Drug Test Anal.* 2011; 3: 269-276.
3. Accordo, ai sensi dell'articolo 8, comma 2 dell'Intesa in materia di accertamento di assenza di tossicodipendenza, perfezionata nella seduta della Conferenza Unificata del 30 ottobre 2007 (Rep. Atti n. 99/CU), sul documento recante «Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi». (Rep. Atti n. 178/CSR) at: <http://gazzette.comune.jesi.an.it/2008/236/1.htm>
4. [http://www.workplace.samhsa.gov/DrugTesting/Level_1_Pages/Federal%20Register%20Notices%20\(Proposed%20Policies\).html](http://www.workplace.samhsa.gov/DrugTesting/Level_1_Pages/Federal%20Register%20Notices%20(Proposed%20Policies).html)
5. <http://www.simlaweb.com/component/kunena/12-tossicologia-forense/156-linee-guida-gtfi.html>

Letteratura consigliata sulle analisi di sostanze d'abuso nella saliva

Allen KR. Screening for drugs of abuse: which matrix, oral fluid or urine? *Ann Clin Biochem.* 2011; 48: 531-41.

Bosker WM, Huestis MA. Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clin Chem.* 2009; 55: 1910-31.

Gallardo E, Barroso M, Queiroz JA. Current technologies and considerations for drug bioanalysis in oral fluid. *Bioanalysis.* 2009; 1: 637-67.

Drummer OH. Introduction and review of collection techniques and applications of drug testing of oral fluid. *Ther Drug Monit.* 2008; 30: 203-6.

Pil K, Verstraete A. Current developments in drug testing in oral fluid. *Ther Drug Monit.* 2008; 30: 196-202.

Cone EJ, Huestis MA. Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Mar; 1098: 51-103.

Drummer OH. Drug testing in oral fluid. *Clin Biochem Rev.* 2006; 27: 147-59.

Kadehjian L. Legal issues in oral fluid testing. *Forensic Sci Int.* 2005; 150: 151-60.

Ventura M, Pichini S, Ventura R, Leal S, Zuccaro P, Pacifici R, de la Torre R. Stability of drugs of abuse in oral fluid collection devices with purpose of external quality assessment schemes. *Ther Drug Monit.* 2009; 31: 277-80.

Ventura M, Ventura R, Pichini S, Leal S, Zuccaro P, Pacifici R, Langohr K, de la Torre R. ORALVEQ: external quality assessment scheme of drugs of abuse in oral fluid: results obtained in the first round performed in 2007. *Forensic Sci Int.* 2008; 182: 35-40.

Ventura M, Pichini S, Ventura R, Zuccaro P, Pacifici R, de la Torre R. Stability studies of principal illicit drugs in oral fluid: preparation of reference materials for external quality assessment schemes. *Ther Drug Monit.* 2007; 29: 662-5.

Pujadas M, Pichini S, Civit E, Santamariña E, Perez K, de la Torre R. A simple and reliable procedure for the determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 44: 594-601.

Note



