



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

**Proposta di linee guida per l'analisi
delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici**

P. Zuccaro, S. Pichini,
I. Altieri e R. Pacifici

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

96/29

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

**Proposta di linee guida per l'analisi
delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici**

Piergiorgio Zuccaro, Simona Pichini,
Ilaria Altieri e Roberta Pacifici

Laboratorio di Biochimica Clinica

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

96/29

Istituto Superiore di Sanità

Proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici.

Piergiorgio Zuccaro, Simona Pichini, Ilaria Altieri e Roberta Pacifici

1996, ii, 26 p. Rapporti ISTISAN 96/29

Il risultato delle determinazioni analitiche eseguite in un laboratorio che analizza farmaci e sostanze d'abuso in diverse matrici biologiche (sangue, urine, capelli, ecc.) ha spesso rilevanza sociale e giudiziaria. Questo rende indispensabile che il laboratorio raggiunga l'obiettivo della sicurezza della qualità. A tale scopo sono state approntate alcune linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei diversi liquidi biologici. Per quanto riguarda l'analisi del campione vengono descritte sia le metodiche per i test iniziali che per i test di conferma, e la loro convalida analitica. Per l'organizzazione di un sistema di qualità inoltre è necessario approntare una struttura organizzativa, definire le responsabilità e le procedure e controllare il processo di produzione del dato analitico mediante controllo di qualità interno e partecipazione a programmi di valutazione esterna della qualità. Viene poi configurata la tipologia di un laboratorio che segue solo test iniziali e di un laboratorio che esegue sia test iniziali che di conferma.

Parole chiave: Assicurazione di qualità, Matrici biologiche, Sostanze d'abuso, Tossicologia analitica

Istituto Superiore di Sanità

Proposal of guidelines for drugs of abuse testing in biological fluids.

Piergiorgio Zuccaro, Simona Pichini, Ilaria Altieri and Roberta Pacifici

1996, ii, 26 p. Rapporti ISTISAN 96/29 (in Italian)

The analytical determinations carried out in a laboratory engaged in analyses of drugs and drugs of abuse in the different biological matrices (blood, urine, hair, etc.) very often assume a social and legal significance. This fact requires the quality assurance as a prerequisite of the laboratory. For this reason, the clinical biochemistry laboratory of the Istituto Superiore di Sanità reports the guidelines for drugs of abuse testing in different biological fluids. Methods for initial tests and confirmatory tests are described together with the assay validation. The control of data production process requires an internal quality control program and the participation in a proficiency testing program. The typology of a laboratory for initial tests and laboratory for confirmatory tests is also described.

Key words: Analytical toxicology, Biological matrices, Drugs of abuse, Quality assurance

Si ringrazia la Sig.ra Antonella Bacosi e la Dott.ssa Manuela Pellegrini per l'aiuto nella revisione e stesura del manoscritto.

INDICE

PREMESSA	p. 1
1. ANALISI DEL CAMPIONE	
1.1. Sostanze da dosare	“ 2
1.2. Matrici biologiche	“ 2
<i>1.2.1. Urina</i>	“ 2
<i>1.2.2. Sangue</i>	“ 2
<i>1.2.3. Saliva</i>	“ 2
<i>1.2.4. Capelli</i>	“ 2
1.3. Test iniziali	“ 3
1.4. Analisi di conferma	“ 4
1.5. Metodiche per i test iniziali	“ 4
1.6. Metodiche per le analisi di conferma	“ 5
1.7. Convalida delle metodiche immunochimiche	“ 6
1.8. Convalida delle metodiche cromatografiche	“ 6
2. ORGANIZZAZIONE DI UN SISTEMA QUALITA'	“ 10
2.1. Requisiti sistemi qualità	“ 10
2.2. Struttura organizzativa	“ 10
<i>2.2.1. Locali</i>	“ 10
<i>2.2.2. Raccolta campioni urina</i>	“ 10
<i>2.2.3. Campioni raccolti nel laboratorio analisi</i>	“ 10
<i>2.2.4. Campioni provenienti altre strutture</i>	“ 11
2.3. Le responsabilità	“ 11
<i>2.3.1. Direttore del laboratorio</i>	“ 11
<i>2.3.2. Responsabile per l'assicurazione della qualità</i>	“ 11
<i>2.3.3. Personale tecnico di laboratorio</i>	“ 12

2.4. Le procedure	p. 12
2.4.1. <i>La documentazione</i>	“ 12
2.4.2. <i>Test iniziali e di conferma</i>	“ 12
2.4.3. <i>Revisione e certificazione dato analitico</i>	“ 12
2.4.4. <i>Programmi di controllo di qualità</i>	“ 12
2.4.5. <i>Strumentazione</i>	“ 13
2.4.6. <i>Catena di custodia</i>	“ 13
2.4.7. <i>Modulo richiesta analisi</i>	“ 13
2.5. Processi di produzione	“ 13
2.5.1. <i>Controllo qualità interno</i>	“ 13
2.5.2. <i>Documentazione</i>	“ 13
2.5.3. <i>Metodologie analitiche</i>	“ 14
2.5.4. <i>Standard di riferimento</i>	“ 14
2.5.5. <i>Campioni di controllo</i>	“ 14
2.5.6. <i>Valutazione esterna della qualità</i>	“ 15
2.5.7. <i>Valutazione dei risultati</i>	“ 16
3. TIPOLOGIA DEL LABORATORIO	“ 17
3.1. Configurazione di un laboratorio che esegue test iniziali (LAB/A)	“ 18
3.2. Configurazione di un laboratorio che esegue test iniziali e analisi di conferma (LAB/B)	“ 19
4. GLOSSARIO	“ 20

PREMESSA

Il risultato delle determinazioni analitiche eseguite in un laboratorio che analizza farmaci e sostanze d'abuso in diverse matrici biologiche (sangue, urina, capelli) ha spesso rilevanza sociale e giudiziaria.

Per questo motivo è indispensabile che il laboratorio sia in grado di garantire la sicurezza della qualità delle analisi. Tuttavia l'obiettivo finale non può essere solo la qualità del dato analitico, ma è necessario assicurare la qualità di un prodotto complesso ove al contenuto tecnologico si associa quello di servizio globale all'utente.

Il DL 502/517 (1) di riordino del Servizio Sanitario Nazionale demanda alle regioni le competenze in tema di classificazione ed accreditamento delle strutture abilitate ad operare nel territorio regionale tenendo conto, non solo della struttura in sé, ma anche della tecnologia e della organizzazione di tale struttura.

Pertanto il laboratorio dovrebbe allestire un sistema di qualità inteso come l'insieme delle strutture organizzative, delle responsabilità, delle procedure e dei processi messi in atto per la certificazione della qualità.

In un laboratorio che analizza sostanze stupefacenti è necessario quindi procedere ad uniformare le procedure e a standardizzare i metodi di analisi.

A tale scopo è stata approntata una proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nelle matrici biologiche.

Tale proposta tiene conto delle raccomandazioni contenute nel documento "Federal Workplace drug testing programs" dell' "American Department of Health and Human Services" (2), e anche le considerazioni contenute nel documento sulla validazione dei metodi analitici negli studi di farmacocinetica (pubblicato in *Journal of Pharmaceutical Sciences* del 1992)(3).

Si è tenuto inoltre conto dei documenti sul controllo di qualità in biochimica clinica proposti dall'International Federation of Clinical Chemistry (4) e i lavori delle Commissioni apposite della Società Italiana di Biochimica Clinica (5).

E' intenzione degli autori raccogliere l'opinione e i commenti del mondo scientifico italiani interessato alla stesura di linee guida definitive.

1. ANALISI DEL CAMPIONI

1.1. Sostanze da dosare

La scelta delle sostanze da dosare viene determinata in base alla disponibilità dei dati ufficiali sulla diffusione del fenomeno tenendo anche conto della possibilità di avere a disposizione dei metodi di analisi sensibili e specifici da poter essere utilizzati nella normale routine di laboratorio.(6,7)

Vista la rilevanza sociale e la loro pericolosità normalmente vengono dosati gli oppiacei, la cocaina, i cannabinoidi, le amfetamine, i barbiturici e le benzodiazepine.(8)

1.2. Matrici biologiche

1.2.1. Urine.- L'urina è la matrice biologica di prima scelta nell'analisi delle sostanze d'abuso.

Il suo utilizzo presenta molti vantaggi quali il prelievo non invasivo del campione, la possibilità di campionare grandi volumi e la possibilità di analizzare sia le sostanze che i loro metaboliti dopo diversi giorni dall'assunzione.

Gli svantaggi sono: scarsa rilevanza clinica dell'analisi quantitativa in quanto le concentrazioni degli analiti nell'urina variano con la dose, via di somministrazione, tempo di latenza fra l'assunzione e l'analisi, stato fisiologico dell'individuo, eventuale aggiunta di sostanze adulteranti. Di conseguenza l'analisi dell'urina può solo indicare la presenza o l'assenza di una sostanza ad un definito valore soglia.

Non si può dare indicazione sulla quantità di sostanza assunta né sul momento dell'assunzione.

1.2.2. Sangue.- La presenza di sostanze d'abuso e loro metaboliti è rivelabile nel sangue ad elevate concentrazioni solo se il prelievo è stato eseguito poche ore dopo l'assunzione.

Le concentrazioni diminuiscono in maniera molto sensibile nel giro di poche ore. Può quindi indicare solo una esposizione recente. Il prelievo peraltro è invasivo e la quantità di sangue che si può prelevare è limitata. Il campione non può essere soggetto a manipolazioni e/o adulterazioni.

1.2.3. Saliva.- La saliva può essere facilmente raccolta, solo però in piccoli volumi non sufficienti per le analisi preliminari e per le conferme e le concentrazioni trovate non sono sempre correlate a quelle plasmatiche o urinarie.

1.2.4. Capelli.- L'analisi sui capelli presenta diversi vantaggi. Il prelievo è non invasivo e poiché il farmaco ed eventualmente il metabolita sono incorporati nella matrice cheratinica durante la crescita del capello, possono essere correlati all'assunzione di settimane o mesi. L'interpretazione del dato analitico può essere però molto problematica in quanto è difficile risalire in maniera inequivocabile ai periodi di assunzione, soprattutto quella recente.

Inoltre poiché la concentrazione di analita per milligrammo di capello è in genere di pochi nanogrammi è necessario prelevare una grande quantità di campione ed utilizzare

test immunochimici ad elevata sensibilità. Tali test peraltro sono stati messi a punto e validati per l'analisi sulle urine.

La gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa viene considerata la tecnica di elezione per l'analisi di questa matrice.

L'analisi dei capelli è soggetta a interferenze; per esempio l'uso di particolari saponi detergenti per il lavaggio dei capelli può diminuire la qualità di analita determinata, inoltre la tintura dei capelli può interferire sia nell'analisi immunochimica che cromatografica.

Non esistono per ora procedure standardizzate per il prelievo, l'estrazione e l'analisi della matrice.

L'analisi delle droghe nei capelli per essere introdotta nella routine di laboratorio necessita di ulteriori prove, verifiche e consensi da parte della comunità scientifica nazionale e internazionale. Rimane comunque un' interessante strumento di studio e di ricerca.

1.3. Test iniziali

Sono quei test che permettono di analizzare in poco tempo un gran numero di campioni di urine in maniera economica, efficace, e standardizzata.(7)

Questi test permettono di escludere i campioni che sono negativi; identificano infatti quei campioni che non contengono la sostanza o la classe di sostanze oppure quelli in cui la concentrazione è al di sotto di un valore soglia (cut-off).

Il valore soglia è una definizione operativa scelta per stabilire se il campione analizzato è positivo o negativo. Non bisogna però confondere il valore soglia con il limite di determinazione del metodo che è la più bassa concentrazione dell'analita che può essere sicuramente determinata. Il valore soglia è normalmente fissato ad una concentrazione maggiore della sensibilità del metodo per ovviare la imprecisione dell'analisi vicino al limite di sensibilità. In tabella 1 sono riportati i valori di cut-off proposti per i test iniziali per l'analisi delle sostanze d'abuso nelle urine. Come è stato già detto questi valori sono convenzionali e tengono conto di molteplici fattori quali la possibilità di utilizzare reagenti in commercio, proprietà farmacocinetiche delle sostanze e necessità di evitare falsi negativi.

Questi livelli possono essere modificati in seguito all'esperienza fatta nella applicazione dei valori indicati da parte dei laboratori, all'analisi dei dati epidemiologici raccolti negli anni, e alle modifiche delle modalità di assunzione da parte dei tossicodipendenti.

Inoltre per particolari indagini, come per esempio gli screening epidemiologici, questi valori possono essere non adatti.

Tutte le case produttrici dei test immunochimici usati per i test iniziali riportano il proprio valore di cut-off analitico.

Solo lavorando con il cut-off indicato dalla casa produttrice del kit l'analizzatore è sicuro dell'affidabilità dei reagenti utilizzati e del dato analitico prodotto.

L'utilizzatore che volesse apportare modifiche alle procedure operative dei kit per abbassare ad esempio il cut-off, deve approntare un protocollo di modifica e fare la

validazione della metodica. Dovranno essere per esempio studiate le reazioni crociate, la riproducibilità e l'accuratezza nelle nuove condizioni operative.

E' evidente che in queste condizioni non sarà valida la certificazione della ditta produttrice del kit.

I limiti proposti tengono inoltre conto del fatto che gli anticorpi in commercio sono per la maggior parte policlonali e quindi permettono di aumentare la sensibilità del metodo. Infatti riconoscono non solo la sostanza in esame come ad esempio la morfina ma anche i suoi glucuronidi, che sono presenti in concentrazioni uguali o maggiori del farmaco parente.

Se si utilizza invece un anticorpo monoclonale che riconosce per esempio solo la morfina libera allora è necessario usare un valore soglia più basso oppure eseguire una idrolisi acida o enzimatica per rompere il legame del glucuronide (tab. 1).

Un campione trovato positivo nel test iniziale immunochimico, se non verificato con un test di conferma cromatografico, può essere contestato e non ha valore medico-legale.

E' inoltre da tener presente che la positività dei test immunochimici può essere dovuta anche all'assunzione di farmaci o ingestione di sostanze particolari (esempio: semi di papavero).

1.4. Analisi di conferma

Le analisi di conferma servono a verificare che non ci siano risultati falsi positivi dovuti alla non specificità dei test iniziali.

I test di conferma devono essere specifici per il singolo analita per ovviare alla non specificità della maggior parte dei metodi immunochimici che è per classi di sostanze.

Devono avere sensibilità uguale o maggiore al valore soglia stabilito nei test preliminari.

Il valore soglia dei test di conferma deve essere posto ad una concentrazione più bassa rispetto al valore soglia dei test immunochimici quando viene confermato il singolo farmaco o il metabolita (tab.2).

Le analisi di conferma devono essere quantitative. Per ultimo un test di conferma si deve basare su principi fisici e chimici diversi da quelli dei test preliminari. Poichè i test iniziali sono immunochimici, le conferme vanno effettuate con metodiche cromatografiche.

1.5. Metodiche per i test iniziali

Le metodiche usate per i test iniziali sono ormai tutti immunochimiche.

Possono essere metodiche radioimmunologiche (RIA), immunoenzimatiche (EIA), metodiche che utilizzano immunofluorescenza a luce polarizzata (FPIA) o inibizione dell'agglutinazione (HI).

Per ognuna di queste tecniche esistono in commercio diversi kit che possono differire per la scelta dell'anticorpo (policlonale o monoclonale), per la metodologia di esecuzione del test e per la sensibilità e specificità.

Tutte le case produttrici riportano nel kit un valore di cut-off analitico confrontabile con quello indicato in tabella 1.

La scelta di una metodica analitica per i test iniziali non può non tener conto anche dei costi. Così metodiche flessibili e facilmente utilizzabili con i comuni analizzatori di chimica clinica permettono nel caso di esecuzioni di un elevato numero di campioni, una notevole riduzione dei costi.

I test speditivi sono quei test che permettono la determinazione di una o più sostanze d'abuso e dei loro metaboliti ad una fissata concentrazione soglia senza apparecchiature ed in tempi di analisi ridotti.

I dati della letteratura riportano, per questi test, se usati correttamente dallo stesso personale di laboratorio che normalmente esegue le analisi, risultati paragonabili agli altri test immunochimici; hanno quindi tutti i vantaggi e svantaggi degli altri metodi.

Il responsabile del laboratorio li utilizzerà tenuto conto del numero e della finalità delle analisi da eseguire, del costo dei reattivi e del personale a disposizione.

1.6. Metodiche per i test di conferma

Le metodiche cromatografiche che possono essere usate per le conferme sono la gascromatografia (GC) e la cromatografia liquida (LC) indicata normalmente anche come cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). I rivelatori più comunemente usati per la gas cromatografia sono i detector a cattura di elettroni e detector azoto fosforo.

Inoltre il gas cromatografo può essere accoppiato ad uno spettrometro di massa (GC/MS). Con questa tecnica si uniscono le caratteristiche di separazione proprie della gas cromatografia con la specificità propria della spettrometria di massa.

L'accoppiamento con la spettrometria di massa rende il metodo assoluto poiché le sostanze vengono identificate in base al loro peso molecolare e/o ai frammenti chimici che producono per impatto con elettroni ad alta velocità, presenti nella sorgente ionica dello spettrometro. I progressi tecnologici di questi ultimi anni hanno consentito l'ingresso sul mercato di apparecchiature che con la stessa specificità e sensibilità del passato presentano facilità di esecuzione, ingombri ridotti e abbassamento dei costi. Per tutti questi motivi la GC/MS attualmente può essere considerata la metodica di elezione per la conferma delle sostanze d'abuso. E' possibile comunque confermare la presenza delle sostanze d'abuso e dei loro eventuali metaboliti nei liquidi biologici anche tramite la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) accoppiata ad un rivelatore elettrochimico, o ad un rivelatore ad emissione di fluorescenza, o più semplicemente ad un rivelatore ad assorbimento di luce ultravioletta.

Questa strumentazione è meno costosa rispetto alla GC/MS, di più facile utilizzo ed è la più diffusa nei laboratori di analisi. La rivelazione non si basa su un metodo assoluto e può quindi essere soggetta ad interferenze per la presenza di molecole che coeluiscono con gli analiti in esame. L'accoppiamento dell'HPLC con un rivelatore ad assorbimento di luce ultravioletta a fotodiodi (diode array), che consente la registrazione dell'intero spettro ultravioletto dell'eluato cromatografico, permette una identificazione più sicura dell'analita, in base all'assorbimento ultravioletto massimo, minimo e al loro rapporto.

Un discorso a parte merita l'accoppiamento della cromatografia liquida con la spettrometria di massa (HPLC/MS). Questo accoppiamento ha consentito di poter

affiancare ad un metodo di rivelazione assoluto, una tecnica separativa a temperatura ambiente che consente di poter analizzare non solo sostanze poco polari, stabili e volatili ad elevate temperature, ma anche sostanze termolabili, idrofile quali sono molti metaboliti (es. glucuronidi) di sostanze d'abuso.

Questo evita tutte le procedure di idrolisi ed eventuali derivatizzazioni, spesso richieste nell'analisi gas cromatografica delle sostanze suddette.

Di contro, l'accoppiamento HPLC/MS non raggiunge la sensibilità della GC/MS a causa delle difficoltà di interfacciamento tra la cromatografia liquida ed uno spettrometro ad alto vuoto che richiede l'eliminazione della massima parte dell'eluato liquido prima dell'entrata in sorgente di massa.

Inoltre questa metodologia non è standardizzata: le interfacce utilizzabili (termo-spray, particle beam, electro-spray) sono diverse a seconda del tipo di ionizzazione che si vuole ottenere e consentono di ottenere sensibilità di analisi differenti. Infine, la strumentazione è al momento molto più costosa ed ingombrante rispetto ai comuni gas-cromatografi-spettrometri di massa in commercio, e richiede una manutenzione costante e un servizio di assistenza tecnica altamente specializzato sia a causa delle difficoltà di interfacciamento HPLC ed MS sia per la presenza di un elevato numero di pompe da vuoto, di differente natura, che assicurano il funzionamento dello strumento.

1.7. Convalida delle metodiche immunochimiche

La convalida di una metodica immunochimica necessita delle stesse procedure descritte per una metodica cromatografica (vedi cap. 1. 8) con particolare attenzione per esempio alle reazioni-crociate e alla matrice biologica.(3)

Le metodiche immunochimiche usate per la determinazione delle sostanze d'abuso seguono procedure standardizzate e riportate nelle specifiche dei kit in commercio.

E' importante perciò attenersi scrupolosamente alle istruzioni indicate dalla ditta costruttrice sul foglietto illustrativo allegato che riporta aggiornamenti, modifiche o limitazioni all'utilizzo del kit stesso. Solo se si cambiano le condizioni operative è necessario procedere alla validazione secondo le nuove procedure approntate.

1.8. Convalida delle metodiche cromatografiche

Le metodiche analitiche che vengono utilizzate nel laboratorio di analisi per la conferma della presenza delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici devono essere validate prima di poter essere utilizzate di routine. Si tratta di metodiche cromatografiche che ci permettono di determinare i singoli analiti presenti nel campione.(3)

La convalida si prefigge lo scopo di documentare le caratteristiche del metodo analitico al fine di permettere una valutazione obiettiva dei risultati.

Per tale scopo deve essere approntata una specifica descrizione scritta del protocollo di analisi. Ciascun passaggio della procedura deve essere analizzato per determinare tutte quelle variabili che possono influenzare la stima dell'analita nella matrice biologica.

Devono essere valutati i seguenti parametri:

Specificità. E' la capacità del metodo di determinare l'analita senza subire interferenze da parte di altre sostanze note presenti nel campione. Un test statistico permetterà poi di valutare, con una probabilità definita, se esistono differenze significative tra i dati di due insiemi di osservazioni indipendenti (il primo in presenza, e il secondo in assenza di sostanze note diverse dall'analita del campione). Il metodo deve essere quindi in grado di dosare il prodotto in presenza di sostanze endogene, metaboliti e farmaci che possono essere somministrati contemporaneamente.

Limite di quantificazione (LOQ). E' la piu' bassa concentrazione dell'analita che puo' essere calcolata con una precisione e accuratezza prestabilita.

Limite di rivelazione (LOD). E' la minima concentrazione di un analita che si puo' distinguere da un campione bianco. E' quindi la piu' bassa concentrazione per valutare qualitativamente la presenza o assenza di un analita.

Calibrazione. Si effettua determinando la relazione che lega la risposta del metodo di analisi alla concentrazione dell'analita. Si deve calcolare quindi l'equazione che lega le due variabili e mediante l'analisi della varianza viene valutato se la relazione è lineare e se la retta che rappresenta il fenomeno ha intercetta zero. Il range di concentrazioni testate deve comprendere quelle che si trovano in vivo.

Precisione. Si intende la dispersione dei dati ottenuti. Si deve calcolare la media e i suoi limiti fiduciali, la deviazione standard, il coefficiente di variazione (CV) e la precisione percentuale. La precisione intrasaggio (Intra-assay) si calcola replicando i campioni in un singolo esperimento. La precisione intersaggio (Inter-assay) si calcola replicando un campione singolo in esperimenti diversi. La precisione intorno al valore medio non dovrebbe eccedere più del 15% del CV, eccetto nel caso del LOQ, in cui non deve eccedere il 20% del CV.

Accuratezza. E' lo scostamento tra il valore trovato e il valore atteso (vero). I valori medi non dovrebbero variare più o meno del 15% dal valore atteso eccetto nel caso del LOQ in cui si puo' avere una deviazione più o meno del 20%.

Standard interno. Lo standard interno serve per calcolare il recupero dell'analita e per validare la corsa cromatografica. Lo standard interno ideale dovrebbe essere una sostanza con proprietà chimico-fisiche del tutto simili a quelle dell'analita in esame. Inoltre esso non dovrebbe essere un farmaco che possa essere assunto dal paziente o un metabolita dell'analita. Non deve inoltre interferire nella corsa cromatografica.

Recupero totale. Viene calcolato dal confronto dei risultati ottenuti da campioni biologici di controllo ai quali sono stati aggiunti sia il prodotto che lo standard interno prima della manipolazione del campione, e campioni controllo ai quali viene aggiunto inizialmente solo lo standard interno, mentre il prodotto viene aggiunto al termine della manipolazione. Più elevato è il recupero, più elevata sarà la precisione ed inferiore il limite di sensibilità.

Stabilità. Va valutata la stabilità dell'analita nella matrice biologica sia in funzione del tempo che della temperatura di conservazione. La valutazione della stabilità di un prodotto non dipende solo dalla differenza di concentrazione trovata (statisticamente significativa) tra campioni conservati e campioni preparati al momento, ma deve anche tener conto di un intervallo stabilito dall'operatore all'interno del quale la differenza può non essere rilevante. Dipende inoltre dalla precisione del metodo di analisi, dal numero di replicazioni, dal grado di confidenza richiesto.

Campioni di controllo. Campioni per il controllo di qualità interno devono essere aggiunti ai campioni che vengono analizzati nell'ambito della giornata in duplicato a tre diverse concentrazioni: una vicino al LOQ, una intorno al valore medio della curva di calibrazione ed una ad un valore elevato. Il risultato dei campioni di controllo permette di decidere se accettare o rifiutare i risultati delle analisi.

Tabella 1.- *Concentrazione soglia (cut-off) nei test iniziali per la positività delle classi di sostanze nelle urine.*

CLASSE DI SOSTANZA	CONCENTRAZIONE
OPPIACEI	300 ng/ml (1)
COCAINA METABOLITI	300 ng/ml
CANNABINOIDI	100 ng/ml
AMFETAMINE ED ANALOGHI	1000 ng/ml
BARBITURICI	500 ng/ml
BENZODIAZEPINE	500 ng/ml
METADONE	300 ng/ml

(1) 25 ng/ml per test immunochimico specifico per la morfina libera

Tabella 2.- Concentrazione soglia (cut-off) nei test di conferma per la quantizzazione delle singole sostanze nelle urine.

CLASSE DI SOSTANZE	CONCENTRAZIONE
OPPIACEI :	
MORFINA (libera+coniugata)	300 ng/ml
MORFINA 3-GLUCURONIDE (1)	
MORFINA 6-GLUCURONIDE (1)	
6-MONOACETILMORFINA (2)	
CODEINA	300 ng/ml
COCAINA METABOLITI:	
BENZOILECGONINA	150 ng/ml
ECGONINAMETILESTERE (2)	
CANNABINOIDI:	
DELTA 9 TETRAIDROCANNABINOLO-ACIDO CARBOSSILICO	30 ng/ml
GLUCURONIDE del DELTA 9 TETRAIDRO-CANNABINOLO-ACIDO CARBOSSILICO (2)	
AMFETAMINE ED ANALOGHI:	
AMFETAMINA	500 ng/ml
METAMFETAMINA	500 ng/ml
3,4 METILENDIOSSIMETAMFETAMINA (MDMA)	1000 ng/ml
METILENDIOSSIAMFETAMINA (MDA)	1000 ng/ml
BARBITURICI:	
FENOBARBITAL	500 ng/ml
SECOBARBITAL	500 ng/ml
AMOBARBITAL	500 ng/ml
BENZODIAZEPINE:	
7 AMMINOFLUNITRAZEPAM	500 ng/ml
NORDIAZEPAM	500 ng/ml
OXAZEPAM	500 ng/ml
METADONE:	300 ng/ml
2 ETILIDENE-1,5-DIMETIL-3,3-DIFENIL-PINOLIDENE (EDDP) (2)	

- (1) Metabolita presente nell'urina che può essere dosato tal quale oppure insieme alla morfina in seguito ad un processo di idrolisi (acida o enzimatica) per rompere il legame con il glucuronide.
 (2) Altro metabolita presente nell'urina.

2. ORGANIZZAZIONE DI UN SISTEMA QUALITÀ

L'obiettivo di un laboratorio che analizza sostanze d'abuso è quello di garantire l'attendibilità del risultato sulla presenza/assenza e sul dosaggio delle sostanze nei campioni testati. Per ovviare a questo sia la direzione che lo staff di un laboratorio devono attuare una politica per la qualità (4,5).

2.1. Requisiti del sistema di qualità

Per sistema di qualità si intende la struttura organizzativa, le responsabilità, le procedure, i processi di produzione e le risorse messe in atto per la conduzione della qualità.

2.2. Struttura organizzativa

2.2.1. Locali.- Un laboratorio che analizza sostanze d'abuso deve essere separato dagli altri reparti del laboratorio di analisi. Poichè in alcuni casi il risultato delle analisi assume aspetti propri della tossicologia forense (medico-legali) il laboratorio deve avere un accesso controllato, indicato e dotato di un sistema di sicurezza che permetta l'ingresso solo alle persone autorizzate. L'ingresso di persone non autorizzate (visitatori, fornitori, ed anche persone dipendenti dalla stessa struttura ma che non fanno parte del gruppo) deve essere annotato su un apposito registro indicando nome e cognome, motivo della visita e nome dell'accompagnatore.

Con la consulenza dell'ufficio tecnico della struttura bisogna verificare che nel laboratorio tutti gli impianti siano conformi alle normative vigenti.

Il laboratorio si dovrà attrezzare di tutti gli strumenti necessari alle analisi immunochimiche e se esegue conferme, di apparecchiature per la cromatografia.

Dovrà essere posta evidenza a tutte quelle misure inerenti la sicurezza del personale riguardo alla manipolazione e analisi di materiale biologico, che deve essere considerato sempre come patogeno.

2.2.2. Raccolta campioni urina.- I campioni di urina possono essere raccolti presso il laboratorio di analisi o presso altre strutture o enti.

2.2.3. Campioni raccolti nel laboratorio analisi.-Qualora i campioni siano raccolti presso il laboratorio e l'analisi venga richiesta per motivi inerenti a procedure amministrative o dall'autorità giudiziaria e i risultati comunque abbiano valenza medico legale, il prelievo verrà effettuato in locali idonei e secondo procedure che pur salvaguardando il riserbo individuale, assicurino l'identità, l'integrità e l'autenticità del campione. Il locale, all'uopo attrezzato, non deve avere possibilità di comunicazione con l'esterno.

Se la raccolta non è osservata direttamente, non deve essere disponibile alcun detergente e il comando dell'acqua di scarico deve essere azionato dall'esterno; oppure all'acqua deve essere aggiunto un opportuno colorante.

Nello spogliatoio dovranno essere collocati appositi armadietti ove il soggetto puo' inserire i propri indumenti ed oggetti personali ed indossare un camice monouso.

Il campione deve essere raccolto in un apposito contenitore sterile. Il volume dell'urina raccolta non deve essere inferiore a 40 ml per permettere le analisi preliminari, le conferme ed eventuali analisi di revisione. L'autenticita' del campione deve essere accertata subito dopo il prelievo mediante la verifica delle caratteristiche organolettiche. Va controllata la temperatura che deve essere fra 32-38 ° C ed il pH che deve oscillare fra 4,6 e 8.

Per il prelievo possono anche essere usati appositi contenitori che permettono una piu' agevole verifica di queste caratteristiche. Tutte le procedure del prelievo devono essere documentate e registrate cosi' come i motivi dell'accettazione o del rigetto del campione. Il campione va diviso in due aliquote che devono essere sigillate. Ciascun contenitore deve essere dotato di etichetta in cui è riportata l'identita' del soggetto indicata nel documento, la data, l'ora, il luogo del prelievo e la firma del donatore e del tecnico addetto al prelievo.

Una aliquota del campione va conservato a - 20° C per le eventuali verifiche e/o contestazioni. L'altra aliquota se non analizzata entro le 24 ore va congelata a - 20° C.

2.2.4. Campioni provenienti da altre strutture o enti.- Deve essere stabilita una procedura standardizzata per il ricevimento dei campioni. I campioni devono essere accompagnati da un modulo di richiesta di analisi. I metodi di accoglimento del campione devono essere chiaramente definiti. Quando un campione viene accettato deve essere attivata una procedura interna di custodia.

2.3. Le responsabilità

Devono essere chiaramente descritte tutte le fasi del lavoro con le funzioni attribuite a ciascun componente del laboratorio.

La qualificazione del direttore di laboratorio, del responsabile per l'assicurazione della qualità e del personale tecnico devono essere riportate nel protocollo.

Ciascun membro dello staff deputato ad una specifica funzione deve avere una necessaria esperienza e preparazione commensurata con la responsabilità della funzione.

La documentazione deve essere disponibile per stabilire quale ruolo svolge il personale nel laboratorio ad ogni punto dell'analisi.

2.3.1. Direttore del laboratorio.- Il direttore del laboratorio è il responsabile dell'attività professionale, organizzativa, amministrativa ed educativa del laboratorio.

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

2.3.2. Responsabile per l'assicurazione della qualità.- Oltre al direttore del laboratorio è importante individuare un responsabile per l'assicurazione della qualità per garantire che le prescrizioni relative alla qualità siano applicate e mantenute.

La persona designata, che risponde alla direzione, deve avere nel proprio ambito specifica autorità, competenza e autonomia.

Suo compito é di revisionare i dati analitici, inclusi quelli che si riferiscono ai bianchi, agli standard, ai controlli e ai campioni da esaminare assicurandosi che essi siano stati ottenuti in accordo alle procedure stabilite.

Dopo essersi assicurato che tutti i risultati sono accettabili in accordo con i criteri stabiliti, il responsabile per l'assicurazione della qualità certifica i risultati e permette che vengano refertati.

Questa persona deve avere l'educazione scientifica e training specifico per comprendere tutti gli aspetti delle metodologie analitiche e deve avere familiarità con la catena di custodia, controllo di qualità e con tutte le procedure .

2.3.3. Personale tecnico di laboratorio.- Il personale tecnico di laboratorio deve essere addestrato su tutte le procedure inerenti all'analisi del campione. Deve partecipare alle riunioni periodiche con tutto lo staff del laboratorio e seguire corsi di aggiornamento professionale.

2.4. Le procedure

2.4.1. Documentazione.- Il laboratorio deve conservare tutti i protocolli e le procedure correnti.

Tutti i cambiamenti devono essere chiaramente individuati nel manuale e l'approvazione dei cambiamenti da parte del direttore responsabile deve essere evidenziata. Documentazione sulla qualificazione e training del direttore del laboratorio, del responsabile per l'assicurazione della qualità e di tutto lo staff tecnico deve essere disponibile per la revisione critica. Deve essere anche descritto il lavoro che effettua ciascun membro del personale.

Poichè le eventuali dispute legali possono durare anni, tutte le procedure e i dati devono essere conservati per poter eventualmente essere prodotti in giudizio.

2.4.2. Test iniziali e di conferma.- Le procedure per tutti i test iniziali e di conferma devono includere le istruzioni per la preparazione e l'analisi del campione.

Se le procedure descritte nel manuale del kit non sono seguite, il laboratorio deve validare tutti i cambiamenti e la documentazione degli studi di validazione deve essere disponibile.

Il laboratorio deve documentare le limitazioni dei test iniziali e mostrare come i test di conferma risolvano il problema della non specificità dei primi test.

Ciascuna procedura deve essere rivista regolarmente, datata e siglata dal direttore di laboratorio o da un suo designato.

La documentazione tecnica relativa alle analisi deve essere conservata in un luogo sicuro ed essere sufficientemente completa per permettere la revisione scientifica del processo analitico. La documentazione deve riguardare, fra l'altro, i calibratori e i controlli associati con ciascun lotto delle analisi, le letture degli strumenti ed i cromatogrammi generati durante le analisi, la identificazione del campione esaminato, il nome dell'analizzatore e la certificazione del rapporto finale.

2.4.3. Revisione e certificazione del dato analitico.- La revisione deve includere i dati sui bianchi, calibratori, controlli e campioni analizzati.

2.4.4. Programmi di controllo di qualità (CQ). - Devono essere disponibili dati sul controllo di qualità interno ed esterno.

Deve essere portato in evidenza la documentazione delle misure correttive adottate per ovviare ai problemi identificati dai programmi di controllo di qualità.

2.4.5. Strumentazione.- E' necessario un protocollo per la calibrazione ed operatività degli strumenti così come una lista per la manutenzione ordinaria e straordinaria. Deve esserci un manuale per riportare i problemi riscontrati nello strumento e gli interventi tecnici programmati e quelli dovuti a guasti.

2.4.6. Catena di custodia.- La validità dei risultati di laboratorio per una particolare analisi non dipende solo dall'adeguatezza del processo analitico ma anche dalla prova dell'integrità del campione dal momento in cui il campione è stato raccolto fino a quando l'analisi viene completata.

La documentazione che accompagna il campione e che riporta notizie sul prelievo, sul trasporto, sulla conservazione è chiamata catena di custodia.

L'iter seguito fino dalla raccolta deve essere facile da rintracciare, seguendo le date e le firme del personale che ha preso in carico il campione.

Questa documentazione deve nascere insieme agli eventi e non essere ricostruita a posteriori.

Viene fatto un esempio di modulo di catena di custodia. La parte superiore del modulo deve contenere informazioni circa la raccolta compreso il nome ed il numero di identificazione del soggetto, la data e l'ora del campionamento e il nome e la firma del raccogliitore (vedi 2.2.3.). Nella parte posteriore ciascun cambio di custodia deve essere documentato.

Un esempio di cambio di custodia è la consegna del campione dal personale indicato per il trasporto al personale del laboratorio incaricato del ricevimento. Nel modulo deve essere specificato nome e cognome del trasportatore, ora e data di consegna.

2.4.7. Modulo richiesta analisi.- Ogni campione deve essere accompagnato da un apposito modulo di richiesta analisi.

Nel modulo devono essere riportati oltre ai dati del paziente il motivo della richiesta in modo da poter indirizzare il laboratorio nella scelta dell'analisi; se cioè deve essere fatto solo il riconoscimento delle sostanze oppure l'analisi quantitativa dei singoli analiti.

Devono anche essere indicati eventuali urgenze e la ricerca di particolari analiti non analizzati di routine dal laboratorio.

2.5. Processi di produzione

I prodotti in entrata (campioni, reattivi, strumenti, ecc.) non devono essere utilizzati prima che sia stata effettuata su di essi una verifica formale delle specifiche richieste.

Per lo stesso motivo la verifica all'idoneità dei campioni di urina che devono essere sottoposti all'analisi va effettuata al momento dell'accettazione.

2.5.1. Controllo di qualità interno (CQI). - Il CQI può essere definito come quel meccanismo di attività approntato per controllare gli errori e per promuovere le validità ed attendibilità dei dati di laboratorio.

2.5.2. Documentazione.- Il CQ comincia con una dettagliata documentazione delle attività di laboratorio per mezzo di procedure operative standard (SOP, Standard Operating Procedures).

Queste SOP non solo descrivono tutti i dettagli del procedimento analitico ma anche la raccolta e la manipolazione del campione, la conservazione dei dati raccolti, l'uso e la manutenzione degli apparecchi.

Un effettivo CQ richiede una adesione consistente e stringente a queste SOP.

Tutte le SOP devono essere datate e soggette ad una revisione periodica da parte del personale che supervisiona. Ciascun cambiamento deve essere documentato, avere l'approvazione del direttore di laboratorio ed indicare l'effettiva data del cambiamento.

2.5.3. Metodologie analitiche.- L'uso di metodologie analitiche con sensibilità, specificità e precisioni note è un punto cruciale per la produzione di risultati validi e attendibili. Tutti i metodi devono essere validati dal laboratorio nelle loro condizioni operative.

Ciascun metodo deve essere descritto in una SOP dettagliando la procedura per la preparazione degli standard e dei reagenti, preparazione del campione, funzionamento e calibrazione degli strumenti, sequenza di posizionamento degli standard, controlli e campioni, e produzione dei dati basati su definiti criteri di accettabilità.

Ciascuna analisi deve essere eseguita in stretta aderenza alle SOP.

E' incluso in ciascun metodo un controllo di qualità del sistema di analisi per assicurare che la procedura continui a produrre dati con la stessa qualità prodotta quando il metodo è stato validato.

2.5.4. Standard di riferimento.- Gli standard dei farmaci e dei metaboliti devono essere scelti con cura perchè essi servono per calibrare i metodi analitici. Deve essere riportata la formula chimica, il grado di purezza, le proprietà chimico-fisiche, se è una base o un sale e il peso molecolare. Il certificato di analisi che accompagna ciascuno standard deve essere archiviato e conservato.

Per il possesso degli standard bisogna adeguarsi alla normativa vigente. E' importante controllare come devono essere conservati e periodicamente vanno analizzati per verificare l'eventuale degradazione.

2.5.5. Campione di controllo.- Il campione di controllo contenente una quantità nota del farmaco o del metabolita deve essere analizzato come un campione qualsiasi da analizzare.

Il materiale di controllo deve essere il piu' possibile simile ai campioni di urina dei soggetti tossicodipendenti: dovrebbe quindi contenere i farmaci e i metaboliti che sono presenti nei campioni dei pazienti (per esempio dovrebbe contenere morfina e morfina glucoronide o cocaina e benzoilecgoina). Urine drug-free possono essere preparate nel laboratorio ma devono essere attentamente analizzate prima dell'uso per assicurarsi che nessuna sostanza interferente sia presente.

Per le analisi preliminari un controllo negativo, uno positivo contenente l'analita con concentrazione vicino il valore soglia ed un controllo positivo contenente l'analita al di sopra del valore soglia devono essere analizzati con ciascuna serie di campioni.

Generalmente un minimo del 10% di tutti i campioni analizzati devono essere campioni per il controllo di qualità.

Al fine di una maggiore efficacia questi campioni devono essere dispersi in maniera casuale fra i campioni che vengono analizzati.

Per evitare errori i campioni di controllo negativi devono essere posizionati dopo un controllo positivo.

I campioni di controllo per le tecniche di conferma quantitative devono consistere di un campione negativo, uno vicino al LOQ, uno intorno al valore medio della curva di calibrazione ed uno ad un valore elevato. Per confronto con i già visti valori target e limiti di accettabilità l'analista può determinare se il test è stato eseguito in maniera appropriata.

I risultati del controllo devono essere riportati ogni giorno. Tutti i dati del CQ devono essere riuniti e documentati.

2.5.6. Valutazione esterna della qualità (VEQ).- Il controllo di qualità esterno è un procedimento che utilizza, al fine del controllo, i risultati delle analisi eseguite nei diversi laboratori che analizzano lo stesso campione o campioni diversi. Fornisce una valutazione a posteriori dell'attendibilità analitica.

La partecipazione ai VEQ può essere volontaria oppure richiesta dalla legge e i risultati vengono valutati da un organismo di controllo o di accreditamento. I programmi di valutazione esterna della qualità (VEQ) si pongono l'obiettivo di fornire una misura della capacità dei diversi laboratori di ottenere lo stesso risultato per un medesimo campione.

I VEQ a seconda della proprietà e delle modalità di espletamento sono utili per:

- definire lo stato dell'arte delle prestazioni fornite per una determinata analisi;
- ottenere valori di consenso per materiali di controllo;
- studiare le variabili che influenzano i risultati;
- migliorare il livello di prestazione dei singoli laboratori.

Nei programmi aperti, i campioni possono essere conosciuti dal personale del laboratorio. Spesso però maggior attenzione è posta nella manipolazione e analisi di questi campioni. Il risultato è che la performance di un laboratorio basato su un programma VEQ probabilmente rappresenta il massimo sforzo del laboratorio e può non indicare la vera abilità del laboratorio nell'analizzare i campioni della routine.

Inoltre nei programmi facoltativi è più alta la partecipazione dei laboratori più preparati e più motivati che trovano beneficio dalla partecipazione ai programmi e aumentano così il divario con i laboratori meno preparati.

Nell'interpretare i risultati ottenuti in un programma di VEQ nazionale si deve tener anche conto della dislocazione geografica dei laboratori partecipanti onde evitare errori nella stima dell'efficienza del livello delle prestazioni di tutti i laboratori di analisi.

I VEQ dovrebbero avere un numero di partecipanti alto in modo da poter analizzare i risultati anche in base ai sottogruppi (esempio metodi di analisi, pretrattamento del campione ecc....).

Devono essere ben specificate le modalità per lo stoccaggio, e per le analisi dei campioni e per l'invio dei risultati. Il volume dei campioni inviati per l'analisi deve essere commisurato al tipo di analisi richiesta onde evitare che l'analizzatore ripeta più volte, e con metodiche diverse da quelle indicate, le analisi.

Nei programmi di controllo di qualità esterni delle sostanze d'abuso, vengono misurati campioni di urine a cui sono state aggiunte concentrazioni note delle principali sostanze d'abuso e/o e dei loro metaboliti.

I laboratori possono partecipare alla identificazione delle classi di sostanze con i cut-off stabiliti dal programma. (esempio quelli della tab.1)

Parteciperanno a questi programmi i laboratori che eseguono analisi iniziali (LAB/A) (vedi 3.1.).

I laboratori che eseguono oltre all'analisi iniziali anche le analisi di conferma parteciperanno a programmi che prevedono l'identificazione e la quantizzazione delle singole sostanze. (LAB/B) (vedi 3.2.).

I laboratori del primo tipo dovranno fornire i risultati analitici in termini di assenza o presenza per classi di sostanze; gli altri dovranno comunicare anche la concentrazione delle singole sostanze.

Dovrà essere anche indicata la metodologia scelta per le analisi di primo livello e di conferma.

2.5.7. Valutazione dei risultati.- Lo scopo di questa fase è di ottenere informazioni circa l'efficienza dei laboratori e rappresentare queste informazioni nel modo più chiaro e rapido possibile.

I risultati possono essere valutati in diversi modi a secondo come sono stati definiti i valori assegnati:

- come valore medio ottenuto con un metodo di riferimento o con un metodo ad accuratezza noto;
- come media generale di tutti i risultati dopo aver eliminato i valori aberranti;
- come media di un gruppo di laboratori di riferimento;
- come media di tutti i risultati ottenuti da un gruppo di laboratori che impiegano lo stesso metodo dopo l'esclusione dei valori aberranti.

Il criterio per l'esclusione dei valori aberranti varia da indagine a indagine, se per esempio la distribuzione dei risultati validi è simmetrica si possono escludere tutti i risultati studiati al di fuori della media $\pm 3DS$, oppure si possono usare percentili indipendenti dalla distribuzione o fissare dei limiti stabiliti in base all'esperienze di analoghi programmi di VEQ.

L'inclusione dei valori aberranti condurrà, ad una valutazione dell'efficienza globale dei laboratori; se sono esclusi è verosimile che si valuterà l'efficienza analitica manuale.

Se un risultato differisce in modo marcato dal valore atteso ed è stato definito come aberrante il laboratorio partecipante al VEQ deve controllare che:

- non siano stati compiuti errori nella trascrizione del risultato;
- sia stato analizzato il campione giusto;
- non ci sia stato inquinamento del campione.

Se i risultati presentano un'ampia dispersione dal valore atteso da ambo i lati vuol dire che c'è una imprecisione che deve essere verificata e corretta.

I parametri da verificare sono:

- che la tecnica analitica venga seguita esattamente;
- che la preparazione del personale sia adeguata.

Se i risultati divergono in modo sistematico dai valori attesi occorre verificare se questo non sia un problema della tecnica di analisi oppure vi siano errori sistematici sul protocollo di analisi.

3. TIPOLOGIA DEL LABORATORIO

3.1. Configurazione di un laboratorio che esegue test iniziali (LAB/A)

<i>Cut-off</i>	vedi tab.1
<i>Metodiche</i>	immunochimiche
<i>Procedure</i>	vedi (1.3.)
<i>Documentazione</i>	si
<i>Revisione e certificazione dato analitico</i>	si
<i>Controllo di qualità</i>	si, partecipazione ad un programma di VEQ con l'opzione per analisi qualitativa.
<i>Liquido biologico</i>	urina
<i>Tipo di analisi</i>	qualitativa
<i>Strumentazione ed equipaggiamento</i>	vedi (1.5.)
<i>Catena di custodia</i>	no

La maggior parte dei soggetti afferenti ai servizi pubblici assumono come droga primaria l'eroina. E' evidente quindi che grande attenzione deve essere posta alle conseguenze dell'uso di questa sostanza.

Nei soggetti già in carico al servizio e assegnati a trattamenti di disintossicazione e/o mantenimento con metadone o con altri farmaci agonisti o antagonisti è sufficiente eseguire solo lo screening qualitativo per oppiacei, cannabinoidi, cocaina, amfetamina, benzodiazepine e barbiturici.

Solo su richiesta motivata si procederà all'analisi di altri analiti.

Il referto sarà portato a conoscenza del paziente da parte del personale del servizio. In caso di contestazione del risultato da parte dell'utente si procederà all'analisi di conferma con il riconoscimento ed il dosaggio dei singoli analiti.

E' evidente che non avendo approntato una adeguata catena di custodia, anche l'eventuale analisi effettuata con metodica cromatografica non potrà avere valenza medico-legale.

Bisogna inoltre considerare che la positività alle urine non deve avere necessariamente come conseguenza l'esclusione del soggetto dal programma di trattamento (Circolare Ministero Sanità n° 20 del 30 /09/1994)(9).

Trascorse 48 ore dalla consegna del referto in assenza di contestazioni il campione di urina verrà eliminato.

3.2. Configurazione di un laboratorio che esegue test iniziali e analisi di conferma (LAB/B).

<i>Cut-off</i>	vedi tab. 1 e 2
<i>Metodiche</i>	immunochimiche e cromatografiche
<i>Procedure</i>	vedi (1.3 e 1.4.)
<i>Documentazione</i>	si
<i>Revisione e certificazione dato analitico</i>	si
<i>Controllo di qualità</i>	si, partecipazione ad un programma di VEQ con l'opzione dell'analisi qualitativa delle classi di sostanze e quantitativa dei singoli analiti.
<i>Matrici biologiche</i>	tutte (urina, sangue, capelli)
<i>Strumentazione ed equipaggiamenti</i>	vedi (1.5 e 1.6.)
<i>Catena di custodia</i>	si

Solo eseguendo analisi iniziali immunochimiche e conferme cromatografiche è possibile identificare con certezza un campione positivo per la sostanza indagata.

Le analisi iniziali sono qualitative ed individuano solo la classe di sostanze. La conferma quantitativa permette di identificare il singolo analita.

Motivo della richiesta dei test iniziali e di conferma:

- per l'accertamento dello stato di tossicodipendenza nei soggetti che si rivolgono per la prima volta ad un servizio;
- contestazione di un campione da parte di un soggetto in trattamento metadonico o non (valore non medico-legale non essendo stata approntata la catena di custodia);
- in tutti quei casi in cui il risultato ha valore medico legale quali: ritiro della patente, porto d'armi, affidamento minori ecc.

4. GLOSSARIO

Le definizioni dei termini sono quelle proposte dalla Sottocommissione 01.1 Controllo di Qualità della Sibioc, pubblicate su *Biochimica Clinica* 1995, 19 (5): 372-400 e riportate per gentile concessione dell' Editore.

Accuratezza. Grado di concordanza tra la misura di posizione di un insieme di misure ripetute (la media nel caso di una distribuzione gaussiana) e il --- valore medio. Non ha valore numerico. Vedere --- inaccuratezza.

Affidabilità strumentale. Espressione utilizzata di norma con riferimento alla frequenza dei guasti strumentali.

Aliquota. Porzione misurata di un intero, avente composizione omogenea e uguale a quella dell'intero da cui è tratta. Termine generale, che si riferisce a qualsiasi soluzione, campione, miscela, eccetera.

Analita. Vedere ---- componente.

Attendibilità. Concetto d'insieme che comprende tutte le proprietà di un metodo (come ad esempio la precisione, l'accuratezza, la sensibilità e la specificità) che contribuiscono alla utilità clinica dei risultati ottenuti. Tanto maggiore è l'attendibilità di un metodo, tanto più esso sarà utile dal punto di vista clinico.

Calibratore. Vedere --- materiale di calibrazione.

Calibrazione. Procedimento mediante il quale si mette in rapporto il valore letto sullo strumento (la --- lettura strumentale) con la grandezza che si intende misurare.

Campione analitico. La --- aliquota del --- campione in esame ricevuto dal laboratorio che è utilizzata per l'analisi. E' opportuno aggiungere al termine "campione" l'attributo "analitico" onde evitare confusione con il termine statistico "campione", che indica un sottoinsieme estratto da una popolazione

Campione di controllo. Campione che è analizzato esclusivamente a scopo di controllo di qualità, e non per calibrazione.

Campione in esame. Il tipo di materiale disponibile per l'analisi. Esempi: campione di sangue, campione di siero, campione di urine, campione di liquido cerebrospinale, eccetera.

Campo analitico. Vedere --- intervallo analitico.

Coefficiente di variazione. Vedere --- deviazione standard relativa.

Componente. Qualsiasi costituente del --- campione in esame misurato a scopo diagnostico. Può essere un elemento, uno ione, un composto, una sostanza, un fattore, un agente di infezione, una cellula, o una attività enzimatica, ormonale o immunologica; o

una sostanza o proprietà di cui si debbano misurare la concentrazione, l'attività, l'intensità o altre caratteristiche.

Controllo. Vedere --- materiale di controllo.

Controllo di calibrazione. L'insieme delle procedure di --- controllo di qualità che consentono di verificare la corretta --- calibrazione di un sistema analitico prima dell'avvio del processo analitico.

Controllo di qualità. L'insieme di tutte le procedure che consentono di garantire la qualità dell'aspetto tecnico del prodotto "analisi di laboratorio", cioè la qualità del processo analitico.

Controllo di qualità esterno. Espressione sconsigliata. Vedere l'espressione consigliata --- valutazione esterna della qualità.

Controllo di qualità interno. L'insieme delle procedure di --- controllo di qualità eseguite quotidianamente, per tutti gli analiti, a più livelli di concentrazione per ciascun analita, al fine di ottenere un segnale di allarme in tempo reale al verificarsi di un --- errore della serie analitica, e di monitorare la --- imprecisione e la --- inaccuratezza del metodo analitico.

Controllo di qualità interno allargato. Procedura di --- controllo di qualità consistente nella elaborazione complessiva dei risultati del --- controllo di qualità interno provenienti da laboratori che utilizzano tutti lo/gli stesso/i materiale/i di controllo.

Controllo di sistema. Procedura di --- controllo di qualità che prevede il controllo, prima dell'avvio del processo analitico, delle funzioni meccaniche, ottiche e/o elettroniche del sistema analitico. Non comporta l'utilizzo di materiali di controllo. Un esempio di controllo di sistema è il controllo delle lunghezze d'onda di uno spettrofotometro mediante filtro di olmio.

Controllo di validità. Procedura di --- controllo di qualità che consente di verificare la corretta esecuzione di ogni singolo test mediante un controllo cablato nel test stesso (esempio: controllo positivo e/o negativo incluso nei test immunoenzimatici su stiscia). Il controllo di validità è prevalentemente orientato alla rilevazione degli --- sbagli.

CQ. Sigla utilizzata per indicare il --- controllo di qualità.

CQA. Sigla utilizzata per indicare il --- controllo di qualità interno allargato.

CQI. Sigla utilizzata per indicare il --- controllo di qualità interno.

CV. Sigla utilizzata per indicare il --- coefficiente di variazione.

Dato aberrante. Vedere --- risultato aberrante.

Deviazione standard. La misura di dispersione di una distribuzione gaussiana.

Deviazione standard relativa. Rapporto tra la --- deviazione standard e la --- media di una distribuzione gaussiana. La deviazione standard relativa consente di rendere confrontabili tra loro le deviazioni standard corrispondenti a medie diverse. Moltiplicato

per 100, il rapporto tra la deviazione standard e la media viene denominato --- coefficiente di variazione.

Errore. Differenza tra una singola misura di una grandezza e il suo --- valore vero. Questa differenza o deviazione (positiva o negativa) può essere espressa sia nelle unità in cui è misurata la grandezza, sia --- come percentuale del valore vero. Se il valore vero non è conosciuto, la differenza può essere espressa come deviazione da un --- valore assegnato. Ripetendo più volte una misura, è possibile pervenire ad una migliore caratterizzazione dell'errore: vedere --- errore casuale ed --- errore sistematico.

Errore casuale. L'errore per cui, nel caso di misure replicate della stessa grandezza, le singole misure differiscono casualmente, cioè senza nessuna regola apparente al succedersi delle misure stesse, tra di loro. L'errore casuale viene stimato dalla --- imprecisione.

Errore grossolano. Vedere --- sbaglio

Errore sistematico. L'errore per cui un insieme di misure ripetute della stessa grandezza, preso come un tutt'uno, si discosta dal --- valore vero. L'errore sistematico viene stimato dalla --- inaccuratezza.

Imprecisione. Misura di dispersione di un insieme di misure ripetute. Nel caso di una distribuzione gaussiana come misura di dispersione viene utilizzata la --- deviazione standard. E' necessario indicare il valore medio e il numero delle repliche, e descrivere il piano sperimentale in modo che altri operatori lo possano ripetere. Ciò è particolarmente importante qualora si utilizzi un termine specifico per indicare un particolare tipo di imprecisione: ad esempio tra laboratori, nel giorno, tra giorni.

Inaccuratezza. Differenza numerica tra la misura di posizione di un insieme di misure ripetute (la media nel caso di una distribuzione gaussiana) e il valore vero. La differenza, positiva o negativa, può essere espressa sia nelle unità in cui la grandezza è misurata, sia come percentuale del valore vero.

Interferenza. Effetto indesiderato di un componente sulla --- accuratezza della misura di in altro componente.

Intervallo analitico. Intervallo di concentrazione, o altra grandezza del campione, nel cui ambito il metodo è applicabile senza alcuna modifica.

Lettura strumentale. Valore (espresso in una qualsiasi scala numerica) del segnale fornito da uno strumento o dispositivo analitico.

Limite di rivelazione. Il più piccolo valore di concentrazione di un analita che, con un livello di probabilità prestabilito, può essere differenziato dalla concentrazione zero (assenza dell'analita). Il limite di rivelazione definisce la concentrazione a partire dalla quale ha significato esprimere i risultati in termini quantitativi.

Materiale certificato. Materiale le cui caratteristiche sono certificate da un organismo ufficiale.

Materiale di calibrazione. Materiale impiegato per la --- calibrazione di un sistema analitico. Un materiale di calibrazione non può essere utilizzato a scopo di controllo.

Materiale di calibrazione primario. Materiale impiegato per la --- calibrazione di un sistema analitico, e la cui concentrazione è determinata esclusivamente sciogliendo una quantità pesata di un --- materiale standard primario in un volume o peso prestabilito di un solvente appropriato.

Materiale di calibrazione secondario. Materiale impiegato per la ---calibrazione di un sistema analitico, e la cui concentrazione è stata dettrminata mediante analisi con un metodo analitico avente inaccuratezza nota.

Materiale di controllo. Materiale usato per effettuare il --- controllo di qualità. Un materiale di controllo non può essere utilizzato a scopo di calibrazione.

Materiale standard primario. Sostanza di composizione chimica nota, e di purezza sufficiente per consentire l'impiego nella preparazione di un --- materiale di calibrazione primario.

Media. La misura di posizione di una distribuzione gaussiana.

Metodo analitico. L'insieme delle procedure che consentono di ottenere, su un determinato campione, il risultato analitico. Il metodo analitico viene codificato mediante istruzioni scritte, che descrivono i materiali, il procedimento e la strumentazione necessari per ottenere un risultato.

Metodo definitivo. Un metodo che, per convenzione, viene assunto in grado di fornire il --- valore vero. Nel caso di specie molecolari definite, il metodo definitivo è quello che, dopo esauriente ricerca, e per accordo generale, viene considerato ideale sia in termini di --- inaccuratezza che in termini di --- imprecisione.

Metodo di inaccuratezza ignota. Un metodo analitico la cui --- inaccuratezza è ignota.

Metodo di inaccuratezza nota. Un metodo analitico per la quale è stata determinata la direzione e l'entità della --- inaccuratezza (questa può essere addirittura uguale a zero).

Metodo di riferimento. Un --- metodo di inaccuratezza nota rispetto al --- metodo definitivo e che, per le sue caratteristiche di maggiore praticabilità, viene utilizzato per il trasferimento della --- accuratezza del metodo definitivo del --- metodo di routine.

Metodo di routine. Metodo analitico di uso corrente. L'accuratezza del metodo di routine viene garantita, a partire dal --- metodo definitivo e dal --- metodo di riferimento, attraverso l'utilizzo di appropriati materiali di calibrazione e di controllo. Il metodo di routine deve fornire il --- valore vero con un --- errore contenuto entro limiti prestabiliti.

Precisione. Grado di concordanza trà misure ripetute. Non ha valore numerico. Vedere --- imprecisione.

Risultato. Valore finale ottenuto per una grandezza misurata con un metodo analitico; comprende anche le valutazioni del laboratorio.

Risultato aberrante. Risultato che, in un insieme di risultati, si discosta dagli altri in misura tale da rendere assai improbabile la sua appartenenza all'insieme stesso.

Rivelabilità. Capacità di un metodo analitico di evidenziare piccole quantità di un componente. Non ha valore numerico. Vedere --- limite di rivelazione.

Sbaglio. Accidente tecnico. Gli sbagli sono legati prevalentemente all'organizzazione (esempi di sbagli in chimica clinica possono essere l'errata trascrizione di un dato numerico, l'utilizzo di un reagente scaduto, lo sbaglio nell'identificazione del campione). Contrariamente a quanto avviene per gli errori gli sbagli si possono evitare operando con cura, e migliorando il sistema organizzativo. Contrariamente a quanto avviene per gli errori, non è possibile fissare un livello di tolleranza per gli sbagli, cioè definire una percentuale ammissibile di sbagli: semplicemente, gli sbagli per definizione non si devono verificare.

Sensibilità. Riferita a un metodo analitico, la sensibilità è il rapporto tra la variazione tra il segnale strumentale e la variazione della concentrazione dell'analita. In pratica la sensibilità misura la pendenza della curva di calibrazione. Riferita a un test diagnostico per una data malattia la sensibilità è la percentuale di soggetti malati in cui il test è positivo. Un test ideale ha una sensibilità del 100 % (è positivo in tutti i malati).

Serie analitica. Insieme di test eseguiti consecutivamente, senza interruzione, i cui risultati vengono calcolati sulla base della medesima procedura di --- calibrazione, e validati sulla base della medesima procedura di --- controllo di qualità interno.

Sistema analitico. L'insieme della strumentazione, dei materiali di calibrazione e dei materiali di controllo con i quali è possibile produrre e riprodurre un determinato risultato analitico.

Soluzione di controllo. Vedere --- materiale di controllo.

Soluzione standard primaria. Vedere --- materiale di calibrazione primario.

Soluzione standard secondaria. Vedere --- materiale di calibrazione secondario.

Specificità. Riferita ad un metodo analitico, la specificità è la capacità del metodo di determinare esclusivamente il componente o i componenti che si debbono misurare. Non ha valore numerico. È valutata in base alle informazioni disponibili sui componenti che contribuiscono al risultato, e al grado con cui essi vi contribuiscono. Riferita a un test diagnostico per una data malattia, la specificità è la percentuale di soggetti sani in cui il test è negativo. Un test ideale ha una specificità del 100% (è negativo per tutti i sani).

Standard. Vedere --- materiali di calibrazione.

Standard interno. Una sostanza normalmente assente nel campione in esame e chiaramente distinguibile dalla sostanza da analizzare, che è aggiunta in quantità nota al campione o anche allo standard di calibrazione, allo scopo di correggere i risultati, e di ottenere una migliore --- accuratezza del risultato.

Standard primario. Vedere --- materiale standard primario e materiale di calibrazione primario.

Standard secondario. Vedere --- materiale di calibrazione secondario.

Taratura. Vedere --- calibrazione.

Trascinamento. Influenza di un campione sul successivo (nella letteratura inglese “ carry-over”). In italiano è possibile utilizzare anche l'espressione “interazione tra campioni”.

Valore (di concentrazione o altri tipi di grandezza, nei materiali di calibrazione, nei campioni di controllo, eccetera). Occorre dichiarare sempre il metodo con il quale è stato ottenuto il valore. Il termine è impiegato in numerose espressioni come ad esempio --- valore aberrante, --- valore assegnato, --- valore certificato, --- valore definitivo, valore del metodo di riferimento, --- valore dichiarato, --- valore vero.

Valore aberrante. Vedere --- risultato aberrante

Valore assegnato. Valore assegnato o arbitrariamente (ad esempio per convenzione), o in base a una serie di misure aventi accuratezza nota o ignota (ad esempio in assenza di un metodo di riferimento riconosciuto).

Valore certificato. Valore certificato da un organismo ufficiale, secondo i criteri stabiliti dall'organismo stesso.

Valore definitivo. Valore assegnato a un materiale mediante un --- metodo definitivo: rappresenta la migliore stima disponibile del --- valore vero.

Valore dichiarato. Valore senza certificazione ufficiale.

Valore di riferimento. Valore che fa parte di un insieme di dati utilizzati per calcolare gli intervalli di riferimento. Non va confuso con il --- valore del metodo di riferimento.

Valore metodo di riferimento. Valore assegnato a un materiale mediante un --- metodo di riferimento: rappresenta una stima del --- valore vero di qualità lievemente inferiore a quella fornita dal --- metodo definitivo.

Valore misurato. Sinonimo di --- valore sperimentale.

Valore sperimentale. Valore numerico ottenuto mediante un procedimento di misura.

Valore trovato. Sinonimo --- valore sperimentale.

Valore vero. Valore che si otterrebbe nel corso di una misura, se il procedimento di una misura non fosse affetto da incertezza.

Valore vero convenzionale. E' per convenzione, la migliore stima disponibile del valore vero, fornita dai valori del --- metodo definitivo; un'approssimazione di qualità lievemente inferiore è fornita dai valori del --- metodo di riferimento.

Valutazione esterna della qualità. Procedura che utilizza, ai fini del --- controllo di qualità, i risultati di laboratori che, in un'area geografica più o meno estesa, analizzano materiali di controllo appositamente distribuiti. La valutazione esterna della qualità

consente di ottenere una misura della efficacia delle procedure di controllo di qualità adottate.

VEQ. Sigla utilizzata per indicare la --- valutazione esterna della qualità.

BIBLIOGRAFIA

- 1) DL 502, G.U. n.350 del 30/12/1992; DL 517 , G.U. n.293 del 15/12/1993
- 2) AMERICAN DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. *Federal Workplace drug testing programs, mandatory guidelines*, 1994 (FR doc, 94-13940) .
- 3) VINOD, P., SHAH, K., MIDHA, K., et al. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. *J. Pharmaceutical Sciences* 1992, 81: 309-312 .
- 4) IL CONTROLLO DI QUALITA' IN CHIMICA CLINICA. Traduzione italiana dei documenti IFCC (1992). *Biochimica Clinica* 1992, 16 (5): 405-459.
- 5) BESOZZI, M., BOLELLI, G., BORSOTTI, M., LEONE, L., MESSERI, G., MOTTA, R., PRENCIPE, L., TOCCHINI, M. Il controllo di qualità in chimica clinica: le basi, gli obiettivi, il disegno. *Biochimica Clinica* 1995, 19 (5): 372-400.
- 6) OSTERLOH, J. Testing for drugs of abuse. *Clin. Pharmacokinet.* 1993, 24: 355-361.
- 7) BRAITHWAITE, R.A., JARVIE, D.R., MINTY, P.S.B., SIMPSON, D., WIDDOP, B. Screening for drugs of abuse: I: Opiates, anphetamines and cocaine. *Ann..Clin. Biochem.* 1995, 32: 123-153 .
- 8) *Relazione sui dati relativi allo stato delle tossicodipendenze in Italia, sulle strategie adottate e sugli obiettivi raggiunti nel 1995. Presidenza del Consiglio dei Ministri, Dipartimento per l'informazione e l'Editoria (Roma, 31/03/1996).*
- 9) *Linee guida per il trattamento delle dipendenze da oppiacei con farmaci sostitutivi. Circolare Ministero della Sanità n° 20 del 30-09-1994.*

*Direttore reggente dell'Istituto Superiore di Sanità
e Responsabile scientifico: Aurelia Sargentini*

Direttore responsabile: Vilma Alberani

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, settembre 1996 (n. 3) 7° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*