

LINEE GUIDA PER I LABORATORI DI ANALISI DI SOSTANZE D'ABUSO CON FINALITÀ TOSSICOLOGICO-FORENSI E MEDICO-LEGALI

Revisione n. 3 del 1 marzo 2010 a cura della Commissione Qualità¹ del Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)

PREMESSA

Le "LINEE GUIDA PER I LABORATORI DI ANALISI DELLE DROGHE D'ABUSO CON FINALITÀ MEDICO-LEGALI" furono elaborate per la prima volta nell'anno 2000, nell'ambito dei Progetti di ricerca del Ministero della Salute in tema di: "Miglioramento della qualità analitica nell'analisi tossicologica delle sostanze d'abuso e standardizzazione delle procedure analitiche adottate nella diagnostica di laboratorio, nonché di formazione specifica del personale preposto agli accertamenti tossicologici".

Le Linee Guida, condivise dal Gruppo Tossicologi Forensi Italiani della SIMLA, sono state quindi oggetto di revisione ed aggiornamento periodici. In particolare, nel luglio 2003 è stata pubblicata una prima revisione, successivamente aggiornata nel maggio 2008 (revisione n. 2) al fine di standardizzare le procedure analitiche adottate dai LABORATORI DI ANALISI DI SOSTANZE D'ABUSO CON FINALITÀ TOSSICOLOGICO-FORENSI E MEDICO-LEGALI. La revisione contenuta nel presente documento (revisione n. 3) è stata elaborata dalla Commissione Qualità del GTFI ed approvata dal Consiglio Direttivo della stessa Società Scientifica.

Si è ritenuto opportuno procedere alla presente revisione al fine di meglio esplicitare i concetti della qualità cui devono attenersi i laboratori che effettuano analisi di sostanze d'abuso con finalità medico-legali. Inoltre sono stati perfezionati alcuni aspetti propriamente tossicologico-forensi della precedente versione. Infine, si è ritenuto necessario introdurre nelle LINEE GUIDA PER I LABORATORI DI ANALISI DI SOSTANZE D'ABUSO CON FINALITÀ TOSSICOLOGICO-FORENSI E MEDICO-LEGALI (d'ora in avanti denominate *Linee Guida*) le procedure relative alla determinazione dell'alcoolemia.

La presente revisione delle *Linee Guida* è stata realizzata in considerazione:

- dello sviluppo ed affinamento dei concetti e finalità delle Linee Guida già formulati dal GTFI nelle precedenti versioni;
- dell'interpretazione della norma UNI EN ISO 9000:2005 "Sistemi di gestione per la qualità (Fondamenti e terminologia)";
- dell'interpretazione della norma UNI EN ISO 9001:2008 "Sistemi di gestione per la qualità (Requisiti)";
- del recepimento di alcuni requisiti della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura".

Le *Linee Guida* sono articolate in 9 sezioni:

1. Scopo e applicazioni
2. Termini e definizioni
3. Personale
4. Procedure
5. Requisiti per le attività analitiche
6. Accettazione, prelievo, manipolazione e movimentazione dei campioni
7. Metodi analitici
8. Assicurazione della qualità
9. Rapporto analitico o referto

¹La Commissione Qualità del GTFI che ha elaborato la revisione n. 3 delle *Linee Guida* è costituita da:

Aldo Poletti, Università degli Studi di Verona (coordinatore)
Renata Borriello, II Università degli Studi di Napoli;
Marina Caligara, Università degli Studi di Milano;
Marcello Chiarotti, Università Cattolica S. Cuore di Roma;
Roberto Gagliano Candela, Università degli Studi di Bari;
Francesco Mari, Università degli Studi di Firenze;

Elisa Saligari, Università degli Studi di Brescia;
Rossella Snenghi, Università degli Studi di Padova;
Cristiana Stramesi, Università degli Studi di Pavia;
Sabina Strano Rossi, Università Cattolica del S. Cuore di Roma - Laboratorio Antidoping FMSI

1. SCOPO E APPLICAZIONI

1.1. Scopo

L'esigenza che ha ispirato l'elaborazione delle *Linee Guida* è individuabile nei punti di seguito descritti.

- Le analisi di sostanze d'abuso a scopo forense sono suscettibili di miglioramento continuo sia per i progressi nell'individuazione di nuovi marcatori specifici di abuso come pure nell'individuazione di substrati biologici alternativi o complementari a quelli di impiego tradizionale, sia infine per il progresso e il consolidamento delle tecniche analitiche.
- Le analisi di sostanze d'abuso a scopo forense possono assumere carattere di prova giudiziaria la quale, per definizione, deve possedere requisiti di certezza e di affidabilità (dimostrabili attraverso la documentazione e la rintracciabilità di ogni fase analitica) nonché di trasparenza ed uniformità.
- Un elevato livello qualitativo dei risultati delle analisi di sostanze d'abuso a scopo forense è assicurato non solo dall'utilizzo di metodi e tecniche consolidate, ma anche dalla certezza che gli stessi risultati provengano da strutture culturalmente preparate, costantemente aggiornate, dotate di organizzazione efficiente e caratterizzate da elevata affidabilità nel tempo.
- A livello nazionale, infine, è avvertita la forte richiesta di uniformità e confrontabilità delle procedure pre-analitiche (accettazione, consenso, prelievo, conservazione), analitiche (trattamento del campione, analisi strumentale) e post-analitiche (interpretazione del dato, refertazione, stoccaggio del campione) al fine di poter considerare tutti gli elementi che concorrono alla produzione del risultato.

Lo scopo delle presenti *Linee Guida* è dunque riassumibile nei seguenti punti:

- mettere a disposizione di tutti i laboratori di analisi di sostanze d'abuso a scopo forense uno strumento di riferimento per un corretto approccio alle analisi improntato alla standardizzazione e alla confrontabilità dei risultati;
- fornire indicazioni e raccomandazioni sulla gestione di ogni processo analitico;
- assicurare che i laboratori dispongano di risorse culturali, umane, materiali e strumentali adeguate per operare nel settore delle analisi di sostanze d'abuso a scopo forense;
- supportare e cautelare i laboratori nella refertazione delle analisi tossicologiche a scopo forense.

1.2. Applicazioni

La stesura delle presenti *Linee Guida* è stata realizzata nell'intento di integrare tra loro i seguenti aspetti:

- diffondere e promuovere la cultura analitico-tossicologica applicata alla diagnosi a scopo forense, frutto dell'esperienza maturata negli anni dal GTFI, nello sviluppo e nell'esecuzione delle *Analisi* come pure nella loro interpretazione;
- favorire l'acquisizione, da parte dei laboratori di analisi di sostanze d'abuso a scopo forense, dei requisiti per un'organizzazione efficiente, efficace ed affidabile nel tempo attraverso l'adozione di un sistema di gestione per la qualità progettato e realizzato anche in considerazione delle caratteristiche degli stessi laboratori.

Le *Linee Guida*, quindi, sono state ideate quale elemento di autodisciplina e requisito dichiarato fondamentale di un sistema di gestione per la qualità applicato ai laboratori di analisi di sostanze d'abuso a scopo forense proponendosi come componente essenziale di un auspicabile processo di "accreditamento all'eccellenza".

E' necessario, quindi, che i laboratori di analisi di sostanze d'abuso a scopo forense adottino un sistema di gestione per la qualità che esprima e verifichi la politica della qualità basata sui seguenti principi:

- eccellenza del risultato ed efficacia organizzativa;
- costante miglioramento dello standard di qualità del servizio fornito;
- responsabilizzazione del personale nell'assicurare la qualità del lavoro svolto nell'ambito della propria funzione;
- diffusione della politica della qualità a tutto il personale della struttura;
- costante riesame della politica della qualità e dei relativi obiettivi.

1.3. Ambito di applicazione

Le presenti *Linee Guida* devono essere recepite ed applicate da tutti i laboratori deputati all'esecuzione di analisi di sostanze d'abuso in materiale biologico.

I laboratori che operano in questo ambito devono pertanto attenersi ai principi enunciati nell'ambito delle presenti *Linee Guida*, sotto il profilo organizzativo e metodologico, al fine di rispettare i requisiti di uniformità e verificabilità che garantiscano la sicurezza di qualità.

Tali requisiti riguardano:

- l'organigramma del personale, con individuazione dei compiti e delle relative responsabilità;
- le procedure di acquisizione dei campioni e di analisi degli stessi;
- le procedure di validazione dei metodi analitici;
- i criteri minimi di identificazione e quantificazione;
- i valori di cut-off per i diversi campioni biologici;
- il monitoraggio interno ed esterno dell'affidabilità analitica;
- le modalità di stesura e di emissione del rapporto analitico o referto, con eventuale interpretazione dei risultati ovvero indicazione dell'ambito di utilizzabilità.

2. TERMINI E DEFINIZIONI

I termini sottolineati nel testo trovano corrispondente definizione in questa sezione.

Accreditamento: processo volontario, volto al miglioramento continuo della qualità, mediante il quale un'istituzione o un programma si sottopongono alla valutazione di un organismo indipendente al fine di verificare e documentare se soddisfano requisiti predeterminati.

Analisi: ai fini delle presenti *Linee Guida*, il termine è riferito alle analisi di sostanze d'abuso in campione biologico prelevato da vivente a scopo forense e che possono assumere carattere di prova giudiziaria nell'applicazione di normative vigenti.

Analisi di conferma: seconda *Analisi* da eseguirsi obbligatoriamente, con un metodo dotato di maggiore specificità rispetto a quella impiegata per l'*Analisi* di *screening*, e comunque fondato su principi chimico-fisici diversi, su una differente aliquota del campione originale, al fine di identificare specificamente una sostanza e/o suoi metaboliti individuati in maniera presuntiva attraverso l'*Analisi* di *screening*.

Analisi di revisione (o controanalisi): *Analisi* eseguita su un campione di revisione (controcampione) con un metodo avente caratteristiche di specificità e di sensibilità uguali o superiori a quelle del metodo analitico utilizzato per un'*Analisi* oggetto di contestazione. Il soggetto da cui è stato prelevato il campione di revisione ha facoltà di assistere, personalmente o tramite un proprio consulente tecnico, al riconoscimento del campione stesso, alla verifica dell'integrità del sigillo e a tutte le procedure dell'analisi di revisione. L'analisi di revisione può essere effettuata dal medesimo laboratorio che ha eseguito l'analisi di prima istanza ovvero da laboratori specificamente individuati sulla base di una valutazione esterna oggettiva, ufficialmente riconosciuti per tale scopo, e dichiaranti la piena adesione alle presenti Linee Guida.

Analisi di screening: *Analisi* preliminare che fornisce un risultato presuntivo, ovvero la probabile negatività o positività (non negatività) di un campione rispetto ad una sostanza/classe di sostanze e in riferimento a un valore di cut-off prestabilito. Per definizione, un risultato positivo ottenuto con un'*Analisi* di *screening* non può assumere valenza forense.

Analisi qualitativa: *Analisi* che fornisce soltanto un risultato in termini di presenza/assenza di un analita in riferimento ad un valore di cut-off prestabilito.

Analisi quantitativa: *Analisi* in grado di misurare la concentrazione di uno o più analiti con un livello predeterminato di precisione e accuratezza

Assicurazione della qualità: rispetto delle Procedure Operative Standard attraverso l'applicazione rigorosa delle istruzioni operative e il monitoraggio continuo delle varie fasi gestionali.

Batch: gruppo di campioni esaminati in serie o in parallelo, processati nell'ambito della stessa sessione analitica.

Bianco o campione bianco: campione biologico in precedenza sottoposto ad *Analisi* per una o più sostanze e risultato negativo (concentrazione della/e sostanza/e inferiore o uguale al LLOD)

Bias (inaccuratezza): misura dell'inaccuratezza di un metodo analitico quantitativo ad una determinata quantità o concentrazione di analita. Si ottiene per differenza tra il valore medio di una serie di misurazioni ripetute su aliquote diverse di uno stesso campione e il valore reale. Esso è generalmente misurato all'interno di una sessione analitica e tra sessioni analitiche diverse (anche in considerazione della possibile esecuzione del metodo da parte di operatori diversi);

Calibratore: campione contenente una quantità definita di analita, nota al *Laboratorio* che lo esamina, allestito in matrice biologica uguale o, se questa non è disponibile, comunque simile a quella dei campioni da analizzare, e utilizzato per l'allestimento della curva di calibrazione.

Carry-over (effetto di "trascina mento"): caratteristica di un metodo analitico, misurabile attraverso l'*Analisi* di un bianco successivamente all'*Analisi* di un campione contenente una quantità/concentrazione elevata (es. ULOQ) di analita. Qualora l'*Analisi* di tale bianco produca un risultato inferiore al LLOD il *carry-over* del metodo è da considerare accettabile.

Catena di custodia: procedura documentata atta a garantire l'autenticità, l'integrità e la tracciabilità di un campione dal momento del prelievo/raccolta sino allo smaltimento; essa deve permettere, tra l'altro, di ricostruire l'iter del campione all'interno del *Laboratorio*, di conoscerne in ogni momento l'ubicazione, di identificarlo in maniera inequivocabile, di conservarlo correttamente e di verificare la correttezza delle condizioni di conservazione, di preservarlo in tutte le fasi da manomissioni e adulterazioni volontarie o involontarie, nonché di individuare tutte le movimentazioni e manipolazioni del campione, in quali date e da quali soggetti esse sono state eseguite.

Coefficiente di Variazione (CV) o deviazione standard relativa: frequentemente utilizzato per misurare la precisione di una determinazione quantitativa, è dato dal rapporto percentuale della deviazione standard di una serie di misurazioni eseguite su aliquote diverse di uno stesso campione sul valore medio di tali misurazioni.

Controcampione (campione di revisione, campione B): campione avente caratteristiche del tutto sovrapponibili e prelevato contestualmente al campione sul quale sarà eseguita un'*Analisi* (campione A). Il controcampione deve essere sigillato e conservato in catena di custodia per un periodo di tempo prestabilito, comunque superiore al periodo di conservazione del campione A, in modo da essere disponibile per un'eventuale Analisi di revisione.

Controllo cieco: controllo non dichiarato atto a verificare la conformità di un'*Analisi* alla rispettiva Procedura Operativa Standard oppure campione contenente una predeterminata concentrazione di analita, ignota al *Laboratorio* a cui tale campione è inviato, utilizzato per valutare se, e in che misura, il risultato analitico prodotto dal *Laboratorio* soddisfa caratteristiche di qualità prestabilite.

Controllo noto (controllo negativo, controllo positivo): campione contenente una quantità definita di analita, nota al *Laboratorio* che lo esamina, e allestito in matrice biologica uguale o, se questa non è disponibile, simile a quella dei campioni reali. I controlli noti sono preparati in maniera il più possibile indipendente dai calibratori a partire da standard di purezza certificata e in corso di validità, ovvero sono reperibili in commercio sotto forma di materiali di riferimento certificati, e sono aggiunti ad ogni batch di *Analisi* allo scopo di controllare la performance della procedura analitica.

Controllo di qualità interno: monitoraggio dell'affidabilità analitica di un *Laboratorio*, effettuata dal *Laboratorio* stesso, attraverso l'*Analisi* di controlli ciechi e controlli noti.

Criteri minimi di identificazione e quantificazione: insieme di criteri prestabiliti che devono essere simultaneamente e obbligatoriamente verificati al fine di attribuire il grado di specificità richiesto per l'identificazione di un analita (es. tempo di ritenzione e rapporti ionici all'interno di intervallo prestabiliti) e/o di precisione e accuratezza per la sua quantificazione (es. lettura di un controllo positivo corrispondente alla concentrazione reale entro un intervallo di tolleranza prestabilito).

Curva di calibrazione: valutazione grafica e matematica della relazione esistente tra quantità o concentrazione di un analita e il segnale da esso prodotto. Tale valutazione deve prendere in esame sia il tipo di interpolazione dei punti di calibrazione (es. lineare, non lineare) sia il valore del relativo coefficiente di regressione. Per definizione, la curva di calibrazione non ammette estrapolazioni. Pertanto, non può essere utilizzata per misurare concentrazioni al di fuori di tale intervallo, a meno di non operare una diluizione del campione così da riportarne la concentrazione all'interno dell'intervallo di calibrazione. La scelta del numero di calibratori dipende da diverse considerazioni, tra cui la linearità o non linearità dell'interpolazione (più elevato nel secondo caso). I calibratori devono essere in ogni caso uniformemente distribuiti e devono includere il LLOQ quale calibratore inferiore.

Cut-off o Valore Soglia o Soglia Decisionale: limite di concentrazione definito, in maniera convenzionale e arbitraria, per stabilire la negatività ovvero la positività (non negatività nel caso di Analisi di screening) di un campione. Il valore di cut-off, pertanto, può dipendere dall'ambito di applicazione dell'analisi.

Effetto matrice: capacità di un substrato biologico e o delle condizioni analitiche adottate (es. composizione della fase mobile in HPLC) di interferire nella rilevazione/identificazione/quantificazione di un composto da parte di un metodo analitico. La misura dell'effetto matrice è obbligatoria in tutti i metodi basati su analisi strumentale mediante HPLC-MS.

Imprecisione: caratteristica di un metodo analitico che si riferisce alla dispersione di una serie di misurazioni ripetute su aliquote diverse di un medesimo campione. Essa corrisponde al coefficiente di variazione ottenuto ad una determinata concentrazione o quantità di analita. E' generalmente misurata all'interno di una sessione analitica e tra sessioni analitiche diverse (anche in considerazione della possibile esecuzione del metodo da parte di operatori diversi);

Inaccuratezza: vedi Bias

Incertezza di misura: misura della somma dell'effetto di tutte le possibili sorgenti di variabilità legate all'applicazione di un metodo analitico.

Intervallo di calibrazione (o di linearità): intervallo all'interno del quale un metodo è in grado di produrre risultati quantitativi accettabili.

Laboratorio: ai fini delle presenti *Linee Guida*, il termine è riferito ai laboratori che eseguono analisi di sostanze d'abuso in campione biologico a scopo forense.

Limite inferiore di quantificazione, Lower Limit of Quantification (LLOQ): E' la concentrazione o quantità più piccola di analita che il metodo analitico è in grado di misurare con sufficiente accuratezza e precisione (ad es: bias e deviazione standard relativa inferiori o uguali al 20%). E' possibile calcolare il LLOQ anche come la concentrazione di analita che produce un segnale analitico pari ad almeno 10 volte il corrispondente segnale prodotto da un controllo negativo (bianco). Quest'ultimo metodo di calcolo del LLOQ non fornisce tuttavia alcuna informazione sulla precisione ed accuratezza del metodo analitico in corrispondenza di tale valore.

Limite inferiore di rivelabilità, Lower Limit of Detection (LLOD): Corrisponde generalmente alla concentrazione o quantità di analita che produce un segnale analitico pari ad almeno 3 volte il corrispondente segnale prodotto da un controllo negativo (bianco).

Limite superiore di quantificazione, Upper Limit of Quantification (ULOQ): Concentrazione o quantità più elevata di analita che un metodo analitico è in grado di misurare con sufficiente accuratezza e precisione (ad es: bias e deviazione standard relativa inferiori ad un valore percentuale prestabilito). L'ULOQ non può superare la concentrazione più elevata della curva di calibrazione. Nel caso si debba procedere alla quantificazione di concentrazioni superiori all'ULOQ è necessario procedere alla diluizione del campione.

Manuale della Qualità: raccolta della documentazione relativa all'attività del *Laboratorio*; ne descrive nel dettaglio l'attività, gli obiettivi, gli ambiti di applicazione, i requisiti gestionali, strutturali e tecnici; contiene le Procedure Operative Standard, le Procedure Documentate.

Materiale di Riferimento Certificato (Certified Reference Material, CRM): controllo noto in forma di standard puro ovvero di matrice biologica, la cui concentrazione di uno o più analiti è omogenea e stabile per un periodo di tempo specificato e, appunto, certificata (cioè accompagnata dalla relativa incertezza di misura), utilizzato per calibrare un metodo analitico ovvero per il controllo di qualità interno .

Procedura Operativa Standard: sequenza ordinata di azioni ed eventi, documentati in dettaglio e in forma scritta, necessari allo svolgimento in condizioni standardizzate di un'Analisi effettuata dal *Laboratorio*.

Procedura Documentata: Procedure relativa ad attività interfunzionali svolte dal *Laboratorio*, diverse da quelle descritte nelle Procedure Operative Standard.

Processo analitico: insieme di attività correlate o interagenti (es.: accettazione, esecuzione dell'Analisi, rintracciabilità, refertazione, conservazione dei campioni, ecc.) che trasformano elementi in entrata (es. una richiesta di Analisi) in elementi in uscita (es. rapporto analitico o referto).

Prodotto: risultato di un processo (es. rapporto o referto analitico).

Proficiency Testing (PT): percorso di miglioramento della qualità di un *Laboratorio*, generalmente su base volontaria, svolto mediante l'esame periodico di controlli ciechi, forniti gratuitamente o acquistati da un organismo indipendente, attraverso il quale è possibile individuare eventuali errori di natura sistematica o casuale e adottare le necessarie contromisure, la cui efficacia potrà essere valutata nei controlli successivi.

Rapporto analitico o Referto: è il prodotto del processo analitico svolto all'interno del *Laboratorio*, corrispondente a

tutte le attività, correlate o interagenti, che trasformano elementi in entrata in elementi in uscita.

Risultato negativo: risultato inferiore al LLOD, o ad un cut-off prestabilito, ovvero risultato superiore al LLOD/cut-off quando uno o più dei criteri minimi di identificazione non è rispettato.

Risultato positivo: identificazione dell'analita nel pieno rispetto dei criteri minimi di identificazione prestabiliti e presenza dello stesso nel campione in concentrazione superiore o uguale al LLOD o a un cut-off prestabilito. Nel caso di un risultato positivo espresso in termini quantitativi devono essere rispettati anche i criteri minimi di quantificazione.

Robustezza: caratteristica di un metodo analitico riferita alla capacità di produrre risultati validi sotto il profilo qualitativo e/o quantitativo anche in presenza di modificazioni delle caratteristiche del campione e/o della Procedura Operativa Standard.

Sistema di gestione per la qualità: insieme di elementi tra loro correlati o interagenti, per stabilire politica ed obiettivi e per conseguire tali obiettivi, nonché per guidare e tenere sotto controllo un'organizzazione, con riferimento alla qualità.

Specificità analitica (o Selettività): capacità di un metodo analitico di differenziare e, nel caso di un metodo quantitativo, quantificare correttamente un determinato analita nella matrice biologica in presenza di altre sostanze, quali metaboliti, prodotti di degradazione, componenti endogeni della matrice, impurezze, altri xenobiotici. Si valuta tipicamente mediante l'*Analisi* di un certo numero di campioni bianchi (non miscelati in *pool*), oppure mediante l'*Analisi* di campioni positivi per sostanze di frequente riscontro nel campione (es. caffeina, nicotina, farmaci d'uso largamente diffuso, ecc.).

Stabilità: misura la suscettibilità dell'analita a fenomeni degradativi-idrolitici di natura biotica (nel campione biologico, successivamente al prelievo) e/o abiotica (esposizione alla luce, al calore, al pH). Essa viene generalmente distinta in stabilità durante la conservazione (in condizioni ambientali e di temperatura, e per un periodo di tempo corrispondenti a quelli applicati normalmente ai campioni; nel caso di campioni conservati a -20°C la stabilità è verificata mediante rianalisi del campione dopo un certo numero di cicli di scongelamento e ricongelamento), stabilità durante la preparazione del campione e, nel caso di tempi protratti di residenza dell'estratto finito prima dell'*Analisi*, stabilità nel l'autocampionatore.

Taratura: definizione delle caratteristiche metrologiche di uno strumento di misura tramite confronto con una grandezza o con uno strumento di riferimento.

Tracce: espressione utilizzabile per indicare la presenza di una sostanza in concentrazione compresa tra il LLOD e il LLOQ.

ULOQ: vedi Limite Superiore di Quantificazione.

Validazione di un metodo analitico: insieme di prove atte a valutare la capacità di un metodo analitico di raggiungere gli obiettivi per i quali è stato predisposto. Essi possono includere, ma non necessariamente si limitano a, determinazione della specificità, di LLOD, LLOQ e ULOQ, del recupero, dell'effetto matrice, dell'intervallo di calibrazione, dell'accuratezza e precisione all'interno della stessa sessione analitica e tra sessioni diverse (al LLOQ e ad almeno un'altra concentrazione), della stabilità dell'analita, della robustezza, dell'applicabilità della diluizione.

Verifica Esterna della Qualità (VEQ) o Controllo di Qualità Esterno: monitoraggio esterno dell'affidabilità analitica di un *Laboratorio* effettuata da un organismo indipendente, valutata attraverso l'esame dei risultati quali-quantitativi ottenuti dall'*Analisi* di una serie di controlli ciechi. Diversamente da un *Proficiency Testing*, la partecipazione a una VEQ può essere obbligatoria e determinare provvedimenti di natura limitativa e/o sanzionatoria nei confronti dei *Laboratori* che non rispettano gli standard minimi previsti dalla VEQ.

3. PERSONALE

3.1. Direzione del laboratorio

La direzione di un laboratorio di analisi di sostanze d'abuso a scopo forense comporta l'assunzione di responsabilità professionali, organizzative, educative ed amministrative. Tale carica richiede il possesso di una laurea in discipline scientifiche, accompagnata da una specifica competenza in diagnostica chimico-tossicologica, ottenuta attraverso idoneo e documentabile percorso formativo di tipo universitario ovvero attraverso una provata esperienza nel settore per un periodo continuativo di almeno tre anni, e supportata da pubblicazioni attinenti all'esperienza pratica e da continuità nel l'aggiornamento.

3.2. Organico del laboratorio

Il personale deve ricevere una formazione professionale adeguata alle particolari responsabilità rivestite all'interno del laboratorio e una approfondita conoscenza della normativa specifica dei laboratori di analisi delle droghe d'abuso. A tale riguardo, il Direttore del laboratorio è tenuto a qualificare il personale allo svolgimento delle varie funzioni in base alla preparazione, alla cultura e all'esperienza dei singoli, promuovendone l'addestramento e il costante aggiornamento. L'attività di addestramento/aggiornamento del personale del laboratorio deve essere documentata e conservata a cura del Direttore. Egli deve assicurare, inoltre, il rispetto da parte del personale delle procedure che regolano l'attività del laboratorio.

Il personale preposto alle analisi di sostanze d'abuso a scopo forense deve essere adeguato in relazione al numero degli accertamenti e deve essere in grado di eseguire le procedure descritte nel Manuale della Qualità del laboratorio. Tali procedure devono essere commisurate, per numero e caratteristiche, all'organico del laboratorio ed alle apparecchiature in dotazione allo stesso.

E' indispensabile la presenza nel laboratorio, oltre al Direttore, di almeno un altro laureato in discipline scientifiche idonee, con adeguata esperienza in tossicologia analitica (documentata dal percorso formativo, dall'esperienza pratica, dall'aggiornamento e da pubblicazioni) che supervisioni l'attività del personale, accertando il rispetto delle procedure e verificando la validità dei risultati analitici e riferisca al Direttore in merito all'operatività del laboratorio. Tale figura professionale, come previsto da un sistema di gestione per la qualità, deve rivestire il ruolo di "Responsabile della Qualità", con compiti di verifica e di miglioramento della qualità, di supervisione sull'adeguatezza dei processi e sul corretto impiego, funzionamento e manutenzione della strumentazione analitica.

3.3. Norme minime di sicurezza

Nel laboratorio debbono essere messe in atto procedure finalizzate alla tutela della incolumità degli operatori e, in particolare, deve essere fornita adeguata informazione ed indicazione dei rischi, delle misure necessarie per la loro prevenzione e, in generale, per la sicurezza degli operatori nel rispetto della normativa vigente. Il Direttore, o un suo referente, al quale è conferito l'incarico di "Responsabile della Sicurezza", deve accertarsi che tali disposizioni siano rigorosamente rispettate.

La manipolazione e lo smaltimento dei materiali a rischio deve essere regolamentata da specifiche procedure, nel rispetto della normativa vigente.

4. PROCEDURE

4.1. Generalità

Il laboratorio di analisi di sostanze d'abuso a scopo forense (d'ora in avanti denominato *Laboratorio*) deve raccogliere in forma documentale la descrizione dettagliata delle attività relative allo sviluppo di tutti i processi identificati come necessari alla realizzazione del prodotto finale (rapporto analitico), a partire dalla fase di accettazione del campione e della relativa richiesta di analisi, per finire con la consegna del rapporto analitico. Tale documentazione deve essere inclusa nel Manuale della Qualità. Essa comprende una raccolta delle Procedure Operative Standard che descrivono in dettaglio, per ciascun tipo di analisi di sostanze d'abuso a scopo forense (d'ora in avanti denominata *Analisi*) che il *Laboratorio* dichiara di effettuare, tutte le operazioni analitiche necessarie al loro corretto svolgimento e delle Procedure Documentate.

Tutte le Procedure Operative Standard o Procedure Documentate devono essere chiaramente identificate e complete nei loro contenuti, aggiornate e stampate su pagine numerate progressivamente, e devono essere sempre disponibili per il personale impegnato nell'esecuzione delle *Analisi*. Esse devono essere allestite a cura del Responsabile della Qualità ed approvate e vistate dal Direttore e devono riportare la data della prima stesura e di ogni successiva revisione. Il *Laboratorio* è in ogni caso tenuto a conservare tutte le revisioni precedenti di una procedura.

4.2. Procedure Documentate

Le Procedure Documentate descrivono ogni processo realizzato nel *Laboratorio* ad eccezione di quelli descritti nelle Procedure Operative Standard (vedi paragrafo successivo). La disponibilità di Procedure Documentate, costantemente aggiornate e controllate, assicura che, tramite la loro osservanza, tutti i processi in esse descritti siano realizzati in modo omogeneo e riproducibile. Tra le Procedure Documentate sono incluse:

- procedure per la definizione dei requisiti del prodotto (caratteristiche e finalità di un'*Analisi* nonché del relativo risultato);
- procedure per la catena di custodia;
- procedure di accettazione del campione;
- procedure per i controlli di qualità interni ed esterni;
- procedure di utilizzo, manutenzione ordinaria e taratura degli strumenti di misura e della strumentazione analitica;
- procedure per la redazione e la consegna/invio del rapporto analitico;
- procedure per la tutela e riservatezza dei dati personali sensibili e dei risultati;
- procedure per l'archiviazione e la conservazione della documentazione analitica e dei dati ad essa correlati;
- procedure di monitoraggio e miglioramento della qualità;

- procedure di qualificazione, formazione ed aggiornamento del personale.

4.3 Procedure Operative Standard

Le Procedure Operative Standard descrivono in dettaglio tutte le attività necessarie al corretto svolgimento di ogni tipo di accertamento analitico-diagnostico che il *Laboratorio* dichiara di effettuare; contengono un metodo analitico e stabiliscono sequenze ordinate di azioni ed eventi affinché l'*Analisi* sia svolta in condizioni standardizzate.

4.3.1. Requisiti delle Procedure Operative Standard

Ciascuna Procedura Operativa Standard deve riportare dettagliata mente:

- finalità dell '*Analisi* (obiettivi diagnostici e ambiti applicativi dell'*Analisi*; elenco dei singoli analiti o delle classi di sostanze che l'*Analisi* è in grado di rilevare presuntivamente o identificare specificamente e/o quantificare; matrice biologica alla quale l'*Analisi* si applica; eventuale valore di cut-off);
- principio del metodo analitico con eventuali riferimenti bibliografici;
- elenco dei parametri di validazione testati e dei rispettivi valori ottenuti;
- dettagli operativi con riferimento agli standard di riferimento e ai reagenti (composizione, preparazione, precauzioni d'uso, condizioni di conservazione, caratteristiche di instabilità o deterioramento, durata di validità) e ai consumabili;
- caratteristiche qualitative e quantitative della matrice biologica necessarie per poter eseguire l'*Analisi* ed eventuali ripetizioni;
- procedura per l'allestimento del campione e dei controlli, per la loro identificazione e posizionamento nel batch analitico;
- strumentazione utilizzata con riferimento alle relative procedure di manutenzione ordinaria, di verifica della funzionalità e di taratura nonché alla loro periodicità;
- criteri prestabiliti per l'accettabilità di una sessione di *Analisi*;
- criteri minimi di identificazione e/o quantificazione di ciascun analita o classe di sostanze.

Ciascuna Procedura Operativa Standard, che sia riferita ad un metodo di *screening* ovvero di conferma, deve prevedere l'inclusione, nell'ambito di ciascuna sessione analitica, di un numero di controlli positivi e negativi commisurato alla numerosità dei campioni da esaminare (almeno un controllo positivo e un controllo negativo ogni 10 campioni) al fine di assicurare la qualità dei risultati prodotti e prevedere le azioni correttive da adottare qualora i risultati dei controlli esulino dai limiti di accettabilità.

4.3.2. Gestione delle Procedure Operative Standard

Ciascuna Procedura Operativa Standard utilizzata dal *Laboratorio*, sia che riproduca un metodo sviluppato da terzi e descritta nella letteratura di merito, sia che rappresenti il frutto dell'attività di ricerca del *Laboratorio* stesso, deve essere sottoposta a validazione prima di essere approvata ed entrare nell'uso.

Ogni procedimento analitico deve essere svolto in assoluta ottemperanza alle relative Procedura Operativa Standard inclusa nel Manuale della Qualità. Qualora nell'esecuzione di una sessione analitica ciò risultasse impossibile, per cause accidentali o di forza maggiore, la deviazione dalla procedura deve essere registrata per iscritto dall'esecutore su un modulo predisposto e riportata al Responsabile della Qualità al quale spetta la responsabilità di valutare, sulla base delle caratteristiche di robustezza del metodo definite nella fase di validazione, l'accettabilità o meno dei risultati ottenuti in quella sessione analitica.

5. REQUISITI PER LE ATTIVITÀ ANALITICHE

5.1. Sistema di Gestione per la Qualità delle *Analisi* di *screening* e di conferma

Il *Laboratorio* deve erogare i propri servizi e sviluppare i relativi processi in condizioni controllate e deve adottare un sistema di gestione per la qualità per tutte le attività relative ai processi dedicati ad *Analisi* a scopo forense. Per tali attività il *Laboratorio* deve dichiarare la conformità alle presenti *Linee Guida*.

Il sistema di gestione per la qualità può essere limitato alla sola *Analisi* di *screening*, ovvero comprendere anche l'*Analisi* di conferma e/o l'*Analisi* quantitativa. Nel primo caso, il *Laboratorio* **non potrà emettere referti con validità medico-legale**, la quale richiede necessariamente l'invio del campione, in catena di custodia, ad un *Laboratorio* dotato di un sistema di gestione per la qualità delle *Analisi* di conferma e delle *Analisi* quantitative. Ciascun *Laboratorio* dovrà indicare, all'atto della dichiarazione dei propri requisiti, il campo d'estensione del sistema di gestione per la qualità.

5.2. Finalità diagnostiche e Matrici Biologiche

Le *Analisi* tossicologiche con finalità diagnostiche prevedono l'esame di matrici convenzionali (sangue, urina, matrice pilifera) e/o di matrici alternative (saliva, sudore), i cui rispettivi esiti, da soli o in combinazione tra loro, forniscono elementi utili per una corretta diagnosi con valenza medico-legale in diverse fattispecie, quali guida sotto l'influenza di

sostanze d'abuso, idoneità alla guida, infortunistica stradale, mansioni lavorative a rischio per l'incolumità e la sicurezza di terzi, porto d'armi, idoneità a specifiche norme concorsuali, affidamento di minori, annullamento di matrimonio, adozioni internazionali, diagnosi di consumo, diagnosi di effetto biologico ("sotto l'influenza di"), diagnosi di tossicodipendenza, ecc.

Il *Laboratorio* che dichiara la sua competenza nell'esecuzione di accertamenti a scopo forense deve dimostrare di essere in grado di eseguire l'*Analisi* su almeno uno dei seguenti campioni biologici: sangue, urina, matrice pilifera. In ogni caso un *Laboratorio* può eseguire *Analisi* esclusivamente per le sostanze e nelle matrici biologiche per le quali siano incluse nel Manuale della Qualità le rispettive procedure.

Qualora il *Laboratorio* debba valutare la "attualità d'uso di sostanze illecite", ovvero l'effetto biologico prodotto da una sostanza d'abuso (es. modificazione del comportamento, inabilità temporanea, intossicazione acuta) le indagini devono essere eseguite su sangue. Anche la saliva (più propriamente il fluido del cavo orale) può essere utilizzata a tale scopo, ma il limite di sensibilità del metodo deve tenere conto delle concentrazioni in genere estremamente ridotte degli analiti in questo campione biologico. Inoltre, la possibilità di correlare la concentrazione salivare a quella ematica è legata al valore di pH della saliva rispetto al sangue e alla possibile presenza di contaminazione del cavo orale. Atteso il carattere a tutt'oggi ancora non consolidato dell'*Analisi* sulla saliva, si ritiene che, per avere piena validità in ambito forense, un risultato ottenuto sulla saliva debba essere confermato, ove possibile, su un corrispondente campione di sangue.

Per la determinazione del consumo "recente" di sostanze d'abuso (con una finestra di rilevabilità temporale di ore-giorni a seconda delle caratteristiche farmacocinetiche della sostanza in questione) il campione d'elezione è l'urina. Tale campione può essere impiegato anche per la determinazione dello stato di assuntore cronico qualora l'*Analisi* sia estesa a più campioni raccolti in giorni diversi e "a sorpresa" (vale a dire con preavviso all'interessato il più breve possibile, comunque non superiore alle 24 ore). E' inaccettabile, per diagnosticare l'effetto biologico prodotto da una sostanza d'abuso a scopo forense (ad esempio uno stato di alterazione psicofisica per uso di sostanze stupefacenti), l'impiego della matrice urinaria. Ciò dal momento che la rilevabilità di una sostanza e/o di suoi metaboliti nell'urina può protrarsi anche oltre la sua completa eliminazione dal sangue (e quindi la cessazione dell'effetto biologico). E' altresì inaccettabile, a tale fine, la rilevazione di metaboliti privi di attività farmacologica (es. benzoilecgonina, acido THC-carbossilico).

Lo stato di assuntore cronico, come pure comportamenti pregressi di abuso, possono essere verificati attraverso l'*Analisi* di campioni di capelli effettuando, se la lunghezza lo consente, *Analisi* su sezioni seriate, al fine di poter ottenere elementi utili a ricostruire la cronologia dell'assunzione. L'*Analisi* di peli provenienti da altri distretti corporei (ascelle, torace, pube) non si ritiene permetta valutazioni cronologiche attendibili, atteso il diverso *pattern* di crescita delle formazioni pilifere in tali distretti, e pertanto ha valore esclusivamente qualitativo pur testimoniando l'uso pregresso. Nel caso di valutazioni di tipo quantitativo si ritiene di dover escludere l'impiego dei peli pubici attesa la possibilità di contaminazione attraverso le urine.

Il sudore, a seconda delle modalità di prelievo (strofinamento della fronte o di altre superfici corporee con materiale assorbente, ovvero applicazione tramite cerotto adesivo di materiale assorbente alla superficie corporea per un periodo di tempo prolungato) può essere considerato quale alternativa, rispettivamente, alla raccolta singola ovvero seriale delle urine, oppure, nel caso di corrispondenza cronologica tra durata dell'applicazione del cerotto assorbente e periodo di crescita, ai capelli. Anche nel caso del sudore, così come per la saliva, si ritiene che il carattere ancora sperimentale dell'*Analisi* di tale matrice biologica e dell'interpretazione dei risultati non consentano una sua applicazione in ambito routinario, quanto meno in mancanza del confronto con l'*Analisi* di altre matrici biologiche prelevate in condizioni cronologicamente corrispondenti.

5.3. Campioni biologici

La minima quantità di campione biologico e di controcampione ritenuta sufficiente per l'esecuzione di ciascuna *Analisi* deve essere chiaramente indicata dal *Laboratorio* nella corrispondente Procedura Operativa Standard. Essa deve tenere in considerazione la eventuale necessità di esaminare il campione più volte, anche in rapporto al numero degli analiti oggetto d'indagine, alla finalità, qualitativa e/o quantitativa, dell'esame, o alla necessità per qualsivoglia motivo di ripetere l'*Analisi* stessa. La tabella 5.1 riporta volumi e quantità minime necessari per eseguire uno *screening* per sostanze d'abuso e le relative Analisi di conferma.

Per ogni campione biologico debbono essere chiaramente indicate in una specifica Procedura Documentata le modalità di prelievo, di trasporto, di conservazione prima dell'*Analisi*, nonché le condizioni di stoccaggio dopo l'esecuzione dell'*Analisi*.

Tabella 5.1. Volumi e quantità minime delle diverse matrici biologiche raccomandati dal GTFI per l'esecuzione di uno screening per sostanze d'abuso e delle relative analisi di conferma.

Matrice Biologica	Campione	Controcampione	Volume o Quantità totale
Urina	15 ml	15 ml	30 ml
Sangue per alcolemia	5 ml	5 ml	10 ml
Sangue per altre sostanze d'abuso	10 ml	10 ml	20 ml
Matrice pilifera ^a	50 mg	50 mg	100 mg
Saliva ^b	1 ml	1 ml	2 ml

*a in caso di analisi segmentale la quantità è riferita a ciascun segmento
b nel caso di impiego di un campionatore commerciale, marca e modello devono essere specificati nel referto.*

5.4. Manutenzione, Monitoraggio e Taratura degli Strumenti di Misurazione e della Strumentazione Analitica

Per ciascuno strumento di misurazione di peso, volume, temperatura e pH, nonché per la strumentazione analitica il *Laboratorio* deve stabilire una Procedura Documentata di manutenzione ordinaria, di monitoraggio delle prestazioni e di taratura nella quale sia, tra l'altro, prestabilita la frequenza di tali operazioni e l'intervallo di tolleranza delle prestazioni al di fuori del quale è necessario comunque procedere alla taratura. Tali Procedure Documentate devono essere incluse nel Manuale della Qualità.

Frigoriferi e congelatori devono essere dotati di un sistema di monitoraggio manuale (con cadenza almeno quotidiana) o automatico della temperatura. A tal fine, il *Laboratorio* deve disporre di almeno 1 termometro certificato dal Servizio di Taratura in Italia (S.I.T.) da utilizzare per la taratura degli altri termometri impiegati. Analogamente, il *Laboratorio* deve disporre di uno o più pesi di riferimento certificati per la taratura della bilancia analitica e di tamponi di riferimento per la taratura del pHmetro.

La lettura di ciascuna grandezza sottoposta a monitoraggio deve essere registrata su carte di controllo in modo da permetterne la valutazione delle fluttuazioni nel tempo. Tale registrazione deve essere conservata dal *Laboratorio* per almeno 3 anni.

5.5. Rintracciabilità della documentazione analitica e di ogni altra documentazione relativa al campione

Il *Laboratorio* deve attuare un sistema di registrazione e archiviazione di tutte le informazioni di natura cartacea e elettronica relative alle *Analisi* strumentali eseguite, in modo che ciascuna di esse sia completamente rintracciabile e documentabile. E' in ogni caso obbligatorio predisporre una Procedura Documentata di *back-up* della documentazione analitica in formato elettronico, stabilendone l'organizzazione, le modalità e la frequenza di salvataggio.

In aggiunta alla documentazione analitica, il *Laboratorio* è tenuto a conservare:

- la documentazione cartacea relativa ai campioni (es. moduli di richiesta, di prelievo, di trasporto);
- la documentazione, cartacea ed elettronica, relativa alla catena di custodia;
- copia del referto/rapporto analitico;
- la documentazione relativa alla certificazione (o alla verifica) del grado di purezza e della durata di validità degli standard di riferimento;
- i dati relativi alla manutenzione, al monitoraggio e alla taratura degli strumenti di misurazione e della strumentazione analitica (cfr. paragrafo 5.4);

per almeno 3 anni dalla data di emissione del referto, se non diversamente indicato da normativa specifica.

6. ACCETTAZIONE, PRELIEVO, MOVIMENTAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

6.1. Accesso al Laboratorio

L'accesso al *Laboratorio* deve essere limitato soltanto alle persone autorizzate; quelle non autorizzate devono essere sempre accompagnate e registrate su un apposito registro. A tal fine, l'elenco delle persone autorizzate ad accedere al *Laboratorio* deve essere approvato dal Direttore del *Laboratorio* e incluso nel Manuale della Qualità e il *Laboratorio* deve adottare misure atte a garantire che l'accesso di estranei al *Laboratorio* non possa avvenire né durante, né al di fuori dell'orario di operatività.

6.2. Accettazione

I *Laboratori* che eseguono anche *Analisi* su reperti non biologici (es. preparati illeciti contenenti sostanze d'abuso),

devono effettuare l'acquisizione, la manipolazione e lo stoccaggio di tali reperti in ambienti **diversi** rispetto a quelli dei campioni biologici onde evitare il rischio di contaminazione ambientale.

Il *Laboratorio* deve documentare l'adozione di procedure idonee affinché vengano rispettate le modalità di preservazione del campione descritte nella rispettiva Procedura Documentata, dal campionamento sino alla restituzione e/o allo smaltimento dello stesso. Il *Laboratorio* deve, inoltre, fornire evidenza di tutte le operazioni cui il campione è sottoposto, adottando idonee procedure per la realizzazione di tutte le fasi necessarie per il completamento dell'intero processo. Tali procedure debbono essere incluse nel Manuale della Qualità.

6.2. 1. Accettazione di una richiesta di Analisi

Nel caso in cui il campione biologico sia prelevato da una struttura esterna al *Laboratorio* è necessario preliminarmente concordare con essa modalità di prelievo e trasporto tali da garantire la catena di custodia. In ogni caso, la responsabilità del *Laboratorio* in merito al rispetto della catena di custodia è da riferire al momento dell'accettazione dello stesso e alle fasi successive.

In fase di accettazione il *Laboratorio* deve, comunque, verificare:

- la corretta modalità di conservazione del campione durante il trasporto;
- l'idoneità della richiesta di *Analisi* e la eseguibilità della stessa da parte del *Laboratorio*;
- l'idoneità quali-quantitativa del campione rispetto alla richiesta d'*Analisi*;
- la corrispondenza tra i dati identificativi del campione e la documentazione di accompagnamento;
- l'avvenuta acquisizione del consenso, che in taluni casi (es. infortunistica stradale) deve rispettare le disposizioni di cui alla Legge 160/2007.

In tale fase il *Laboratorio* è tenuto a registrare:

- data e ora del prelievo;
- data e ora di accettazione;
- richiedente;
- finalità dell'*Analisi*;
- tipologia del campione, suo protocollo di conservazione e ubicazione in attesa dell'*Analisi*;
- eventuali dati clinici, anamnestici e circostanziali utili all'esecuzione dell'*Analisi* e/o all'interpretazione del risultato;
- nome e firma del trasportatore;
- nome e firma dell'operatore del *Laboratorio* che effettua l'accettazione.

Nel caso in cui i prelievi di campioni biologici siano effettuati nella sede del *Laboratorio* la fase di accettazione si realizza con:

- l'identificazione del soggetto mediante documento d'identità in corso di validità;
- l'informativa al soggetto in rapporto alla finalità dell'*Analisi*, alle modalità di esecuzione del prelievo e delle successive fasi di campionamento, confezionamento ed etichettatura dei campioni, nonché agli eventuali rischi per la salute a cui il soggetto si sottopone attraverso il prelievo;
- la raccolta del consenso informato scritto del soggetto al prelievo e all'analisi;
- l'attestazione da parte del soggetto, mediante firma da apporre sul modulo di prelievo, di aver presenziato a tutte le fasi di suddivisione, confezionamento ed etichettatura dei campioni prelevati.

nonché con le registrazioni pertinenti di cui sopra.

6.2.2. Prelievo del campione

L'accessibilità al luogo del prelievo è consentita esclusivamente al personale specificamente autorizzato e al singolo soggetto che deve essere sottoposto al prelievo.

Il prelievo del campione deve sempre prevedere la raccolta di un controcampione per eventuali Analisi di revisione. Normative specifiche possono richiedere il prelievo di 3 aliquote di campione equivalenti. In questo caso le tre aliquote devono essere utilizzate per l'analisi di screening (campione A), di conferma (campione B) e di revisione (campione C), rispettivamente. Tale procedura di prelievo è da utilizzare obbligatoriamente nel caso in cui l'Analisi di screening e l'Analisi di conferma siano effettuate da due strutture diverse (cfr. sezione 5.1).

6.2.2.1 Raccolta delle urine

La raccolta delle urine da parte del *Laboratorio* deve rispettare le seguenti condizioni e successione di eventi:

- prima di accedere al luogo di prelievo il soggetto è tenuto a depositare qualunque oggetto, borsa, o indumento tale da poter occultare materiale utile a adulterare o manomettere il campione urinario;
- il soggetto è tenuto a lavarsi accuratamente le mani e ad asciugarle;
- il personale consegna al soggetto il materiale per la raccolta urinaria, lo informa del quantitativo di urina che deve essere approssimativamente raccolto per l'allestimento del campione e del controcampione e lo invita a entrare nel locale di prelievo.

- il locale di prelievo deve poter garantire, se necessario, la possibilità di osservazione diretta o indiretta (telecamera a circuito chiuso, della cui presenza il soggetto deve essere preventivamente informato) e in esso non devono essere presenti fonti o materiali utilizzabili per la diluizione o l'adulterazione del campione (sanitari o altre sorgenti d'acqua, contenitori di sapone, di disinfettanti, di detergenti per la pulizia del locale, ecc.).

L'adozione di queste modalità di prelievo si ritiene offra sufficienti garanzie rispetto a tentativi di adulterazione o manomissione del campione urinario. E' tuttavia possibile effettuare ulteriori controlli sul campione successivamente alla raccolta (es. temperatura, gravità specifica, creatininuria, pH). La verifica della gravità specifica o della creatininuria consentono inoltre di controllare l'eventuale diluizione del campione conseguente all'ingestione di una elevata quantità di liquidi prima della raccolta urinaria.

6.2.2.2. Prelievo di Capelli

Il personale verifica l'idoneità dei capelli al prelievo (lunghezza disponibile in rapporto alla richiesta di *Analisi*, trattamenti cosmetici visibili), richiede al soggetto informazioni utili all'esecuzione dell'*Analisi* e all'interpretazione del risultato analitico (trattamenti igienici e cosmetici, uso di lozioni anticaduta, di gel o di altre sostanze che potrebbero interferire con l'*Analisi*) e registra tutte le informazioni raccolte su un apposito modulo.

L'operatore addetto al prelievo, dopo avere accuratamente lavato ed asciugato le mani (ovvero munito di guanti del tipo Usa e getta), isola una ciocca di capelli del diametro di circa 1 cm nella zona del vertice posteriore del capo, l'attorciglia con le dita e la preleva mediante taglio con una lama sufficientemente affilata o con forbici il più possibile vicino alla cute. Mantenendo l'allineamento dei capelli prelevati, l'operatore divide longitudinalmente la ciocca in due parti approssimativamente uguali da destinare, rispettivamente, all'allestimento del campione e del controcampione. Il confezionamento degli stessi, a meno di richiesta di *Analisi* della ciocca di capelli *in toto*, deve permettere l'identificazione inequivocabile dell'estremità prossimale della ciocca e impedire il disallineamento dei capelli. Inoltre, è necessario accertarsi che il prelievo di capelli sia **perfettamente asciutto** prima del confezionamento, onde evitarne la rapida degradazione. In caso contrario, è necessario attendere il completo asciugamento del campione lasciandolo a contatto con l'aria dopo averlo posto su una superficie pulita.

Nel caso in cui i capelli presenti nella zona del vertice posteriore fossero insufficienti (ovvero per motivi estetici e su specifica richiesta del soggetto) l'operatore può prelevare da diverse zone del capo sino a raggiungere il quantitativo richiesto. In tal caso l'operatore dovrà fare in modo che le diverse zone di prelievo siano equamente rappresentate nel campione e nel controcampione. Nel caso di indisponibilità dei capelli è possibile prelevare formazioni pilifere da altre zone della superficie corporea, tenendo a mente quanto riportato nella sezione 5.2. Tutte le anomalie sopra descritte relative alla zona di prelievo devono essere registrate sul modulo di prelievo. Il confezionamento dei capelli deve garantire la loro preservazione dalla luce e dall'umidità (es. busta di carta all'interno di una busta di plastica, conservazione a temperatura ambiente).

6.2.2.3. Prelievo di Sangue

Il prelievo di sangue deve essere eseguito dalla vena di un arto superiore dopo aver pulito la superficie cutanea con un disinfettante non alcolico. Dal momento che si tratta di un prelievo di tipo invasivo, esso deve essere eseguito nel rispetto della normativa vigente in materia e deve essere atto a ridurre al minimo il rischio per la salute del soggetto che vi si sottopone.

Nel caso di prelievo di sangue per *Analisi* a scopo forense (*fatta eccezione per il caso dell'alcolemia trattato nel paragrafo successivo*) è inoltre necessario escludere l'aggiunta al campione di sostanze di qualsivoglia natura (es. disinfettanti, anticoagulanti, gel, ecc.) che potrebbero interferire con l'*Analisi* alterandone il risultato. Pertanto, è opportuno procedere immediatamente alla conservazione del campione e del controcampione alla temperatura di -18/-22°C a meno che l'*Analisi* non sia eseguita entro 8 h dal prelievo, nel qual caso è sufficiente la conservazione, appena possibile, a +4/+6°C.

6.2.2.4. Prelievo di sangue per la determinazione dell'alcolemia

Il prelievo di sangue per la determinazione dell'alcolemia deve necessariamente tenere in considerazione le seguenti criticità:

- potenziale contaminazione dovuta all'uso disinfettanti cutanei contenenti alcol etilico;
- possibili fenomeni degradativi che possano favorire la neoformazione di alcol etilico;
- manipolazioni del campione (es. sierazione, centrifugazione) tali da alterarne le caratteristiche originarie;
- possibile evaporazione dell'alcol dal campione dopo il prelievo.

Per tali ragioni il prelievo di sangue per la determinazione dell'alcolemia richiede obbligatoriamente i seguenti accorgimenti:

- effettuare un prelievo di sangue dedicato alla determinazione dell'alcolemia;
- disinfettare l'area di prelievo con un **disinfettante non alcolico**;
- aggiungere sodio fluoruro, o analogo preservante, al campione di sangue (in ragione di 100 mg NaF₂ per 10 ml di sangue);

- evitare la centrifugazione o sierazione del campione. E' da rilevare, a tale proposito, che la determinazione dell'alcol etilico sui derivati del sangue (plasma, siero) può produrre una sovrastima rispetto alla determinazione su sangue intero;
- utilizzare il più possibile il volume utile del contenitore del campione (eventualmente cambiare contenitore in rapporto al volume di sangue prelevato) onde evitare fenomeni di evaporazione;
- procedere immediatamente alla conservazione del campione e del controcampione alla temperatura di -18/-22°C a meno di *Analisi* del campione eseguita entro 4 h dal prelievo, nel qual caso è sufficiente la conservazione, appena possibile, a +4/+6°C.

6.2.2.5. Prelievo di Saliva

Il prelievo del fluido del cavo orale può essere eseguito con un dispositivo commerciale la cui vendita è autorizzata nel nostro paese, ovvero mediante la raccolta del fluido, **senza stimolazione della salivazione**, in un apposito contenitore. La suddivisione del prelievo in campione e controcampione può essere omessa solo nel caso in cui sia stato prelevato contestualmente alla "saliva" anche un campione di sangue. Relativamente alle operazioni e agli accorgimenti da seguire dopo il prelievo si fa riferimento a quanto illustrato nel paragrafo relativo al sangue.

Per tutte le fattispecie di prelievo illustrate nei paragrafi precedenti valgono inoltre i seguenti obblighi:

- il materiale necessario al prelievo deve essere fornito integro e sigillato;
- il paziente deve poter scegliere il contenitore fra più contenitori messi a disposizione;
- l'esecuzione di tutte le operazioni di suddivisione, confezionamento del campione e del controcampione ed etichettatura devono essere effettuate alla presenza dell'interessato;
- l'identificazione del campione e del controcampione deve essere riportata sulle etichette dei contenitori utilizzati;
- la corretta preservazione del campione da qualsivoglia adulterazione, inquinamento, o dispersione di parte deve essere garantita mediante l'utilizzo di materiale idoneo, a perfetta chiusura, inviolabile o comunque sigillabile, non suscettibile di rotture in caso di urto durante il trasporto, o per *shock* termico durante il congelamento;
- l'iter del campione, in ogni fase analitica deve essere annotato sulla modulistica relativa alla catena di custodia;

6.2.3. Cause di esclusione e modalità di riacquiescenza dei campioni biologici

Nel caso in cui il campione biologico sia prelevato da una struttura esterna al *Laboratorio*, è possibile riacquiescere il materiale inviato se viene ravvisata ovvero è documentabile:

- l'incongruità, sotto il profilo qualitativo o quantitativo, del campione biologico in relazione alla specifica richiesta d'*Analisi*, anche in considerazione delle caratteristiche farmacocinetiche dell'analita richiesto (es. campione di urine con richiesta di *Analisi* per diagnosi di "guida sotto l'effetto"; sangue coagulato con richiesta di diagnosi di assunzione di amfetamine, circostanzialmente riferibile a 48 ore prima del prelievo; alcolemia richiesta su un campione di sangue prelevato il giorno successivo rispetto all'evento oggetto di indagine);
- la non corretta conservazione del campione durante il trasporto;
- la mancata o non verificabile (es. illeggibilità) corrispondenza tra i dati identificativi del campione e la documentazione di accompagnamento;
- l'evidenza di manomissione del campione (es. rimozione o rottura del sigillo)

In tutti i casi di riacquiescenza, il Direttore del *Laboratorio* è tenuto a compilare lo specifico rapporto di "non conformità" che definisca dettagliatamente le cause di riacquiescenza del campione.

6.3. Conservazione, manipolazione e movimentazione del campione

All'interno del *Laboratorio* devono essere predisposte Procedure Documentate mirate alla corretta conservazione del campione, ove il termine "corretta" deve intendersi nel significato di "utile a preservare il campione nelle condizioni il più possibile simili a quelle al momento del prelievo".

Tali modalità devono assicurare:

- L'identificazione e l'idoneità dei luoghi di conservazione dei campioni;
- La conservazione alla temperatura di +4/+6°C ovvero a -18/-22°C dei campioni:
 - di sangue per la determinazione dell'alcolemia se l'*Analisi* è eseguita entro ovvero dopo 4 h dal prelievo;
 - degli altri prelievi di sangue e di "saliva" se l'*Analisi* è eseguita entro ovvero dopo 8 h dal prelievo;
 - dei campioni di urina se l'*Analisi* è eseguita entro ovvero dopo 12 h dal prelievo.
- per i campioni da conservare a -18/-22°C (sangue, saliva ed urine) devono essere previsti congelatori diversi per la conservazione pre-analitica e per il successivo stoccaggio;
- le condizioni di conservazione dei capelli devono essere tali da proteggere i campioni dall'umidità e dalla luce.

I prelievi di capelli possono essere conservati a temperatura ambiente evitando eccessive escursioni termiche;

- il rispetto della catena di custodia;
- la conservazione dei campioni risultati sia positivi sia negativi sino alla produzione del rapporto analitico/referto, se non diversamente indicato da normativa specifica;
- la conservazione dei controcampioni dei campioni risultati positivi dopo Analisi di conferma per almeno 1 anno dalla data di produzione del rapporto analitico/referto, se non diversamente previsto da normativa specifica.

7. METODI ANALITICI

7.1. Generalità

Per tutti i metodi analitici impiegati nel *Laboratorio* deve essere definita una Procedura Operativa Standard, inclusa nel Manuale della Qualità, nella quale siano dettagliate tutte le informazioni descritte nel paragrafo 4.3.1 e la sequenza di operazioni ed eventi necessari all'ottenimento del risultato analitico..

I risultati delle prove di validazione (nonché la rispettiva documentazione analitica) del metodo analitico originario e delle sue revisioni successive devono essere archiviati e conservati dal *Laboratorio* congiuntamente a tutte le revisioni obsolete del metodo.

7.2. Metodi di screening

L'impiego di un metodo di *screening* trova giustificazione in un *Laboratorio* di Tossicologia Forense quando vi è necessità di analizzare un elevato numero di campioni in tempi brevi e a costi contenuti. I metodi di *screening* impiegano tipicamente, ma non necessariamente si limitano a, tecniche colorimetriche, enzimatiche, e immunochimiche. I metodi di *screening* sono generalmente caratterizzati da costi contenuti, tempi di esecuzione rapidi, elevata o totale automazione e, per contro, specificità ridotta e elevata inaccuratezza del risultato quantitativo, in particolare quando nel campione sono presenti più specie chimiche in grado di essere rilevate ma non discriminate dal metodo (es. composto immodificato e suoi metaboliti).

Questi metodi, per le loro caratteristiche intrinseche, producono esclusivamente un risultato di tipo presuntivo, vale a dire la *probabile* negatività o positività (meglio definita come "non negatività") del campione rispetto a un analita, o più spesso a una classe di sostanze, e relativamente a un valore di cut-off prestabilito. In ogni caso, quale che sia la specificità analitica del metodo di *screening*, è principio fondamentale della Tossicologia Forense che **NON PUO' AVERE VALIDITA' FORENSE UN RISULTATO OTTENUTO ATTRAVERSO UN'UNICA PROVA DOCUMENTALE** e che pertanto **E' OBBLIGATORIO CHE TALE RISULTATO SIA SUPPORTATO E CONFERMATO DA UN'ANALISI DI CONFERMA**. Unica eccezione, per altro solo apparente, a questo principio, è l'impiego di metodi che combinano una tecnica di separazione (es. cromatografia) ad una tecnica di rivelazione spettroscopica in continuo e in scansione (es. spettrofotometria UV-Vis a matrice di diodi, spettrometria di massa, ecc.). In tal caso infatti il risultato finale è costituito dalla combinazione di due informazioni tra loro indipendenti, vale a dire la ritenzione cromatografica e l'informazione spettrale, equivalente alla somma di informazioni ottenute attraverso l'impiego di due tecniche analitiche separate.

Dal momento che l'esito negativo di un'Analisi di screening è generalmente accettato come valido (in virtù del principio "in dubio, pro reo") è essenziale verificare che il metodo di *screening* sia in grado di minimizzare il numero di risultati falsi negativi. A tale riguardo è consigliabile applicare comunque l'Analisi di conferma anche ad una certa percentuale di campioni risultati negativi allo *screening*. Meno importante, sotto il profilo forense, è che il metodo minimizzi le false positività, dal momento che qualunque esito positivo allo *screening* deve necessariamente essere sottoposto a conferma. Tuttavia, considerazioni di ordine economico e pratico richiedono ovviamente che anche il numero di false positività sia minimizzato, per la semplice ragione che all'aumentare della percentuale di false positività si riduce proporzionalmente la convenienza pratica ed economica dell'Analisi di screening.

L'effettuazione di Analisi di screening mediante l'impiego di kit e di calibratori direttamente forniti dalle ditte produttrici è ammessa purché l'Analisi sia eseguita secondo le indicazioni e il valore di cut-off definiti dal produttore.

E' altresì da rilevare che il valore di cut-off definito dalla ditta produttrice di un kit analitico di *screening* potrebbe essere stato individuato per l'applicazione a fattispecie diverse dalla diagnosi a scopo forense ovvero per l'applicazione in aree geografiche ove sono vigenti valori di cut-off stabiliti da specifici accordi o normative. Per altro, anche nell'ambito della tossicologia forense esistono fattispecie che possono richiedere l'individuazione di valori di cut-off differenti. Non è, pertanto, corretto adottare incondizionatamente il cut-off proposto dal produttore. Nel caso in cui sia necessario individuare un valore di cut-off differente, il metodo di *screening* deve in ogni caso essere sottoposto a ri-validazione. Analogamente, è necessario ri-validare il metodo nel caso di applicazione ad una matrice biologica diversa da quella definita dalla ditta produttrice o di qualsiasi altra modificazione del metodo.

Il risultato di una Analisi di screening, non può essere espresso in termini quantitativi ma unicamente sotto forma di positività o di negatività.

7.2.1. Metodi di screening per l'alcol etilico nel sangue

La determinazione dell'alcol etilico nell'espriato è da considerare quale metodo di *screening* attesa la ridotta specificità

analitica delle tecniche strumentali utilizzate e, soprattutto, in considerazione del fatto che il metodo prevede la stima dell'alcolemia mediante calcolo a partire dalla concentrazione di alcol etilico nell'aria espirata, attraverso l'applicazione di un fattore di conversione medio che è documentato essere altamente variabile. Esso, infatti, varia in rapporto a alle condizioni ambientali, alle condizioni fisiologiche e patologiche del soggetto e alla fase cinetica (assorbimento, eliminazione) nella quale il soggetto si trova dopo aver ingerito alcol. L'esecuzione di due determinazioni distanziate di almeno 5 min tra loro (ex art. 379 D.P.R. 495/92, comma 2) garantisce esclusivamente rispetto a errori di misurazione dovuti a contaminazione residua del cavo orale.

La determinazione dell'alcolemia per via enzimatica è da considerare anch'esso metodo di *screening*, dal momento che l'enzima utilizzato per la reazione (alcol deidrogenasi, ADH) e le modalità di rivelazione dell'avvenuta reazione enzimatica in presenza di alcol sono caratterizzati da insufficiente selettività analitica. Non è accettabile, in base a quanto illustrato nel paragrafo 6.2.2.4, la determinazione dell'alcol etilico su un derivato del sangue intero (plasma, siero) e, comunque, mediante l'impiego di una curva di calibrazione prodotta con un derivato del sangue intero.

7.3. Metodi di conferma e Metodi di Quantificazione

Il metodo di conferma deve essere in grado di produrre un risultato analitico il più possibile indipendente da quello dell'Analisi di screening. Per tale ragione è consigliabile l'uso di un metodo di conferma basato su principi chimico-fisici diversi da quello di *screening*. Inoltre, il metodo di conferma deve essere caratterizzato da selettività e sensibilità analitiche superiori a quello di screening. A tale riguardo, si ritiene accettabile un metodo si conferma in grado di raggiungere un LLOD pari ad almeno la metà del cut-off del metodo di *screening*.

E' inaccettabile l'impiego di un metodo di conferma che sia fondato sulla misurazione di un segnale analitico altamente correlato a quello dello *screening* (es. conferma di un dato immunochimico con un'altro metodo immunochimico). L'impiego di una tecnica cromatografica per confermare un dato ottenuto per via cromatografica è ammesso esclusivamente se le due tecniche separative producono risultati scarsamente correlati (cioè due serie di tempi di ritenzione significativamente diversi e, appunto, tra loro poco correlati, per un medesimo gruppo di analiti).

Nell'ambito della tossicologia forense l'impiego della spettrometria di massa, da sola (MS), in configurazioni tandem (MS-MS) o multiple (MSⁿ), a bassa (LRMS) o alta (HRMS) risoluzione, eventualmente in combinazione con una tecnica di separazione di tipo cromatografico (es. gascromatografia, GC; cromatografia liquida ad alta pressione, HPLC) o elettroforetico (elettroforesi capillare, EC), per Analisi di conferma ha trovato il consenso generale della comunità scientifica nazionale e internazionale. Anche il GTFI ritiene, in tutti i casi in cui ciò è possibile, che la spettrometria di massa sia la tecnica d'elezione per l'Analisi di conferma.

7.3.1. Standard Interno

L'impiego, in tutti i casi in cui la tecnica di *Analisi* strumentale lo consente, di uno o più standard interni è obbligatorio sia nel caso di metodi di conferma esclusivamente qualitativa, sia nel caso di metodi di conferma e/o di quantificazione. Lo standard interno, infatti, conferisce elevata precisione e accuratezza sia alla misura della ritenzione cromatografica, sia alla quantificazione. Esso deve essere aggiunto al campione e ai controlli prima di qualsiasi loro trattamento preparativo. Unica eccezione a tale regola è l'Analisi dei capelli per la quale l'aggiunta dello standard interno deve essere effettuata dopo le operazioni di lavaggio, di sminuzzamento (se del caso) e di pesata.

Nel caso di impiego di tecniche di rivelazione mediante spettrometria di massa, il GTFI incoraggia l'uso di standard interni deuterati (con numero di deuteri ≥ 3) previa verifica che la quantità/concentrazione dello standard deuterato non sia tale da interferire significativamente sulla efficienza di ionizzazione (es. fenomeni di competizione) ovvero sulla quantificazione (es. contributi isotopici) dell'analita. Inoltre, la stabilità dello standard interno durante il trattamento preparativo del campione e, se del caso, sull'autocampionatore deve essere preventivamente accertata o verificata.

7.3.2. Criteri Minimi di Identificazione

Il *Laboratorio* è tenuto a stabilire e adottare criteri minimi di identificazione che devono tutti obbligatoriamente essere rispettati per realizzare la identificazione di conferma di un analita in un campione. La scelta di tali criteri, come pure dei rispettivi intervalli di tolleranza, può variare in relazione alle tecniche di *Analisi* strumentale impiegate nel *Laboratorio* ma deve comunque attenersi alle indicazioni di eventuale normativa di riferimento, e/o a quanto proposto nella letteratura di riferimento e comunque a quanto generalmente accettato dalla comunità scientifica.

Si definiscono, in questa sede, i criteri minimi di identificazione relativamente alle tecniche di *Analisi* strumentale di impiego più diffuso:

Analisi cromatografica: tempo di ritenzione relativo allo standard interno compreso entro $\pm 1\%$ (GC) o $\pm 2\%$ (HPLC) di quello prodotto dal corrispondente analita nel controllo positivo

Analisi MS in scansione (full scan):

- presenza nello spettro incognito di tutti gli ioni dello spettro del composto di riferimento che hanno intensità relativa al picco base superiore al 10% (lo spettro incognito deve essere acquisito sino ad almeno 30 μ eccedenti la massa del composto di riferimento, e ottenuto senza sottrazione del fondo; la massa iniziale dell'intervallo di scansione deve corrispondere a quella utilizzata per l'acquisizione degli spettri di massa della collezione di riferimento, generalmente m/z 50; si segnala tuttavia l'opportunità, per alcuni composti, ad es. alcuni antidepressivi triciclici o derivati amfetaminici, di ridurre il limite inferiore dell'intervallo di acquisizione, es. m/z 30 o m/z 40, al fine di acquisire il picco base dello spettro);
- le abbondanze relative di tali ioni nello spettro incognito devono essere comprese entro \pm il 20% rispetto allo

spettro di riferimento, fatta eccezione per i frammenti con abbondanza relativa inferiore al 10%, per i quali è accettabile una tolleranza di $\pm 50\%$;

- la presenza nello spettro incognito di frammenti ionici assenti nello spettro di riferimento deve essere spiegabile (es. contributo del rumore chimico, profilo del picco del frammento ionico assente nello spettro di riferimento non completamente sovrapponibile a quello dei frammenti presenti nello spettro di riferimento);

Analisi MS mediante monitoraggio di ioni specifici (Selected Ion Monitoring, SIM): monitoraggio di almeno 3 frammenti ionici (ove possibile includenti lo ione molecolare o un suo addotto in dipendenza della tecnica di ionizzazione utilizzata ed escludenti picchi isotopici e perdite aspecifiche, es. perdita di H₂O); i rapporti ionici devono essere compresi entro un intervallo di tolleranza rispetto al corrispondente valore ottenuto per il controllo positivo pari a quello precedentemente definito per l'analisi in scansione.

Analisi mediante MS tandem (MS-MS) nella modalità di scansione degli ioni prodotto (product ion scan): vale quanto specificato per l'analisi MS full scan; inoltre lo spettro degli ioni prodotto deve, ove possibile, contenere anche lo ione precursore residuo con un'abbondanza relativa superiore al 5%.

Analisi MS-MS nella modalità Selected Reaction Monitoring (SRM): monitoraggio di almeno 2 transizioni precursore → prodotto, e dello ione precursore residuo dopo frammentazione (*surviving ion*). Ove possibile, lo ione precursore di almeno una delle due transizioni dovrebbe essere lo ione molecolare o un suo addotto in dipendenza della tecnica di ionizzazione utilizzata e gli ioni prodotto non devono risultare da perdite aspecifiche (es. perdita di H₂O). Le abbondanze relative dei 2 ioni prodotto devono essere comprese entro Intervallo di $\pm 25\%$ del corrispondente valore ottenuto per il controllo positivo.

Eccezioni a questi criteri minimi di identificazione devono trovare giustificazione nelle caratteristiche fisico-chimiche e/o strutturali dell'analita, ovvero nei limiti della tecnica di *Analisi* strumentale utilizzata. Le ragioni che giustificano deviazioni rispetto ai criteri sopra elencati devono essere descritte nella Procedura Operativa Standard. In tali casi, e comunque in generale, l'identificazione nel campione di metaboliti specifici di un analita può essere utilizzata a supporto dell'identificazione dello stesso. Si rammenta altresì che è talora possibile modificare le caratteristiche di frammentazione di un analita attraverso tecniche di derivatizzazione.

Nel caso in cui siano utilizzate tecniche analitiche diverse da quelle sopra elencate, il GTFI incoraggia l'impiego del sistema degli *Identification Points* (IP) secondo quanto stabilito dalla *Decisione della Commissione 2002/657/EC del 12 agosto 2002 in attuazione della direttiva 96/23/CE del Consiglio dell'Unione Europea relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (G.U. dell'Unione Europea L 221, 8-36 del 17.8.2002)*. Essa prevede che l'identificazione di un composto incognito sia realizzata con sufficiente specificità quando, attraverso l'applicazione di una tecnica analitica, ovvero di più tecniche in combinazione *on-line* o *off-line*, sia stato raggiunto un numero di IP pari a 4. Il punteggio è calcolato sulla base di quanto riportato nella seguente tabella.

Tabella 7.1. Numero di Identification Points (IP) relativi a diverse combinazioni di tecniche di analisi

Tecnica Analitica	Numero di frammenti ionici acquisiti	IP
Low resolution MS (LR-MS)	N	N
LC/LR-MS o GC/LR-MS	N	N+1
LR-MS ⁿ (ione precursore)	1	1
LR-MS ⁿ (ioni prodotto)	N	2N
High resolution MS (HR-MS)	N	2N
HR-MS ⁿ (ione precursore)	1	2
HR-MS ⁿ (ioni prodotto)	N	2.5N

Nel caso in cui il metodo di conferma abbia anche obiettivi di quantificazione, oltre ai criteri minimi di identificazione esso deve soddisfare i criteri minimi di quantificazione. Se il metodo di conferma ha valenza esclusivamente di conferma qualitativa rispetto a un valore di cut-off prestabilito, l'errore di misura (precisione e accuratezza) in corrispondenza di tale valore deve essere noto, evidenziato e sottratto al valore effettivamente misurato, riferendo la positività esclusivamente ai casi in cui il valore misurato, sottratto dell'errore di misura, risulta ancora superiore al cut-off. L'analisi di controlli positivi per concentrazioni prossime al cut-off (es. cut-off $\pm 25\%$) permette di verificare la *performance* del metodo qualitativo in tale ambito critico.

Il risultato di un'Analisi di conferma di tipo qualitativo deve essere espresso esclusivamente sotto forma di positività o di negatività.

7.3.3. Criteri Minimi di Quantificazione

L'applicazione di un metodo di quantificazione deve necessariamente prevedere, tra i criteri minimi di quantificazione, la valutazione quantitativa di un congruo numero di controlli negativi e di controlli positivi (cfr. paragrafo 4.3.1). Nel caso si utilizzi un solo controllo positivo esso dovrà preferibilmente corrispondere al cut-off del metodo, o, in mancanza di questo, al LLOQ. Tali controlli, alla lettura sull'ultima curva di calibrazione esaminata, devono risultare avere una concentrazione corrispondente a quella reale entro un prefissato intervallo di tolleranza. Qualora tale criterio non fosse rispettato non è possibile procedere alla quantificazione dei campioni contenuti nel batch in questione, a meno di non riesaminare, contestualmente ai campioni, la curva di calibrazione completa. Qualora i controlli positivi fossero in numero superiore a uno è necessario che siano distribuiti il più possibile in maniera uniforme nell'ambito dell'intervallo di calibrazione, prevedendo anche controlli inferiori al cut-off (es. 50% del cut-off) e corrispondenti a concentrazioni elevate (es. 200% del cut-off, ULOQ).

Lo standard utilizzato per la quantificazione di un analita (e il relativo standard interno) deve essere di composizione e purezza certificata e in corso di validità. Qualora non fosse disponibile in commercio uno standard di composizione e purezza certificata è ammesso l'uso di uno standard non certificato purché il Laboratorio ne abbia verificato e dichiarato nella Procedura Operativa Standard il grado di purezza. La documentazione relativa alla certificazione ovvero alla verifica della purezza degli standard di riferimento deve essere conservata dal Laboratorio per almeno 3 anni dalla data di acquisizione o di sintesi.

Il risultato di un'Analisi quantitativa deve essere espresso in un'unità di misura uniforme, tale da escludere dubbi interpretativi, direttamente confrontabile con eventuali valori di riferimento (cut-off) e, preferibilmente, accettata dal Sistema Internazionale di Unità di Misura (SI).

7.3.4. Determinazione dell'alcoemia

La tecnica d'elezione per la determinazione dell'alcoemia a scopo forense è la gascromatografia con campionamento dello spazio di testa (HS-GC). In tal caso, il metodo deve essere in grado di quantificare nell'intervallo di calibrazione compreso tra 0,05 e 3,0 grammi/litro (g/l), con imprecisione e inaccuratezza (intra-sessione e inter-sessione analitica) ai valori di 0,5 g/l, di 0,8 g/l e di 1,5 g/l non superiori al 10%. Il LLOQ del metodo deve essere pari a 0,05 g/l. Al di sotto di questo valore il campione deve considerarsi negativo.

7.4. Validazione di un metodo analitico

Con il termine validazione, si intende l'esecuzione di un insieme di prove atte a valutare la capacità di un metodo analitico di raggiungere gli obiettivi per i quali è stato predisposto. In altri termini, la validazione è la verifica della capacità del metodo di rilevare, identificare e/o quantificare uno o più analiti in una matrice biologica con sufficiente affidabilità e riproducibilità per il fine cui il metodo è destinato. La validazione deve essere effettuata, prima dell'applicazione del metodo analitico in routine, per ciascun metodo sviluppato dal Laboratorio ovvero ricavato dalla letteratura scientifica. La validazione deve essere inoltre nuovamente eseguita in tutti i casi in cui, per qualsiasi ragione, il Laboratorio stabilisce di aggiornare/modificare un metodo analitico. In tal caso dovranno essere rieseguite solo le prove relative ai parametri che il Responsabile della Qualità ritiene possano essere stati influenzati dalle modifiche apportate al metodo.

La validazione può includere, ma non necessariamente si limita a, la determinazione dei seguenti parametri, per una dettagliata illustrazione dei quali si rimanda al paragrafo 2:

- applicabilità della diluizione;
- *carry-over*;
- criteri minimi di identificazione e di quantificazione;
- effetto matrice;
- incertezza di misura;
- valutazione matematica dell'intervallo di calibrazione (o di linearità);
- imprecisione e inaccuratezza (*bias*);
- limite inferiore di quantificazione (LLOQ);
- limite inferiore di rivelabilità (LLOD);
- limite superiore di quantificazione (ULOQ);
- robustezza ;
- specificità (selettività analitica);
- stabilità dell'analita ;
- verifica dell'applicabilità della diluizione

La scelta dei parametri da includere nelle prove di validazione deve tenere conto anche della frequenza di impiego di un metodo analitico. Per metodi di impiego estemporaneo o occasionale i parametri minimi di validazione che devono essere esaminati sono: LLOD, LLOQ, valutazione matematica dell'intervallo di calibrazione, carry-over, imprecisione e inaccuratezza intra-sessione analitica misurate ad almeno un livello di concentrazione.

7.5. CUT-OFF

Il cut-off (o Valore Soglia o Soglia Decisionale) è un limite di concentrazione definito, in maniera convenzionale, per

stabilire la negatività ovvero la positività (non negatività nel caso di *Analisi di screening*) di un campione. Le seguenti tabelle riportano i valori di *cut-off* di *screening* e/o di conferma stabiliti dal GTFI per l'urina (tabella 7.2), il sangue intero (tabella 7.3), i capelli e altre matrici pilifere (tabella 7.4), e la "saliva" (tabella 7.5). Si sottolinea che i *cut-off* elencati nelle tabelle successive consentono esclusivamente di discriminare tra negatività o positività analitica di un campione rispetto ad una determinata sostanza/meta bolita, mentre l'interpretazione diagnostica di un *risultato* analitico coinvolge necessariamente la valutazione di molteplici altri aspetti.

Tabella 7.2. Valori di *cut-off* di *screening* e di conferma nell'urina.

Classe di sostanze o sostanza (sostanza target per lo screening)	Cut-off screening (ng/ml)	Cut-off conferma (ng/ml)
Oppiacei (morfina libera) <i>morfina totale</i> ^a <i>codeina totale</i> ^a <i>6-acetilmorfina</i>	300	200 200 10
Cocaina metabolita (benzoilecgonina) <i>cocaina</i> <i>benzoilecgonina</i>	300	150 150
Amfetamina e congeneri <i>amfetamina</i> <i>metamfetamina</i>	500	200 200
3,4-Metilendiossimetamfetamina e congeneri <i>MDMA</i> <i>MDA</i> <i>MDEA</i> <i>MBDB</i>	500	200 200 200 200
Metadone (metadone) <i>metadone</i> <i>EDDP</i>	300	100 100
Cannabinoidi (THC-COOH) <i>THC-COOH</i>	50	15
Buprenorfina <i>buprenorfina totale</i> ^a <i>norbuprenorfina totale</i> ^a	5	5 5

^a il valore è riferito al campione sottoposto a idrolisi (la verifica dell'efficienza della reazione di idrolisi su morfina-3-glucuronide in fase di validazione del metodo è obbligatoria).

Tabella 7.3. Valori di *cut-off* di conferma nel sangue intero.

Sostanza	Cut-off conferma (ng/ml)
<i>morfina</i>	10
<i>codeina</i>	10
<i>6-acetilmorfina</i>	10
<i>cocaina</i>	10
<i>cocaetilene</i>	10
<i>amfetamina</i>	20
<i>metamfetamina</i>	20
<i>MDMA</i>	20
<i>MDA</i>	20
<i>MDEA</i>	20
<i>MBDB</i>	20
<i>metadone</i>	10
<i>THC</i>	2
<i>11-OH-THC</i>	2

Tabella 7.4. Valori di cut-off di screening e di conferma in matrice pilifera.

Classe di sostanze o sostanza	Cut-off screening (ng/mg)	Cut-off conferma (ng/mg)
Oppiacei <i>morfina</i> <i>codeina</i> <i>6-acetilmorfina</i>	0,2	 0,2 0,2 0,2
Cocaina (cocaina) <i>cocaina</i> <i>benzoilecgonina</i> <i>ecgonina metilestere</i> <i>cocaetilene</i>	0,5	 0,5 0,05 0,05 0,05
Amfetamina e congeneri <i>amfetamina</i> <i>metamfetamina</i>	0,2	 0,2 0,2
3,4-Metilendirossimetamfetamina e congeneri <i>MDMA</i> <i>MDA</i> <i>MDEA</i> <i>MBDB</i>	0,2	 0,2 0,2 0,2 0,2
Metadone <i>metadone</i> <i>EDDP</i>	0,2	 0,2 0,2
Cannabinoidi <i>THC</i> <i>THC-COOH</i>		 0,05 0,0002
Buprenorfina <i>buprenorfina</i> <i>norbuprenorfina</i>		 0,05 0,05
Etilglucuronide		0,03

Tabella 7.5. Valori di cut-off di screening e di conferma nella "saliva".

Classe di sostanze o sostanza	Cut-off screening (ng/ml)	Cut-off conferma (ng/ml)
Oppiacei (morfina libera) <i>morfina</i> <i>codeina</i> <i>6-acetilmorfina</i>	40	 40 40 4
Cocaina metabolita (benzoilecgonina) <i>cocaina</i> <i>benzoilecgonina</i>	20	 8 8
Amfetamina e congeneri <i>amfetamina</i> <i>metamfetamina</i>	50	 50 50
3,4-Metilendirossimetamfetamina e congeneri <i>MDMA</i> <i>MDA</i> <i>MDEA</i> <i>MBDB</i>	50	 50 50 50 50
Cannabinoidi <i>THC</i>	4	 2

8. ASSICURAZIONE DELLA QUALITÀ

La gestione del *Laboratorio* deve essere mirata ad assicurare che i requisiti per la qualità siano soddisfatti: deve cioè dare evidenza oggettiva di "assicurazione di qualità".

8.1. Assicurazione di qualità

L'assicurazione della qualità assume un ruolo peculiare nelle attività analitiche a scopo forense in quanto i relativi risultati possono assumere rilevanza di "prova giudiziaria".

La finalità dell'assicurazione della qualità consiste nell'individuazione ed attuazione di meccanismi in grado d'identificare eventuali errori e nell'attuare appropriati rimedi per evitarne il ripetersi; tali meccanismi generano fiducia che il *Laboratorio* possa soddisfare i requisiti di qualità del proprio operato.

L'assicurazione della qualità coinvolge tutti i processi che si svolgono all'interno del *Laboratorio*, dalla raccolta ed accettazione dei campioni biologici, allo svolgimento dell'*Analisi*, alla validazione dei risultati ed alla refertazione degli stessi.

L'assicurazione della qualità implica una appropriata documentazione e registrazione delle attività di *Laboratorio* per mezzo di procedure mirate sia al controllo dei processi (Procedure Documentate, Procedure Operative Standard), sia al controllo dei prodotti (verifica dei criteri di accettabilità dell'*Analisi*, verifica dei criteri minimi di identificazione e/o di quantificazione, verifica della lettura dei controlli negativi e positivi).

L'assicurazione della qualità implica inoltre che il *Laboratorio* ha l'obbligo di aderire a programmi di Proficiency Testing e/o di Verifica Esterna della Qualità, ove esistenti, almeno per le *Analisi* che rivestono carattere routinario.

8.2. Controlli di qualità

I *Laboratori* che svolgono indagini di tipo tossicologico-forense devono dedicare una parte della gestione della struttura ad attività mirate a soddisfare i requisiti per la qualità i quali rappresentano l'evidenza oggettiva dell'assicurazione di qualità.

Il *Laboratorio* deve acquisire un sistema di controllo di qualità interno, individuando i parametri critici a tal fine e registrandone l'effettuazione. Tale controllo deve riguardare almeno gli aspetti descritti di seguito.

- accettazione dei campioni (es. quantità e qualità);
- conservazione dei campioni (monitoraggio temperature e accesso ai luoghi di conservazione);
- strumentazione analitica (manutenzione ordinaria, verifica di funzionamento, taratura);
- *Analisi* (controlli positivi e negativi, controlli ciechi, monitoraggio di uno standard di riferimento);
- refertazione (completezza della compilazione).

9. RAPPORTO ANALITICO O REFERTO

9.1. Requisiti del rapporto analitico

Il rapporto analitico finale deve essere prodotto obbligatoriamente in forma scritta e consegnato di norma a chi ha richiesto l'accertamento o a persona munita di delega scritta. E' ammesso l'invio aggiuntivo del rapporto analitico in formato elettronico (previo consenso scritto del destinatario, indicato nel modulo di richiesta di analisi) qualora il *Laboratorio* metta in atto una Procedura Documentata sufficiente a garantire l'inaccessibilità delle informazioni in esso contenute da parte di persone diverse dal destinatario e, in ogni caso, in ottemperanza alla normativa vigente in tema di riservatezza dei dati personali e sensibili. Tale procedura deve essere descritta nel dettaglio nel Manuale della Qualità.

Il rapporto analitico deve contenere almeno i seguenti elementi:

- titolo;
- dati identificativi del *Laboratorio*: nome, indirizzo, e-mail, e numero di telefono per eventuali richieste di chiarimenti;
- numero di identificazione del rapporto analitico (es. numero progressivo). Se il rapporto consta di più pagine esse devono essere numerate progressivamente con indicazione del numero totale di pagine (es. 1 di 4, 2 di 4, ecc.);
- nome del richiedente;
- nome e cognome e data di nascita del soggetto (ovvero, se richiesto, codice alfanumerico anonimo) da cui è stato prelevato il campione oggetto dell'*Analisi*;
- tipo di accertamento richiesto e relativa finalità;
- data del prelievo (se nota al *Laboratorio*);
- data di accettazione;
- data di refertazione;
- descrizione del campione oggetto dell'*Analisi* (con dettaglio di eventuali anomalie);

- indicazione dell'*Analisi* eseguita;
- indicazione dell'eventuale tecnica di *screening* utilizzata;
- risultato dell'*Analisi* di *screening* e relativo *cut-off*;
- indicazione della tecnica di conferma e/o quantificazione;
- risultato dell'*Analisi* di conferma con relativa unità di misura (in caso di risultato quantitativo) e relativo *cut-off*;
- legenda che descriva il significato di abbreviazioni o terminologie inusuali (es.: tracce= concentrazione compresa tra LLOD e LLOQ del metodo);
- eventuali limiti di utilizzabilità del risultato analitico;
- nome e firma dell'analista e del direttore del *Laboratorio*.