



Assessorato Tutela della Salute e Sanità

DETERMINAZIONI DI LABORATORIO DELLE SOSTANZE PSICOTROPE

AGGIORNAMENTO DELLE PROCEDURE

Luglio 2009

Gruppo di studio " droghe d'abuso e abuso alcolico"
della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare – Sezione
Piemonte :

- Aldo Arnelli ASL "CN1"
- Marco Bagnati AOU Maggiore Carità -Novara
- Vincenza Bianchi ASO S. Antonio e Biagio - Alessandria
- Maria Marmo ASL "AT"
- Antonello Nonnato AOU S. Giovanni Battista - Torino
- Giovanna Patrucco ASL "VC"
- Sergio Pellegrino Centro Regionale Antidoping Orbassano
- Michele Petrarulo AO Mauriziano - Torino
- Manuela Viarengo ASL "AT"

Con la collaborazione di :

- Sciacca Annunziata - Assessorato Regionale alla Tutela della Salute e Sanità – Settore Assistenza Specialistica e Ospedaliera
- Simona Pichini, Roberta Pacifici - Istituto Superiore di Sanità ROMA
- Vincenti Marco - Centro Regionale Antidoping "A. Bertinaria" Orbassano (TO)

L'argomento trattato nella presente pubblicazione aggiorna una tematica che per le sue particolari connotazioni, incluse le ripercussioni sociali e medico-legali, necessita di adeguati interventi di coordinamento per fornire agli operatori sanitari protocolli di intervento e modalità di comportamento omogenei in ambito regionale, soprattutto in una fase delicata e determinante quale è la diagnosi di laboratorio. Per questo, l'Assessorato alla Tutela della Salute e Sanità ha aderito al progetto di ridefinizione delle procedure tossicologiche emanate nel 2001 con l'intento di offrire agli operatori dello specifico settore un quadro aggiornato secondo la letteratura scientifica più recente, il cui obiettivo prioritario è di giungere a stabilire procedure di laboratorio univoche. L'iniziativa è altamente encomiabile in quanto rappresenta anche un momento d'incontro e di collaborazione tra professionalità diverse che hanno così l'occasione di confrontarsi sul tema della Diagnostica Tossicologica.

Un doveroso ringraziamento per il prezioso contributo va agli operatori sanitari che hanno curato gli aspetti tecnici, ai funzionari che hanno svolto un valido ruolo di coordinamento del Progetto e a tutti coloro che a diverso titolo hanno collaborato per il buon andamento dell'iniziativa.

*Eleonora ARTESIO
Assessore Regionale alla Sanità*

INDICE

Presentazione	pg.	5
1. Procedure operative	pg.	6
2. Fase preanalitica	pg.	7
• Modulistica per richiesta analisi	pg.	7
• Catena di custodia	pg.	8
• Raccolta e conservazione dei campione	pg.	8
• Matrici biologiche	pg.	9
3. Fase analitica	pg.	13
A. Droghe d'abuso		
• Indagine sull'autenticità del campione	pg.	13
• Metodi analitici	pg.	14
B. Alcolemia,alcoluria e biomarcatori correlati	pg.	17
C. Test speditivi point of care testing (POCT): on-site drug testing	pg.	24
D. Controlli di qualità	pg.	25
4. Fase postanalitica	pg.	27
5. Conclusioni	pg.	28
Bibliografia	pg.	29
Tabelle	pg.	32
Documenti speciali	pg.	39
Questionari	pg.	42

PRESENTAZIONE

La diagnostica tossicologica riguarda un ambito della Medicina di Laboratorio che richiede particolari competenze e strumentazioni mirate. Il laboratorio che esegue analisi tossicologiche in diverse matrici biologiche (sangue, urine, fluido orale, capelli) deve essere in grado di assicurare la qualità di un prodotto complesso garantendo elevata qualità tecnico analitica e doverosa attenzione verso gli aspetti medico legali.

Risulta, quindi necessario operare per uniformare le procedure e standardizzare i metodi all'interno di un sistema qualità che garantisca l'elevato livello del prodotto finale.

A tale scopo nasce questo lavoro con il duplice intento di verificare lo stato dell'arte in Piemonte, a seguito della divulgazione nel 2001 delle linee guida "Determinazione di laboratorio delle sostanze d'abuso nell'area delle tossicodipendenze" e, di aggiornare gli operatori sui più recenti ed accreditati aspetti metodologici ed analitici in ambito tossicologico, ben consci che le normative in tema di tossicodipendenza ed abuso alcolico sono sempre più numerosi e richiedono aggiornamenti più tempestivi.

La raccolta dei dati ottenuti tramite questionari inviati a tutti i Laboratori e ai Ser.T della Regione Piemonte ha evidenziato l'adozione di modelli operativi e gestionali più omogenei rispetto al quadro messo in luce con i dati raccolti nel 2001, a riprova del valore formativo di linee guida proposte da gruppi di lavoro di professionisti radicati sul territorio.

Su questa base, il nuovo documento è proposto per essere anche un valido strumento di appropriatezza, sia per indirizzare gli operatori nella scelta delle prestazioni di laboratorio con criteri basati su evidenze, sia per favorire la collaborazione tra specialisti di laboratorio e utilizzatori in ambito clinico e forense al fine di evitare sprechi di preziose risorse.

E' stato, inoltre, ritenuto opportuno pubblicare in questa sede oltre il risultato del lavoro scientifico, documenti speciali quali " Istruzioni per i prelievi in caso di sospetta violenza", i questionari rivolti agli operatori dei Servizi di Medicina di Laboratorio e di Cura della Tossicodipendenza, nonché una puntuale bibliografia contenente i principali riferimenti normativi e scientifici in materia.

1. PROCEDURE OPERATIVE

In accordo con quanto previsto dall'attuale normativa regionale per l'Accreditamento Istituzionale (D.C.R. n° 616-3149 del 22 febbraio 2000, "...requisiti strutturali, tecnologici ed organizzativi minimi per l'esercizio delle attività sanitarie..." che ha recepito il D.P.R. n° 37 del 14 gennaio 1997) (1,2), devono essere stilati documenti che descrivano in dettaglio le procedure operative standard (SOP) in tutte le fasi del ciclo analitico: dalla fase preanalitica ("preparazione dell'utente..", "identificazione dei campioni", "trasferimento del materiale biologico dalle zone del prelievo al laboratorio"), alla fase analitica ("descrizione del metodo analitico impiegato", "procedura d'esecuzione", "controllo di qualità") sino alla fase postanalitica ("modalità di compilazione, trasmissione e consegna referti", "conservazione dei campioni", "archiviazione dei dati").

L'attuazione di una politica della qualità, requisito indispensabile per la garanzia dei dati di laboratorio ha, inoltre, promosso l'adesione a programmi di Accreditamento d'Eccellenza o di Certificazione per l'implementazione di un Sistema Qualità. I vari programmi utilizzano una diversa terminologia, talora per identificare lo stesso argomento: protocolli operativi, procedure operative, procedure specifiche, procedure operative standard, modalità operative, istruzioni operative, disposizioni interne, regolamenti interni.

Occorre, comunque, predisporre:

- Documenti e Procedure Generali, comprendenti prescrizioni o indicazioni applicabili a tutte le Unità Operative Aziendali (ad esempio il Manuale della Qualità, la Carta dei Servizi, il Piano di Organizzazione Aziendale, etc...)
- Documenti e Procedure Specifiche delle singole Unità Operative, comprendenti prescrizioni o indicazioni la cui applicazione è limitata ad una particolare Unità Operativa
- Istruzioni Operative, per ciascuna Unità Operativa, che specifichino le sequenze di comportamenti, in genere a livello di Settore, che garantiscono il completamento delle Procedure sia Generali che Specifiche.

In questa sede, sono prevalentemente trattati i contenuti di quelli che saranno genericamente chiamati "documenti operativi". I riferimenti principali per la terminologia

e l'articolazione dei documenti fanno capo alle norme UNI ISO 9001:2000 e ISO 15189:2007(3,4).

Per i laboratori che eseguono indagini di II livello è opportuno fare riferimento alla norma "ISO/IEC 17025: 2005 Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura" che pone particolare attenzione alle regole per assicurare la competenza tecnica del laboratorio ad eseguire le misure (5).

Per "documenti operativi" sono da intendersi disposizioni scritte che specificano lo scopo, le modalità ed il campo di applicazione delle attività svolte. Definiscono come e da chi le attività debbano essere attuate, controllate e registrate. Indicano le responsabilità ed i sistemi di verifica. Devono essere approvati dal Responsabile del Laboratorio, datati e periodicamente revisionati ed aggiornati.

Per motivi di praticità si consiglia di trattare gli argomenti specificati dalla normativa vigente suddividendoli in più "documenti operativi".

Una possibile suddivisione ed articolazione degli argomenti da trattare, utilizzabile come traccia (debitamente adeguata alle specifiche esigenze del Servizio, dell'Unità Operativa e dell'Azienda), è riassunta nella tabella 1.

2. FASE PREANALITICA

2.1 MODULISTICA PER RICHIESTA ANALISI

Il modulo di richiesta analisi, oltre ai dati anagrafici/identificativi di chi è sottoposto ad analisi, ed ai dati identificativi del richiedente (Ente, Reparto, Medico, Privato), dovrà contenere le seguenti indicazioni:

- provenienza del campione
- data ed ora del prelievo
- sostanze da ricercare
- finalità dell' indagine
- l'eventuale terapia o assunzioni di farmaci in atto
- modalità di prelievo (- a vista, - campione consegnato, - prelevato, - altro)
- firma del richiedente

Data la possibilità di eventuali implicazioni giudiziarie/amministrative è necessario garantire l'identità, l'integrità e l'autenticità del campione.

È necessario segnalare e documentare le modalità con cui è avvenuto il prelievo, allegando al modulo di richiesta " la catena di custodia".

2.2 CATENA DI CUSTODIA

È la documentazione che garantisce l'autenticità, l'integrità e la tracciabilità, in termini di trasporto, del campione dal momento del prelievo al momento dell'analisi.

Un documento di trasporto è necessario per i campioni provenienti da strutture esterne a quella in cui è situato il laboratorio.

Si consiglia di attuare una catena di custodia separata per ciascuno dei differenti materiali biologici anche dello stesso soggetto. Essa è costituita da un modulo che deve riportare:

- generalità del soggetto e numero identificativo univoco
- data del prelievo
- tipologia di materiale biologico
- ente richiedente
- finalità dell'indagine
- eventuali terapie in corso
- generalità, ora e firma del prelevatore o di chi ha assistito alla raccolta del campione
- generalità, ora e firma del/i addetto/i al trasporto
- generalità, ora e firma del personale del laboratorio che riceve in carico il campione
- luogo di conservazione del campione

Quanto definito indica le condizioni minime per l'attuazione di un documento per usi generali. Con delibera n 13 – 10928 del 09/03/2009 la Regione Piemonte individua più precise condizioni in relazione alle "...procedure relative all'accertamento di assenza di tossicodipendenza...in lavoratori addetti a mansioni con particolari rischi..."(6).

2.3 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

La conservazione del campione biologico deve essere effettuata in modo idoneo al fine di prevenire eventuale contaminazione o degradazione. Sono raccomandate le seguenti condizioni :

- Sangue : - 20°C per anni
- Urina : - 20°C per anni

- Fluido orale: fino a due mesi se mantenuta a $4^{\circ} \div - 20^{\circ}\text{C}$ in presenza di conservanti
- Capello o altra matrice cheratinica: temperatura ambiente in luogo idoneo per anni.

I campioni ottenuti a seguito di una richiesta dell'Autorità Giudiziaria, e quelli sottoposti a test di conferma devono essere conservati tutti a $- 20^{\circ}\text{C}$, per un periodo non inferiore ad un anno, specificando in referto il periodo di conservazione. I laboratori, che eseguono le analisi di conferma sui campioni risultati non negativi alle analisi di screening per l'accertamento della tossicodipendenza nelle mansioni a rischio, devono custodire l'aliquota residua del campione in congelatore per un periodo di tempo non inferiore a 90 giorni (6).

Per quanto riguarda i campioni sottoposti a test di screening devono essere conservati almeno quelli risultati positivi, per un periodo tale da permettere a chi gestisce l'invio dei campioni (Ser.T., Medicina Legale, Carceri, ecc.) di recepire l'esito analitico e di richiedere (in base alle singole e specifiche esigenze) il test di conferma. Tale periodo, variabile da 7 a 14 giorni dall'emissione del referto, deve essere indicato in referto. In caso di richiesta del test di conferma, il laboratorio provvede all'esecuzione del test o all'invio del campione presso un laboratorio di II livello, in base alla propria organizzazione.

2.4 MATRICI BIOLOGICHE

2.4.1 Matrici Biologiche: il sangue

Il sangue costituisce la matrice biologica di elezione per le indagini cliniche e forensi. La concentrazione ematica e/o plasmatica della sostanza ricercata, infatti, consente di stabilire o di escludere la recente assunzione ed è direttamente correlabile allo *status* psicofisico del soggetto al momento del prelievo.

Prelievo

Il prelievo di un campione di sangue per la determinazione delle sostanze d'abuso e/o dell'alcol è invasivo e deve essere effettuato con il consenso dell'interessato. È consigliabile eseguire tre prelievi in provette senza o con anticoagulante (K_3EDTA , fluoruro di sodio, eparinato di litio o ammonio o sodio) (7). Un campione viene utilizzato per l'analisi di I livello, il secondo per l'analisi di II livello e il terzo congelato (in caso di positività) per gli eventuali successivi approfondimenti

analitici in caso di ricorso. È possibile utilizzare per le analisi delle sostanze d'abuso sangue intero, siero o plasma.

2.4.2 Matrici Biologiche: l'urina

L'esame delle urine può essere eseguito per motivi di semplicità, rapidità o di non invasività; la positività dell'analisi indica che la sostanza è stata assunta da alcune ore ad alcuni giorni prima del prelievo, ma non può correlare l'eventuale stato di alterazione psico-fisica ad una recente assunzione.

In caso di positività del campione urinario ed in assenza di prelievo ematico o salivare, non vi è la certezza dell'eventuale stato di alterazione psico-fisica in quanto può non essere noto il tempo trascorso tra il momento dell'assunzione della sostanza e quello del prelievo urinario.

Prelievo

È necessario raccogliere almeno 60 mL di campione urinario. Al fine di favorire la minzione, l'interessato può bere acqua, in ragione di non più di 500 mL.

Per motivi amministrativi e/o giudiziari, i campionamenti devono essere effettuati a vista da un operatore sanitario qualificato. I contenitori devono essere dotati di chiusura ermetica antiviolazione oppure chiusi e sigillati con sigillo adesivo a nastro non rinnovabile sul quale l'interessato e l'operatore addetto ai prelievi appongono congiuntamente la propria firma.

2.4.3 Matrici Biologiche: il fluido orale

Il fluido orale o saliva, miscela di secrezioni delle ghiandole parotide, sottomascellare, sublinguale e salivare minore, contiene mucina, batteri, leucociti, cellule epiteliali, liquido dello spazio sottogengivale e trasudato mucoso.

La saliva può essere connotata come un ultra-filtrato plasmatico naturale ed è costituita da acqua per il 99.4% e da proteine (mucina, lisozima, immunoglobuline, albumina) in quantità di 0.15-4.0 g/L. Il pH varia nell'intervallo 6.2-7.4 (un incremento della velocità di flusso può determinare l'aumento del pH fino ad un valore massimo di 8.0, a causa dell'incremento dei livelli di bicarbonato).

I campioni di fluido orale devono essere trattati come materiale biologico potenzialmente infetto al pari del sangue (8).

Studi recenti sul fluido orale hanno dimostrato che la maggior parte delle droghe d'abuso (oppioidi, amfetamine, cocaina, ecc.) e dei farmaci assunti diffondono nel fluido orale per trasferimento passivo dal torrente circolatorio e le concentrazioni salivari correlano con quelle ematiche (9).

L'analisi della saliva consente di determinare una droga d'abuso o un farmaco in un periodo di tempo breve, compreso tra meno di un'ora e 24 ore dall'assunzione, utilizzabile per verificare l'eventuale stato di alterazione psico-fisica del soggetto.

Al contrario della maggior parte delle droghe d'abuso e dei farmaci, il principio attivo della cannabis (Δ^9 -tetraidrocannabinolo, Δ^9 -THC o THC) non diffonde dal sangue alla saliva a causa della sua scarsa idrosolubilità e basicità (9), di conseguenza le concentrazioni misurate nel fluido orale derivano dalla sostanza genitrice presente nella cavità orale, in seguito a fumo.

In queste condizioni, è possibile che la presenza del principio attivo nella cavità orale possa derivare anche da una contaminazione ambientale esterna (fumo passivo).

Allo scopo di stabilire con certezza l'avvenuta assunzione di cannabinoidi, le linee guida del SAMHSA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration) (10) prevedono la raccolta contemporanea di un campione di saliva e di urina. Quest'ultima sarà analizzata quando la ricerca preliminare del Δ^9 -THC nel fluido orale sia risultata positiva. In caso di fumo passivo le concentrazioni dei metaboliti dei cannabinoidi nelle urine risultano sempre inferiori a 10 $\mu\text{g/L}$.

Prelievo

La saliva può essere raccolta semplicemente, con carattere di non invasività, espellendo almeno 10 mL di fluido orale in un contenitore graduato o provetta, in un periodo di tempo di circa 30 minuti o finché non è stato raggiunto il volume definito. Attendere almeno 10 minuti dall'ingestione di cibo, bevande o farmaci prima della raccolta del campione.

Sono attualmente in fase di definizione studi approfonditi sulla stabilità delle sostanze d'abuso nella saliva e sulla modalità di raccolta della saliva utilizzando stimolatori salivari, attualmente sconsigliati dalle linee guida SAMSHA (10).

Per motivi amministrativi e/o giudiziari, i campionamenti devono essere effettuati a vista ed i contenitori devono essere dotati di chiusura ermetica antiviolazione oppure chiusi e sigillati con sigillo adesivo a nastro non rinnovabile sul quale l'interessato e l'operatore addetto ai prelievi appongono congiuntamente la propria firma.

È stato osservato che la presenza di conservanti (sodio azide 0.1% e tampone citrato pH 4) previene la degradazione delle droghe per un periodo di 1 settimana se mantenuta a 25° ÷ 37°C e fino a due mesi se mantenuta a 4° ÷ - 20°C. Sono in fase di svolgimento studi approfonditi sulla stabilità delle sostanze d'abuso nella saliva (11).

2.4.4 Matrici Biologiche: formazioni pilifere (matrice cheratinica)

I capelli hanno velocità di crescita variabile tra 0.8 e 1.4 cm/mese e possono essere considerati come “memoria” delle sostanze tossiche presenti nell'organismo al momento della crescita del pelo. I metalli, gli altri xenobiotici ed i loro metaboliti presenti nell'organismo vengono incorporati in misura variabile nella matrice cheratinica durante la crescita del capello e/o pelo e le loro concentrazioni possono essere correlate ai periodi di tempo (mesi, anni) in cui sono state assunte le sostanze tossiche. Nell'interpretazione del dato analitico è difficile risalire con assoluta precisione al momento esatto di assunzione di una droga d'abuso, tuttavia è possibile che l'analisi segmentale dei capelli nello stesso individuo possa collocare temporalmente la frequenza delle assunzioni, con una certa variabilità legata alla differente velocità di crescita.

Le droghe d'abuso si legano alla matrice cheratinica attraverso il flusso ematico, la secrezione delle ghiandole sebacee e sudoripare ed è altresì possibile una contaminazione ambientale dovuta ad esposizione esterna. E' possibile comunque distinguere il contenuto endogeno da quello esogeno ricercando i principali metaboliti derivanti dalla trasformazione metabolica della droga assunta ed analizzando i liquidi di lavaggio dei capelli prima delle procedure di estrazione, per assicurarsi dell'assenza della sostanza ricercata.

Variabili importanti sono, inoltre, il colore dei capelli e l'origine etnica: i capelli più scuri fissano più metaboliti rispetto a quelli chiari, i capelli dei Mongoloidi e degli Africoidi ne trattengono quantità superiori rispetto ai Caucasici. Occorre sottolineare che mentre i risultati qualitativi possono essere di indubbia utilità, l'attendibilità di quelli quantitativi è ancora oggetto di discussione. Allo stato attuale di conoscenza, inoltre, un risultato negativo per una determinata sostanza tossica non ne può escludere l'assunzione occasionale ed un risultato positivo può essere indice di un consumo abitudinario di sostanze d'abuso. E' tuttavia possibile, per molecole con elevata affinità per la matrice cheratinica, dimostrare la presenza di una determinata sostanza nel capello anche se

assunta una sola volta, ricorrendo in tal caso all'analisi segmentaria della frazione temporale corrispondente alla sua presunta somministrazione (12).

La letteratura riporta anche valori differenziati per consumo (13). Inoltre, è possibile che i capelli possano essere adulterati mediante trattamenti cosmetici di decolorazione, tinture e permanente, che possono alterare e danneggiare la struttura cheratinica determinando una perdita della droga incorporata, la cui concentrazione può diminuire anche sensibilmente.

Prelievo

Si preleva una ciocca di capelli nella zona nucale delle dimensioni di una matita e si arrotola su se stessa prima del taglio in modo da effettuare una recisione uniforme (circa 300 mg di capelli). Si taglia la ciocca ponendo le forbici aderenti al cuoio capelluto. Una volta effettuato il taglio, i capelli possono essere fissati con uno spago annodato il più vicino possibile alla parte dei capelli prossimale al cuoio capelluto (mezzo centimetro circa) in modo da evidenziare il segmento iniziale. Nel caso in cui i capelli fossero più corti di 1 cm si può ricorrere al prelievo dei peli pubici o di quelli ascellari.

A causa della estrema variabilità delle fasi di crescita/quiescenza e sollecitazione ed usura fisica, i risultati ottenuti sui peli pubici non possono essere correlati con certezza al periodo di esposizione, rendendo ardua la datazione analitica. I peli ascellari, inoltre, cedono in parte le sostanze trattenute per adsorbimento sugli indumenti.

3. FASE ANALITICA

A DROGHE D'ABUSO

A.1 INDAGINI SULL'AUTENTICITA' DEL CAMPIONE

Per una corretta interpretazione dei dati analitici relativi alle sostanze stupefacenti e/o psicotrope è considerato requisito indispensabile effettuare analisi su campioni autentici ed integri. Mentre sangue e capello sono prelevati direttamente, l'urina e, in misura minore, la saliva, sono certamente più a rischio di adulterazione.

I principali test attualmente a disposizione del Laboratorio per indagare sull'autenticità del campione di urine sono indicati nella tabella 2.

I valori di cut-off riportati sono quelli raccomandati dal SAMHSA (10)

Tra i test elencati, il dosaggio della creatininuria, rispondendo a requisiti quali economicità, affidabilità, praticità, accessibilità, frequenza d'utilizzo, automazione,

standardizzazione delle metodiche analitiche e dei valori di riferimento, è quello che più facilmente si presta ad essere utilizzato per fornire indicazioni in merito all'autenticità ed integrità del campione.

Viene quindi richiesta, per ogni campione di urine sottoposto ad analisi per la ricerca di sostanze d'abuso, la determinazione della creatininuria e la sua indicazione in referto. Per valori di creatininuria inferiori a 20 mg/dL deve essere riportato in referto un commento sull'inattendibilità dei dati e raccomandata la ripetizione dell'esame con l'invio di un nuovo campione; mentre per valori compresi tra 20 e 40 mg/dL viene consigliato di indicare nel referto il dubbio sull'autenticità del campione. Come specificato al successivo punto "Modalità di refertazione", il dosaggio della creatininuria può essere omesso in caso di misura in urgenza. È bene precisare che la determinazione della creatininuria, pur se ritenuta indispensabile, non è da considerarsi in termini esclusivi; ogni Laboratorio potrà avvalersi, a propria discrezione, di ulteriori test per valutare con maggior precisione l'autenticità e l'integrità del campione.

Per verificare l'autenticità di un campione di fluido orale è necessario determinare la concentrazione di Immunoglobulina G. Se il valore ottenuto è inferiore a 0.10 mg/L il campione non può essere ritenuto valido.

A.2 METODI ANALITICI

Le metodologie analitiche per la determinazione di laboratorio delle sostanze d'abuso, in base ad esigenze analitiche, procedurali, organizzative, ed economiche si distinguono in due gruppi:

- test di screening (iniziali o di I livello)
- test di conferma (o di II livello)

A.2.1 Test di screening (iniziali o di I Livello)

- SANGUE/PLASMA/SIERO e MATRICE CHERATINICA

I test di screening o semiquantitativi su matrice ematica o cheratinica possono essere eseguiti utilizzando metodiche commerciali validate per queste matrici.

Volendo utilizzare, per ragioni di economicità o praticità, metodiche validate su matrici differenti (urine, fluido orale) è necessario procedere ad una validazione della metodica secondo le linee guida per la convalida dei metodi immunochimici (14). In particolare,

per la ricerca delle principali classi delle droghe d'abuso in matrice cheratinica, è possibile ricorrere alle metodiche di screening su fluido orale, che consentono di ottenere concentrazioni compatibili con quelle che si riscontrano nei capelli. La convalida si prefigge di documentare le caratteristiche del metodo analitico per avere una valutazione obiettiva dei risultati. I parametri fondamentali da valutare sono:

- specificità: capacità del metodo di determinare l'analita senza interferenze da parte di altre sostanze presenti; occorre, quindi, scegliere test immunochimici altamente specifici per le sostanze da determinare;
- calibrazione: costruzione della retta di calibrazione all'interno dell'intervallo di concentrazioni di interesse analitico e verifica della linearità della curva di taratura in matrice ematica o cheratinica per correggere l'effetto matrice
- limite di quantificazione (LOQ): la più bassa concentrazione dell'analita misurabile con una precisione ed accuratezza definite
- limite di rivelazione (LOD): la minima concentrazione dell'analita che si può distinguere da un campione bianco; è la più bassa concentrazione per valutare qualitativamente la presenza o l'assenza di un analita
- imprecisione: dispersione dei dati ottenuti; occorre calcolare il coefficiente di variazione (CV) intrasaggio e intersaggio. La imprecisione intorno al valore medio non deve superare un CV del 15% (15)
- inaccuratezza: scostamento tra il valore trovato e il valore atteso (vero); l'inaccuratezza del metodo non deve superare il 15% del valore atteso (15)
- controllo di qualità: occorre utilizzare un controllo con concentrazione vicina al LOQ, un controllo con concentrazione intorno al valor medio della retta di calibrazione, un controllo con concentrazione elevata.

- URINE e FLUIDO ORALE

Sono test che rispondendo prevalentemente a requisiti di economicità, velocità, standardizzazione, efficacia ed efficienza, permettono la gestione di numerosi campioni in tempi brevi. Analiticamente differenziano i campioni in:

- NEGATIVI, ovvero che non contengono la sostanza in esame o la cui concentrazione è al di sotto di un valore soglia (cut-off).
- POSITIVI, ovvero che contengono presumibilmente la classe a cui appartiene la sostanza ad una concentrazione uguale o superiore al valore soglia.

Il valore soglia (cut-off), limite operativo scelto in base alle caratteristiche analitiche del metodo per stabilire la positività o la negatività del campione, permette di escludere da un eventuale approfondimento diagnostico (test di conferma) i campioni risultati negativi. Per contro, i campioni risultati positivi ai test di screening, se non verificati con test di conferma, non hanno valore amministrativo o legale (14).

Le metodiche immunochimiche, applicate su analizzatori automatici, attualmente più utilizzate per i test di screening sulle matrici citate sono le seguenti:

- CEDIA (Cloned Enzyme Donor Immunoassay)
- EIA (Immuno Enzimatiche)
- ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
- EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique)
- FPIA (Immunofluorescenza a luce polarizzata)
- KIMS (Interazione Cinetica di Microparticelle in Soluzione)

I test di screening su fluido orale utilizzano preferenzialmente la tecnologia ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

A.2.2 Test di conferma (o di II livello)

I test di II livello (procedure di estrazione del principio attivo e/o dei suoi metaboliti, in fase liquida o solida, seguite dall'analisi cromatografica accoppiata alla spettrometria di massa) rispondono prevalentemente a requisiti di specificità e consentono la conferma della positività dei campioni o la verifica di eventuali falsi positivi ai test di screening. Devono avere quindi un limite di determinazione inferiore al valore soglia stabilito per i test di I livello. La risposta dei test di conferma viene espressa per singola sostanza in termini QUANTITATIVI ovvero in $\mu\text{g/L}$. Tutti le metodiche utilizzate necessitano di validazione. È consigliabile effettuare la validazione utilizzando la norma ISO 17025 con particolare riferimento alla stima dell'incertezza di misura.

Le metodiche cromatografiche utilizzate per i test di conferma sono le seguenti:

- GC - MS (Gas Cromatografia accoppiata a Spettrometria di Massa)
- LC - MS (Cromatografia Liquida accoppiata a Spettrometria di Massa).

A.2.3 Valori Soglia

- Sangue/Plasma/Siero

Test di screening

Si consiglia di utilizzare per i test di screening i valori di cut-off indicati dalle ditte produttrici dei kit commerciali.

Test di conferma

Si consiglia di utilizzare per i test di conferma valori di cut-off inferiori alle concentrazioni dei principi attivi e dei loro metaboliti, compatibili con lo stato di alterazione psicofisico.

- Matrice cheratinica

test di screening

Poiché non sono definiti valori di cut-off ufficiali dei vari xenobiotici nel capello i quali permettano di stabilire la positività o la negatività rispetto all'utilizzo o meno di una certa sostanza, si propongono le indicazioni della Society of Hair Testing (SoHT) (16).

Sono definiti come valori di cut-off per l'analisi dei capelli con i test immunochimici i limiti indicati in tabella 3.

test di conferma

La Society of Hair Testing (SoHT) ha definito, come valori di cut-off per l'analisi dei capelli con analisi cromatografica, i limiti indicati in tabella 4.

- Urina

Test di screening

Classi di sostanze e valori soglia (cut-off) per i test di screening, raccomandati dalle Linee Guida Regione Piemonte (2001) e dall'Istituto Superiore Sanità (1996) (17), tenuto conto dell'attuale stato dell'arte sono riportati in tabella 5.

test di conferma

Classi di sostanze e valori soglia (cut-off) per i test di conferma, raccomandati da un Documento Europeo (18) sono riportati in tabella 6.

- Fluido orale

test di screening

Classi di sostanze e valori soglia (cut-off) per i test di screening, raccomandati dal SAMHSA (10) sono riportati in tabella 7.

test di conferma

Classi di sostanze e valori soglia (cut-off) per i test di conferma, raccomandati dal SAMHSA (10) sono riportati in tabella 8.

B ALCOLEMIA, ALCOLURIA E BIOMARCATORI CORRELATI

B.1 ALCOLEMIA

L'etanolo, pur rientrando tra le sostanze d'abuso, è trattato separatamente in quanto:

- sostanza lecita e liberamente in commercio
- possiede aspetti normativi (limiti di concentrazione, matrici biologiche) ben definiti
- per struttura chimica e per livelli di concentrazione espressi in g/L, può essere determinato anche con metodologie analitiche analoghe a quelle utilizzate in chimica clinica.

- Farmacocinetica dell'alcol etilico

- Picco ematico: 1-2 ore
- Velocità di scomparsa dal sangue: 0.15-0.20 g/L/ora
- Emivita: 2-14 ore, dose dipendente
- Volume di distribuzione: 0.6 L/Kg circa
- Distribuzione: rapporto siero/sangue intero = 1.2 circa
- Legame proteico: non significativo

- Tossicità dell'alcol etilico

Alcolemia g/L	Quadro clinico
- 0.50 - 0.80	EBBREZZA iniziale, accentuata da stati di ipoglicemia
- 0.80 - 2.00	INSTABILITA' EMOTIVA: diminuzione delle percezioni sensoriali, loquacità, sonnolenza, deambulazione incerta, incoerenza ideativa
- 2.00 – 4.00	CONFUSIONE: nausea, vomito, vertigini, sudorazione e salivazione profuse, ipotermia lieve, midriasi, in coordinazione motoria ed ideativa
- 4.00 – 6.00	STUPORE-COMA: iporiflessia, paralisi incombente, coma con acidosi metabolica, insufficienza respiratoria e circolatoria, ipotermia marcata

- Aspetti normativi

- Il legislatore ha stabilito in 0.50 g/L la concentrazione alcolemica oltre la quale viene definito lo stato di ebbrezza.
- Il legislatore ha individuato nell'analisi alcolimetrica dell'aria alveolare espirata, misurata tramite etilometro omologato, lo strumento utilizzabile per la determinazione dell'alcolemia con metodo non invasivo.

- Non può esser disposto coattivamente il prelievo ematico, trattandosi di un atto invasivo della libertà personale se non su provvedimento scritto e motivato dell'Autorità Giudiziaria.
 - Il prelievo ematico può quindi essere legittimamente esperito solo con il consenso dell'interessato.
- Determinazione analitica
 - Il sangue è la matrice biologica di elezione per la determinazione dell'alcolemia.
 - Attualmente vengono utilizzate due tipologie analitiche:
 - ❖ metodiche enzimatiche (test di screening o di I livello)
 - ❖ metodiche gas-cromatografiche (test di conferma o di II livello)

Le metodiche enzimatiche, seppur dotate di un buon livello di precisione e di accuratezza, risultano dotate di sensibilità e specificità sufficienti per fini clinici, ma non per fini giuridici. Il rischio di ottenere risultati “falsi positivi” (per limiti di specificità) o “falsi negativi” (per limiti di sensibilità) comporta la necessità, per le analisi con valenza medico-legale, di confermare sia i risultati positivi che quelli dubbi con metodiche gas-cromatografiche.

Le metodiche gas-cromatografiche sono invece utilizzabili per analisi con valenza clinica, indipendentemente dal dato ottenuto. Nel caso in cui il campione sia destinato ad analisi di conferma, sul referto riportante il risultato ottenuto con analisi enzimatica dovrà essere segnalato che “seguirà test di conferma”. Qualora presso il laboratorio non sia disponibile la metodica di conferma, si deve provvedere all'invio del campione ad un laboratorio di II livello.

Metodo di conferma:

- HS-GC–FID (Gas-cromatografia con spazio di testa e rivelatore a ionizzazione di fiamma)
- HS-GC–MS (Gas-cromatografia con spazio di testa e rivelatore a spettrometria di massa).

Per l'esame dell'alcolemia è consigliabile raccogliere il sangue in due provette con fluoruro di sodio, una delle quali viene utilizzata per le indagini; la seconda è da conservare a non meno di –20°C per eventuali controanalisi.

I campioni che possono avere una valenza medico-legale sono da conservare a non meno di – 20 °C per un periodo non inferiore ad un anno, specificando sul referto il periodo di conservazione.

Per quanto attiene alle indicazioni di minima da riportare sul modulo di refertazione, la modulistica per richieste, le modalità di raccolta e la catena di custodia vale quanto descritto ai punti precedenti.

B.2 ALCOLURIA

L'etanolo urinario non è un buon indicatore per valutare lo stato di ebbrezza, data l'estrema variabilità della concentrazione a parità di assunzione. Tuttavia, la permanenza dell'etanolo nelle urine per un tempo più lungo, rispetto al sangue, lo rende utile per monitorare l'astinenza: a questo scopo occorre che l'esame venga richiesto quasi giornalmente, a causa del basso tempo di emivita dell'etanolo. Rispetto al sangue, le urine hanno il grosso vantaggio di non richiedere prelievi invasivi. La presenza di etanolo nelle urine va valutata caso per caso. La positività a bassi valori di concentrazione (0.30-0.50 g/L) in urine prelevate dopo pranzo è poco significativa mentre è preoccupante se il prelievo è fatto di mattina. Un solo valore positivo non significa nulla mentre più valori positivi evidenziano una assunzione cronica di alcol. Valori positivi in persone che dovrebbero essere astinenti sono ovviamente indice di interruzione dello stato di sobrietà. L'etanolo si ritrova nelle urine fino a 12 ore dopo l'assunzione.

La determinazione dell'alcol etilico nelle urine viene eseguita con le stesse metodiche analitiche utilizzate per il dosaggio dell'alcolemia.

B.3 BIOMARCATORI NEL MONITORAGGIO DELL'ABUSO ALCOLICO

Esistono diversi parametri biochimici che, in modo più o meno specifico ed in sinergia tra loro, sono in grado di monitorare l'abuso alcolico. Correttamente misurati, possono dare importanti indicazioni circa uso/abuso e ricadute in persone in trattamento o in disassuefazione, in quanto consentono di aumentare la finestra diagnostica per l'individuazione dell'abuso rispetto alla semplice determinazione dell'alcolemia. I test sono utilizzati per il monitoraggio del soggetto sia per motivi sanitari (programmi riabilitativi) sia per motivi medico legali (patente di guida, affidamento di minori, rilascio di porto d'armi ed altro). Allo stato attuale, per l'accertamento del consumo alcolico in un soggetto a rischio di abuso, viene utilizzato un pannello di esami biochimici scelti per migliorare la prestazione diagnostica in termini di sensibilità, specificità e valore predittivo. I biomarcatori più promettenti ad elevata sensibilità e specificità sono:

- Transferrina Carboidrato Carente (CDT, Carbohydrate- Deficient Transferrin, “Transferrina desialilata”)
- Etilglucuronato (EtG) attualmente in fase di studio, ma molto promettente per la sua finestra di indagine a breve e a lungo termine a seconda del materiale biologico utilizzato.

- TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (CDT)

L'abuso alcolico interferisce con il metabolismo di molte proteine tra cui la transferrina. Sulla base di un ampio consenso scientifico si definisce CDT l'insieme delle glicoforme della transferrina con pls ≥ 5.7 di cui le componenti rappresentative sono: asialo-TRF, monosialo-TRF, disialo-TRF e trisialo-TRF –essendo la tetrasialo-TRF la forma completamente sialilata-. Nei soggetti che non abusano di alcol si ritrovano frazioni di disialo- e asialo-transferrina minori del 2 % del totale, mentre questo valore aumenta significativamente nei soggetti abusatori.

In particolare la glicoforma disialo-transferrina è considerata marcatore di abuso alcolico di riferimento. L'asialo-transferrina in teoria sarebbe più specifica ma compare solo quando la disialo-transferrina è elevata (19-22).

- Farmacocinetica
 - consumi > 50-80 g etanolo/die per una settimana aumentano i livelli di CDT;
 - a seguito di astinenza alcolica la CDT mostra un $T_{1/2}$ di circa 15 giorni
 - Sensibilità - 80% circa
 - Specificità - 95% circa
- Aspetti normativi

Nell'ambito dell'uso forense, il laboratorio deve garantire la catena di custodia e la conservabilità del campione per l'analisi di revisione ed uno schema analitico che preveda analisi di conferma. Poiché la CDT è una misura indiretta dell'alcol assunto, la diagnosi di abuso alcolico cronico, comunque, necessita di un protocollo clinico più ampio (EDAC= Early Detection of Alcohol Consumption) (23).

- Determinazione analitica

Il siero è la matrice d'elezione per il dosaggio della CDT. Subito dopo il prelievo è possibile conservare il siero a 4-6 °C per una settimana o a -20 °C per tempi superiori. Campioni lipemici e/o emolizzati possono creare problemi di

interpretazione del risultato. Congelamento e scongelamento anche se ripetuti non alterano la concentrazione della CDT.

Le metodiche attualmente in uso sono di tipo immunologico e di tipo separativo.

- Le metodiche immunologiche utilizzano la formazione del legame tra la CDT e un anticorpo specifico anti-transferrina sia con reazione diretta sia accoppiata con purificazione preliminare su microcolonne. Quest'ultima tecnica, con selettività e riproducibilità limitata, è obsoleta e non più in commercio. Questi metodi, relativamente poco accurati, sono utilizzabili per fini clinici ma non per fini medico legali.
- Tra le varie metodiche separative disponibili sono maggiormente utilizzate la cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) e l'elettroforesi capillare zonale (CZE).

Queste tecniche hanno il vantaggio di separare ed evidenziare le singole glicoforme della transferrina permettendo l'identificazione di varianti o di possibili patologie (es. CDG, Congenital Disorder of Glycosylation, rara malattia genetica). Le tecniche devono essere in grado di separare in modo ottimale la disialo-transferrina dalla trisialo-transferrina con una risoluzione almeno di $R > 1.23$ (24-26).

La quantificazione della CDT, senza uno standard di calibrazione, non garantisce la trasferibilità dei dati da un laboratorio all'altro. È auspicabile l'utilizzo di un calibratore certificato. La CDT viene normalmente espressa come:

- o **CDT index**: rapporto percentuale disialo-/tetrasialo-transferrina
- o **% CDT**: rapporto percentuale della somma delle isoforme asialo- e disialo-rispetto alla transferrina totale (somma delle varie isoforme). Tale metodologia di calcolo è raccomandata dal gruppo di lavoro IFCC - "Standardizzazione della CDT"- perché non influenzata dalla concentrazione totale della transferrina. Ad oggi è la modalità più diffusa (27).

Valori indicativi di abuso alcolico cronico sono i seguenti:

- $\geq 2,0\%$ per i metodi separativi
- $\geq 2,5\%$ per i metodi immunologici

Nel referto è necessario specificare metodo utilizzato, metodo di calcolo e valore di cut-off.

Il referto deve riportare inoltre l'eventuale riscontro di varianti o di patologie congenite la cui presenza impedisce la corretta quantificazione della CDT.

In caso di interferenze con la separazione della disialo-transferrina è sempre consigliato non esprimere il risultato, ma scrivere un commento quale *“la presenza di una probabile variante della transferrina impedisce la quantificazione della glicofoma disialo-transferrina”*.

- ETILGLUCURONATO (EtG)

L'etilglucuronato (EtG) è un metabolita non ossidativo diretto dell'etanolo che si forma per coniugazione con l'acido glucuronico (acido etil β -D-6-glucuronico). È idrosolubile, non volatile e stabile ed è presente in tutti i liquidi biologici e le matrici cheratiniche. Ha un' emivita di 2-3 ore. È un marcatore specifico e sensibile. Il suo dosaggio consente di chiudere il *gap* esistente tra marcatori a breve ed a lungo termine.

- Farmacocinetica

Nelle urine può essere determinato fino a circa 80 ore dopo la completa eliminazione dell'alcol dall'organismo (28). A differenza dell'alcol etilico nelle urine, l'EtG non si forma per fermentazione, ma solo in seguito ad esposizione epatica all'alcol e raggiunge livelli molto elevati nei consumatori cronici ed in seguito ad un uso acuto eccessivo, mentre è assente negli astemi (29). La concentrazione urinaria risente della diluizione del campione e, in tal caso, potrebbe essere utile normalizzare l'EtG in rapporto alla creatinina oppure considerare non valido il risultato ottenuto quando la creatinina urinaria è inferiore a 20 mg/dL. L'EtG urinario in presenza di batteriuria risente di un aumento per la via fermentativa batterica, non derivante dall'alcol.

Nel sangue raggiunge la massima concentrazione in 3.5-5.5 ore dall'assunzione di etanolo, in un tempo superiore di 2.0–3.5 ore rispetto all'alcolemia. La concentrazione di EtG nel siero rimane determinabile fino a 10-20 ore dopo l'assunzione (30). Attualmente non è ancora dimostrato quale sia il livello di EtG che distingue tra l'uso moderato e l'abuso cronico.

- Determinazione analitica

La determinazione analitica dell'EtG viene effettuata mediante cromatografia liquida accoppiata ad uno spettrometro di massa (LC - MS) o mediante GC - MS (31). È attualmente disponibile un test immunochimico per urina, i cui risultati correlano con quelli ottenuti in LC -MS (32). Per una corretta interpretazione del dato, in

considerazione di eventuali esposizioni accidentali con prodotti contenenti alcol etilico (farmaceutici, disinfettanti topici faringei a base di alcol, alimenti, cosmetici, ecc.) i valori soglia consigliati sono(30-32):

Metodo immunochimici cut-off EtG: urine = 1000 µg/L

Metodi cromatografici (LC – MS) cut-off EtG: sangue = 90 µg/L; urine = 200 µg/L.

La determinazione analitica dell'EtG nei capelli (33) consente di discriminare i consumatori occasionali (Social Drinkers, da 11 a 60 g/die di etanolo) da quelli abitudinari (Heavy Drinkers, > 60 g/die di etanolo).

Sono stati proposti i seguenti valori di cut-off (33):

EtG (pg/mg capello)

< 8	astemi
8 - 25	consumatori occasionali
> 25	consumatori cronici

È stato riportato che un valore soglia superiore a 30 pg/mg può essere rappresentativo di un consumo di alcol superiore a 60 g/die. Tale valore può essere utilizzato come discriminante nelle analisi con valenza medico-legale.

C TEST SPEDITIVI POINT OF CARE TESTING (POCT): ON SITE DRUG TESTING

Sono contemplate in questo paragrafo tecniche di analisi rapida, enzimatiche e/o immunochimiche, che consentono l'esecuzione di uno screening rapido, anche senza l'ausilio di strumentazione.

I test speditivi: sono test che permettono la determinazione di una o più sostanze d'abuso e dei loro metaboliti ad un valore soglia prestabilito senza apparecchiature ed in tempi di analisi ridotti; sono ammessi esclusivamente per le analisi in urgenza (Dipartimento d'Emergenza, Ser.T.) e nel controllo iniziale durante la verifica della guida sotto l'effetto di sostanze stupefacenti o psicotrope.

Point of Care Testing (POCT): il termine indica l'attività relativa ad indagini di laboratorio effettuate presso il "luogo di cura", eventualmente quindi all'esterno del laboratorio tradizionale. Assume di riflesso la denominazione POCT la strumentazione con cui l'analisi è eseguita.

Nell'analisi tossicologica i sistemi di rivelazione rapidi vengono definiti On-Site Drug Testing. Sono dispositivi che utilizzano tecniche immunocromatografiche e che consentono di rivelare la presenza di sostanze d'abuso attraverso una lettura visiva.

Questi sistemi possono essere una risorsa per rispondere a particolari esigenze quali, tempi di risposta rapidissimi non ottenibili altrimenti per problemi di trasporto del campione, difficoltà di accesso ai laboratori istituzionali per aree isolate quali piccole isole e comunità montane, strumento per le forze dell'ordine per verificare lo stato di alterazione psicofisica in seguito ad assunzione di sostanze psicotrope (34).

Tuttavia, l'uso improprio degli stessi e la mancanza di una cultura sulla qualità degli esami di laboratorio impongono di precisare quanto segue:

- questi dispositivi devono essere utilizzati solo nel caso di evidente e quantificabile beneficio in termini di costi e salute
- se utilizzati in zone decentrate devono essere comunque posti sotto il controllo del laboratorio istituzionale
- le analisi eseguite con questi dispositivi devono essere sottoposti al Controllo di Qualità specifico
- le analisi eseguite devono essere tracciabili (identificazione del paziente, data e ora di esecuzione dell'analisi, identificazione dell'operatore che ha eseguito l'analisi)
- l'esecuzione delle analisi su questi sistemi deve essere eseguita da personale di laboratorio o da operatori la cui formazione sia adeguatamente certificata
- adeguata conoscenza della concentrazione del cut-off, delle interferenze, delle reazioni crociate, della specificità di classe
- i risultati, che non hanno valore legale, devono essere confermati con metodi analitici più sensibili e specifici quali quelli indicati per i test di conferma (17).

D CONTROLLI DI QUALITA'

Il controllo di qualità (CQ) è un sistema finalizzato a garantire l'affidabilità del dato analitico mediante l'utilizzo di campioni di controllo ed in grado di rilevare eventuali errori del sistema al fine di porre gli adeguati rimedi. È previsto dal DPR 14 gennaio 1997 e recepito con delibera del Consiglio Regionale (Piemonte) n° 616-3149 del 22 febbraio 2000 (1) "...requisiti strutturali, tecnologici ed organizzativi minimi per l'esercizio delle attività sanitarie...". È cardine indispensabile nel programma di accreditamento istituzionale e in tutti i programmi di certificazione.

Il CQ viene distinto in:

- ✓ Interno (CQI): eseguito in ogni seduta analitica, con campioni di controllo a valore noto, per una valutazione immediata del risultato onde consentire un'azione tempestiva in merito all'accettabilità o meno dei dati conseguiti.
- ✓ Esterno (Valutazione Esterna di Qualità o VEQ): eseguito periodicamente, con campioni di controllo a valore ignoto. È organizzato da un ente esterno che provvede all'invio dei campioni e alla raccolta/elaborazione dei dati. Fornisce una valutazione a posteriori dell'attendibilità analitica ed un confronto interlaboratoristico sulle metodologie utilizzate.

D.1 CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO (CQI)

Il CQI per le analisi di I livello o di screening deve essere eseguito all'inizio ed alla fine di ogni seduta analitica. Ognuno dei controlli, di inizio, di fine serie, ed eventuali intermedi, deve comprendere un controllo negativo ed un controllo positivo contenente l'analita a concentrazione vicina (20-50% sopra e sotto) al valore soglia. Allo scopo di evidenziare eventuali errori di trascinamento, il controllo negativo deve essere posto dopo il controllo positivo. Vanno poste sotto controllo tutte le classi di sostanze determinate nella seduta. Il CQI della creatininuria, e degli altri eventuali parametri di verifica sull'autenticità del campione, deve essere effettuato con un campione a valore noto ad inizio ed a fine serie. In caso di corrispondenza tra risultato e valore atteso, il sistema può essere giudicato sotto controllo e si può procedere all'analisi dei campioni ed alla validazione dei risultati. In caso di discordanza, devono essere predisposte, e dettagliatamente descritte nelle apposite Istruzioni Operative, adeguate misure correttive (verifica sulla corretta applicazione delle procedure analitiche, nuova calibrazione dell'analita e ripetizione del controllo, sostituzione del campione di controllo ed eventuale sostituzione dei reattivi, richiesta di assistenza tecnica ecc.). Il CQI per le analisi di II livello o di conferma deve prevedere almeno un controllo quantitativo per ogni seduta analitica. La documentazione relativa al CQI deve essere conservata per un anno e deve contenere i seguenti dati:

- la data di esecuzione
- gli analiti interessati
- gli esiti perseguiti
- i rimedi adottati in caso di esiti discordanti
- il nominativo di chi lo ha eseguito

D. 2 VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ (VEQ)

È considerato requisito indispensabile, sia per i Laboratori di I livello o di screening, sia per i Laboratori di II livello o di conferma, la partecipazione ad un programma di VEQ regionale, nazionale o internazionale. La VEQ è uno strumento fondamentale per valutare l'attendibilità analitica e le capacità dei diversi laboratori che utilizzano gli stessi metodi di fornire lo stesso risultato sullo stesso campione. La VEQ fornisce valutazioni a posteriori ed è un utile strumento di crescita formativa del laboratorio.

4. FASE POSTANALITICA

MODALITÀ DI REFERTAZIONE

La risposta dei test di screening deve essere espressa in termini QUALITATIVI (assenza o presenza in relazione al cut-off). In casi particolari e solo esclusivamente per motivi clinici, può essere ammessa, a discrezione del Laboratorio, in caso di positività, un'indicazione SEMIQUANTITATIVA (il segnale rilevato nel campione viene confrontato con una curva di calibrazione per ricavare la concentrazione dell'analita in esame). È opportuno indicare il tipo di calibratore utilizzato per la curva di taratura al fine di evidenziare le possibili differenze di reattività-crociata tra la molecola di calibrazione e la sostanza misurata, appartenente alla stessa classe/famiglia farmacologica.

I risultati ottenuti dal test di conferma sono da esprimere per singola sostanza in termini QUANTITATIVI, in $\mu\text{g/L}$, con indicazione sul referto del limite di determinazione e quantificazione, l'incertezza analitica, etc.) Il referto, oltre ai dati anagrafico/identificativi di chi è sottoposto ad analisi, ed ai dati identificativi del Laboratorio, dovrà contenere le seguenti indicazioni:

- tipologia dell'analisi (di I livello o di screening, di II livello o di conferma, o entrambe) e del laboratorio
- specifica indicazione del metodo analitico utilizzato (ELISA, EMIT, FPIA, KIMS, GC-MS, ecc.)
- provenienza del campione
- data e ora del prelievo
- data di esecuzione delle analisi
- esami eseguiti e relativi risultati con specifica indicazione dei valori di cut-off, per i test di screening e per i test di conferma

- valore di creatininuria, con eventuali commenti in caso di dubbi sull'autenticità del campione, (limitatamente all'utilizzo di urina quale matrice biologica)
- periodo di conservazione del campione
- firma del responsabile

Nel caso di determinazione in urgenza, al fine di rendere più brevi i tempi di risposta, e se in accordo con quanto stabilito dalle Istruzioni Operative del Laboratorio, può essere omesso dal referto il valore della creatininuria.

La documentazione deve essere conservata per un periodo non inferiore a cinque anni così come disciplinato dal comma 5 art. 7 della L.R. 55/87.

5. CONCLUSIONI

Il documento proposto rappresenta il punto finale di un lungo lavoro comprendente la raccolta di dati relativi a modelli operativi e gestionali adottati nei settori di tossicologia dei laboratori analisi del Piemonte e la proposta di un "modus operandi" in linea con lo stato dell'arte. A tale scopo sono stati esaminati i vari aspetti coinvolti nell'intero processo analitico che vanno dalla fase preliminare di scelta del campione biologico e della metodologia adeguata al tipo di indagine richiesta fino alla produzione del dato analitico e relativa interpretazione. La consapevolezza che i risultati tossicologici non abbiano solo una ricaduta in termini di diagnosi e terapia, ma conducano a decisioni amministrative, legali e penali, ha indotto a porre massima attenzione alle caratteristiche di affidabilità del dato analitico, all'attuazione di rigorosi programmi di controllo, all'aggiornamento delle procedure, alla tracciabilità di ogni fase del processo con l'obiettivo di definire un laboratorio tossicologico che lavori in qualità.

BIBLIOGRAFIA

1. D.C.R. 22 febbraio 2000 n. 616-3149 (B.U. 12 agosto 2004 n. 32). Approvazione dei requisiti minimi strutturali, tecnologici ed organizzativi per l'autorizzazione all'esercizio delle attività sanitarie delle strutture pubbliche e private, i requisiti ulteriori per l'accreditamento delle strutture medesime, nonché le modalità procedurali e di accertamento dei requisiti per l'adozione del relativo provvedimento regionale di accreditamento.
2. D.P.R. 14 gennaio 1997 n. 37 (Gazz.Uff. 20 febbraio 1997, n.42, S.O.). Decreto sui requisiti minimi strutturali, tecnologici ed organizzativi per l'esercizio delle attività sanitarie da parte delle strutture pubbliche e private.
3. UNI EN ISO 9001:2000. Quality management systems - Requirements. Cod ICS : 03.120.10
4. ISO 15189:2007. Medical laboratories - Particular requirements for quality and competence. Ginevra: ISO 2007.
5. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO:2005
6. D.G.R. 9 marzo 2009 n. 13-10928 (B.U.R. n.12 del 26/03/2009). Linee di indirizzo regionali per le procedure relative agli accertamenti sanitari in assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza , l'incolumità e la salute di terzi, ai sensi dell'Intesa Stato/ Regioni del 30/10/2007 e dell'Accordo Stato/ Regioni del 18/09/2008
7. Augsburger M, Donzè N, Menetrey A, et al. Concentration of drugs in blood of suspected impaired drivers. Forensic Science International 2005;153:11-15.
8. Universal Precaution of Transmission of Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis B Virus, and other Bloodborn Pathogens in Health-Care Settings. Centers for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Reports on HIV/AIDS. MMWR, 24/06 1998.
9. Drummer OH. Drug testing in oral fluid. Clin Biochem Rev 2006;27:147-159.
10. SAMSHA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration). Department of Health and Human Services, Rockville , Maryland: Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs. Federal Register/Vol. 69, No. 71/Tuesday, April 13, 2004/Notices.

11. Ventura M, Pichini S, Ventura R, et al. Stability studies of principal illicit drugs on oral fluid: preparation of reference materials of external quality assessment schemes. *Therapeutic Drug Monitoring* 2007;29:662-665.
12. Kintz P, Villain M, Dumestre-Toulet V, Cirimele V. Utilité de la LC-MS/MS dans les agressions sexuelles sous l'emprise de molécules psychoactives. Etude d'un cas impliquant du zolpidem. *Annales de Toxicologie Analytique* 2005;Vol. XVII (4):263-8.
13. Pichini S, Palmeri A, Pellegrini M, et al." Proposta di linee guida per l'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nei capelli". *Rapporti ISTISAN Roma* 1999/24.
14. Zuccaro P, Pichini S, Altieri I, et al. "Procedure per l'analisi delle sostanze d'abuso nelle urine e organizzazione di un laboratorio di tossicologia analitica". *Rapporti ISTISAN Roma* 1998
15. SOFT/AAFS (Society of Forensic Toxicologists/American Academy of Forensic Sciences) Forensic Toxicology Laboratory Guidelines. February 23, 2006
16. Society of Hair Testing (www.SOHT.org). Recommendations for Hair Testing in Forensic Cases. *Forensic Science International* 1997;84:3-6.
17. Zuccaro P, Pichini S, Altieri I, et al. Proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici. *Rapporti ISTISAN Roma* 1996/29.
18. Ferrara SD, Tedeschi L, Brusini G. Documento Europeo sull'analisi delle droghe d'abuso. *Biochimica Clinica* 1997;21:483-90.
19. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem.* 2001; 47: 13-27.
20. Bortolotti F, De Paoli G, Tagliaro F. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005 *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006;841(1-2): 96-109.
21. Appenzeller BM, Schneider S, Yegles M, et al. Drug and chronic alcohol abuse in drivers. *Forensic Sci. Int.* 2005;155: 83-90.
22. Appenzeller BM, Schneider S, Maul A, et al. Relationship between blood alcohol concentration and carbohydrate deficient transferrin among drivers. *Drug Alcohol Depend.* 2005;79: 261-5.
23. Ferrara SD, Snenghi R, Boscolo M. Linee guida metodologico-accertative-criteriologico- valutative. Idoneità alla Guida e sostanze psicoattive. SIMLA Ed. Piccin 2006

24. Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem* 2003;49:1881-1890
25. Lanz C, Thormann W. Capillary zone electrophoresis with a dynamic double coating for analysis of carbohydrate-deficient transferrin in human serum: impact of resolution between di and trisialotransferrin on reference limits. *Electrophoresis* 2003;24: 4272-4281
26. Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, et al. Fully automated analysis of Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT) by using a multicapillary electrophoresis system. *Clin Chim Acta* 2007 May 1;380(1-2): 4-7.
27. Jeppsson JO, Arndt T, Schellenberg F, et al. Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:558-62.
28. Wurst FM, Kempter C, Seidl S, et al. Ethyl glucuronide-a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *Alcohol Alcohol* 1999;34:71-7.
29. Bendtsen P, Jones AW. Impact of water-induced diuresis on excretion profiles of ethanol, urinary creatinine, and urinary osmolality. *J. Anal. Toxicol.* 1999;23:565-9.
30. Høiseth G, Bernard P, Karinen L, et al. A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology. *Forensic Science International* 2007;172:119-24.
31. Morini L, Politi L, Groppi A, et al. Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2006;41:34-42.
32. Böttcher M, Beck O, Helander A. Evaluation of a new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing. et Al. *Alcohol Alcohol* 2008;43:46-8.
33. Yegles M, Pragst F. Cut-offs for the detection of alcohol abuse by measurement of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair. Workshop of the Society of Hair Testing (SoHT), Strasbourg, 28-30 September 2005.
34. Nichols JH, Christenson RH, Clarke W, et al. Executive summary -The National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guideline: Evidence-based practice for point-of-care testing. *Clinica Chimica Acta* 2007; 379:14- 28.

Tabella 2

Principali test per indagare l'autenticità del campione di urine

CREATININURIA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ valori di riferimento 25 - 300 mg/dL ▪ valori medi 170 mg/dL ▪ concentrazioni fra 20 e 40 mg/dL sono fortemente sospette di adulterazione, in vivo o in vitro ▪ cut-off 20 mg/dL; per valori inferiori il campione è da considerare inattendibile in quanto adulterato, in vivo o in vitro
PESO SPECIFICO (densità relativa o massa specifica)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ valori di riferimento 1.003 – 1.030 ▪ cut-off 1.003; per valori inferiori il campione è da considerare inattendibile in quanto adulterato, in vivo o in vitro
pH	<ul style="list-style-type: none"> ▪ valori di riferimento 4.5 – 9 ▪ cut-off: 3-10; per valori inferiori a 3 e superiori a 10 il campione è da considerare inattendibile in quanto sicuramente adulterato, in vivo o in vitro
NITRITI	<p>Sostanze riducenti che interferiscono nelle reazioni NAD-NADH e nel riconoscimento dell'anticorpo specifico per la sostanza originale. Possono esser presenti nelle urine, in conseguenza di crescita batterica (per infezione delle vie urinarie o per contaminazione esterna), ma a concentrazioni tali da non interferire con i test analitici. Possono essere indice di adulterazione in vitro per aggiunta di sostanze attualmente in commercio.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ cut-off 5 mg/dL. Valori massimi riscontrati in condizioni naturali sono di 1.3 mg/dL.
GLUTARALDEIDE	<p>Sostanza sterilizzante che interferisce nel legame antigene-anticorpo. Non è presente come componente normale nelle urine per cui il suo riscontro è indice di adulterazione.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Cut-off zero (assente)

Tabella 3

Classi di sostanze e valori soglia per test di screening su matrice cheratinica

CLASSE DI SOSTANZA	CONCENTRAZIONE SOGLIA (cut-off)
6-MAM	0.2 ng/mg
morfina	0.2 ng/mg
codeina	0.2 ng/mg
cocaina	0.5 ng/mg
amfetamine ¹	0.2 ng/mg
THC	0.1 ng/mg

¹ il test utilizzato deve rispondere allo stesso modo, separatamente, per le seguenti molecole: MDMA, metamfetamina, amfetamina, MDEA, MDA

Tabella 4

Classi di sostanze e valori soglia per test di conferma su matrice cheratinica

CLASSE DI SOSTANZA	CONCENTRAZIONE SOGLIA (cut-off)
6-MAM ¹	0.2 ng/mg
morfina	0.2 ng/mg
codeina	0.2 ng/mg
cocaina ²	0.5 ng/mg (0.05 ng/mg per gli altri metaboliti)
amfetamine ³	0.2 ng/mg
THC	0.1 ng/mg (0.05 ng/mg se il metodo è sufficientemente sensibile)
THC-COOH ⁴	0.2 pg/mg
metadone ⁵	0.2 ng/mg
buprenorfina ⁵	0.05 ng/mg

¹ il consumo di eroina deve essere differenziato da quello di codeina o morfina determinando la 6-MAM

² l'analisi cromatografica dovrebbe comprendere, oltre la cocaina, almeno uno dei seguenti metaboliti: benzoilecgonina, cocaetilene, norcocaina o ecgonina metilestere. 0.2 ng/mg = cut-off adottato nell'accertamento della tossicodipendenza nelle mansioni a rischio (6)

³ la classe delle amfetamine comprende MDMA, metamfetamina, amfetamina, MDEA, MDA

⁴ la conferma del THC-COOH è richiesta per provare l'uso dei cannabinoidi

⁵ valori di cut-off adottati nell'accertamento della tossicodipendenza nelle mansioni a rischio (6)

Tabella 5

Classi di sostanze e valori soglia per test di screening su urina

CLASSE DI SOSTANZA	CONCENTRAZIONE SOGLIA (cut-off)
Oppiacei	300 µg/L
Metadone	300 µg/L
Cocaina	300 µg/L
cannabinoidi	50 µg/L
buprenorfina	5 µg/L
benzodiazepine	200 µg/L
amfetamine ¹	1000 µg/L
MDMA/MDA/MDEA ^{2,3,4}	500 µg/L
barbiturici	200 µg/L
LSD ⁵	0.5 µg/L
ossicodone	100 µg/L
PCP ⁶	25 µg/L
TCA ⁷	1000 µg/L

¹ 500 µg/L = cut-off adottato nell'accertamento della tossicodipendenza nelle mansioni a rischio (6)

² 3,4 metilendioossimetamfetamina (MDMA)

³ metilendiossiamfetamina (MDA)

⁴ metilendiossietilamfetamina (MDEA)

⁵ dietilamide dell'acido lisergico

⁶ fenilciclidina

⁷ antidepressivi triciclici

Tabella 6

Classi di sostanze e valori soglia per test di conferma su urine

<ul style="list-style-type: none"> • OPPIACEI: 	
morfina (libera + coniugata) ¹	200 µg/L
6-acetilmorfina (6-MAM)	
codeina	
<ul style="list-style-type: none"> • METADONE ² 	200 µg/L
<ul style="list-style-type: none"> • COCAINA ² 	150 µg/L
benzoilecgonina, ecgonina metilestere	
<ul style="list-style-type: none"> • CANNABINOIDI: 	
acido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocannabinolo-9-carbossilico (THC-COOH)	15 µg/L
<ul style="list-style-type: none"> • AMFETAMINE ED ANALOGHI: 	
amfetamina ³	200 µg/L
metamfetamina ³	200 µg/L
3,4 metilendiossimetamfetamina (MDMA) ³	200 µg/L
metilendiossiamfetamina (MDA) ³	200 µg/L
metilendiossietilamfetamina (MDEA) ³	200 µg/L
buprenorfina ⁴	5 µg/L

¹ 100 µg/L = cut-off adottato nell'accertamento della tossicodipendenza nelle mansioni a rischio (6)

² 100 µg/L = cut-off adottato nell'accertamento della tossicodipendenza nelle mansioni a rischio (6)

³ 250 µg/L = cut-off adottato nell'accertamento della tossicodipendenza nelle mansioni a rischio (6)

⁴ valore di cut-off adottato nell'accertamento della tossicodipendenza nelle mansioni a rischio (6)

Tabella 7

Classi di sostanze e valori soglia per test di screening su fluido orale

CLASSE DI SOSTANZA	CONCENTRAZIONE SOGLIA (cut-off)
THC e metaboliti	4 µg/L
Cocaina e metaboliti	20 µg/L
Oppiacei e metaboliti ¹	40 µg/L
Amfetamine ²	50 µg/L
Fenilciclidina (PCP)	10 µg/L

¹ per i laboratori che analizzano la 6-MAM il cut-off è 4 µg/L

² la Metamfetamina è l'analita target, lo stesso test deve cross-reagire anche con MDMA, MDA e MDEA (range di cross-reattività: 50-150%)

Tabella 8

Classi di sostanze e valori soglia per test di conferma su fluido orale

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE SOGLIA (cut-off)
THC	2 µg/L
Cocaina ¹	8 µg/L
OPPIACEI:	
Morfina	40 µg/L
Codeina	40 µg/L
6-acetilmorfina (6-MAM)	4 µg/L
Fenciclidina	10 µg/L
AMFETAMINE:	
Amfetamina	50 µg/L
Metamfetamina ²	50 µg/L
MDMA	50 µg/L
MDA	50 µg/L
MDEA	50 µg/L

¹ Cocaina o Benzoilecgonina

² il campione deve contenere anche amfetamina in concentrazione uguale o superiore al limite di determinazione (LOD µg/L) della procedura analitica

Appendice 1

DOCUMENTI SPECIALI

ISTRUZIONI PER I PRELIEVI NECESSARI ALL'ESECUZIONI DI ANALISI TOSSICOLOGICHE IN CASO DI SOSPETTA VIOLENZA CON USO DI SOSTANZE PSICOTROPE

In sede di indagine giudiziaria e/o di esame presso Pronto Soccorso ospedaliero, nel sospetto che il soggetto abbia subito violenza con l'ausilio di somministrazione di sostanze psicotrope, nel caso in cui si ritenga opportuno valutare tipo e quantità di sostanza somministrata, si suggerisce quanto segue:

Prendere nota delle seguenti informazioni rilasciate dal soggetto:

- descrizione cronologica di quanto è successo nelle ore precedenti la violenza e nel corso della violenza stessa
- descrizione dei luoghi della violenza
- quanto il soggetto ricorda a riguardo del proprio stato psico-fisico nel corso dei periodi prima, durante e dopo la violenza
- se ha bevuto alcolici, consumato altre bevande e/o pasti, se ha fumato o ha fatto spontaneamente uso di altre sostanze
- in quale circostanza potrebbe aver assunto sostanze a sua insaputa; (ai fini dell'identificazione della sostanza sarebbe importante disporre di bicchieri, alimenti, altro utilizzati dalla vittima)
- se il soggetto ha vomitato e dove ha vomitato (ai fini dell'identificazione della sostanza usata può essere utile disporre di un campione di vomito).

Acquisire quanto prima i seguenti campioni biologici e reperti (Tabella 9) :

n. 1 provetta di sangue senza additivi + n. 1 provetta di sangue con fluoruro di Na
(centrifugare, congelare)

n. 1 provetta urina

n. 2 barattoli (100 mL) urina

n. 4 provette sangue con EDTA di K (centrifugare, congelare)

Altro materiale eventualmente da acquisire presso il luogo della violenza.

NOTE:

Tipologia campioni biologici: le quantità e le tipologie descritte in Tabella 9 consentono l'analisi di screening (I livello) e n. 2 indipendenti analisi di conferma (II livello) e approfondimento completo.

Rappresentatività del campione biologico

Campioni di sangue o di urina raccolti rispettivamente 12 o 48 ore dopo la violenza possono non contenere più traccia delle sostanze psicotrope eventualmente assunte.

Precauzioni da seguire nella fase di raccolta e trasporto dei campioni

I contenitori devono essere sigillati e controfirmati dall'addetto al prelievo e dal soggetto interessato. Ciascun contenitore deve essere etichettato, e l'etichetta deve riportare chiaramente tutte le indicazioni necessarie all'identificazione univoca del campione (ora e data del prelievo, nome, eventuale codice identificativo, etc.). Dovrebbe riportare inoltre, se disponibili, informazioni relative alla infettività del campione stesso.

In ottemperanza a quanto richiesto dai criteri di responsabilizzazione per la catena di custodia, ciascun trasferimento del campione deve essere documentato attraverso compilazione di un modulo di accompagnamento che identifica in modo univoco il prelievo effettuato riportando dati anagrafici, eventuale codice identificativo, eventuali note. Allo stesso modo, il ricevimento dei campioni in laboratorio deve essere registrato avendo cura di annotare ora e data, numero di contenitori pervenuti, tipologia dei materiali contenuti, infettività, ed eventuali note particolari e non conformità.

BIBLIOGRAFIA

1. American College of Emergency Physicians (ACEP). Evaluation and Management of the Sexually Assaulted or Sexually Abused Patient. Contract 98-0347(P) with the US Department of Health and Human Services, Health Resources and Services Administration, Maternal and Child Health Bureau. Dallas, 1999
2. LeBeau M, Andollo W, Hearn WL, et al. Recommendations for toxicological investigations of drug-facilitated sexual assault. J Forensic Sci 1999; 44: 227-30
3. Fitzgerald N, Riley KJ. Drug-facilitated rape: looking for the missing pieces. National Institute of Justice Journal. 2000;April: 8-15
4. Zacà S, Pellegrino S. Manuale di Tossicologia Forense. 2006. G. Giappichelli Editore. Torino.

Tabella 9

MATERIALE DA RACCOGLIERE IN CASO DI SOSPETTA VIOLENZA CON USO DI SOSTANZE PSICOTROPE

CAMPIONI DA PRELEVARE	Suddivisione e conservazione	Destinazione
URINA: 100-200 mL in unico contenitore, prelievo a vista	1 provetta da 10 mL (-20°C): 1 barattolo tipo urocoltura (-20°C): 1 barattolo tipo urocoltura (-20°C):	→ screening droghe d'abuso → a disposizione per analisi tossicologica completa (fini giudiziari) → a disposizione per successive conferme (fini giudiziari)
SANGUE: 6 provette	2 provette di siero 7-10 mL (centrifugate e separate, -20°C) 2 provette di sangue intero 7-10 mL (di cui una centrifugata e separata, -20°C) 2 provette di sangue intero 7-10 mL (di cui una centrifugata e separata, -20°C)	→ screening droghe d'abuso ed alcol → a disposizione per analisi tossicologica completa (fini giudiziari) → a disposizione per successive conferme (fini giudiziari)
CAPELLI Molte sostanze esogene, una volta in circolo, entrano a far parte della cheratina del capello. Un campione di capelli (o altri peli) prelevato tra 1 e 4 settimane dopo l'assunzione può conservare traccia della sostanza	Prelevare una ciocca delle dimensioni di una matita sottile tagliandola alla base (verso la radice) in zona occipitale. Raccogliere e segnalare con adesivo la parte verso la radice.	→ a disposizione per analisi tossicologica completa (fini giudiziari)
MATERIALE UTILE NELLA RICERCA DI SOSTANZE ASSUNTE: Reperti raccolti sul luogo della violenza (es. vomito, bicchieri, residui alimentari, resti di sigaretta, etc.)	Confezionare separatamente in buste sigillate, indicando tipologia del reperto, descrizione di luogo e ora della repertazione, -20°C.	→ a disposizione per analisi tossicologica completa (fini giudiziari)

QUESTIONARI RELATIVI ALLE PROCEDURE PER LA DETERMINAZIONE DI LABORATORIO DELLE SOSTANZE STUPEDACENTI E PSICOTROPE NELLE MATRICI BIOLOGICHE

d) CLASSI DI SOSTANZE – CUT-OFFs UTILIZZATI – TECNICHE IMPIEGATE

Sostanza	Test di screening	soglia	tecnica utilizzata;	Test di conferma	soglia	tecnica utilizzata
Anfetamine	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____
Barbiturici	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____
Benzodiazepine	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____
Buprenorfina	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____
Cannabinoidi	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____
Cocaina	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____
LSD	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____
Metadone	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____
Metanfetamine	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____
Oppiacei	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIng/ml;	_____
Etanolo	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIg/l	_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SIg/l	_____
Altra_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI	_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI	_____
Altra_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI	_____	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI	_____

(Indicare eventuali osservazioni o precisazioni al paragrafo 6 del presente questionario)

Se si eseguono sia test di screening che di conferma, indicare in percentuale i test di conferma:.....%.

TransferrinaCarboidrato-
Carente (CDT) NO SIng/ml; _____ NO SIng/ml; _____

(Indicare il calcolo eseguito per la refertazione della
CDT.....)

e) VARIE

- a. I campioni sono raccolti nei locali del laboratorio? Sempre Qualche volta Mai
- b. I campioni sono raccolti a vista? Sempre Qualche volta Mai
- c. Utilizzate una modulistica specifica per richieste analisi tossicologiche? Sempre Qualche volta Mai
- d. La refertazione dei test iniziali o di screening è qualitativa ? Sempre Qualche volta Mai
- e. La refertazione dei test iniziali o di screening è semiquantitativa ? Sempre Qualche volta Mai
- f. Utilizzate procedure scritte per la raccolta dei campioni? SI NO
- g. Utilizzate procedure scritte per l'accettazione dei campioni? SI NO
- h. E' predisposta una procedura scritta di "catena di custodia"? SI NO
- i. Nel modulo di refertazione è indicata la tecnica analitica utilizzata? SI NO
- j. Nel modulo di refertazione sono indicati i valori soglia adottati? SI NO
- k. Utilizzate procedure scritte per la conservazione postanalitica dei campioni? SI NO
- l. Partecipate a Programmi di Verifica Esterna della Qualità? SI NO
- m. Utilizzate ed attuate procedure scritte per i Controlli di Qualità Interni? SI NO
- n. Avete predisposto istruzioni operative scritte per le analisi tossicologiche? SI NO
- o. Sentite l'esigenza di un coordinamento regionale delle procedure analitiche per la determinazione di laboratorio delle sostanze d'abuso ? SI NO
- p. Ritenete necessario ampliare la gamma delle classi di sostanze normalmente testate?
 NO
 SI (indicare quali classi)_____

**QUESTIONARI RELATIVI ALLE PROCEDURE PER LA DETERMINAZIONE
DI LABORATORIO DELLE SOSTANZE STUPEDACENTI E PSICOTROPE NELLE
MATRICI BIOLOGICHE**

q. Sentite l'esigenza di attività formativa e/o di aggiornamento su temi:

Clinico-tossicologiche

SI

NO

Tecnico-analitici

SI

NO

Medico-legali

SI

NO

r. Le sostanze d'abuso vengono determinate in un settore specialistico SI

NO

Indicare

quale.....

Indicare il numero di personale

dedicato.....

s. La CDT viene determinata in un settore specialistico

SI

NO

Indicare

quale.....

t. Indicare il numero di personale dedicato.....

f) Osservazioni – Chiarimenti – Note

Grazie per la collaborazione.

QUESTIONARI INFORMATIVO RELATIVO ALLE ESIGENZE DEI SerT PER LA DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE STUPEDACENTI E PSICOTROPE NELLE MATRICI BIOLOGICHE

1. DATI

Ser.T. di :ASL n°.....

Responsabile.....

Indirizzo.....Tel.....Fax.....

E-mail.....

Dati del compilatore: Cognome.....Nome.....qualifica.....

2. GENERALITA'

a. Numero di utenti/anno presi in carico dal Servizio: _____

Indicare la tipologia di richieste (es programma di recupero, adozioni etc) _____

b. Quantità annua di dosaggi di sostanze d'abuso richieste ai Laboratori Analisi: _____;

(indicare il/i Laboratorio/i di riferimento): _____;

c. Eseguite indagini analitiche su sostanze d'abuso direttamente in sede?

NO

SI (indicare la percentuale rispetto al totale delle analisi richieste ed eseguite): _____ %;

d. In caso eseguite indagini analitiche su sostanze d'abuso direttamente in sede indicare:

• il materiale prevalentemente utilizzato (urine, siero, altro): _____;

• utilizzate strumentazione di laboratorio per l'esecuzione delle analisi in sede?

NO

SI (indicare il metodo utilizzato) _____;

• utilizzate esclusivamente metodi rapidi senza strumentazione? SI NO

• attuate procedure scritte per controlli di qualità? SI NO

• tali analisi sono eseguite da personale specializzato (tecnici, medici)?

SI (indicare con precisione la figura professionale incaricata): _____;

NO (indicare con precisione la figura professionale incaricata): _____;

• registrate gli esiti delle analisi? Sempre Qualche volta Mai

• formalizzate gli esiti delle analisi tramite referti ? Sempre Qualche volta Mai

e. I risultati analitici dei test iniziali (o di screening) preferite siano espressi in forma:

Qualitativa (negativo, positivo);

Semiquantitativa (ng/ml) solo in caso di positività;

Semiquantitativa (ng/ml) sempre;

Semiquantitativa (ng/ml) solo in caso di negatività;

E' indifferente

f. In che percentuale sentite la necessità di eseguire test di conferma o di verifica del risultato analitico ottenuto, sul totale dei test eseguiti ? : _____ %

Continua (

