

Determinazioni di laboratorio delle sostanze psicotrope: un aggiornamento delle procedure

Giovanna Patrucco¹, Aldo Arnelli², Marco Bagnati³, Vincenza Bianchi⁴, Maria Marmo⁵, Antonello Nonnato⁶, Sergio Pellegrino⁷, Michele Petrarulo⁸, Manuela Viarengo⁵ per il Gruppo di Studio SIBioC-Piemonte Droghe d'abuso e abuso alcolico

¹Laboratorio Analisi, Ospedale S. Andrea di Vercelli, ASL "VC" di Vercelli

²Laboratorio Analisi, Ospedale Civile di Savigliano, ASL "CN1" di Cuneo-Mondovì, Savigliano

³Laboratorio Analisi, Ospedale Maggiore della Carità di Novara, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Novara

⁴Laboratorio Analisi, Ospedale SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo di Alessandria, Azienda Ospedaliera di Alessandria

⁵Laboratorio Analisi, Ospedale Cardinal Massaia di Asti, ASL "AT" di Asti

⁶Laboratorio Analisi Baldi e Riberi, Ospedale Molinette di Torino, Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Giovanni Battista di Torino

⁷Centro Regionale Antidoping "Alessandro Bertinaria", Orbassano (TO)

⁸Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano di Torino

ABSTRACT

Laboratory testing of psychotropic substances: an update of procedures. The achievement of homogeneous, univocal, and effective procedures for the determination of substances of abuse was the goal of the first documents produced in 2001 by the regional expert panel that were chosen by the Piemonte Region Department of Health as regional guidelines. The implementation of the guidelines provided a significant step ahead in the regional management of toxicology. Here, those procedures are updated, with special focus on the following items: sample management, cut-off values, relative value of screening and confirmatory analytical methods, and significance of drug of abuse measurement in different biological matrices. In addition, the protocol has been improved as it takes into account more items, such as point-of-care testing, oral fluid analysis, use of keratin matrix, influence of the detection period on data interpretation, standardization of the determination of biomarkers for alcohol abuse, accreditation programs, and quality assurance. As far as quality assurance is concerned, a particular attention is paid to the post-analytical aspects. Since this point is particularly important, accurate instructions are given on how to collect blood samples from subjects who might have been victims of rape (Appendix). The new procedures represent a further attempt to facilitate and improve the work of toxicologists and health service personnel, underlining the ethical-legal and medical-forensic implications of their activity.

INTRODUZIONE

Il laboratorio che esegue analisi tossicologiche su 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 ed attenzione verso gli aspetti medico-legali. Risulta quindi necessario uniformare le procedure e standardizzare i metodi all'interno di un sistema qualità che garantisca un elevato livello del prodotto finale.

Questo lavoro nasce 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 importanti aspetti metodologici ed analitici in ambito tossicologico. La raccolta di 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 queste basi, questo documento è proposto per essere anche un valido strumento di appropriatezza al fine di indirizzare gli operatori nella scelta delle prestazioni di laboratorio con criteri basati su evidenze e favorire la collaborazione tra specialisti di laboratorio e utilizzatori in ambito clinico e forense al fine di evitare sprechi di preziose risorse.

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), devono essere stilati documenti che descrivano in dettaglio le procedure operative standard (SOP) in tutte le fasi del ciclo analitico: dalla fase pre-analitica (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 post-

nalitica (modalità di compilazione, trasmissione e consegna referti, conservazione dei campioni, archiviazione dei dati) (1, 2). 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. In generale, occorre 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),
- 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 anche riferimento alla norma ISO/IEC 17025:2005 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 e 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.

FASE PREANALITICA

Modulistica per richiesta esami

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

- 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".

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 di esecuzione dell'analisi.

Si consiglia di attuare una catena di custodia separata per ciascuno dei differenti materiali biologici anche appartenenti allo 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.

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 mantenuto a 4 °C/-20 °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 ad esami di conferma devono essere conservati a -20 °C, per un periodo non inferiore ad un anno, specificando in referto il periodo di conservazione. Per quanto riguarda i campioni sottoposti a esami 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

Tabella 1*Argomenti da trattare nei documenti operativi*

Determinazione delle sostanze d'abuso	Fase preanalitica	Accettazione campioni e richieste Identificazione campioni e pazienti Modalità di prelievo Modalità di trasferimento dei campioni Inserimento dati
	Fase analitica	Predisposizione seduta analitica Calibrazione e controlli di qualità Caricamento campioni Verifica dati
	Fase postanalitica	Validazione esiti Trasmissione esiti Stampa Lista sospesi Trasmissione e consegna referti Archiviazione dati Trattamento postanalitico dei campioni
Manutenzione della strumentazione per analisi tossicologiche	Manutenzione interna	Giornaliera, settimanale, mensile
	Manutenzione esterna	Schede di manutenzione Calendario manutenzione programmata
Controllo di qualità in tossicologia	CQI	Esecuzione, valutazione Archiviazione, relazioni e verbali
	VEQ	Esecuzione, valutazione Archiviazione, relazioni e verbali
Gestione sistema informatico		
Formazione ed aggiornamento		

legale, carceri, ecc.) di recepire l'esito analitico e di richiedere (in base alle singole e specifiche esigenze) l'esame di conferma. Tale periodo, variabile da 7 a 14 giorni dall'emissione del referto, deve essere indicato nel referto stesso. In caso di richiesta dell'esame di conferma, il laboratorio provvede all'esecuzione dello stesso o all'invio del campione presso un laboratorio di II° livello, in base alla propria organizzazione.

Matrici biologiche e loro prelievo

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 assunzio-

ne ed è direttamente correlabile allo status psicofisico del soggetto al momento del 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 (K₃EDTA, fluoruro di sodio, eparinato di litio o ammonio o sodio) (6). 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.

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.

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.

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 ultrafiltrato 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 (7).

Studi recenti sul fluido orale hanno dimostrato che la maggior parte delle droghe d'abuso (oppioidi, amfetamine, cocaina) e dei farmaci assunti diffondono nel fluido orale per trasferimento passivo dal torrente circolatorio e le concentrazioni salivari correlano con quelle ematiche (8). 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 (8); 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") prevedono la raccolta contemporanea di campioni di saliva e di urina (9). 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 <10 µg/L.

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 min o finché non è stato raggiunto il volume definito. È necessario attendere almeno 10 min 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 (9).

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 il campione è mantenuto a 25 ÷ 37 °C e fino a due mesi se mantenuto a 4 ÷ -20 °C. Sono anche in atto studi approfonditi sulla stabilità delle sostanze d'abuso nella saliva (10).

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 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. È 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 Caucasic. 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 abituale 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 (11). La letteratura riporta anche valori differenziati per consumo (12). 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.

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 (0,5 cm circa) in modo da evidenziare il segmento iniziale. Nel caso in cui i capelli fossero più corti di 1 cm si può ricorrere al pre-

lievo 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.

FASE ANALITICA

Droghe d'abuso

Indagini sull'autenticità 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 esami attualmente a disposizione del laboratorio per indagare l'autenticità del campione di urine sono indicati nella Tabella 2. I valori di cut-off riportati sono quelli raccomandati dal SAMHSA (9). Tra gli esami elencati, il dosaggio della creatinuria, rispondendo a requisiti quali economicità, affidabilità, praticità, accessibilità, frequenza d'utilizzo, automazione, standardizzazione delle metodiche analitiche e dei limiti 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 creatini-

Tabella 2

Principali esami utilizzati per indagare l'autenticità del campione di urine

Creatinuria	<ul style="list-style-type: none"> - limiti di riferimento: 25-300 mg/dL - concentrazione media: 170 mg/dL - concentrazioni fra 20 e 40 mg/dL sono fortemente sospette di adulterazione, in vivo o in vitro - per valori <20 mg/dL il campione è da considerarsi adulterato, in vivo o in vitro
Peso specifico (densità relativa o massa specifica)	<ul style="list-style-type: none"> - limiti di riferimento: 1,003-1,030 - per valori <1,003 il campione è da considerarsi adulterato, in vivo o in vitro
pH	<ul style="list-style-type: none"> - limiti di riferimento: 4,5-9,0 - per valori <3 e >10 il campione è da considerarsi 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 essere 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 gli esami 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 usata come sterilizzante che interferisce nel legame antigene-anticorpo. Non è presente come componente biologica nelle urine per cui il suo riscontro, a qualsiasi concentrazione, è indice di adulterazione.</p>

nuria e la sua indicazione in referto. Per valori di creatinuria 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 successivamente, il dosaggio della creatinuria può essere omesso in caso di misura in urgenza. È bene precisare che la determinazione della creatinuria, pur se ritenuta indispensabile, non è da considerarsi in termini esclusivi; ogni laboratorio potrà avvalersi, a propria discrezione, di ulteriori esami per valutare con maggior accuratezza l'autenticità e l'integrità del campione.

Per verificare l'autenticità di un campione di fluido orale è necessario determinare la concentrazione di IgG. Se il valore ottenuto è <0,1 mg/L il campione non può essere ritenuto valido.

Metodi

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:

- esami di screening (iniziali o di I° livello)
- esami di conferma (o di II° livello)

Esami di screening

Sangue/plasma/siero e matrice cheratinica. Gli esami 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 (13). 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 misurare concentrazioni compatibili con quelle che si riscontrano nei capelli. La convalida si prefigge di documentare le caratteristiche del metodo analitico. 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 metodi 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 esattezza definite;
- limite di rivelabilità (LOD): la minima concentrazione dell'analita che si può distinguere da un campione privo dello stesso; è la più bassa concentrazione per valutare qualitativamente la presenza o l'assenza di

un analita;

- imprecisione: dispersione dei dati ottenuti nelle misure; occorre calcolare il CV intrasaggio e intersaggio. La imprecisione intorno al valore di concentrazione medio non deve superare un CV del 15% (14);
- inesattezza: scostamento tra il valore trovato e il valore atteso (vero); non deve superare il $\pm 15\%$ del valore atteso (14);
- controllo di qualità: occorre utilizzare un materiale con concentrazione vicina al LOQ, un materiale con concentrazione intorno al valor medio della retta di calibrazione e un materiale con concentrazione elevata.

Urine e fluido orale. Sono metodi che, rispondendo prevalentemente a requisiti di economicità, velocità, standardizzazione, efficienza ed efficacia, 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,
- positivi, ovvero che contengono presumibilmente la classe a cui appartiene la sostanza ricercata 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 (esame di conferma) i campioni risultati negativi. Per contro, i campioni risultati positivi agli esami di screening, se non verificati con esami di conferma, non hanno valore amministrativo o legale (13).

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

- CEDIA ("cloned enzyme donor immunoassay"),
- EIA ("enzyme immunoassay"),
- ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay"),
- EMIT ("enzyme multiplied immunoassay technique"),
- FPIA (immunofluorescenza a luce polarizzata),
- KIMS (interazione cinetica di microparticelle in soluzione).

Gli esami di screening su fluido orale utilizzano preferenzialmente la tecnologia ELISA.

Esami di conferma

Gli esami 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 agli esami di screening. Devono avere quindi un limite di determinazione inferiore al valore soglia stabilito per gli esami di I° livello. La risposta degli esami di conferma viene espressa per singola sostanza in termini quantitativi ($\mu\text{g/L}$). Tutte le metodiche utilizzate necessitano di validazione. È consigliabile effettuare la validazione utilizzando la norma ISO 17025 con particolare riferimento alla stima dell'incertezza della misura (5).

Le metodiche cromatografiche utilizzate per gli esami

di conferma sono la gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS) e la cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS).

Valori soglia

Sangue/plasma/siero (esami di screening). Si consiglia di utilizzare i valori di cut-off indicati dalle ditte produttrici dei kit commerciali.

Sangue/plasma/siero (esami di conferma). Si consiglia di utilizzare i valori di cut-off inferiori alle concentrazioni dei principi attivi e dei loro metaboliti, compatibili con lo stato di alterazione psicofisico.

Matrice cheratinica (esami di screening). Poiché non sono consensualmente definiti valori di cut-off per i vari xenobiotici nel capello che 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) per l'analisi dei capelli con i metodi immunochimici (Tabella 3) (15).

Matrice cheratinica (esami di conferma). La SoHT ha definito come valori di cut-off per l'analisi dei capelli con metodica cromatografica i limiti indicati nella Tabella 4.

Urina (esami di screening). Classi di sostanze e valori soglia, raccomandati dalle linee guida Regione Piemonte (2001) e dall'Istituto Superiore Sanità (1996), tenuto conto dell'attuale stato dell'arte (16), sono riportati nella Tabella 5.

Urina (esami di conferma). Classi di sostanze e valori soglia (cut-off) per gli esami di conferma, raccomandati da un Documento Europeo (17), sono riportati nella Tabella 6.

Fluido orale (esami di screening). Classi di sostanze e valori soglia raccomandati dal SAMHSA (9) sono riportati nella Tabella 7.

Fluido orale (esami di conferma). Classi di sostanze e valori soglia raccomandati dal SAMHSA (9) sono riportati nella Tabella 8.

Alcolemia, alcoluria e biomarcatori correlati

Alcolemia

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

- sostanza lecita e liberamente in commercio,

Tabella 3

Valori soglia per esami di screening su matrice cheratinica

Sostanza	Cut-off
6-Acetil morfina	0,2 ng/mg
Morfina	0,2 ng/mg
Codeina	0,2 ng/mg
Cocaina	0,5 ng/mg
Amfetamine*	0,2 ng/mg
Tetraidrocannabinolo	0,1 ng/mg

*Il metodo utilizzato deve rispondere allo stesso modo, separatamente, alle seguenti molecole: 3,4-metilendiossietilamfetamina, metamfetamina, amfetamina, metilendiossietilamfetamina, metilendiossiamfetamina.

- 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.

Tabella 4

Valori soglia per esami di conferma su matrice cheratinica

Sostanza	Cut-off
6-Acetil morfina ^a	0,2 ng/mg
Morfina	0,2 ng/mg
Codeina	0,2 ng/mg
Cocaina ^b	0,5 ng/mg (≤0,05 ng/mg per gli altri metaboliti)
Amfetamine ^c	0,2 ng/mg
Tetraidrocannabinolo	0,1 ng/mg (≤0,05 ng/mg se il metodo è sufficientemente sensibile)
Acido 11-nor-Δ ⁹ -tetraidrocannabinolo-9-carbossilico ^d	0,2 pg/mg

^aIl consumo di eroina deve essere differenziato da quello di codeina o morfina determinando la 6-acetil morfina; ^bL'analisi cromatografica dovrebbe comprendere, oltre la cocaina, almeno uno dei seguenti metaboliti: benzoilecgonina, cocaetilene, norcocaina o ecgonina metilestere; ^cLa classe delle amfetamine comprende 3,4-metilendiossietilamfetamina, metamfetamina, amfetamina, metilendiossietilamfetamina, metilendiossiamfetamina; ^dLa conferma dell'acido 11-nor-Δ⁹-tetraidrocannabinolo-9-carbossilico è richiesta per provare l'uso dei cannabinoidi.

Tabella 5

Valori soglia per esami di screening su urina

Sostanza	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	1000 µg/L
MDMA/MDA/MDEA	500 µg/L
Barbiturici	200 µg/L
LSD	0,5 µg/L
Ossicodone	100 µg/L
PCP	25 µg/L
TCA	1000 µg/L

MDMA, 3,4 metilendiossietilamfetamina; MDA, metilendiossiamfetamina; MDEA, metilendiossietilamfetamina; LSD, dietilamide dell'acido lisergico; PCP, feniliclidina; TCA, antidepressivi tricyclici.

Tabella 6

Valori soglia per esami di conferma su urine

Sostanza	Cut-off
Oppiacei:	200 µg/L
- morfina (libera + coniugata), morfina 3-glucuronato ^a	
- morfina 6-glucuronato ^a	
- 6-acetilmorfina ^b	
- codeina	
Metadone	200 µg/L
Cocaina:	150 µg/L
- benzoilecgonina	
- ecgonina metilestere ^b	
Cannabinoidi:	15 µg/L
- acido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocannabinolo-9-carbossilico	
- glucuronato dell'acido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocannabinolo-9-carbossilico ^b	
Amfetamine ed analoghi:	
- amfetamina	200 µg/L
- metamfetamina	200 µg/L
- 3,4-metilendioossimetametamina	200 µg/L
- metilendioossiamfetamina	200 µg/L
- metilendiossietilamfetamina	200 µg/L

^aMetabolita presente nell'urina che può essere dosato tal quale oppure insieme alla morfina in seguito ad un processo di idrolisi (acida o enzimatica) per rompere il legame con il glucuronato;

^bAltro metabolita presente nell'urina.

Tabella 7

Valori soglia per esami di screening su fluido orale

Sostanza	Cut-off
Tetraidrocannabinolo e metaboliti	4 µg/L
Cocaina e metaboliti	20 µg/L
Oppiacei e metaboliti ^a	40 µg/L
Amfetamine ^b	50 µg/L
Fenilciclidina	10 µg/L

^aPer i laboratori che analizzano la 6-acetilmorfina il cut-off è 4 µg/L; ^bLa metamfetamina è l'analita target, lo stesso metodo deve cross-reagire anche con 3,4-metilendioossimetametamina, metilendioossiamfetamina e metilendiossietilamfetamina (intervallo di crossreattività: 50-150%).

La Tabella 9 riporta i dati relativi alla farmacocinetica e tossicità dell'etanolo. Il legislatore ha stabilito in 0,5 g/L la concentrazione alcolemica oltre la quale viene definito lo stato di ebbrezza e 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.

Tabella 8

Valori soglia per esami di conferma su urina

Sostanza	Cut-off
Tetraidrocannabinolo	2 µg/L
Cocaina o benzoilecgonina	8 µg/L
Oppiacei:	
Morfina	40 µg/L
Codeina	40 µg/L
6-Acetilmorfina	4 µg/L
Fenciclidina	10 µg/L
Amfetamine:	
Amfetamina	50 µg/L
Metametamina ^a	50 µg/L
3,4-Metilendioossimetametamina	50 µg/L
Metilendioossiamfetamina	50 µg/L
Metilendiossietilamfetamina	50 µg/L

^aIl campione deve contenere anche amfetamina in concentrazione uguale o superiore al limite di rivelabilità della procedura analitica.

Non può essere 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 (esami di screening o di I° livello) e metodiche gas-cromatografiche (esami di conferma o di II° livello).

Le metodiche enzimatiche, seppur dotate di un buon livello 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. Queste ultime sono anche 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 esame 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.

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 -20 °C per eventuali controanalisi. I campioni che possono avere una valenza medico-legale sono da conservare a -20 °C per un periodo non

Tabella 9*Farmacocinetica e tossicità 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
- Legame proteico: non significativo

Tossicità dell'alcol etilico (concentrazioni di alcolemia)

- 0,5-0,8 g/L
Quadro clinico: ebbrezza iniziale, accentuata da stati di ipoglicemia
- 0,8-2,0 g/L
Quadro clinico: instabilità emotiva, diminuzione delle percezioni sensoriali, loquacità, sonnolenza, deambulazione incerta, incoerenza ideativa
- 2,0-4,0 g/L
Quadro clinico: confusione, nausea, vomito, vertigini, sudorazione e salivazione profuse, ipotermia lieve, midriasi, in coordinazione motoria ed ideativi
- 4,0-6,0 g/L
Quadro clinico: stupore-coma, iporiflessia, paralisi incomben- te, coma con acidosi metabolica, insufficienza respiratoria e circolatoria, ipotermia marcata

inferiore ad un anno, specificando sul referto il periodo di conservazione.

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

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.

La presenza di etanolo nelle urine va valutata caso per caso. La positività a bassi valori di concentrazione (0,3-0,5 g/L) in urine prelevate dopo pranzo è poco significativa mentre è preoccupante se il prelievo è eseguito di mattina. Un solo valore positivo non ha significato, 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.

Altri biomarcatori utilizzati nel monitoraggio dell'abuso alcolico

Esistono diversi parametri biochimici che, in modo più o meno specifico e sinergico, sono in grado di monitorare l'abuso alcolico. Se 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 determinazione dell'alcolemia. 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). Allo stato attuale, per l'accertamento del consumo alcolico in un soggetto a rischio di abuso, viene utilizzato un gruppo di esami biochimici scelti per migliorare la prestazione diagnostica in termini di sensibilità, specificità e valore predittivo. I biomarcatori più promettenti sono transferrina carboidrato-carente (CDT) ed etilglucuronato (EtG).

Transferrina carboidrato-carente

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 glicofor- me della transferrina con pl $\geq 5,7$, di cui le componenti sono: asialo-transferrina, monosialo-transferrina, disialo-transferrina e trisialo-transferrina – essendo la tetrasialo-transferrina 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 glicofor- ma disialo-transferrina è considerata marcatore di riferimento di abuso alcolico. L'asialo-transferrina in teoria sarebbe più specifica, ma compare solo quando la disialo-transferrina è elevata (18-21). Consumi >50-80 g di etanolo/die per una settimana aumentano le concentrazioni plasmatiche di CDT; a seguito di astinenza alcolica, la CDT mostra un tempo di dimezzamento di circa 15 giorni.

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 ["Early detection of alcohol consumption" (EDAC)] (22).

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 °C per una settimana o a -20 °C per tempi più lunghi. Campioni lipemici e/o emolizzati possono creare interferenze. 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 limita-

ta, è obsoleta e non più in commercio. Questi metodi, relativamente poco accurati, sono utilizzabili per fini clinici, ma non per scopi medico legali. Tra le varie metodiche separative disponibili sono maggiormente utilizzate la HPLC e l'elettroforesi capillare (CE). Queste tecniche hanno il vantaggio di separare ed evidenziare le singole glicoforme della transferrina permettendo l'identificazione di varianti o di possibili patologie. Le tecniche devono essere in grado di separare in modo ottimale la disialo-transferrina dalla trisialo-transferrina con una risoluzione almeno di $R > 1,23$ (23-25).

La quantificazione della CDT non è standardizzata e quindi la trasferibilità dei dati da un laboratorio all'altro non è garantita. La CDT può essere espressa come CDT index (rapporto percentuale disialo/tetrasialo-transferrina) oppure come % CDT [rapporto percentuale della somma delle isoforme asialo- e disialo- rispetto alla transferrina totale (somma delle varie isoforme)]. Quest'ultima espressione è raccomandata dal gruppo di lavoro IFCC perché non influenzata dalla concentrazione totale della transferrina ed è ad oggi la modalità di espressione più diffusa (26).

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 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 consigliato non esprimere il risultato, ma fornire un commento quale "la presenza di una probabile variante della transferrina impedisce la quantificazione della glicoforma disialo-transferrina".

Etilglucuronato

L'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.

Nelle urine può essere determinato fino a circa 80 ore dopo la completa eliminazione dell'alcol dall'organismo (27). L'EtG si forma solo in seguito ad esposizione epatica all'alcol e raggiunge concentrazioni molto elevate nei consumatori cronici ed in seguito ad un uso acuto eccessivo, mentre è assente negli astemi. La concentrazione urinaria risente della diluizione del campione e, per questo, 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, aumenta a causa della 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 (28). Attualmente non è ancora

definito quale sia il livello di EtG che distingue tra l'uso moderato e l'abuso cronico.

Determinazione analitica. La determinazione dell'EtG viene effettuata mediante LC-MS o GC-MS (29). È attualmente disponibile un metodo immunochimico per urina, i cui risultati correlano con quelli ottenuti in LC-MS (30). 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 1000 $\mu\text{g/L}$ (urine) per il metodo immunochimico e 90 $\mu\text{g/L}$ (sangue) e 200 $\mu\text{g/L}$ (urine) per il metodo LC-MS.

La determinazione dell'EtG nei capelli 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) (31). Sono stati proposti i seguenti valori di cut-off (31):

- <8 pg/mg capello astemi,
- 8-25 pg/mg capello consumatori occasionali,
- >25 pg/mg capello 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.

"Point-of-care-testing" (POCT)

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 metodi speditivi 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 e nel controllo iniziale durante la verifica della guida sotto l'effetto di sostanze stupefacenti o psicotrope.

Il termine POCT indica l'attività relativa ad indagini di laboratorio effettuate presso il "luogo di cura", 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 anche 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 (32).

Tuttavia, l'uso improprio degli stessi e la possibile mancanza di una cultura sulla qualità degli esami di laboratorio da parte di utilizzatori non laboratoristi 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 comunque essere sottoposte a controllo di qualità,
- le analisi eseguite devono essere tracciabili (identificazione del soggetto, data e ora di esecuzione dell'analisi, identificazione dell'operatore che ha eseguito l'analisi),
- l'esecuzione delle analisi deve essere effettuata da operatori la cui formazione sia adeguatamente certificata,
- deve esistere un'adeguata conoscenza della concentrazione di cut-off, delle interferenze, delle reazioni crociate, della specificità di classe,
- i risultati, che non hanno valore legale, devono essere confermati con metodi più sensibili e specifici, quali quelli indicati per gli esami di conferma (16).

Controlli di qualità

Il controllo di qualità 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 cardine indispensabile nel programma di accreditamento istituzionale e in tutti i programmi di certificazione. Il controllo di qualità viene distinto in CQI, eseguito in ogni seduta analitica, con materiali 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, e VEQ, eseguita periodicamente, con materiali di controllo a valore ignoto. È organizzata da un ente esterno che provvede all'invio dei campioni e alla raccolta/elaborazione dei dati. Fornisce una valutazione a posteriori dell'accuratezza analitica ed un confronto interlaboratoristico sulle metodologie utilizzate.

CQI

Il CQI per le analisi di I° livello 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 trascinarsi, 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, adeguate misure correttive (verifica sulla corretta applicazione delle procedure analitiche, nuova calibrazione

dell'analita e ripetizione del controllo, sostituzione del materiale di controllo ed eventuale sostituzione dei reattivi, richiesta di assistenza tecnica, ecc.). Il CQI per le analisi di II° livello deve prevedere almeno un controllo quantitativo per ogni seduta analitica. La documentazione relativa al CQI deve essere conservata per un anno e deve contenere la data di esecuzione, gli analiti interessati, gli esiti perseguiti, i rimedi adottati in caso di esiti discordanti ed il nominativo di chi lo ha eseguito.

VEQ

È considerato requisito indispensabile, sia per i laboratori di I° livello, sia per i laboratori di II° livello, 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.

FASE POSTANALITICA

Modalità di refertazione

La risposta degli esami 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 dall'esame di conferma sono da esprimere per singola sostanza in termini quantitativi in µg/L, con indicazione sul referto del limite di rivelabilità e quantificazione e l'incertezza analitica. 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,
- 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, può essere omesso dal referto il valore della creatininuria. La documentazione deve essere conservata per un periodo non inferiore a cinque anni.

CONCLUSIONI

Questo documento rappresenta il punto finale di un 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 clinici, 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 i livelli di qualità di un laboratorio tossicologico.

RINGRAZIAMENTI

Un particolare ringraziamento per la collaborazione alle dottoresse Simona Pichini e Roberta Pacifici, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

APPENDICE

Istruzioni per i prelievi necessari all'esecuzione 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 o 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*:

- 1 provetta di sangue senza additivi e 1 provetta di sangue con fluoruro di Na (centrifugare, congelare),
- 1 provetta urina,
- 2 barattoli (100 mL) urina,
- 4 provette di sangue con EDTA (centrifugare, congelare),
- Altro materiale eventualmente da acquisire presso il luogo della violenza.

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). 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 identifichi 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.

LETTURE CONSIGLIATE

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.

LeBeau M, Andollo W, Hearn WL, et al. Recommendations for toxicological investigations of drug-facilitated sexual assault. J Forensic Sci 1999;44:227-30.

Fitzgerald N, Riley KJ. Drug-facilitated rape: looking for the missing pieces. National Institute of Justice Journal. 2000;April:8-15.

Zacà S, Pellegrino S. Manuale di tossicologia forense. Torino: Giappichelli, 2006.

*E' disponibile a richiesta (giovanna.patrucchio@tin.it) uno specifico elenco relativo alla tipologia dei campioni da prelevare, alla loro suddivisione, conservazione e destinazione d'uso.

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. Geneva: ISO, 2007.
5. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: ISO, 2005.
6. Augsburg M, Donzè N, Menetrey A, et al. Concentration of drugs in blood of suspected impaired drivers. *Forensic Sci Int* 2005;153:11-5.
7. Universal precaution of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. Centers for Disease Control. *Morbidity and Mortality Weekly Reports on HIV/AIDS. MMWR*, 24/06 1998.
8. Drummer OH. Drug testing in oral fluid. *Clin Biochem Rev* 2006;27:147-59.
9. 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* 2004;79:19644-73.
10. 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;29:662-5.
11. Kintz P, Villain M, Dumestre-Toulet V, et al. Utilité de la LC-MS/MS dans les agressions sexuelles sous l'emprise de molécules psychoactives. Etude d'un cas impliquant du zolpidem. *Ann Toxicol Analytique* 2005;17:263-8.
12. 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.
13. 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.
14. SOFT/AAFS (Society of Forensic Toxicologists/American Academy of Forensic Sciences) Forensic Toxicology Laboratory Guidelines. February 23, 2006.
15. Society of Hair Testing (www.SOHT.org). Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int* 1997;84:3-6.
16. 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.
17. Ferrara SD, Tedeschi L, Brusini G. Documento europeo sull'analisi delle droghe d'abuso. *Biochim Clin* 1997;21:483-90.
18. 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.
19. 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;841:96-109.
20. Appenzeller BM, Schneider S, Yegles M, et al. Drug and chronic alcohol abuse in drivers. *Forensic Sci Int* 2005;155:83-90.
21. 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.
22. Ferrara SD, Snenghi R, Boscolo M. Linee guida metodologico-accertative-criteriologico-valutative. Idoneità alla guida e sostanze psicoattive. Padova: Piccin, 2006.
23. Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem* 2003;49:1881-90.
24. 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;24:4272-81.
25. 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;380:4-7.
26. 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.
27. Wurst FM, Kempter C, Seidl S, et al. Ethylglucuronide-a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *Alcohol Alcohol* 1999;34:71-7.
28. Høiseth G, Bernard P, Karinen L, et al. A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology. *Forensic Sci Int* 2007;172:119-24.
29. Morini L, Politi L, Groppi A, et al. Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrometry* 2006;41:34-42.
30. Böttcher M, Beck O, Helander A, et al. Evaluation of a new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing. *Alcohol Alcohol* 2008;43:46-8.
31. Yegles M, Pragst F. Cut-off 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; 2005.*
32. 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. *Clin Chim Acta* 2007;379:14-28.