

Il laboratorio di tossicologia forense nell'ambito della diagnostica medico-legale

Nadia De Giovanni, Nadia Fucci

Laboratorio di Tossicologia Forense - Istituto di Medicina Legale – Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

ABSTRACT

The role of the toxicology laboratory in legal medicine

The forensic toxicological laboratory is a highly specialistic laboratory which interests include the determination of use/abuse of drugs, workplace and roadside controls, therapeutical programs in rehabilitation, doping problems. The laboratory must guarantee the reliability and the high quality of its performances, using sophisticated instrumentations and highly qualified researchers. This paper describes the laboratory organization discussing the analytical process from the choice of biological sample and adequate procedures to the supply of analytical data and interpretation of results.

INTRODUZIONE

La Tossicologia Forense è una disciplina nata all'interno degli Istituti di Medicina Legale per la diagnosi di avvelenamento [1, 2] ma nel corso degli anni ha sviluppato numerose diramazioni in diversi campi di interesse, soprattutto a causa della diffusione dell'uso/abuso di sostanze stupefacenti. Oggi tale disciplina ha per oggetto la totalità delle questioni di carattere tossicologico attinenti l'ambito forense, e quindi al laboratorio possono essere richieste informazioni di vario tipo che vanno dalla determinazione di un eventuale stato di tossicodipendenza alla verifica di uso/misuso di sostanze psicotrope sia per finalità amministrative che legali [3].

Attualmente i campi di interesse della Tossicologia Forense includono anche i controlli del personale a rischio nei luoghi di lavoro [4-6], il controllo del contratto terapeutico nei programmi di riabilitazione [7,8], gli accertamenti di tipo assicurativo [9], i controlli nell'ambito della sicurezza stradale [10-12] nonché l'accertamento di doping [13].

Il Laboratorio di Tossicologia Forense è un laboratorio di chimica analitica ad elevata specializzazione al quale viene richiesta affidabilità e garanzia della qualità della prestazione erogata. A tale scopo deve utilizzare sofisticata strumentazione e risorse umane qualificate, addestrate ed aggiornate che abbiano competenze specifiche nella diagnostica chimico-tossicologica.

Scopo del presente lavoro è quello di illustrare l'organizzazione del Laboratorio di Tossicologia Forense, esaminando i vari aspetti coinvolti nella strutturazione del processo analitico che va dalla fase preliminare di scelta del campione biologico e della metodologia adeguate al tipo di indagine richiesta, fino alla produzione del dato analitico e relativa interpretazione.

IL LABORATORIO DI TOSSICOLOGIA FORENSE IN QUALITÀ

Il Laboratorio di Tossicologia Forense deve regolamentare la propria attività nell'osservanza di diverse normative che costituiscono requisito cogente; è inoltre auspicabile che vengano osservate le procedure indicate nelle linee-guida dalle diverse associazioni scientifiche accreditate sia nazionali che internazionali [14-23].

L'obiettivo di un laboratorio che lavora in qualità è costituito non solo dall'affidabilità dei risultati analitici, ma anche dalla possibilità di dare evidenza all'attendibilità dei processi e procedure utilizzati per ogni analisi effettuata. E' quindi necessario introdurre degli strumenti che siano in grado di controllare processi e procedure ed allo stesso tempo di rintracciare e registrare ogni fase del procedimento svolto. A tale scopo può essere quindi importante l'adozione di un sistema di qualità che grazie all'inserimento di metodologie e procedure codificate fornisca una guida alla gestione del sistema [24].

Normative

La prima normativa cui deve far riferimento un Laboratorio di Tossicologia è senza dubbio quella contenuta nel Testo Unico delle leggi in materia di stupefacenti (D.P.R. 9 ottobre 1990, n. 309 e successive modifiche). Il D.P.R. 309/90 ha unificato e in parte modificato le leggi precedenti con i decreti applicativi emanati dal Ministero della Salute [25], nell'intento di allinearsi con le più recenti risoluzioni adottate dagli Stati membri della Comunità Europea. Gli obiettivi dichiarati dal D.P.R. 309/90 sono fondamentalmente di combattere nel modo più efficace possibile la diffusione di tutte le sostanze stupefacenti e creare sanzioni amministrative e penali in ordine di gravità crescente. Stabilisce inoltre che le sostanze stupefacenti o psicotrope, sottoposte alla vigi-

lanza ed al controllo del Ministero della Salute, siano raggruppate in sei Tabelle, sottoposte a continuo aggiornamento.

Lo scorso febbraio è stata pubblicata la Legge n. 49/2006 contenente modifiche al D.P.R. 309/90 riguardanti anche la suddivisione in tabelle delle sostanze sottoposte a vigilanza. Attualmente la normativa ha raggruppato le sostanze stupefacenti in due sole tabelle. La stessa normativa regola i requisiti soggettivi per l'autorizzazione all'acquisto, alla custodia ed al corretto impiego di standard di sostanze stupefacenti da utilizzare nel Laboratorio di Tossicologia Forense per tutte le fasi analitiche.

La diffusione dell'abuso di sostanze stupefacenti e/o psicotrope nella popolazione pone problemi non solo di natura forense, ma genera anche oneri di carattere amministrativo che non sono certamente meno preoccupanti.

Tra questi si inserisce l'articolo 125 del DPR 309/90 che prevede che gli appartenenti alle categorie di lavoratori destinati a mansioni che comportano rischi per la sicurezza, la incolumità e la salute di terzi (individuate con decreto del Ministero del Lavoro e della Previdenza Sociale, di concerto con il Ministero della Salute) siano sottoposti ad accertamento di assenza di tossicodipendenza prima dell'assunzione in servizio e, successivamente, ad accertamenti periodici [4, 5].

In tale contesto il tossicologo è chiamato a verificare l'uso/abuso di sostanze stupefacenti attraverso una serie di accertamenti.

In tema di sicurezza stradale [26,27], gli articoli 186 e 187 del vigente Codice della Strada (D.L.n.285 del 30-04-92 e aggiornamenti successivi) prevedono accertamenti tossicologici su conducenti di veicoli coinvolti in incidenti stradali o quando si abbia motivo di ritenere che il conducente del veicolo si trovi in stato di alterazione psico-fisica derivante dall'influenza dell'alcool, o sotto l'effetto conseguente all'uso di sostanze stupefacenti o psicotrope [28].

Le disposizioni contenute nel Decreto Legislativo n.196 del 30 giugno 2003, in materia di protezione dei dati personali, con particolare riguardo alla gestione delle risorse umane (Direttiva n. 1/2005) trovano una applicazione in ambito tossicologico-forense, in quanto vengono trattati dati sensibili in contesti particolarmente delicati. Infatti il laboratorio non è autorizzato ad effettuare analisi su materiale biologico prelevato da altre persone senza il consenso dell'interessato e la garanzia della catena di custodia; non è possibile inoltre consegnare i referti analitici a terze persone né comunicare i risultati telefonicamente.

Altra normativa cui fare riferimento è il Decreto Legislativo n.626 del 19 settembre 1994 che recepisce in Italia le direttive della CEE finalizzate a promuovere la salute e la sicurezza dei lavoratori nei luoghi di lavoro [29]. Nell'osservanza di tali direttive il Laboratorio di Tossicologia Forense deve stabilire delle regole da seguire per tutelare e garantire la sicurezza del personale afferente.

Negli ultimi anni i Laboratori di Tossicologia

Forense sono stati chiamati ad affiancare i centri di ricerca antidoping nell'ambito della prevenzione e tutela della salute in ambiente sportivo [13]. In tale ottica il laboratorio deve seguire le direttive riportate nella legge n. 376 del 14 dicembre 2000 recante "Disciplina della tutela sanitaria delle attività sportive e della lotta contro il doping". Questa Legge contiene disposizioni di particolare rilevanza, anche di carattere penale, per tutti coloro che utilizzano sostanze illecite durante le attività sportive o che ne siano coinvolti a livello organizzativo.

Linee-guida - Norme ISO per la certificazione

Gli accertamenti tossicologici in tema di analisi di sostanze d'abuso nei reperti biologici, possono assumere carattere di prova giudiziaria, pertanto è necessario non solo migliorare la qualità analitica, ma uniformare le procedure analitiche ed organizzative del laboratorio. È auspicabile quindi che un Laboratorio di Tossicologia Forense si attenga ai principi riportati nelle linee guida indicate da Società Scientifiche Nazionali ed Internazionali al fine di rispettare requisiti che garantiscano la sicurezza di qualità. Tali requisiti riguardano il personale afferente al laboratorio, la struttura, la procedura di acquisizione dei campioni, l'analisi e l'interpretazione dei risultati, il monitoraggio interno ed esterno dell'affidabilità analitica, le modalità di refertazione.

A livello Nazionale da svariati anni il Gruppo dei Tossicologi Forensi (G.T.F.I della S.I.M.L.A.) [9] si sta occupando della elaborazione di linee guida specifiche per la disciplina. Tali direttive hanno lo scopo di fornire utili suggerimenti e regole agli operatori in modo tale che i risultati analitici siano accettabili in ambito medico legale. Già nel novembre del 1998 fu affidato ad un gruppo di lavoro il mandato di elaborare delle proposte in tema di "Qualità Totale" che sono state sottoposte a successive modifiche e approvate dal G.T.F.I. L'esigenza di far riferimento a linee guida specifiche, nasceva dalla consapevolezza che a garanzia della qualità delle prestazioni tossicologiche non fosse più sufficiente l'esperienza di singoli operatori ma che occorresse individuare criteri e procedure comuni utilizzabili per una valutazione oggettiva delle prestazioni erogate dal laboratorio. La verifica del consenso venne effettuata in occasione di raduni scientifici nazionali [22] e la prima stesura delle linee guida è stata pubblicata nel 2002 [16] ed in modo completo nel 2003 [23].

L'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO) si è premurata di fornire delle Linee Guida per stabilire i requisiti indispensabili per i laboratori e per procedere alla valutazione di questi requisiti al fine di darne valore legale [24].

L'adozione di una politica di verifica della qualità, intesa come eccellenza del risultato ed efficienza organizzativa (il costante miglioramento dello standard di qualità del servizio fornito, la responsabilizzazione di tutto il personale, la diffusione della Politica di Qualità) dovrebbe essere perseguita come un obiettivo primario del Laboratorio. A tal fine è necessario adottare delle procedure che regolino le attività principali, l'adeguatez-

za e la corretta esecuzione di tali attività, nonché la misurazione dell'efficienza del sistema qualità. Il laboratorio deve raccogliere in un manuale le Procedure Operative Standard (SOP) che devono essere complete, aggiornate e disponibili a tutto il personale.

Tutte le procedure che riguardano le varie fasi del processo devono essere raccolte in forma documentale a partire dalla fase di accettazione delle richieste di analisi fino alla consegna del referto analitico.

IL CAMPIONE BIOLOGICO

Scelta del campione

La scelta del campione biologico da esaminare nelle analisi chimico-tossicologiche è essenziale per poter ottenere una risposta adeguata in relazione alla finalità diagnostica con valenza medico-legale [1-3].

L'accertamento della eventuale presenza di sostanze stupefacenti sul materiale biologico può essere effettuato su diversi distretti corporei, differenti a seconda che si tratti di indagini su cadavere [1, 30] o su soggetti viventi [3] e in relazione alla finalità dell'analisi. Nel caso di accertamenti su vivente, vengono principalmente utilizzati campioni di urine, sangue, capelli, saliva e sudore; quando le analisi devono essere eseguite su materiale cadaverico, oltre ad urine, sangue e capelli si possono esaminare anche campioni di umor vitreo, bile, fluido cerebrospinale, frammenti di organi ecc. La differenza tra i campioni biologici consiste soprattutto nella finestra temporale in cui la droga può essere determinata, con intervalli di tempo che variano da poche ore per il sangue [31], due-tre giorni per le urine [32], alcuni mesi per le matrici cheratiniche [33]. Altre differenze da considerare riguardano la invasività del prelievo, i costi delle analisi, la validità e riproducibilità dei risultati, la possibilità di interferenze, le difficoltà analitiche.

Le **matrici biologiche tradizionalmente utilizzate** in ambito forense sono le urine ed il sangue. Il campione di **sangue** può essere utilizzato per la determinazione di una eventuale assunzione recente di droghe, mentre il campione di urine è idoneo per verificare assunzioni pregresse. Il campione di sangue infatti è l'unica matrice tradizionale in grado di fornire informazioni sullo stato di intossicazione in atto al momento del prelievo in quanto la finestra temporale risulta di poche ore [31]. Il prelievo di tale fluido biologico comporta però una serie di svantaggi quali ad esempio l'invasività e la possibilità di rischio biologico da parte dell'operatore. Di contro è spesso indispensabile l'uso del sangue per ottenere informazioni relative ad un soggetto nel momento in cui si verifica l'evento come ad esempio in caso di incidente stradale [34]. Tale fluido biologico risulta a tutt'oggi campione di elezione in quanto è ben noto il metabolismo per numerose sostanze tossiche [35].

Il campione biologico più usato per l'analisi delle droghe d'abuso e i loro metaboliti è certamente il campione di **urine** la cui finestra temporale è superiore al sangue (24 - 48 ore o più a seconda della sostanza) e

può risultare utile sia nelle analisi di screening che in situazioni in cui sia necessario il controllo di eventuale assunzione di sostanze psicotrope [32]. Questo campione biologico offre vantaggi sia per quanto riguarda i volumi disponibili (sufficienti sia per le analisi di conferma che per eventuale ripetizione delle analisi), sia per le concentrazioni più elevate della sostanza-parente e dei metaboliti rispetto ad altri fluidi; da considerare però la facilità di eventuale adulterazione, l'invasività del prelievo qualora si renda necessario un controllo a vista (sempre per finalità medico-legali), la mancanza di correlazione con la dose assunta.

Gli stessi campioni biologici vengono impiegati anche nelle indagini tossicologiche su cadavere, anche se i problemi analitici sono maggiori in quanto correlati ai processi postmortali che rendono l'analisi più difficile con ripercussioni sull'interpretazione del dato [1, 36].

Negli ultimi anni è stato introdotto l'utilizzo di **matrici biologiche alternative**, quali saliva [37,38] e sudore [39,40] che possono fornire informazioni sullo stato di tossicodipendenza a breve e a medio termine.

La **saliva** fornisce indicazioni utili sullo stato del paziente al momento del prelievo e quindi la finestra temporale è di poche ore. Il prelievo offre indubbiamente una serie di vantaggi dal punto di vista operativo, primo fra tutti la scarsa invasività e la scarsa possibilità di adulterazione.

D'altro canto l'impiego di tale liquido biologico comporta alcuni svantaggi quali ad esempio la bassa concentrazione degli analiti e la sensibilità a variazioni di pH [41], in taluni casi vi può essere una contaminazione in caso di assunzioni orali o intranasali [42]. Inoltre la scarsa quantità di campione che può essere raccolto richiede analisi di screening con elevata sensibilità [43] e non è possibile effettuare analisi di conferma con le metodiche tradizionali che necessitano di una maggiore quantità di campione biologico.

Attualmente l'analisi chimico tossicologica di questo fluido biologico non è impiegata di routine nei Laboratori di Tossicologia Forense poiché non ancora validato per l'impiego in ambito medico-legale. La possibilità di utilizzare il **sudore** in ambito tossicologico, è di più recente sperimentazione, anche se in alcuni Paesi, viene già impiegato in regime carcerario per il controllo di assunzione pregressa di stupefacenti per la sua caratteristica finestra temporale più ampia rispetto al sangue [44,45]. E' in tal modo possibile evidenziare un assuntore occasionale tramite un prelievo non invasivo eseguibile con dei cerotti adattati allo scopo e posizionati sul braccio del paziente, che permettono la traspirazione facilitando la raccolta del fluido.

Ci sono due fattori limitanti per l'uso di queste matrici alternative: la quantità che si può raccogliere e le concentrazioni sono inferiori alle urine. Il volume del campione ottenibile risulta elemento critico soprattutto per l'applicazione forense perchè è necessario poter conservare una parte di campione per ripetere il test in caso di una contestazione.

Altro campione biologico oggi utilizzabile in ambito medico-legale è il campione di capelli: è infatti noto che

le sostanze esogene assunte dall'organismo vengono incorporate nella **matrice cheratinica** (capelli e peli prelevati da altri distretti corporei) in modo irreversibile, seppure in concentrazioni molto basse ed in relazione alla quantità della droga assunta ed alla frequenza d'uso [46,47]. Questo tipo di analisi è pertanto utile nel caso in cui ci siano assunzioni ripetute nel tempo per provare un uso/abuso a lungo termine e per fornire dati analitici che abbiano valenza in ambito medico legale come nel caso di affidamento o custodia minori, rilascio porto d'armi, idoneità alla guida ecc.

Sebbene ci siano difficoltà nell'interpretazione dei risultati, in particolare concernenti la possibilità di contaminazione esterna e l'uso di trattamenti cosmetici, la maggior parte dei problemi analitici sono stati oggi risolti e le Società Scientifiche preposte [17, 48] hanno pubblicato opinioni di consenso proponendo delle linee guida per tale tipo di accertamento.

La procedura di raccolta dei capelli deve essere standardizzata e il prelievo deve essere effettuato da operatori sanitari specializzati, il campione può essere conservato a temperatura ambiente, la determinazione analitica richiede particolari precauzioni legate alla complessità della matrice ed alle basse concentrazioni degli analiti.

Raccolta del campione e catena di custodia

Nelle indagini tossicologiche con valenza medico legale, è indispensabile avere certezza della identità del campione biologico e della sua rintracciabilità in tutte le fasi operative, dall'acquisizione fino allo smaltimento [3]. A tale scopo è necessario istituire una "Catena di custodia" che documenti con apposita modulistica tutte le fasi preanalitiche, la manipolazione, lo stoccaggio, l'analisi e la refertazione [14-20].

In quest'ottica, l'organizzazione del laboratorio deve essere tale da garantire la corretta procedura, a partire da una regolamentazione dell'accesso al laboratorio, che deve essere limitato al solo personale autorizzato. Per i laboratori che eseguono anche analisi tossicologiche su reperti non biologici, l'acquisizione, la manipolazione e lo stoccaggio dei campioni biologici deve avvenire in ambienti separati, contenendo il potenziale rischio di contaminazione.

Il prelievo del campione deve essere preceduto da una fase di accettazione comprendente l'identificazione del soggetto, che firmerà un "Consenso Informato", la finalità dell'indagine e la tipologia dell'analisi. Al campione biologico, prelevato nel rispetto della privacy e con la garanzia dell'identità, viene assegnato un numero identificativo univoco cui fare riferimento in tutte le fasi successive. Il Laboratorio in via preliminare deve suddividere il campione in aliquote, una delle quali deve essere conservata per un tempo prestabilito (non inferiore ad un anno) per essere utilizzata in caso di contestazione. La quantità del campione prelevato deve essere sufficiente sia per l'espletamento delle analisi in funzione della finalità dell'indagine, che per eventuale ripetizione dell'analisi stessa. Le modalità di conservazione del campione

devono essere idonee perchè lo stesso mantenga le caratteristiche organolettiche garantendo in tal modo l'inalterabilità delle sostanze eventualmente presenti nel campione.

ANALISI CHIMICO-TOSSICOLOGICHE

Scelta del tipo di analisi

Per la produzione di risultati affidabili sono indispensabili metodologie analitiche dotate di sensibilità, precisione e accuratezza. Tutte le metodiche analitiche utilizzate dal laboratorio devono essere validate nelle condizioni operative scelte, riportate nel manuale delle procedure operative che deve includere anche la preparazione degli standard, dei reagenti e del campione, la calibrazione degli strumenti ed i criteri di accettabilità definiti per la produzione dei dati.

Un Laboratorio di Tossicologia Forense deve essere in grado di effettuare sia analisi di screening che analisi di conferma, nonchè scegliere la tipologia dell'indagine idonea per il tipo di accertamento richiesto. La scelta del metodo risulta molto ampia e dettata da considerazioni diverse: deve essere valutata tenendo conto dei costi, della quantità di lavoro prevista, del livello di sensibilità e affidabilità richieste, della esperienza del personale, dell'uso finale del dato prodotto.

Generalmente l'analisi tossicologica si effettua con uno screening preliminare per differenziare e rilevare campioni positivi nel minor tempo possibile ed escludere i campioni che non contengono sostanze o loro metaboliti o che abbiano una concentrazione inferiore alla concentrazione soglia (cut-off). Successivamente nei campioni presunti positivi si può procedere all'analisi di conferma, per la verifica della positività riscontrata con lo screening. L'analisi di conferma, che si deve basare su principi chimico-fisici diversi dallo screening, deve quindi identificare i singoli analiti, avere una sensibilità maggiore del cut-off del test preliminare ed essere in grado di fornire un dato quantitativo.

Analisi di screening

I test preliminari (soprattutto determinazioni immunochimiche) vengono effettuati generalmente sulla matrice urinaria [49,50], tanto che la maggior parte dei kit in commercio sono progettati ed utilizzati per questo campione biologico; solo alcuni test immunochimici sono stati ideati per esaminare campioni di siero. Le tecniche immunochimiche sono generalmente utilizzate per lo screening di tossici organici non-volatili, in quanto dotate di caratteristiche di elevata sensibilità e rapidità d'analisi, non necessitando di pretrattamento del campione biologico.

Tali metodiche si basano sulla competizione nei confronti di un anticorpo specifico, tra la sostanza tossica da identificare e la stessa sostanza marcata in modo tale da poter essere riconosciuta e monitorizzata dal sistema analitico.

In funzione del tipo di marcatura avremo diversi tipi di metodi immunochimici, così ad esempio: radio-immunoassay se l'antigene è marcato con isotopi radioattivi, enzime-immunoassay se l'antigene è marcato con enzimi, fluorescent-immunoassay se l'antigene è marcato con sostanze fluorescenti ecc.

Comune a tutti i sistemi immunochimici è l'elevata sensibilità nonché la notevole rapidità e semplicità di analisi. Queste metodiche consentono oggi uno screening rapido per numerose classi di sostanze di interesse tossicologico, si deve tuttavia tenere presente che la specificità di tali sistemi di analisi è fondamentalmente legata alla specificità dell'anticorpo utilizzato dal sistema stesso e che anche in caso di specificità nominalmente elevata (impiego di anticorpi monoclonali) è sempre possibile che la reazione antigene-anticorpo venga influenzata in modo incontrollabile da vari fattori, quali la presenza di sostanze cross-reagenti, il pH, la forza ionica, ecc. Pertanto i risultati positivi ottenuti con queste tecniche analitiche debbono essere confermati mediante l'impiego di metodi di analisi dotati di maggiore specificità.

Analisi di conferma

I fondamenti di tossicologia forense indicano che l'identificazione mediante un test preliminare di sostanze tossiche necessita di conferma con una tecnica basata su principi chimico fisici diversi; il test di conferma deve essere più specifico e sensibile per l'analita target. La qualità dei risultati dipende dalla validità della procedura analitica alle cui caratteristiche di sensibilità, specificità e riproducibilità occorre riservare un'attenta selezione.

Le linee guida raccomandano la spettrometria di massa come tecnica di conferma elettiva. Il suo accoppiamento con la gas cromatografia e/o la cromatografia liquida, tecniche separative ad elevata efficienza, la rende idonea per le suddette finalità analitiche [51,52].

La spettrometria di massa è una tecnica analitica basata sullo studio dei frammenti ionici che si producono dall'impatto di un fascio di elettroni (ionizzazione per impatto elettronico) o molecole elettricamente cariche (ionizzazione chimica) con una molecola neutra. I frammenti ionici prodotti vengono poi separati ed analizzati secondo il loro rapporto massa/carica. Il grafico che riporta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del rapporto massa/carica costituisce lo spettro di massa, caratteristico per ogni sostanza. Tale analisi è in grado di offrire ottime informazioni strutturali sulla molecola oggetto d'indagine e di assicurare livelli elevatissimi di sensibilità, consentendo quindi notevoli applicazioni di tipo qualitativo e quantitativo.

L'accoppiamento della gas cromatografia e/o cromatografia liquida ad alta efficienza con la spettrometria di massa (GC/MS - HPLC/MS) ha esteso notevolmente le applicazioni di entrambe le tecniche. Questi metodi sono, infatti, altamente complementari in quanto all'efficacia separativa delle tecniche cromatografiche viene associato l'elevato potere di identificazione della spettrometria di massa.

Questo tipo di analisi richiede l'uso di uno standard

interno, aggiunto al campione prima di qualsiasi trattamento, per minimizzare sia gli errori manuali che quelli strumentali, consentendo quindi accurate determinazioni quantitative. Gli analoghi dei composti in esame, marcati con deuterio, mostrando lo stesso schema di frammentazione della molecola non marcata, possono agevolmente essere utilizzati come standard interni con elevata specificità.

Recentemente l'introduzione della tecnica GC/MS/MS [53] ha reso possibile l'esecuzione di analisi di miscele complesse, anche quando la separazione cromatografica non risulta ottimale. Mediante questa metodica, infatti, viene separata dalla miscela in esame la specie ionica corrispondente allo ione molecolare dell'analita da identificare, che viene quindi sottoposto ad un secondo procedimento di frammentazione di massa, in modo da escludere le interferenze da parte di molecole strutturalmente simili. L'elevata sensibilità consente inoltre l'identificazione ed il dosaggio di tracce di composti altrimenti non identificabili in miscele molto complesse.

Standard di riferimento

Per le analisi chimico tossicologiche vengono generalmente utilizzati standard di riferimento e relativi analoghi deuterati di sostanze stupefacenti che vengono acquistati da ditte specializzate previa autorizzazione concessa dal Ministero della Salute secondo la normativa vigente (DPR 309/90); l'autorizzazione ha una scadenza periodica che deve essere verificata. La movimentazione di tali sostanze deve essere documentata in un apposito registro custodito dal Laboratorio di Tossicologia e sottoposto a regolare controllo da parte della ASL competente.

Tutte le sostanze standard e tutti i reagenti utilizzati per le analisi devono essere corredati da documentazione di certificazione di analisi che attesti la fonte, la data di preparazione, le concentrazioni, i parametri analitici di controllo, la scadenza e le informazioni sulla tossicità del prodotto. La stabilità e integrità degli standard di riferimento devono essere preservate durante lo stoccaggio, pertanto è compito del Laboratorio provvedere ad una idonea conservazione, e verificare periodicamente la eventuale degradazione alla luce, all'umidità o alle basse temperature. L'identità e il grado di purezza degli standard devono essere verificate con idonee procedure in condizioni strumentali ottimali al momento della prima manipolazione. Tutti gli standard e i reagenti devono essere correttamente identificati mediante etichettatura uniforme, per tutte le sostanze devono essere riportate data di acquisizione, preparazione, scadenza e il nome del preparatore.

Un ulteriore importante aspetto per la sicurezza della qualità consiste nella preparazione ed analisi di campioni biologici contenenti concentrazioni note di droghe e metaboliti, esaminati ad ogni sessione analitica insieme al campione incognito. I campioni di controllo devono essere allestiti in modo da contenere concentrazioni di analiti prossime al limite di sensibilità del test, poco superiori e poco inferiori al valore di cut-off.

Sensibilità e cut-off

Si definisce sensibilità analitica il rapporto tra il segnale strumentale e la minima concentrazione distinguibile dallo stesso. Tale parametro è espresso dalla pendenza della retta di calibrazione ed è caratterizzato dal limite di rivelazione che è il più piccolo risultato che può essere distinto dal bianco con una probabilità stabilita. Tale limite di rivelazione è quindi la più bassa concentrazione che permette di valutare qualitativamente la presenza o assenza di un analita e viene indicato con il termine LOD (Limit of Detection) e deve essere stabilito in ogni laboratorio in riferimento alla strumentazione che viene utilizzata. Il limite di quantificazione (LOQ - Limit of Quantitation) è la più bassa concentrazione dell'analita che può essere calcolata con precisione e accuratezza prestabilite, generalmente considerando il segnale attribuito all'analita circa 10 volte superiore alla deviazione standard del bianco.

Con il termine cut-off viene indicata la più bassa concentrazione dell'analita al di sopra della quale un campione è considerato positivo. Questo parametro deve essere scelto con valore superiore al LOQ e in riferimento a quanto comunemente accettato in ambito scientifico nazionale ed internazionale. Il valore del cut off deve quindi scaturire da una scelta concordata in funzione degli scopi prioritari e previsti nel programma. Linee guida nazionali ed internazionali suggeriscono valori di riferimento da considerare in relazione alle diverse sostanze e diverse matrici biologiche [18, 21, 48].

Controlli di qualità

Il "Controllo di Qualità" è da tempo considerato un obbligo imprescindibile in tutti i settori della produzione industriale, culturale, scientifica, sanitaria. L'essenziale obiettivo del Laboratorio deve quindi consistere nel perseguire il massimo dell'affidabilità. A tal fine i Laboratori devono promuovere dei controlli di qualità interni ed interlaboratorio ed ispirarsi alle linee guida fissate dalle più accreditate società e accademie scientifiche internazionali in tema di sicurezza di qualità.

I Laboratori di analisi tossicologiche con finalità medico-legale devono adottare un sistematico controllo di qualità interno (CQI). In ciascun laboratorio deve operare un supervisore del CQI attuato mediante controlli noti (contenenti quantità note di standard), controlli ciechi (campioni con identità e composizione sconosciuta all'analista) e verifica di aderenza di processi analitici alle procedure operative standard del Laboratorio. I Laboratori devono inoltre partecipare a programmi di controlli di qualità esterni (CQE) per la verifica dell'affidabilità analitica e per migliorare il livello di prestazione del laboratorio [3, 17-19, 54].

Validazione del dato analitico

I risultati analitici ottenuti da un Laboratorio di Tossicologia Forense devono garantire un elevato grado

di affidabilità considerando che si tratta di dati che possono avere una rilevante incidenza in ambito giuridico [2]. E' necessario quindi stabilire delle regole di buona pratica di laboratorio tramite l'uso di procedure standardizzate e di metodologie validate. La validazione di un metodo analitico è un processo che permette di stabilire l'adeguatezza dei parametri di performance analitica; scopo della validazione è di provare l'affidabilità della procedura, documentare la competenza dell'analista, definire i limiti di controllo per la verifica dei parametri di qualità. La validazione di una metodica deve essere eseguita da ciascun laboratorio secondo procedure prestabilite ed i risultati devono essere descritti dettagliatamente nella documentazione. I parametri da considerare per la validazione del metodo includono il recupero dell'analita dalla matrice biologica, la sensibilità, la precisione, l'accuratezza, la specificità. Tutti questi parametri devono essere validati prima di introdurre una nuova metodica nella pratica del laboratorio [55].

REFERTAZIONE E TRASMISSIONE DEL DATO

Uno degli aspetti più delicati del processo analitico è sicuramente la refertazione, ossia la produzione di un rapporto analitico che deve contenere i risultati delle analisi effettuate dal Laboratorio. Il rapporto analitico finale deve essere prodotto esclusivamente in forma scritta, firmato da chi ha effettuato le analisi e dal Dirigente Responsabile del Laboratorio. Il referto può essere consegnato solo alla persona che ha fatto richiesta dell'accertamento o da una persona da lui delegata con delega scritta e copia del documento di identità del delegante. Il risultato delle analisi non può essere comunicato telefonicamente o tramite fax, può essere inviato per posta nel caso in cui ne venga fatta esplicita richiesta al momento dell'accettazione del campione. Quando il committente è un Ente o una struttura ospedaliera, verrà concordata con il Laboratorio la modalità di trasmissione del referto rispettando comunque la catena di custodia e garantendo la privacy. Nel referto devono essere indicati, oltre alla data e a tutti gli estremi di identificazione del campione, anche il metodo impiegato per l'analisi, il cut-off e per le analisi quantitative il limite di sensibilità del metodo utilizzato oltre al valore numerico del risultato.

CONCLUSIONI

Compito del Laboratorio di Tossicologia Forense è generalmente la produzione di un dato che accerti la presenza o assenza di sostanze esogene nel campione biologico. Tuttavia il Laboratorio non fornisce esclusivamente un risultato analitico, ma l'emissione del dato è condizionata da una serie di valutazioni chimico-tossicologiche che possono essere effettuate soltanto da chi ha esperienza e bagaglio culturale idoneo. Quello che viene richiesto al Tossicologo Forense è infatti l'interpretazione del dato analitico ottenuto; l'interpretazione riguarda il significato della positività o negatività in relazione ad una serie di parametri quali ad esempio la tipologia del

campione biologico esaminato e le tecniche analitiche utilizzate [3, 36]. E' necessario inoltre considerare eventuali prescrizioni farmacologiche, la tipologia dell'assunzione (occasionale o cronica, recente o pregressa), eventuali adulterazioni o contaminazioni volontarie o accidentali del campione. La fase dell'interpretazione del dato deve tener presenti anche i parametri analitici riguardanti la specificità e la sensibilità del test impiegato.

Il risultato ottenuto non ha solo una ricaduta nella diagnosi e terapia, come per altre analisi di laboratorio, ma può condurre a decisioni amministrative e legali in contesti diversi. Negli ultimi anni a causa soprattutto della grande espansione dei problemi legati all'assunzione di sostanze stupefacenti, è aumentata la richiesta di risposte analitiche in ambito tossicologico e l'esigenza di maggiore affidabilità del dato. I cambiamenti nel panorama dell'abuso di sostanze stupefacenti rendono necessari programmi di controllo e di collaborazione con altri laboratori al fine di aggiornare e ottimizzare continuamente le procedure analitiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Lodi F, Marozzi E. Tossicologia forense e chimica tossicologica Ed. Libreria Cortina - Milano 1982.
2. Bertol E, Lodi F, Mari F, Marozzi E. Trattato di tossicologia Forense Ed. CEDAM - Padova 1994
3. Ferrara SD. Il laboratorio di farmacologia e tossicologia clinica C.G. Ed. Medico Scientifiche - Torino 1989
4. Chiarotti M, De Giovanni N, Fucci N, Danese D. Analisi tossicologiche per la ricerca di sostanze d'abuso effettuate con riferimento al DPR 309/90 su un campione di lavoratori nel periodo 1995-1999. Boll Farmacodip Alcool 2001; XXIV: 42-53
5. Cone EJ. Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale. Forensic Sci Int 2001; 121: 7-15
6. Verstraete AG, Pierce A. Workplace drug testing in Europe. Forensic Sci Int 2001; 121: 2-6
7. Scarlata S, Chiarotti M, Fucci N, De Giovanni N. Haematic concentrations versus oral doses of methadone. Comparative assessment of two reference systems during substitute therapy in opiate addiction. Heroin addiction and related clinical problems 2001; 3: 13-20
8. Guerrini F, Ceppellini C, Resentini M. Valutazione dei dosaggi di buprenorfina sublinguale in relazione alla storia pregressa di assunzione di eroina e/o metadone: ricerca di un fattore predittivo di performance terapeutica. Boll Farmacodip Alcoolis 2002; XXV: 39-45
9. Società Italiana di Medicina Legale www.simlaweb.com
10. Progetto Rosita www.rosita.org
11. Walsh JM, de Gier JJ, Christopherson AS, Verstraete AG. Drugs and driving. Traffic Inj Prev. 2004; 5:241-53. Review
12. Drummer OH. Drugs and the risk of road crashes. In Proceedings of TIAFT 2000, Ed. I.Rasanen University of Helsinki, Helsinki Finland 2001; 89-95
13. Ferrara SD. Doping Antidoping. Ed. Piccin Nuova Libreria - Padova
14. Zuccaro P, Pichini S, Altieri I, Pacifici P. Proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici - Rapporti ISTISAN 96/29 (1996) 26-36
15. Pichini S, Palmeri A, Pellegrini M, Zuccaro P, Pacifici R. Proposta di linee guida per l'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nei capelli - Rapporti ISTISAN 99/24 (1999) 1-34
16. Borriello R, Caligara M., Chiarotti M., Ferrara SD, Gagliano Candela R et al. Linee guida per i laboratori di analisi delle sostanze di abuso in campioni biologici. Boll Farmacodip Alcool 2002; XXV: 19-26
17. Society of Forensic Toxicology www.soft-tox.org
18. European Workplace Drug Testing www.ewdts.org
19. Substance Abuse and Mental Health Services Administration www.samhsa.gov
20. The International Association of Forensic Toxicologists www.tiaft.org
21. National Institute on Drug Abuse www.nida.nih.gov
22. Chiarotti M, Borriello R, Gigli F, Poletti A. Riflessioni e proposte operative in tema di qualità totale ed accreditamento dei laboratori di tossicologia forense. Atti del XXXIII Congresso Nazionale SIMLA .Brescia 25-28 ottobre 2000
23. Scritti in onore del Professore Emilio Marozzi. Med.Leg.Quad.Cam. 25,3,2003
24. International Organization for Standardization, www.iso.ch/iso/en/ISOonline.frontpage
25. www.ministerosalute.it
26. www.poliziadistato.it/pds/stradale/nuovo_cds/index.html
27. www.interno.it/legislazione/
28. Borriello R, Chiarotti M, Lodi F. I protocolli operativi per gli artt. 186 e 187 del Codice della Strada: un incipit necessario da sottoporre a verifica attuativa. Boll Farmacodip Alcool 2005; XXVIII: 1-4
29. www.giustizia.it/cassazione/leggi/dlgs626_94.html
30. Flanagan RJ, Connally G, Evans JM. Analytical toxicology: guidelines for sample collection postmortem. Toxicol Rev 2005; 24: 63-71
31. Verstraete AG. Detection times of drugs of abuse in blood, urine and oral fluid. Ther Drug Monit 2004; 26: 200-205
32. Vandevenne M, Vandebussche H, Verstraete A. Detection time of drugs of abuse in urine. Acta Clin Belg. 2000; 55: 323-33. Review.
33. Society of Hair Testing. Statement of the Society of Hair testing concerning the examination of drugs in human hair. Forensic Sci Int 1997; 84: 3-6
34. Moeller MR, Kraemer T. Drugs of abuse monitoring in blood for control of driving under the influence of drugs. Ther Drug Monit 2002;24:210-21. Review.
35. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A. Le basi farmacologiche della terapia. Ed. McGraw-Hill Milano 1997
36. Flanagan RJ, Connally G. Interpretation of analytical toxicology results in life and at postmortem. Toxicol Rev 2005; 24: 51-62
37. Drummer OH. Review: pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. Forensic Sci Int 2005; 150: 133-42
38. Kadehjian L. Legal issues in oral fluid testing. Forensic Sci Int 2005; 150: 151-60
39. Dolan K, Rouen D, Kimber J. An overview of the use of urine, hair, sweat and saliva to detect drug use. Drug Alcohol Rev 2004; 23:213-7
40. Samyn N, De Boeck G, Verstraete AG. The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers. J Forensic Sci 2002; 47:1380-7
41. Cone EJ. Saliva testing for drugs of abuse. Ann. NY Acad Sci 1993; 694:91-127
42. Kintz P, Samyn N. Use of alternative specimens: drugs of abuse in saliva and doping agents in hair. Ther Drug Monit 2002; 24: 239-46
43. Fucci N, De Giovanni N, Chiarotti M. Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique Forensic Sci Int 2003; 134: 40-45
44. Samyn N, De Boeck G, Verstraete AG. The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers. J. Forensic Sci 2002;; 47: 1380-7

45. Kidwell DA, Holland JC, Athanaselis S. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chromatogr B*, 1998; 713: 111-35
46. Villain M, Cirimele V, Kintz P. Hair analysis in toxicology. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42:1265-72. Review
47. Kronstrand R, Nystrom I, Strandsberg J, Druid H. Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MS-MS. *Forensic Sci Int*. 2004; 145: 183-90.
48. Society of Hair Testing www.soht.org
49. Maurer HH. Screening procedures for simultaneous detection of several drug classes used for high throughput toxicological analyses and doping control. *Comb Chem High Throughput Screen* 2002; 6: 467-80
50. Peace MR, Tarna LD, Poklis A. Performance evaluation of four on-site drug-testing devices for detection of drugs of abuse in urine. *J Anal Toxicol*. 2000 ; 24: 589-94.
51. Watson Jt. Introduction to mass spectrometry. Raven Press New York 1985 II edizione.
52. Maurer HH. LC/MS analysis of drugs of abuse. TIAFTnet On-line Reviews www.tiaft.org
53. MacLafferty FW. Tandem mass spectrometry. *Science*. 1981; 214: 280
54. Ferrara SD, Brusini G, Maietti S, Frison G, Castagna F, et al. Proficiency testing for psychoactive substances in Italy. *Int. J Legal Med* 1999; 113: 50-4
55. Colucci AP, Gagliano Candela R. Validità del dato analitico del laboratorio chimico clinico e tossicologico – *Boll. Farmacodip. Alcol*. 2004; XXVII: 37-46