

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)



LINEE GUIDA PER LE STRUTTURE DOTATE DI LABORATORI PER GLI ACCERTAMENTI DI SOSTANZE D'ABUSO CON FINALITÀ TOSSICOLOGICO-FORENSI E MEDICO-LEGALI SU CAMPIONI BIOLOGICI PRELEVATI DA VIVENTE

Revisione n. 4 del 6 dicembre 2012 a cura della Commissione Qualità¹
dell'Associazione Scientifica "Gruppo Tossicologi Forensi Italiani" (GTFI)

PREMESSA STORICA

Le Linee Guida in tema di accertamenti analitici di sostanze d'abuso a scopi tossicologico-forensi e medico-legali furono elaborate per la prima volta nell'anno 2000 dalla Commissione Qualità dell'Associazione Scientifica "Gruppo Tossicologi Forensi Italiani" (da qui in avanti nominata per brevità GTFI) nell'ambito dei Progetti di ricerca del Ministero della Salute in tema di: "Miglioramento della qualità analitica nell'analisi tossicologica delle sostanze d'abuso e standardizzazione delle procedure analitiche adottate nella diagnostica di laboratorio, nonché di formazione specifica del personale preposto agli accertamenti tossicologici".

Le Linee Guida sono state sinora oggetto di revisione ed aggiornamento periodici. Nel luglio 2003 è stata pubblicata una prima revisione successivamente aggiornata nel maggio 2008 (revisione n. 2)

La revisione n. 3, pubblicata nel 2010, si rese necessaria per meglio esplicitare i concetti della qualità, perfezionare alcuni aspetti propriamente tossicologico-forensi ed introdurre le procedure relative alla determinazione dell'alcolemia con finalità forensi.

Nell'ottica del concetto delle periodiche revisioni, la presente versione (rev. n. 4) ribadisce i principi fondanti in tema di qualità cui devono attenersi le Strutture dotate di laboratori che effettuano accertamenti di sostanze d'abuso con finalità tossicologico-forensi e medico-legali su campioni biologici da vivente, tenendo conto dei più recenti aggiornamenti previsti dalla normativa vigente (specie in relazione al Codice della Strada ed alle mansioni lavorative a rischio di terzi) ponendo chiarezza nel ribadire la peculiarità di questa tipologia di accertamenti.

Fermi restando quindi i concetti già condivisi ed approvati nelle precedenti versioni anche sulla base dell'interpretazione delle norme UNI EN ISO 9000:2005; UNI EN ISO 15189:2007; UNI EN ISO 9001:2008 e del recepimento di alcuni requisiti della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, anche la presente versione si articola nelle seguenti sezioni:

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

1. SCOPO E APPLICAZIONI

Gli accertamenti di sostanze d'abuso a scopo forense sono suscettibili di miglioramento analitico continuo dovuto non solo al consolidamento di nuove metodologie e strumentazioni, ma soprattutto ai progressi scientifici nell'individuazione di nuovi marcatori specifici di abuso come anche della utilizzabilità di matrici biologiche alternative o complementari a quelli di impiego tradizionale.

Detti accertamenti, assumendo carattere di prova giudiziaria, devono possedere requisiti di certezza e di affidabilità (dimostrabili attraverso la documentazione e la tracciabilità di ogni fase analitica) nonché di trasparenza e possibilmente di uniformità nazionale.

¹La Commissione Qualità del GTFI che ha elaborato la revisione n. 4 delle Linee Guida è costituita da:

COORDINATORE

Elisabetta Bertol, Università degli Studi di Firenze
elisabetta.bertol@unifi.it

MEMBRI

Renata Borriello, II Università degli Studi di Napoli;
Marina Caligara, Università degli Studi di Milano;
Donata Favretto, Università degli Studi di Padova;
Roberto Gagliano Candela, Università degli Studi di Bari;

Elisa Saligari, Università degli Studi di Brescia;
Cristiana Stramesi, Università degli Studi di Pavia;
Sabina Strano Rossi, Università Cattolica "S. Cuore" di Roma;

MEMBRI REVISORI

Marcello Chiarotti, Università Cattolica S. Cuore di Roma;
Francesco Mari, Università degli Studi di Firenze

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)



Un elevato livello qualitativo dei risultati dei suddetti accertamenti analitici è assicurato non solo dall'utilizzo di metodi e tecniche consolidate e condivise dalla società scientifica internazionale, ma anche dall'assicurazione che gli stessi risultati provengano da Strutture culturalmente preparate, costantemente aggiornate, dotate di organizzazione efficiente e caratterizzate da elevata affidabilità nel tempo, individuandosi in queste – preferibilmente anche se non esclusivamente – le *Strutture di Tossicologia Forense accademiche*.

1.1. Scopo

Ciò premesso, l'obiettivo delle presenti *Linee Guida* è dunque riassumibile nei seguenti punti:

- diffondere e promuovere la cultura analitico-tossicologica applicata alla diagnosi a scopo forense, frutto dell'esperienza maturata negli anni dal GTFI nello sviluppo e nell'esecuzione degli accertamenti analitici e soprattutto nell'interpretazione critica dei risultati in ordine al loro significato biologico e statistico;
- favorire l'acquisizione, da parte delle Strutture dotate di *specifici* e *dedicati* laboratori per gli accertamenti di sostanze d'abuso a scopo forense, dei requisiti per un'organizzazione efficiente, efficace ed affidabile nel tempo attraverso l'adozione di un sistema di gestione per la qualità;
- mettere a disposizione delle Strutture dotate di *specifici* e *dedicati* laboratori per gli accertamenti di sostanze d'abuso a scopo forense e che dispongano di risorse culturali, umane, materiali e strumentali adeguate, uno strumento di riferimento per un corretto approccio analitico improntato all'armonizzazione e alla confrontabilità dei risultati fornendo indicazioni e raccomandazioni sulla gestione dei processi analitici, ed un riferimento per la refertazione degli accertamenti analitico-tossicologici con finalità forensi e medico legali.

1.2. Applicazioni

Le *Linee Guida*, ideate quale elemento di autodisciplina e requisito fondamentale di un sistema di gestione per la qualità, si propongono come componente essenziale di un auspicabile processo di "accreditamento all'eccellenza" per Strutture dotate di laboratori di analisi di sostanze d'abuso a scopo forense.

E' necessario, quindi, che dette strutture adottino un sistema di gestione per la qualità che esprima e verifichi la politica della qualità, basata sui seguenti principi:

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

1.3. Ambito di applicazione

Le presenti *Linee Guida* devono essere obbligatoriamente recepite ed applicate da tutte le Strutture dotate di laboratori con documentabili caratteristiche di cui al **paragrafo 1.1.**, che vogliono eseguire accertamenti di sostanze d'abuso in materiale biologico, con finalità applicativa di disposti di legge dettati dalla normativa vigente. Dette Strutture, per brevità, saranno da qui in avanti chiamate indifferentemente Strutture o Laboratori.

Le Strutture che operano in questo ambito devono pertanto attenersi ai principi enunciati nelle presenti *Linee Guida*, sotto il profilo organizzativo e metodologico, al fine di rispettare i requisiti di uniformità e verificabilità che garantiscono la sicurezza di qualità in ordine a:

- organigramma del personale, della sua qualificazione scientifica, compiti e relative responsabilità;
- procedure di acquisizione dei campioni e di analisi;
- procedure di validazione dei metodi analitici;
- criteri minimi di identificazione e quantificazione;
- valori di cut-off per i diversi campioni biologici;
- monitoraggio interno ed esterno dell'affidabilità analitica;
- modalità di stesura e di emissione del rapporto analitico o referto, con interpretazione critica del significato dei risultati e indicazione dell'ambito della loro utilizzabilità.

2. TERMINI E DEFINIZIONI

Attestazione di qualità: processo volto al miglioramento continuo della qualità, mediante il quale una Struttura si sottopone alla valutazione di un ente indipendente per la verifica del proprio operato secondo requisiti predeterminati

Analisi: il termine (così ridotto per brevità) è riferito *in questo testo* agli accertamenti analitici a scopo forense di sostanze d'abuso in campione biologico prelevato da vivente, spendibili anche come prova giudiziaria nell'applicazione di normative vigenti

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

Analisi di conferma: *Analisi* da eseguirsi *obbligatoriamente* con un metodo dotato di maggiore specificità rispetto all'*Analisi* di *screening*, fondato su principi chimico-fisici diversi, al fine di identificare specificamente una sostanza e/o i suoi metaboliti individuati in maniera presuntiva attraverso l'*Analisi* di *screening*.

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)



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

Analisi qualitativa: fornisce un risultato in termini di presenza/assenza di un analita per un valore di cut-off ove previsto da specifiche normative, o comunque predeterminato.

Analisi quantitativa: misura la concentrazione di uno o più analiti con un livello predeterminato di precisione e accuratezza.

Assicurazione della qualità: rispetto delle Procedure Documentate (gestionali e tecniche) attraverso l'applicazione rigorosa delle istruzioni operative e il monitoraggio continuo delle varie fasi della gestione del processo analitico.

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

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

Bias (inaccuratezza): misura dell'inaccuratezza di un metodo analitico quantitativo ad una determinata quantità o concentrazione di analita. Si ottiene per differenza tra il valore medio di una serie di misurazioni ripetute su aliquote diverse di uno stesso campione e il valore reale.

Campione: prelievo di matrice biologica su cui sarà eseguita l'*Analisi*.

Calibratore: campione contenente una quantità definita di analita, nota all'operatore, allestito in matrice biologica uguale o, simile a quella dei campioni da analizzare, da utilizzare per l'allestimento della curva di calibrazione.

Carry-over (effetto di "trascinamento" o "effetto memoria"): misurabile attraverso l'*Analisi* di un bianco successivamente all'*Analisi* di un campione contenente una quantità/concentrazione di analita. Se l'*Analisi* di tale bianco produce un risultato inferiore al LOD (*si veda oltre*) il *carry-over* del metodo è accettabile.

Catena di custodia: procedura documentata atta a garantire l'autenticità, l'integrità e la tracciabilità di un campione dal momento del prelievo/raccolta sino allo smaltimento; essa deve permettere, tra l'altro, di ricostruire l'iter del campione all'interno del *Laboratorio*, di conservarlo verificandone le condizioni, di preservarlo in tutte le fasi da manomissioni e adulterazioni volontarie o involontarie, nonché di individuare tutte le movimentazioni e manipolazioni del campione, con registrazione della data e dell'operatore.

Coefficiente di Variazione (CV) o deviazione standard relativa (RSD): indice di dispersione delle misure analitiche, utilizzato per misurare la precisione di una determinazione quantitativa, dato dal rapporto percentuale della deviazione standard di una serie di misurazioni, eseguite su aliquote diverse di uno stesso campione, e il valore della media aritmetica di tali misurazioni.

Controcampione (campione di revisione): campione predisposto in sede di prelievo contestualmente al campione sul quale sarà eseguita un'*Analisi*.

Controllo: campione contenente una quantità definita e nota di analita, preferibilmente diversa da quella dei calibratori, allestito in matrice biologica uguale o simile a quella dei campioni reali.

Controllo cieco: controllo non dichiarato, atto a verificare la conformità di un'*Analisi* alla rispettiva Procedura Documentata; se di concentrazione ignota all'operatore di un Laboratorio a cui tale campione è inviato o ad uno o più operatori del Laboratorio (controllo cieco ad uso interno) è utilizzato per valutare se, e in che misura, il risultato analitico prodotto soddisfa caratteristiche di qualità prestabilite (controllo di qualità interno).

Criteri di identificazione e quantificazione: insieme di criteri prestabiliti che devono essere simultaneamente e obbligatoriamente verificati al fine di attribuire il grado di specificità richiesto per l'identificazione di un analita e/o di precisione e accuratezza per la sua quantificazione

Curva di calibrazione: valutazione grafica e matematica della relazione esistente tra quantità o concentrazione di un analita e il segnale da esso prodotto.

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

Effetto matrice: effetto combinato di tutti i componenti di un campione biologico, o di un suo estratto, diversi dall'analita sulla misura della quantità dell'analita stesso.

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)



Imprecisione: caratteristica di un metodo analitico che si riferisce alla dispersione di una serie di misurazioni ripetute su aliquote diverse di un medesimo campione. Essa può essere stimata dal coefficiente di variazione ottenuto ad una determinata concentrazione o quantità di analita. E' generalmente misurata all'interno di una sessione analitica e tra sessioni analitiche diverse.

Inaccuratezza: vedi Bias

Incertezza di misura: parametro associato al risultato di una misurazione che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando ed espresso nella stessa unità di misura

Intervallo di calibrazione (o di linearità): intervallo all'interno del quale un metodo è in grado di produrre risultati quantitativi che soddisfino predeterminati criteri di accettabilità.

Limite inferiore di quantificazione, Lower Limit of Quantification (LLOQ): la concentrazione o quantità più piccola di analita che il metodo è in grado di misurare con sufficiente accuratezza e precisione.

Limite di rivelabilità, Limit of Detection (LOD): la più piccola quantità di un analita in un campione che determina un segnale distinguibile dal segnale prodotto da un controllo negativo (bianco)

Limite superiore di quantificazione, Upper Limit of Quantification (ULOQ): Concentrazione o quantità più elevata di analita che un metodo analitico è in grado di misurare con sufficiente accuratezza e precisione.

Manuale della Qualità: raccolta della documentazione concernente tutta l'attività; contiene le Procedure Documentate (Gestionali e Tecniche).

Materiale di Riferimento Certificato (Certified Reference Material CRM): campione di matrice biologica, omogeneo e stabile per un periodo di tempo specificato, contenente quantità note e certificate di uno o più analiti.

Procedure Documentate: Procedure scritte relative a tutte le attività gestionali e tecniche della Struttura

Proficiency Testing (PT): percorso di miglioramento della qualità della Struttura, generalmente su base volontaria, svolto mediante l'esame periodico di controlli ciechi al fine di individuare errori di natura sistematica o casuale e adottare le necessarie contromisure, la cui efficacia potrà essere valutata nei controlli successivi.

Referto o Rapporto analitico: è il prodotto finale del processo analitico e, in ordine ai presenti obiettivi (finalità forense) deve contenere anche commento interpretativo dei risultati analitici.

Risultato negativo: risultato inferiore al *cut-off/Valore Soglia/Valore Decisionale*.

Risultato positivo: identificazione dell'analita nel rispetto dei criteri di identificazione prestabiliti, con presenza nel campione in concentrazione superiore o uguale al *cut-off/Valore Soglia/Valore Decisionale*.

Robustezza: caratteristica di un metodo analitico riferita alla capacità di produrre nel tempo risultati validi e stabili.

Specificità analitica (o Selettività): capacità di un metodo analitico di identificare un determinato analita in presenza di altre sostanze. (quali metaboliti, prodotti di degradazione, componenti endogeni della matrice biologica, impurezze, altri xenobiotici)

Stabilità: misura la suscettibilità dell'analita a fenomeni degradativi-idrolitici di natura biotica (nel campione biologico, successivamente al prelievo) e/o abiotica (esposizione a luce, calore, pH, cicli di congelamento / scongelamento).

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

Validazione di un metodo analitico: insieme di prove atte a valutare la capacità di un metodo analitico di raggiungere gli obiettivi per i quali è stato predisposto.

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

3. PERSONALE

3.1. Direzione di una Struttura

(dotata per definizione di laboratorio per accertamenti di sostanze d'abuso a scopo forense)

La Direzione di una tale Struttura comporta l'assunzione di responsabilità professionali, organizzative, educative ed amministrative. Compito della Direzione è anche quello di compilare una relazione interpretativa (o apporre commenti interpretativi) dei risultati analitici, parte integrante del referto analitico.

Tale carica richiede il possesso di una laurea in discipline scientifiche, accompagnata da una specifica competenza in

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)



diagnostica chimico-tossicologica, ottenuta attraverso idoneo e documentabile percorso formativo di tipo universitario ovvero attraverso una provata esperienza nel settore per un periodo continuativo di almeno cinque anni, e documentata da pubblicazioni scientifiche pertinenti e da continuità nell'aggiornamento.

3.2. Organico del Laboratorio

Il personale deve possedere una preparazione specifica in campo tossicologico-analitico associata ad una documentata formazione professionale adeguata alle responsabilità specifiche e deve approfonditamente conoscere le normative vigenti relative alle analisi delle droghe d'abuso in materiale biologico. L'attività di addestramento e di aggiornamento del personale del Laboratorio deve essere documentata e conservata. La numerosità del personale preposto alle analisi di sostanze d'abuso deve essere adeguata al numero degli accertamenti svolti nel laboratorio. E' indispensabile la presenza di almeno un altro laureato in discipline scientifiche idonee, con adeguata esperienza in tossicologia analitica (documentata dal percorso formativo, dall'esperienza, dall'aggiornamento e da pubblicazioni scientifiche pertinenti) che coordini e supervisioni l'attività del personale, accertando il rispetto delle procedure e verificando in costanza i requisiti di qualità (Responsabile di Laboratorio)

3.3. Norme minime di sicurezza

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

4. PROCEDURE

4.1. Generalità

Il Laboratorio deve redigere e conservare in forma documentale le procedure relative a tutte le attività gestionali e tecniche realizzate, da includere nel Manuale della Qualità.

4.2. Procedure Documentate

Le Procedure Documentate descrivono in dettaglio tutte le attività necessarie al corretto svolgimento di ogni tipo di accertamento analitico-diagnostico che il Laboratorio dichiara di effettuare; contengono anche il metodo analitico e stabiliscono sequenze ordinate di azioni ed eventi affinché tutti i processi in esse descritti, realizzati in modo omogeneo e riproducibile, consentano di effettuare ogni *Analisi* in condizioni standardizzate.

Per l' **Attività Gestionale** sono necessarie Procedure Documentate relative a:

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

Per l' **Attività Tecnica** le Procedure Documentate devono riportare dettagliatamente:

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

Ciascuna Procedura Documentata tecnica riferita ad un metodo di *screening* o di *conferma*, deve prevedere, nell'ambito di ciascuna sessione analitica, un numero di controlli positivi e negativi commisurato alla numerosità



dei campioni da esaminare (almeno un controllo positivo e un controllo negativo ogni 10 campioni) al fine di assicurare la qualità dei risultati prodotti e adottare le azioni correttive qualora non sia rispettato il requisito dell'accettabilità dei risultati.

4.3 Gestione delle Procedure Documentate (Attività Tecniche)

Ciascuna Procedura Documentata tecnica utilizzata dal Laboratorio, sia che riproduca un metodo sviluppato da terzi e descritto in letteratura, sia che rappresenti il frutto dell'attività di ricerca del Laboratorio stesso, deve essere sottoposta a validazione ed approvata.

5. REQUISITI PER LE ATTIVITÀ ANALITICHE

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

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

Il Laboratorio **può emettere referti con validità tossicologico-forense/medico-legale** solo nel caso in cui il proprio sistema di gestione per la qualità comprenda, oltre all' *Analisi* di screening, anche l'*Analisi* di conferma e/o l'*Analisi* quantitativa.

5.2. Finalità diagnostiche e Matrici Biologiche

Le *Analisi* tossicologiche con finalità diagnostiche in ambito forense prevedono l'esame di matrici cosiddette "convenzionali" (sangue, urina) e/o di matrici "alternative" (matrice pilifera, fluido orale, sudore), i cui rispettivi esiti, da soli o in combinazione tra loro, forniscono elementi utili per una corretta diagnosi con valenza tossicologico forense/medico-legale in diverse fattispecie, quali ad esempio guida sotto l'influenza di sostanze d'abuso, idoneità alla guida, infortunistica stradale, mansioni lavorative a rischio per l'incolumità e la sicurezza di terzi, idoneità al porto d'armi, idoneità a specifiche norme concorsuali e/o contrattuali, affidamento di minori, separazioni, divorzi, annullamento di matrimonio, adozioni internazionali, diagnosi di consumo, diagnosi di intossicazione (in attualità di effetto biologico ovvero "sotto l'influenza di"), diagnosi di tossicodipendenza, ecc. Pertanto il Laboratorio che dichiara la sua competenza nell'esecuzione di accertamenti con finalità tossicologico-forense e medico-legali deve dimostrare di essere in grado di eseguire l'*Analisi* almeno su campioni biologici quali sangue, fluido orale, urina, matrice pilifera; il Direttore deve essere altresì in grado (per le caratteristiche già sopra descritte) di valutare, a seconda delle varie esigenze e richieste, la tipologia di matrice biologica necessaria e la metodologia da adottare.

Si riportano di seguito, a titolo esplicativo ma puramente esemplificativo, situazioni di frequente osservazione:

- nei casi in cui si debba valutare la "attualità d'uso di sostanze illecite", ovvero la sussistenza degli effetti prodotti da una sostanza d'abuso, le indagini devono necessariamente essere eseguite su sangue. Anche la saliva (più propriamente il fluido del cavo orale) può essere utilizzata a tale scopo, pur valutando la più ampia finestra di monitoraggio rispetto al sangue;
- per la determinazione del consumo "recente" di sostanze d'abuso (con una finestra di rilevanza temporale di ore-giorni a seconda delle caratteristiche farmacocinetiche della sostanza in questione) il campione d'elezione è l'urina. Tale campione può essere impiegato anche per la determinazione dello stato di assuntore cronico qualora l'*Analisi* sia estesa a più campioni raccolti in giorni diversi e "a sorpresa" (vale a dire con preavviso all'interessato il più breve possibile, comunque non superiore alle 24 ore);
- è inaccettabile, per diagnosticare l'effetto biologico prodotto da una sostanza d'abuso a scopo tossicologico-forense e medico-legale (ad esempio uno stato di alterazione psicofisica per uso di sostanze stupefacenti), l'impiego della matrice urinaria. Ciò dal momento che la rilevanza di una sostanza e/o di suoi metaboliti nell'urina può protrarsi anche oltre la sua completa eliminazione dal sangue (e quindi la cessazione dell'effetto biologico).
- lo stato di assuntore cronico, come pure comportamenti pregressi di uso/abuso, possono essere verificati attraverso accertamenti di matrice pilifera (campioni di capelli e/o peli). L'*Analisi* segmentale dei capelli consente di ricostruire la cronologia dell'assunzione. L'*Analisi* di peli provenienti da altri distretti corporei (ascelle, torace, pube) non permette valutazioni cronologiche attendibili, pur testimoniando l'uso pregresso, ma considerando il tempo complessivo di ricambio del pelo in una area corporea sufficientemente estesa, può essere valutata una "finestra temporale" di circa 8 mesi - un anno. Particolare cautela deve però essere posta nella valutazione e qualora si tratti di un risultato ottenuto dall'*Analisi* dei peli pubici (se espresso in termini quantitativi) la valutazione diviene più complessa, attesa la possibilità di contaminazione attraverso le urine.

5.3. Campioni biologici

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

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

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)



Tabella. Volumi e quantità **minimi** delle diverse matrici biologiche raccomandati per l'esecuzione di uno screening per sostanze d'abuso e delle relative analisi di conferma.

Matrice Biologica	Campione	Controcampione	Volume o Quantità totale
Urina	15 mL	15 mL	30 mL
Sangue per alcolemia	3mL	3 mL	6 mL
Sangue per altre sostanze d'abuso	5 mL	5 mL	10 mL
Matrice pilifera ^a	40 mg	40 mg	80 mg
Saliva (fluido orale) ^b	1 mL	1 mL	2 mL

^a in caso di analisi segmentale la quantità è riferita a ciascun segmento

^b per i campionatori commerciali, marca, modello e volume raccolto devono essere specificati nel referto.

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

Per ciascuno strumento di misurazione di peso, volume, temperatura e pH, nonché per la strumentazione analitica, il Laboratorio deve stabilire ed indicare in apposita Procedura Documentata le modalità e la cadenza della manutenzione ordinaria, del monitoraggio delle prestazioni e della taratura. Tali Procedure Documentate devono essere incluse nel Manuale della Qualità.

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

Il monitoraggio delle misure di taratura deve essere registrato in cartaceo e conservato per almeno 3 anni.

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

Il Laboratorio deve attuare un sistema di registrazione e archiviazione di tutte le informazioni in cartaceo e in forma elettronica relative alle *Analisi* strumentali eseguite, in modo che ciascuna di esse sia completamente rintracciabile e documentabile.

Nella Procedura Documentata vanno stabilite le modalità e la frequenza di *back-up* della documentazione analitica.

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

- la documentazione cartacea relativa ai campioni (es. moduli di richiesta, di accettazione, di prelievo, di trasporto);
- la documentazione, cartacea ed elettronica, relativa alla catena di custodia;
- copia del referto/rapporto analitico;
- la documentazione relativa alla certificazione (o alla verifica) del grado di purezza e della durata di validità degli standard di riferimento;
- i dati relativi alla manutenzione, al monitoraggio e alla taratura degli strumenti di misurazione e della strumentazione analitica (cfr. paragrafo 5.4) per almeno 3 anni dalla data di emissione del referto, se non diversamente indicato da normativa specifica.

6. ACCETTAZIONE, PRELIEVO, MOVIMENTAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

6.1. Accesso al Laboratorio

L'accesso al Laboratorio deve essere limitato soltanto alle persone autorizzate; il Laboratorio deve adottare misure atte a garantire che l'accesso di estranei al Laboratorio non possa avvenire né durante, né al di fuori dell'orario di operatività.

6.2. Limitazioni e cautele

I Laboratori che eseguono anche *Analisi* su reperti non biologici (es. preparati illeciti contenenti sostanze d'abuso, farmaci, miscele o altro), devono effettuare l'acquisizione, la manipolazione e lo stoccaggio di tali reperti in ambienti **diversi** rispetto a quelli in cui vengono accettati e trattati i campioni biologici onde evitare il rischio di contaminazione ambientale.

6.2.1. Accettazione di una richiesta di Analisi

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

In fase di accettazione il Laboratorio deve verificare:

- la corretta modalità di conservazione del campione durante il trasporto;
- l'idoneità della richiesta di *Analisi* e la eseguibilità della stessa da parte del Laboratorio;

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)



- l'idoneità quali-quantitativa del campione rispetto alla richiesta d'*Analisi*;
- la corrispondenza tra i dati identificativi del campione e la documentazione di accompagnamento;
- l'avvenuta acquisizione del consenso, secondo le normative vigenti.

E registrare:

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

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

- l'identificazione del soggetto mediante documento d'identità in corso di validità;
- l'informativa al soggetto sulla finalità dell'*Analisi*, sull'esecuzione del prelievo e sulle successive fasi di campionamento, confezionamento ed etichettatura dei campioni;
- la raccolta del consenso informato scritto del soggetto al prelievo e all'*analisi*;
- l'attestazione da parte del soggetto, mediante firma da apporre sul modulo di prelievo, di aver presenziato a tutte le fasi di suddivisione, confezionamento ed etichettatura dei campioni prelevati.

nonché con le registrazioni pertinenti di cui sopra.

6.2.2. Prelievo del campione

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

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

6.2.2.1 Raccolta delle urine

La raccolta delle urine deve rispettare le seguenti procedure:

- prima di accedere al luogo di prelievo il soggetto è tenuto a depositare qualunque oggetto, borsa, indumento tale da poter occultare materiale utile a adulterare o manomettere il campione urinario;
- il soggetto è tenuto a lavarsi accuratamente le mani e ad asciugarle;
- il personale consegna al soggetto il materiale per la raccolta urinaria, lo informa del quantitativo di urina che deve essere approssimativamente raccolto e lo invita a entrare nel locale di prelievo.
- il locale di prelievo deve poter garantire la possibilità di osservazione diretta o indiretta (telecamera a circuito chiuso, della cui presenza il soggetto deve essere preventivamente informato) e in esso (*ad eccezione del caso di osservazione diretta*) non devono essere presenti fonti o materiali utilizzabili per la diluizione o l'*adulterazione* del campione (sanitari o altre sorgenti d'acqua, contenitori di sapone, di disinfettanti, di detergenti ecc.).

L'adozione di queste modalità di prelievo si ritiene offra sufficienti garanzie rispetto a tentativi di adulterazione o manomissione del campione urinario. E' tuttavia possibile effettuare ulteriori controlli sul campione successivamente alla raccolta (es. temperatura, gravità specifica, creatinuria, pH). La verifica della gravità specifica o della creatinuria consentono inoltre di controllare l'eventuale diluizione del campione conseguente all'ingestione di una elevata quantità di liquidi prima della raccolta urinaria. La valutazione di questi parametri in ordine all'idoneità del campione all'*analisi* è competenza del Direttore o del Responsabile del Laboratorio, e non segue necessariamente valori chimico-clinici standardizzati.

6.2.2.2. Prelievo di Capelli

Il personale del Laboratorio che effettua il prelievo verifica se la lunghezza dei capelli è correlabile alla richiesta di *Analisi*, se i capelli presentano trattamenti estetici visibili e di possibile interferenza, richiede al soggetto informazioni utili all'esecuzione dell'*Analisi* e all'interpretazione del risultato analitico (trattamenti igienici, cosmetici, uso di lozioni, lacche, gel o di altre sostanze che potrebbero interferire con l'*Analisi*) e registra tutte le informazioni raccolte. L'operatore addetto al prelievo, munito di guanti del tipo monouso, isola una ciocca di capelli del diametro di circa 0,5 - 0,7 cm quando possibile nella zona del vertice posteriore del capo, l'attorciglia con le dita e la preleva mediante taglio con una lama affilata o con forbici il più possibile vicino alla cute. Mantenendo l'allineamento dei capelli prelevati, l'operatore divide longitudinalmente la ciocca in due parti approssimativamente uguali da destinare, rispettivamente, all'allestimento del campione e del controcampione. Il confezionamento degli stessi, a meno di



richiesta di *Analisi* della ciocca di capelli *in toto*, deve permettere l'identificazione inequivocabile dell'estremità prossimale della ciocca e impedire il disallineamento dei capelli. Inoltre, è necessario accertarsi che il prelievo di capelli sia *perfettamente asciutto* prima del confezionamento, onde evitarne la rapida degradazione. In caso contrario, è necessario attendere la completa asciugatura del campione lasciandolo a contatto con l'aria dopo averlo posto su una superficie pulita.

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

6.2.2.3. Prelievo di Sangue

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

In funzione dell'indagine da espletare può essere opportuno procedere immediatamente alla conservazione del campione e del controcampione alla temperatura di $-18/-22^{\circ}\text{C}$ a meno che l'*Analisi* non sia eseguita entro 24 h dal prelievo, nel qual caso è sufficiente la conservazione a $+2/+8^{\circ}\text{C}$. Il congelamento causa tuttavia alterazione del campione sangue intero, danneggiandone gli eritrociti.

6.2.2.4. Prelievo di sangue per la determinazione dell'alcolemia a scopi forensi

Deve necessariamente tenere in considerazione le seguenti criticità:

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

Per tali ragioni il prelievo di sangue per la determinazione dell'alcolemia a scopi forensi (ne è classico esempio la determinazione alcolemica ai fini dei disposti del Codice della Strada) richiede obbligatoriamente:

- effettuare un prelievo di sangue dedicato;
- disinfettare l'area di prelievo con un **disinfettante non alcolico**;
- aggiungere sodio fluoruro, o analogo preservante, al campione di sangue (in ragione di 100 mg NaF per 10 ml di sangue);
- in alternativa, utilizzare provette sottovuoto contenenti NaF come conservante ed un anticoagulante;
- invertire più volte la provetta ed **evitare la centrifugazione o sierazione del campione**;
- procedere in presenza del soggetto, alla suddivisione del campione in due aliquote, per ottenere il controcampione;
- procedere alla conservazione del campione e del controcampione alla temperatura di $-18/-22^{\circ}\text{C}$ (eccezione per campione analizzato entro 24 h dal prelievo sufficiente conservazione a $+2/+8^{\circ}\text{C}$)

Si ricorda che, a proposito di quanto sopra affermato riguardo alla precauzione per evitare la sierazione del campione di sangue, che la determinazione dell'alcol etilico sui derivati del sangue (plasma, siero) produce una **sovrastima** (fino anche del 20%) rispetto alla sua determinazione su sangue intero e quindi non è idonea – ad esempio – per la valutazione dei limiti normati dal Codice della Strada; pertanto una determinazione alcolimetrica su plasma o siero può avere valenza esclusivamente diagnostico-clinica.

6.2.2.5. Prelievo di Saliva

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

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

- il soggetto deve verificare che il materiale necessario al prelievo sia integro, nuovo e sigillato e deve poter scegliere il contenitore fra più contenitori messi a disposizione;
- l'esecuzione di tutte le operazioni di suddivisione, confezionamento ed etichettatura del campione e del controcampione devono essere effettuate alla presenza dell'interessato che controfirma il modulo di campionamento nonché l'etichetta del campione e del controcampione;
- la corretta preservazione del campione da qualsivoglia adulterazione, inquinamento, o dispersione di parte deve essere garantita mediante l'utilizzo di materiale idoneo, a perfetta chiusura, inviolabile o comunque sigillabile, non suscettibile di rotture in caso di urto durante il trasporto, o per *shock* termico

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)



- durante il congelamento ove questo sia necessario;
- l'iter del campione in ogni fase analitica deve essere annotato sulla modulistica relativa alla catena di custodia.

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

Nel caso in cui il campione biologico sia prelevato esternamente al Laboratorio, è possibile rikusare il materiale inviato se è documentabile:

- l'incongruità, sotto il profilo qualitativo o quantitativo, del campione biologico in relazione alla specifica richiesta d'*Analisi*, anche in considerazione delle caratteristiche farmacocinetiche dell'analita richiesto;
- la non corretta conservazione del campione durante il trasporto;
- la mancata o non verificabile (es. illeggibilità) corrispondenza tra i dati identificativi del campione e la documentazione di accompagnamento;
- l'evidenza di manomissione del campione (es. rimozione o rottura del sigillo)

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

6.3. Conservazione, manipolazione e movimentazione del campione

Il campione deve essere correttamente conservato ponendo in atto ogni precauzione e modalità "utile a preservare il campione nelle condizioni il più possibile simili a quelle al momento del prelievo".

Tali modalità devono assicurare:

- l'identificazione e l'idoneità dei luoghi di conservazione;
- la conservazione alla temperatura di +2/+8°C ovvero a -18/-22°C dei campioni:
 - di sangue per la determinazione dell'alcolemia se l'*Analisi* è eseguita entro ovvero dopo 24 h;
 - degli altri prelievi di sangue e di "saliva" se l'*Analisi* è eseguita entro ovvero dopo 24 h;
 - dei campioni di urina se l'*Analisi* è eseguita entro ovvero dopo 12 h.
- per i campioni da conservare a -18/-22°C (sangue, saliva ed urine) devono essere previsti congelatori diversi per la conservazione pre-analitica e per il successivo stoccaggio; le condizioni di conservazione dei capelli o altre formazioni pilifere devono essere tali da proteggere i campioni dall'umidità e dalla luce;
- il rispetto della catena di custodia;
- la conservazione dei campioni sia positivi che negativi sino alla produzione del rapporto analitico/referto, se non diversamente indicato da normativa specifica;
- la conservazione dei controcampioni (dei campioni risultati positivi dopo *Analisi* di conferma) per almeno 1 anno dalla data del rapporto analitico/referto, se non diversamente previsto da normativa specifica;
- per campioni giudiziari la conservazione è estesa fino a specifica autorizzazione di distruzione o eliminazione da parte del magistrato

7. METODI ANALITICI

7.1. Generalità

Per tutti i metodi analitici impiegati nel Laboratorio deve essere definita la Procedura Documentata (Attività Tecniche) inclusa nel Manuale della Qualità, con il dettaglio delle informazioni descritte nel paragrafo 4.2.

I risultati delle prove di validazione del metodo analitico originario e delle sue revisioni successive devono essere documentati, archiviati e conservati dal Laboratorio.

7.2. Metodi di *screening*

L'impiego di un metodo di *screening* trova giustificazione in un Laboratorio di Tossicologia Forense quando vi è necessità di analizzare un elevato numero di campioni in tempi brevi e a costi contenuti, con i vantaggi di elevata o totale automazione. I metodi di *screening* impiegano solitamente tecniche colorimetriche, enzimatiche, e immunochimiche. I metodi di *screening* sono tuttavia caratterizzati da ridotta specificità (dato qualitativo) ed elevata inaccuratezza (dato quantitativo) in particolare quando nel campione sono presenti più specie chimiche in grado di essere rilevate ma non discriminate dal metodo (es. composto immodificato e suoi metaboliti, varie tipologie di simili specie di composti).

Questi metodi, per le loro caratteristiche intrinseche, producono esclusivamente un risultato di tipo presuntivo, vale a dire la *probabile* negatività (assenza) o positività (presenza, meglio definita come "non negatività") del campione rispetto ad un analita, o più spesso a una classe di sostanze, relativamente a un valore di *cut-off* prestabilito dal metodo. In ogni caso, qualunque sia la specificità analitica del metodo di *screening* vale il presente assunto:

**NON PUO' AVERE VALIDITA' FORENSE UN RISULTATO POSITIVO
OTTENUTO ATTRAVERSO UN'UNICA PROVA DI SCREENING.
E' PERTANTO INDISPENSABILE
CHE TALE RISULTATO SIA VERIFICATO DA UN'ANALISI DI CONFERMA.**

Dal momento che l'esito negativo di un'*Analisi* di *screening* è generalmente accettato come valido non è sufficiente verificare che il metodo di *screening* sia in grado di minimizzare il numero di risultati falsi negativi, ma deve essere accertata (o documentata dalla ditta) la capacità del metodo a **non produrre falsi negativi**. A tale riguardo è consigliabile applicare comunque l'*Analisi* di conferma anche ad una certa percentuale randomizzata di campioni



risultati negativi allo *screening*.

Meno importante sotto il profilo forense (ma importante sotto il profilo gestionale ed economico) è che il metodo minimizzi le false positività, dal momento che qualunque esito positivo allo *screening* (come dall'assunto sopra riportato) deve *obbligatoriamente* essere sottoposto a conferma.

L'effettuazione di *Analisi* di *screening* mediante l'impiego di kit e di calibratori direttamente forniti dalle ditte produttrici è ammessa purché l'*Analisi* sia eseguita secondo le indicazioni di matrice biologica e il valore di *cut-off* definiti dal produttore, e non vi sia alcun tipo di adattamento del metodo. E' altresì da rilevare che il valore di *cut-off* definito dalla ditta produttrice di un kit analitico di *screening* potrebbe essere diverso dai valori di *cut-off* stabiliti da specifici accordi o normative. Per altro, anche nell'ambito della tossicologia forense esistono fattispecie che possono richiedere l'individuazione di valori di *cut-off* differenti. Non è, pertanto, corretto adottare incondizionatamente il *cut-off* proposto dal produttore. Nel caso in cui sia necessario individuare un valore di *cut-off* differente, il metodo di *screening* deve in ogni caso essere sottoposto a rivalidazione.

Il risultato di una *Analisi* di *screening* non può essere espresso in termini quantitativi ma unicamente sotto forma di positività (presenza) o di negatività (assenza) di un analista o classe di sostanze nel campione.

7.3. Metodi di Conferma e Metodi di Quantificazione

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

Non è accettabile l'impiego di un metodo di conferma che sia fondato sulla misurazione di un segnale analitico altamente correlato a quello dello *screening* (es. conferma di un dato immunochimico con un'altro metodo immunochimico). L'impiego di una tecnica cromatografica per confermare un dato ottenuto per via cromatografica è ammesso esclusivamente se le due tecniche separative producono risultati scarsamente correlati (ad esempio due serie di tempi di ritenzione significativamente diversi, o uso di colonne a diversa polarità etc).

L'impiego di una identica tecnica cromatografica per confermare un dato ottenuto per via cromatografica è accettabile se cambia il metodo di rivelazione abbinato alla cromatografia.

Nell'ambito della tossicologia forense, l'impiego della spettrometria di massa (MS) nelle sue molteplici possibilità metodologiche, in combinazione con una tecnica di separazione di tipo cromatografico (es. gascromatografia, GC; cromatografia liquida ad alta pressione, HPLC) o elettroforetico (elettroforesi capillare, EC) per *Analisi* di conferma ha trovato il consenso generale della comunità scientifica internazionale e nazionale.

Pertanto:

IL GTFI ADOTTA LA SPETTROMETRIA DI MASSA ACCOPPIATA AD UNA METODICA CROMATOGRAFICA COME TECNICA IDENTIFICATIVA DI ELEZIONE PER L'ANALISI DI CONFERMA

L'impiego di uno o più standard interni è *obbligatorio* sia nel caso di metodi di conferma esclusivamente qualitativa, sia nel caso di metodi di conferma e/o di quantificazione. Lo standard interno, infatti, conferisce elevata precisione e accuratezza sia alla misura della ritenzione cromatografica, sia alla quantificazione dell'analita. Essi devono essere aggiunti al campione ed ai controlli prima di qualsiasi loro trattamento preparativo. Unica eccezione a tale regola è l'*Analisi* delle formazioni pilifere per la quale l'aggiunta degli standard interni deve essere effettuata dopo le operazioni di lavaggio, di sminuzzamento (se del caso) e di pesata. Nel caso di impiego di tecniche di rivelazione mediante MS, il GTFI incoraggia l'uso di standard interni deuterati (con numero di deuteri ≥ 3) previa verifica che la quantità/concentrazione dello standard deuterato non sia tale da interferire significativamente sulla efficienza di ionizzazione (es. fenomeni di competizione) o sulla quantificazione (es. contributi isotopici) dell'analita. La stabilità degli standard interni durante tutto il trattamento e l'analisi del campione deve essere preventivamente accertata o verificata.

7.3.2. Criteri Minimi di Identificazione

La scelta di tali criteri, e dei rispettivi intervalli di tolleranza, può variare in relazione alle tecniche di *Analisi* strumentale impiegate nel *Laboratorio* ma deve comunque attenersi alle indicazioni di eventuale normativa di riferimento, e comunque a quanto generalmente accettato dalla comunità scientifica.

Si definiscono di seguito i criteri minimi di identificazione per le tecniche di *Analisi* strumentale più diffuse:
Analisi cromatografica: il tempo di ritenzione relativo dell'analita rispetto al corrispondente standard interno deve essere compreso entro $\pm 1\%$ (GC) o $\pm 2\%$ (HPLC) di quello prodotto dal corrispondente analita nel controllo positivo.

Analisi MS in scansione (full scan, con ionizzazione ad impatto elettronico o ionizzazione chimica):

- presenza nello spettro incognito di tutti gli ioni dello spettro del composto di riferimento (controllo positivo o spettro di libreria) con intensità relativa al picco base $\geq 10\%$, incluso lo ione molecolare e gli ioni del cluster isotopico se $\geq 10\%$; come criterio minimo devono essere presenti almeno 4 ioni con abbondanza $\geq 10\%$;
- le abbondanze relative di tali ioni nello spettro incognito devono essere comprese in un intervallo di tolleranza ($\pm 20\%$) rispetto al corrispondente valore ottenuto per il composto di riferimento
- la presenza nello spettro incognito di frammenti ionici assenti nello spettro di riferimento deve essere spiegabile con la parziale co-eluzione di componenti della matrice;

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)



Analisi MS mediante monitoraggio di ioni specifici (Selected Ion Monitoring, SIM):

- devono essere scelti almeno 3 frammenti ionici (ove possibile includenti lo ione molecolare o un suo addotto in dipendenza della tecnica di ionizzazione utilizzata) escludendo ioni isotopici e derivati da perdite aspecifiche, nonché essere diagnostici dell'intera struttura molecolare e, se possibile, corrispondere a porzioni diverse della molecola;

Analisi mediante MS tandem (MS-MS) in modalità di scansione degli ioni prodotto (product ion scan):

- lo ione precursore deve essere isolato con la minima ampiezza possibile, compatibilmente con l'intensità del segnale, al fine di escludere interferenze;
- valgono inoltre gli stessi principi dell'*Analisi MS in scansione*

Analisi MS-MS in modalità Selected Reaction Monitoring (SRM):

- devono essere acquisite almeno 2 transizioni ione precursore → ione prodotto e lo ione precursore residuo dopo frammentazione (*surviving ion*) deve essere rilevabile;
- lo ione precursore può essere lo stesso, purché i frammenti delle transizioni siano specifici di porzioni diverse della molecola e, per almeno una transizione, deve essere lo ione molecolare o un suo addotto (dipendendo dalla tecnica di ionizzazione); gli ioni prodotto non devono risultare da perdite aspecifiche (es. perdita di H₂O).

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

Utilizzando tecniche di conferma di massa (tecnica di conferma elettiva per il GTFI) è consigliato l'impiego del sistema degli *Identification Points* (IP) adottato con *Decisione della Commissione Europea 2002/657/EC in attuazione della Direttiva 96/23/EC del Consiglio dell'Unione Europea relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (G.U. dell'Unione Europea L 221 del 17.8.2002)*. Nel caso in cui il metodo di conferma abbia anche obiettivi di quantificazione, oltre ai criteri minimi di identificazione esso deve soddisfare i criteri minimi di quantificazione.

Se il metodo di conferma ha valenza esclusivamente di conferma qualitativa rispetto a un valore di *cut-off* prestabilito, l'errore di misura (combinazione di precisione e accuratezza/bias) in corrispondenza di tale valore deve essere noto, evidenziato e sottratto al valore effettivamente misurato, riferendo la positività esclusivamente ai casi in cui il valore misurato, sottratto dell'errore di misura, risulti ancora superiore al *cut-off*.

L'analisi di controlli positivi per concentrazioni prossime al *cut-off* (es. $\text{cut-off} \pm 25\%$) permette di verificare le prestazioni del metodo qualitativo in tale ambito critico.

Il risultato di un'*Analisi* di conferma di tipo qualitativo deve essere espresso esclusivamente sotto forma di positività (presenza) o di negatività (assenza).

7.3.3. Criteri Minimi di Quantificazione

È necessaria la valutazione quantitativa di un congruo numero di controlli negativi e di controlli positivi. Tali controlli, alla lettura sulla curva di calibrazione utilizzata per il batch, devono avere una concentrazione corrispondente a quella attesa entro un prefissato intervallo di tolleranza dichiarato nella Procedura Documentata. Qualora tale criterio non fosse rispettato deve essere riesaminata, contestualmente ai campioni, la curva di calibrazione completa. I controlli positivi devono essere distribuiti in maniera uniforme nell'ambito dell'intervallo di calibrazione, prevedendo anche controlli inferiori al *cut-off* (es. -50% del *cut-off*) e controlli a concentrazioni elevate (es. 200% del *cut-off*, ULOQ). Lo standard utilizzato per la preparazione dei controlli positivi e la quantificazione di un analita (e il relativo standard interno) deve essere di composizione e purezza certificata e in corso di validità. Qualora non disponibile in commercio è ammesso l'uso di uno standard non certificato purché il *Laboratorio* ne abbia verificato e dichiarato nella Procedura Documentata il grado di purezza (cfr. paragrafo 5.5.).

Il risultato di un'*Analisi* quantitativa deve essere espresso in un'unità di misura uniforme, tale da escludere dubbi interpretativi, direttamente confrontabile con eventuali valori di riferimento (*cut-off*) e, preferibilmente, accettata dal Sistema Internazionale di Unità di Misura (SI). Si ritiene inoltre opportuno utilizzare al massimo due cifre significative dopo arrotondamento, se non diversamente previsto.

7.3.4. Determinazione dell'alcolemia a scopi forensi

Tenendo presente quanto descritto al paragrafo 6.2.2.4. in tema di prelievo in tale peculiare fattispecie, il GTFI dichiara

TECNICA D'ELEZIONE PER LA DETERMINAZIONE DELL'ALCOLEMIA A SCOPO FORENSE LA GASCROMATOLOGRAFIA CON CAMPIONAMENTO DELLO SPAZIO DI TESTA (HS-GC)

In tal caso, il metodo deve essere in grado di quantificare nell'intervallo di calibrazione compreso tra 0,05 e 3,0 grammi/litro (g/L), con imprecisione e inaccuratezza ai valori di 0,05 - 0,1 - 0,5 - 0,8 - 1,5 g/l non superiori al 10%. Il LLOQ del metodo deve essere inferiore a 0,05 g/l.

Al di sotto di questo valore il campione deve considerarsi negativo.

Si ribadisce che per quanto attiene la determinazione alcolemica, **non è valida ai fini forensi ogni determinazione eseguita su derivati ematici** (cfr. paragrafo 6.2.2.4.).

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)



7.4. Validazione di un metodo analitico

La validazione deve essere effettuata, prima dell'applicazione del metodo analitico in routine, per ciascun metodo sviluppato dal *Laboratorio* ovvero ripreso o adattato dalla letteratura scientifica. La validazione deve essere inoltre nuovamente eseguita in tutti i casi in cui, per qualsiasi ragione, il *Laboratorio* stabilisce di aggiornare/modificare un metodo analitico. In tal caso dovranno essere rieseguite solo le prove relative ai parametri che il Responsabile della Qualità ritiene possano essere stati influenzati dalle modifiche apportate al metodo. La validazione di un metodo quantitativo deve includere, come requisiti minimi, i seguenti parametri, già precedentemente descritti:

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

La scelta dei parametri da includere nelle prove di validazione deve tenere conto anche della frequenza di impiego di un metodo analitico.

7.5. CUT-OFF

Ribadendo il carattere del tutto convenzionale del valore di cut-off (o Valore Soglia o Soglia Decisionale) per stabilire la negatività ovvero la positività di un campione e ribadendo altresì che esso non coincide necessariamente con i valori LLOQ né LOD, si riportano nelle **TABELLE IN APPENDICE** i valori di cut-off di screening e/o di conferma adottati dal GTFI per l'urina, per il sangue intero, per i capelli e altre matrici pilifere, per il fluido orale ("saliva"). Si sottolinea che i cut-off elencati nelle suddette Tabelle consentono esclusivamente di discriminare tra negatività o positività analitica di un campione rispetto ad una determinata sostanza/metabolita, mentre l'interpretazione diagnostica di un risultato analitico coinvolge necessariamente la valutazione di molteplici altri aspetti.

8. REFERTO O RAPPORTO ANALITICO

8.1. Requisiti del rapporto analitico

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

Il rapporto analitico deve contenere almeno i seguenti elementi:

- titolo;
- dati identificativi del Laboratorio;
- numero di identificazione del rapporto analitico (es. numero progressivo). Se il rapporto consta di più pagine esse devono essere numerate progressivamente con indicazione del numero totale di pagine;
- nome del richiedente;
- nome e cognome e data di nascita del soggetto (ovvero, se richiesto, codice alfanumerico anonimo) da cui è stato prelevato il campione oggetto dell'*Analisi*;
- tipo di accertamento richiesto e relativa finalità;
- data e ora del prelievo (se noti al *Laboratorio*);
- data di accettazione;
- data di refertazione;
- descrizione del campione oggetto dell'*Analisi* (con dettaglio di eventuali anomalie);
- indicazione dell'*Analisi* eseguita;
- indicazione dell'eventuale tecnica di screening utilizzata;
- risultato dell'*Analisi* di screening e relativo cut-off;
- indicazione della tecnica di conferma e/o quantificazione;
- risultato dell'*Analisi* di conferma con relativa unità di misura (in caso di risultato quantitativo) e relativo cut-off;
- legenda che descriva il significato di abbreviazioni o terminologie inusuali
- interpretazione dei risultati analitici, compresa la valutazione sui limiti di utilizzabilità del risultato;
- nome e firma del Direttore del Laboratorio (e facoltativamente dell'analista)

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)



9. ASSICURAZIONE DELLA QUALITA'

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

L'assicurazione della qualità assume un ruolo peculiare nelle attività analitiche di cui alle presenti Linee Guida trattandosi di accertamenti con finalità tossicologico-forensi e medico-legali che rispondono a dettati normativi; per di più i risultati di detti accertamenti possono spesso assumere anche rilevanza di "prova giudiziaria". Devono quindi essere adottati meccanismi in grado d'identificare eventuali errori e rimedi per evitarne il ripetersi; tali meccanismi generano fiducia che il Laboratorio possa soddisfare i requisiti di qualità del proprio operato. L'assicurazione della qualità coinvolge tutti i processi che si svolgono all'interno del Laboratorio, dalla raccolta ed accettazione dei campioni biologici, allo svolgimento dell'*Analisi*, alla validazione dei risultati ed alla refertazione degli stessi.

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

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

L'assicurazione della qualità si raggiunge attraverso un sistema di controllo di qualità interno. Tale controllo deve riguardare **almeno** i parametri riguardanti:

- accettazione dei campioni (es. quantità e qualità);
- conservazione dei campioni e contro campioni (monitoraggio temperature, identificazione dei ed accesso ai luoghi di conservazione);
- strumentazione analitica (manutenzione ordinaria, verifica di funzionamento, taratura);
- *Analisi* (utilizzo di controlli positivi e negativi, controlli ciechi, carte di controllo, proficiency testing);
- refertazione (completezza della compilazione)

Infine vuole esser ribadito quanto riportato nella sezione dedicata agli obiettivi delle presenti Linee Guida, a proposito delle caratteristiche uniche (non mutuabili con altra tipologia di accertamenti) che devono possedere accertamenti analitici di tossicologia forense, che, avendo anche validità medico-legale, devono essere prodotti in Strutture culturalmente preparate, tecnologicamente attrezzate e costantemente aggiornate, consapevoli della necessità di perseguire e mantenere un elevato livello di qualità secondo metodologie accertative e criteriologie interpretative condivise dalla società scientifica internazionale.

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)



APPENDICE

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

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

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

Valori di cut-off di conferma nel sangue intero.

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

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)



Valori di cut-off in matrice pilifera

(il GTFI ritiene non validi metodi di screening immunochimici per questa matrice biologica in quanto ancora forieri, per la maggior parte, di risultati "falsi negativi")

Classe di sostanze o sostanza	Cut-off/ conferma (ng/mg)
Oppiacei morfinina codeina 6-acetilmorfina	0,2 0,2 0,2
Cocaina (cocaina) cocaina benzoilecgonina ecgonina metilestere cocaetilene	0,5 0,05 0,05 0,05
Amfetamina e congeneri amfetamina metamfetamina	0,2 0,2
3,4-Metilendioossimetamfetamina e congeneri MDMA MDA MDEA MBDB	0,2 0,2 0,2 0,2
Metadone metadone EDDP	0,2 0,2
Cannabinoidi THC THC-COOH	0,05 0,001
Buprenorfina buprenorfina norbuprenorfina	0,01 0,01

Valori di cut-off di screening e di conferma nel fluido orale

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

•