



Documento di consenso Gruppo di Studio GDS di Farmacotossicologia clinica e doping SIBioC e Gruppo Tossicologi Forensi (GTFI) - sulle indagini di laboratorio per la determinazione delle sostanze d'abuso.

Donata Favretto¹, Simona Pichini², Paolo Bucchioni³, Roberta Pacifici².

1. Università di Padova - Laboratorio Tossicologia Azienda Ospedaliera di Padova.
2. Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore Sanità.
3. ASL 5 Liguria - Laboratorio Tossicologia Levante Ligure.

Introduzione

Sebbene la diffusione di innumerevoli nuove molecole psicoattive rappresenti un'importante e crescente sfida per i Laboratori che eseguono accertamenti tossicologici, il maggior carico di lavoro per queste strutture rimane l'attività quotidiana di ricerca e determinazione, in differenti matrici biologiche, di molecole ben conosciute sia da un punto di vista chimico-analitico che tossicologico, come oppiacei, cocaina, cannabinoidi, amfetamine, metadone, buprenorfina ed alcol etilico.

Le richieste che giungono ai Laboratori possono riguardare, oltre ai quesiti clinici, anche le procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza e di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope nei lavoratori che svolgono mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi, le determinazioni analitiche volte ad accertare violazioni del Nuovo Codice della Strada ed artt.589-bis e 590 del Codice penale, gli accertamenti per la revisione dei requisiti della patente di guida, gli accertamenti di morte con criteri cerebrali, o altre istanze da Prefettura, Tribunale, Tribunale dei Minorenni, Procura ecc.

Trattasi quindi di accertamenti a finalità medico-legale, la cui varietà di tipologie, ha contribuito all'adozione da parte del singolo Laboratorio di modalità operative personalizzate e fra loro estremamente disomogenee.

Lo scopo di questo documento è quello di fornire ai Laboratori di Strutture del Servizio Sanitario Nazionale che progettano di effettuare o che già effettuano attività accertative con finalità medico-legale, delle raccomandazioni condivise a livello nazionale che tengano conto delle buone pratiche di laboratorio riconosciute a livello internazionale per effettuare accertamenti analitici precisi ed accurati in modo che essi possano far propri i requisiti necessari ad erogare un servizio di elevata qualità.

Con il presente documento si intende:

- riassumere in pochi punti essenziali i fondamenti di un contesto operativo di qualità per i Laboratori che eseguono analisi per le sostanze d'abuso a fini sia clinici che medico-legali;
- richiamare raccomandazioni già condivise a livello nazionale e già espresse nelle Linee Guida dei GTFI e dell'ISS che rappresentano comunque i Documenti di riferimento;
- assicurare che le procedure operative messe in atto dal Laboratorio producano un risultato accurato e legalmente difendibile;
- definire, per tutti i Laboratori che eseguono questa tipologia di esami, criteri comuni di assicurazione e controllo della qualità accreditabili da un organismo esterno.

I PUNTI DEL DOCUMENTO DI CONSENSO:

1 – CAMPIONAMENTO

Prelievo e raccolta dei campioni biologici generalmente avvengono in punti diversi dal Laboratorio ove saranno curate anche le modalità di consenso.

Devono essere adottati adeguati protocolli di prelievo e raccolta dei campioni biologici che evitino la sostituzione o alterazione/adulterazione dei campioni stessi, ed una CATENA DI CUSTODIA che identifichi univocamente ed accompagni i campioni, documentando dove si trovano e a chi sono affidati presso il punto di prelievo/raccolta, durante il trasferimento al Laboratorio, per tutto il tempo del processo analitico e dopo la refertazione (conservazione a fini di controanalisi).

E' indispensabile che l'incaricato all'accettazione del campione in Laboratorio consideri con attenzione, all'arrivo dello stesso, se sia presente o meno la catena di custodia, se essa sia stata correttamente compilata, se i campioni siano integri e correttamente conservati. Altrimenti, dovrà segnalare una NON CONFORMITA' che dovrà essere risolta prima di procedere ad analisi ed emettere un referto.

E' indispensabile sempre prelevare più aliquote del campione (ad esempio due o più provette di sangue) o la suddivisione in più aliquote di un unico prelievo/raccolta (es. due o più provette di urina, suddivisione di ciocche di capelli)

2 – DETERMINAZIONE ANALITICA

La determinazione di sostanze d'abuso e/o metaboliti nelle differenti matrici biologiche con finalità medico-legali richiede che siano eseguite per ogni campione ed ogni richiesta almeno due diverse procedure analitiche, su due diverse aliquote dello stesso campione. La prima procedura può avere carattere di screening (cosiddetto primo livello) mentre la seconda ha caratteristiche di conferma (cosiddetto secondo livello)

NON può avere validità forense (medico-legale) un risultato positivo ottenuto con un'unica prova di screening.

E' necessario che il risultato sia verificato da analisi di conferma specifica e basata su principi chimico-fisici diversi dalla precedente.

I Laboratori che effettuano analisi per la determinazione di sostanze d'abuso e/o metaboliti nelle differenti matrici biologiche con finalità medico-legali, devono essere dotati di strumentazione per analisi di screening e/o strumentazione per analisi di conferma utilizzando procedure separative cromatografiche ed accoppiate alla spettrometria di massa come sistema di rivelazione. Tali strumentazioni possono essere utilizzate anche per analisi di screening, mentre sono necessarie e non sostituibili per le analisi di conferma.

La determinazione dell'alcoemia su sangue intero (e non su siero o plasma, che sono invece adatti a soddisfare un quesito clinico-diagnostico) può essere eseguita sia in gas cromatografia in spazio di testa con rivelatore a ionizzazione di fiamma che in gas cromatografia in spazio di testa con rivelatore spettrometrico di massa, prevedendo sempre l'analisi di due o più aliquote di sangue.

Il PERSONALE operante nel Laboratorio deve essere adeguatamente formato all'utilizzo di suddetta strumentazione e all'interpretazione analitica del risultato.

Tutte le procedure di analisi (metodi) devono essere adeguatamente validate in laboratorio prima del loro utilizzo, seguendo i dettami di Linee Guida internazionali.

E' necessario un SISTEMA di GESTIONE in QUALITA' (norme ISO) del processo analitico che preveda l'uso di controlli di qualità interni, che la partecipazione a programmi di controlli di qualità esterni (proficiency testing).

3 – QUESITO

E' indispensabile che il dirigente Responsabile del Laboratorio consideri con attenzione il QUESITO relativo all'accertamento richiesto e identifichi la finalità clinica/medico-legale, anche ai sensi della vigente normativa di Legge (ad es. art. 186 o art. 187 NCdS)

E' fondamentale valutare se la MATRICE BIOLOGICA inviata (urina, sangue, siero, plasma, formazioni pilifere, saliva o altro) sia idonea a soddisfare il quesito suddetto ed aprire una non conformità nel caso l'indagine non possa essere svolta per inidoneità della matrice. (ad es. richiesta ex art.186 NCdS e prelievo di siero).

4 – CONSERVAZIONE CAMPIONI

In assenza di disposizioni di Legge, eseguite le analisi, è necessario conservare i campioni richiesti dall'Autorità Giudiziaria, sia negativi che positivi, per un periodo NON INFERIORE AI 12 MESI. Di tale periodo va dato atto agli aventi diritto (indagato, autorità giudiziaria), dichiarandolo nel referto.

Per i campioni derivanti da quesiti medico-legali di altra natura (Idoneità alla guida, D.L. 81/2008 o altro, il cui richiedente sia diverso dall'Autorità Giudiziaria), sarà sufficiente la conservazione dei soli campioni positivi per un periodo che il laboratorio giudicherà opportuno rispetto alle esigenze del titolare della richiesta.

E' consigliabile altresì conservare i campioni positivi per sostanze d'abuso giunti al Laboratorio con quesito CLINICO per ALMENO 6 MESI, perché potrebbero comunque essere oggetto di giudiziale sequestro da parte della Autorità Giudiziaria, anche se rimane valido il concetto della NON CORRETTEZZA dell'utilizzo a fini forensi di un liquido biologico già analizzato e manipolato.

•

5 – REFERTAZIONE

I test di screening forniscono risultati qualitativi: negativi o presuntivamente positivi.

I campioni risultanti allo screening PRESUNTIVAMENTE POSITIVI (ovvero NON NEGATIVI) devono essere sempre sottoposti ad un più specifico test di conferma se la tipologia di richiesta ha una finalità medico-legale oppure ai sensi di Legge (D.L. 81/2008 e Intesa Conferenza Unificata).

Se è necessario refertare i risultati di un test di screening ottenuto con tecniche immunochimiche o enzimatiche (ad esempio nel caso di quesito clinico oppure di test iniziale nel controllo dei lavoratori), va indicato il solo valore QUALITATIVO.

Ove esistenti dei cut-off di Legge (D.L. 81/2008 e Intesa Conferenza Unificata), il valore qualitativo POSITIVO/NEGATIVO va indicato rispetto al cut-off di Legge.

Negli altri casi, è necessario riferire il valore qualitativo POSITIVO/NEGATIVO ai cut-off indicati e validati dal produttore del prodotto commerciale che ha installato la metodica di screening in Laboratorio. Suddetti cut-off vanno comunque indicati nel referto.

Se il metodo di screening non utilizza una tecnica immunochimica o enzimatica (es. una tecnica separativa cromatografica con idoneo rivelatore), il Laboratorio avrà cura di validare il proprio metodo identificando anche in tal caso adeguati limiti di rilevazione che permettano di ridurre al minimo i falsi negativi, assicurando nel contempo la possibilità di conferma dei presunti positivi. Il limite di rilevazione del metodo dovrà essere coerente con le conoscenze scientifiche farmacotossicologiche di merito ed adeguato alle caratteristiche del metodo di conferma utilizzato.

Se ESISTONO cut-off di Legge per le analisi di conferma, discriminanti un negativo da un positivo rispetto alla concentrazione di una sostanza (D.L. 81/2008 e Intesa Conferenza Unificata), nella refertazione andrà indicato sia il superamento o meno di tale cut-off (Positivo o Negativo) che il corrispondente dato QUANTITATIVO per i soli risultati positivi.

In ASSENZA di “cut-off” interpretativi di legge per le analisi di conferma, devono essere utilizzati quelli stabiliti da Linee Guida se esistenti (es. GTFI e ISS) o da panels di esperti nazionali ed internazionali e comunque dovranno essere valori condivisi dalla Comunità Scientifica.

E’ consigliabile riportare nel referto finale di un campione positivo confermato insieme al valore numerico quantitativo, i dati relativi all’INCERTEZZA ANALITICA del metodo applicato, come calcolata durante il protocollo di validazione.

Non è appropriato refertare “tracce” di sostanze non quantificate.

6 – CONSERVAZIONE REFERTI

I referti con la documentazione relativa alla catena di custodia devono essere conservati per un tempo non inferiore ai 5 ANNI, salvo i casi previsti di conservazione illimitata (es. cartella clinica).

Bibliografia

1. Bertol E, Lodi F, Mari F et al. Trattato di tossicologia Forense Ed. CEDAM,Padova 1994.
2. Ventura M, Pichini S, Ventura R, et al. Stability studies of principal illicit drugs on oral fluid: preparation of reference materials of external quality assessment schemes. *Therapeutic Drug Monitoring* 2007;29:662-5.
3. Articoli 186 e 187 del Nuovo Codice della Strada (GU Serie Generale n.114 del 18-5-1992 Suppl. Ordinario n. 74)
4. Pichini S, Bucchioni P., Pellegrini M.,Pacifici R, Procedure operative per la determinazione delle sostanze d'abuso su sangue. Sito ISS <https://iss-ofad.azurewebsites.net/>
5. Pichini S, Pacifici R, Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella saliva, ISS, Roma,2013.
6. Plebani M, Sciacovelli L, Aita A et al. Performance criteria and quality indicators for the pre-analytical phase. *Clin Chem Lab Med*, 2015,53:943-8.
7. Pichini S, Pacifici R. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera. ISS,Roma,2013.
8. Pichini S, Pacifici R Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nelle urine. ISS,Roma,2013.
9. Chiarotti M, De Giovanni N, Fucci et al. 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.
10. Cone E Legal,workplace and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale. *Forensic Sci Int* 2001;121:7-15.
11. Verstraete AG, Pierce A Workplace drug testing in Europe. *Forensic Sci Int* 2001;121:2-6.

12. Scarlata S, Chiarotti M, Fucci N et al. 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.
13. Michael Walsh J., Verstraete A.G., Huestis M.A, and Morland J. Guidelines for research on drugged driving . Addiction, Agosto 2008 103(8):1258-1268.
14. Società Italiana di Medicina Legale www.simlaweb.com
15. SAMSHA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration). Department of Health and Human Services, Rockville, Maryland: Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs. Federal Register 2004;79:19644-73.
16. Walsh JM, de Gier JJ, Christopherson AS et al. Drugs and driving. Traffic Inj Prev 2004;5:241-53. Review.
17. 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.
18. Ferrara SD Doping Antidoping. Ed. Piccin Nuova Libreria - Padova 2004.
20. Zuccaro P, Pichini S, Altieri I et al. Proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici – Rapporti ISTISAN 96/29 (1996) 26-36.
21. Pichini S, Palmeri A, Pellegrini M et al. Proposta di linee guida per l'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nei capelli – Rapporti ISTISAN 99/24 (1999) 1-34.
22. Borriello R, Caligara M, Chiarotti M et al. Linee guida per i laboratori di analisi delle sostanze di abuso in campioni biologici. Boll Farmacodip Alcool 2002; XXV:19-26.
23. Society of Forensic Toxicology www.soft-tox.org
24. European Workplace Drug Testing www.ewdts.org
25. Substance Abuse and Mental Health Services Administration www.samhsa.gov
26. The International Association of Forensic Toxicologists www.tiaft.org
27. National Institute on Drug Abuse www.nida.nih.gov
28. Chiarotti M, Borriello R, Gigli F et al. 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.
29. Scritti in onore del Professore Emilio Marozzi. Med Leg Quad Cam 25,3,2003.
30. International Organization for Standardization, www.iso.ch/iso/enISOonline.frontpage
31. www.ministerosalute.it
32. www.poliziadistato.it/pds/stradale/nuovo_cds/index.html
33. www.interno.it/legislazione/

34. 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.
35. www.giustizia.it/cassazione/leggi/dlgs626_94.html
36. Flanagan RJ, Connally G, Evans JM. Analytical toxicology: guidelines for sample collection postmortem. *Toxicol Rev* 2005;24:63-71.
37. Verstraete AG. Detection times of drugs of abuse in blood, urine and oral fluid. *Ther Drug Monit* 2004;26:200-205.
38. Vandevenne M, Vandebussche H, Verstraete A Detection time of drugs of abuse in urine. *Acta Clin Belg* 2000;55:323-33.Review.
39. 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.
40. 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.
41. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB et al *Le basi farmacologiche della terapia*. Ed. McGraw-Hill Milano 1997.
42. Flanagan RJ, Connally G. Interpretation of analytical toxicology results in life and at postmortem. *Toxicol Rev* 2005;24:51-62.
43. Drummer OH. Review:pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Sci Int* 2005;150:133-42.
44. Kadehjian L. Legal issues in oral fluid testing. *Forensic Sci Int* 2005;150:151-60.
45. 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.
46. 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.
47. Cone EJ. Saliva testing for drugs of abuse. *Ann. NY Acad Sci* 1993; 694:91-127.
48. 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.
49. 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.
50. 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 *biochimica clinica*, 2006vol30,n2,105
Tossicologia Guest Editor: Marcello Chiarotti

51. Kidwell DA, Holland JC, Athanaselis S Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chromatogr B*, 1998;713:111-35.
52. Villain M, Cirimele V, Kintz P. Hair analysis in toxicology. *Clin Chem Lab Med* 2004;1265-72. Review.
53. Kronstrand R, Nystrom I, Strandsberg J et al. Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MSMS. *Forensic Sci Int.* 2004;145:183-90.
54. Society of Hair Testing www.soht.org
55. 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.
56. 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.
57. Hilary J. Burch, Elisabeth J. Clarke, Alison M. Hubbard, Mich Scott-Ham. Concentration of drugs determined in blood samples collected from suspected drugged drivers in England and Wales. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 20 (2013) 278 - 289
58. Maurer HH. LC/MS analysis of drugs of abuse. TIAFTnet On-line Reviews www.tiaft.org
59. MacLafferty FW Tandem mass spectrometry. *Science.* 1981;214:280.
60. Ferrara SD, Brusini G, Maietti S et al. Proficiency testing for psychoactive substances in Italy. *Int J Legal Med* 1999;113:50-4.
61. Colucci AP, Gagliano Candela R. Validità del dato analitico del laboratorio chimico clinico e tossicologico – *Boll Farmacodip Alcol.* 2004;XXVII:37-46.
62. Lodi F, Marozzi E. *Tossicologia forense e chimica tossicologica* Ed. Libreria Cortina - Milano 1982.
63. Oreste Dominioni Scuola di Formazione Forense "Giorgio Ambrosoli", 2013.
64. Linee Guida GTFI revisione n. 5 del 29 maggio 2017.
65. Vidali M, Evangelisti F, Petriccioni G et al. Stato dell'arte delle analisi farmacotossicologiche nei laboratori di tossicologia italiani. *BC*, 2015 Vol.39,n.2,100-107.
- 66- Intesa Conferenza Unificata, seduta del 30 ottobre 2007, ai sensi dell'rt. 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131. Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope nei lavoratori.
[http://www.ecospes.it/ upload/Conferenza Unificata 30 10 2007 1.pdf](http://www.ecospes.it/upload/Conferenza_Unificata_30_10_2007_1.pdf)
67. 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. *Rev n.4,6/12/2012.*

<http://www.droganews.it/pubdownload.php?id=3535&lg=11>.

68. Vrenna L, Giardiello D, Morani A et al. Modello organizzativo e ruolo del laboratorio tossicologico ad alta produttività per la gestione della farmacodipendenza del territorio metropolitano ASL Napoli 1, BC, 2006,Vol.30,n.2,156-168.

69. Pacifici R, Gori P, Martucci L et al. Considerazioni sulle matrici biologiche idonee alla valutazione dell'attualità d'uso di sostanze illecite" ai fini degli articoli 186 e 187 del nuovo Codice della Strada. B C 2014;38:27-31.

70. De Giovanni N, Fucci N Il laboratorio di tossicologia forense nell'ambito della diagnostica medico-legale. BC, 2006,Vol.30,n.2,98-105.