

LINEE GUIDA PER I LABORATORI DI ANALISI DELLE DROGHE D'ABUSO CON FINALITÀ MEDICO-LEGALI

revisione n. 2 (maggio 2008) a cura della
Commissione Qualità del Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)

PREMESSA AL TESTO DELLE LINEE GUIDA

Le Linee Guida “**PER I LABORATORI DI ANALISI DELLE DROGHE D'ABUSO CON FINALITÀ MEDICO-LEGALI**” sono state elaborate per la prima volta nell'anno 2000, 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, condivise dal Gruppo Tossicologi Forensi della SIMLA sono state quindi oggetto di revisione ed aggiornamento periodici:

- La revisione 1 è stata emessa a luglio 2003.

- La revisione 2 (maggio 2008) è stata intrapresa al fine di standardizzare le procedure analitiche adottate dai laboratori di tossicologia Forense. La revisione 2 è stata elaborata dalla Commissione Qualità¹ del GTFI ed approvata dal Consiglio Direttivo della stessa Società Scientifica.

E' stato ritenuto opportuno procedere alla presente revisione al fine di meglio esplicitare i concetti della qualità che dovrebbero essere presenti nel modo di operare dei laboratori che effettuano analisi di droghe d'abuso con finalità medico – legali. Inoltre sono stati perfezionati alcuni aspetti propriamente “Tossicologico Forensi” della precedente versione.

La presente revisione delle Linee Guida è stata realizzata a seguito di:

- sviluppo ed affinamento dei concetti e finalità delle “Linee Guida” già formulati dal GTF nelle precedenti versioni;
- interpretazione della norma UNI EN ISO 900:2000 “Sistemi di gestione per la qualità (Fondamenti e terminologia)”;
- interpretazione della norma UNI EN ISO 9001:2000 “Sistemi di gestione per la qualità (Requisiti)”.
- Recepimento di alcuni requisiti della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 “Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura”;

La Commissione del GTF ha ritenuto di strutturare le presenti Linee Guida articolandole in 9 sezioni:

- *Scopo ed applicazione delle Linee guida*

1) La **Commissione Qualità** del **GTFI** che ha elaborato la revisione n.2 delle Linee Guida è costituita da:

Marcello Chiarotti , Università Cattolica S. Cuore di Roma (Coordinatore);
Renata Borriello , II Università degli Studi di Napoli;
Marina Caligara , Università degli Studi di Milano;
Giampetro Frison, Università degli Studi di Padova;
Roberto Gagliano Candela , Università degli Studi di Bari;
Francesco Mari, Università degli Studi di Firenze;
Aldo Poletini, Università degli Studi di Verona
Elisa Saligari, Università degli Studi di Brescia;
Cristiana Stramesi, Università degli Studi di Pavia;
Sabina Strano Rossi, Università Cattolica del S. Cuore di Roma – Laboratorio Antidoping FMSI

- *Termini e definizioni .*
- *Personale.*
- *Procedure(procedure documentate- Procedure Operative Standard).*
- *Requisiti per le attività analitiche.*
- *Accettazione, conservazione e rintracciabilità dei campioni*
- *Metodiche analitiche.*
- *Assicurazione della qualità - controlli di qualità.*
- *Rapporto analitico o referto.*

1 SCOPO ED APPLICAZIONE DELLE LINEE GUIDA

1.1 Scopo

L'esigenza che ha ispirato il GTF per l'elaborazione di un simile documento è individuabile nei punti di seguito descritti.

- Le analisi delle droghe d'abuso con finalità medico – legali sono suscettibili di miglioramento continuo sia in fatto di consolidamento delle tecniche analitiche in uso o di acquisizione di nuove e sia in fatto d'individuazione di analiti indagabili e campioni biologici diversi dai tradizionali.
- Gli accertamenti tossicologici in tema di analisi delle sostanze d'abuso nei reperti biologici possono assumere carattere di prova giudiziaria la quale, per definizione, deve possedere requisiti certi di trasparenza ed uniformità che devono essere rintracciabili in maniera costante nell'operato di tutti i laboratori interessati al settore specifico.
- Un alto livello qualitativo dei risultati degli accertamenti tossicologici in tema di analisi delle sostanze d'abuso viene assicurato non solo dall'utilizzo di metodiche e tecniche largamente sperimentate, ma anche dalla certezza che gli stessi risultati provengano da strutture che dispongono di organizzazioni efficaci ed affidabili nel tempo.
- A livello nazionale, infine, è avvertita la forte richiesta di uniformità nel trattare, nel procedere, nell'analizzare e nell'interpretare tutti gli elementi che concorrono ai risultati degli accertamenti tossicologici in tema di analisi delle sostanze d'abuso.

Quindi lo scopo delle presenti linea guida è riassumibile nei seguenti argomenti:

- mettere a disposizione di tutti i laboratori interessati al settore specifico uno strumento, con caratteristiche operative universali, che permetta, con il suo utilizzo, un corretto approccio di tali laboratori al settore tossicologico forense;
- fornire indicazioni e raccomandazioni su come gestire ogni processo analitico;
- assicurare la messa a disposizione e la relativa gestione delle risorse necessarie;
- cautelare le strutture nelle emissioni e nella gestione dei risultati degli accertamenti tossicologici in tema di analisi delle sostanze d'abuso.

1.2 Applicazione

La stesura delle presenti Linee Guida è stata realizzata cercando di fondere i seguenti aspetti:

- diffondere e rendere applicabili i principi analitici, fondamentali per lo sviluppo delle analisi delle droghe d'abuso con finalità medico – legali, frutto di esperienze maturate negli anni dal GTF;
- far acquisire ai laboratori, che effettuano analisi di droghe d'abuso con finalità medico – legali, i requisiti di un'organizzazione efficace ed affidabile nel tempo con l'adozione di un sistema di gestione per la qualità

progettato e realizzato in base alle caratteristiche degli stessi laboratori.

Le Linee Guida, quindi, sono state ideate quale elemento di autodisciplina e requisito dichiarato fondamentale di un sistema di gestione per la qualità applicato ai laboratori che effettuano analisi di droghe d'abuso con finalità medico – legali, divenendo una componente essenziale di un eventuale processo di “accreditamento all'eccellenza”.

E' auspicabile, quindi, che i laboratori di analisi delle droghe d'abuso con finalità medico- legali adottino un sistema di gestione per la qualità che esprima e verifichi la politica della qualità decisa da ogni struttura, basata sui seguenti principi:

- eccellenza del risultato ed efficacia organizzativa;
- costante miglioramento dello standard di qualità del servizio fornito
- qualità come responsabilità di tutti;
- responsabilizzazione del personale nell'assicurare la qualità del lavoro svolto nell'ambito della propria funzione;
- diffusione della politica della qualità a tutto il personale della struttura;
- costante riesame dell'attualità della politica e dei relativi obiettivi.

1.3 Campo di applicazione

Le presenti Linee Guida devono essere recepite ed applicate da tutti i laboratori deputati all'esecuzione di analisi delle droghe d'abuso nel materiale biologico, con finalità diagnostiche medico legali, i quali saranno indicati più semplicemente come “laboratori di analisi delle droghe d'abuso” o “laboratori di analisi tossicologiche forensi”.

I laboratori autorizzati ad eseguire le suddette analisi, dovrebbero pertanto attenersi ai principi enunciati nell'ambito delle presenti Linee Guida sotto il profilo organizzativo e metodologico, al fine di rispettare requisiti - uniformi e verificabili - che garantiscano la sicurezza di qualità.

Tali requisiti riguardano:

- l'organigramma del personale, con individuazione dei compiti e delle relative responsabilità
- le procedure di acquisizione dei campioni e di analisi degli stessi
- le procedure di validazione dei metodi analitici
- i criteri minimi di identificazione e quantificazione
- i valori di cut-off per i diversi campioni biologici
- l'interpretazione dei risultati, anche in funzione dei valori di cut-off predeterminati
- il monitoraggio interno ed esterno dell'affidabilità analitica
- le modalità di emissione del rapporto analitico o referto.

2. TERMINI E DEFINIZIONI

Accreditamento: processo volontario, volto al miglioramento continuo della qualità, mediante il quale un organismo indipendente valuta se un'istituzione od un programma soddisfano requisiti predeterminati.

Analisi di conferma: seconda analisi da eseguirsi con una metodica dotata di maggiore specificità rispetto a quella impiegata per lo screening, su una differente aliquota del campione originale, al fine di identificare e/o quantificare la presenza di una sostanza o dei suoi metaboliti.

Analisi di screening: analisi preliminare che determina, in riferimento a cut-off prestabiliti, la positività o la negatività di un campione.

Analisi tossicologico-forensi o analisi delle droghe d'abuso con finalità medico- legali: con queste definizioni, ai fini delle presenti Linee Guida, sono indicate le analisi eseguite su materiale biologico per la ricerca delle droghe d'abuso che, avendo finalità medico-legali, possono assumere carattere di prova giudiziaria nell'applicazione di normative vigenti.

Batch: gruppo di campioni che viene esaminato in serie.

Analisi qualitativa: analisi tossicologica che fornisce soltanto un risultato in termini di presenza/assenza di un analita.

Analisi quantitativa: analisi tossicologica in grado di esprimere la concentrazione dell'analita nel campione biologico esaminato

Catena di custodia: procedura documentata atta a ricostruire l'iter di ogni campione all'interno del laboratorio; consente di definire l'attualità di ubicazione nel laboratorio, nonché di individuare tutti i soggetti che hanno manipolato

il campione e le rispettive date, dalla consegna/entrata in laboratorio all'eventuale movimentazione e/o smaltimento secondo le procedure vigenti.

Cut-off o valore soglia: limite di concentrazione definito, in maniera convenzionale, per stabilire se un campione è positivo o negativo.

Controllo cieco: controllo non dichiarato atto a verificare la conformità della messa in atto delle procedure previste oppure campione contenente una predeterminata concentrazione di analita o negativo, utilizzato per valutare l'abilità del laboratorio nell'esecuzione di uno specifico test; il laboratorio non conosce la concentrazione.

Controllo noto: campione contenente una quantità definita di analita, allestito in matrice biologica simile a quella dei campioni reali.

Controllo di qualità esterno: monitoraggio esterno dell'affidabilità analitica del laboratorio, valutata attraverso i risultati quali-quantitativi ottenuti dall'analisi di una serie di controlli ciechi.

Controllo di qualità interno: monitoraggio delle metodologie adottate dal laboratorio attraverso l'analisi di controlli ciechi e controlli noti.

CV: coefficiente di variazione o deviazione standard relativa, frequentemente utilizzato per misurare la riproducibilità, è dato dal rapporto percentuale della deviazione standard sul valore medio.

LOD: limite di rilevabilità; può essere calcolato in base al valore medio del bianco a cui va addizionato un valore pari, generalmente, a tre volte la deviazione standard.

LOQ: limite di quantificazione, può essere calcolato addizionando al valore del bianco, dieci volte la deviazione standard; tuttavia, è preferibile determinare il LOQ sperimentalmente valutando la concentrazione più bassa che si associa ad un CV accettabile.

Manuale della Qualità: raccolta della documentazione relativa all'attività del laboratorio; ne descrive nel dettaglio l'attività, lo scopo, il campo di applicazione, i requisiti gestionali e quelli tecnici; contiene le procedure documentate e le istruzioni operative.

Procedure Operative Standard (Metodi Interni): sequenze ordinate di azioni, eventi, necessari allo svolgimento dell'analisi in condizioni standardizzate ed in uso nel laboratorio.

Procedure documentate: descrivono le attività interfunzionali.

Istruzioni operative: descrivono i compiti nell'ambito di una sola funzione diversa dallo svolgimento dell'analisi.

Risultato Negativo: mancata identificazione dell'analita in accordo con i protocolli analitici propri del laboratorio.

Risultato Positivo: identificazione dell'analita in accordo con i protocolli analitici propri del laboratorio.

Sistema di gestione per la qualità: insieme di elementi tra loro correlati o interagenti, per stabilire politica ed obiettivi e per conseguire tali obiettivi, per guidare e tenere sotto controllo un'organizzazione con riferimento alla qualità.

Processo: insieme di attività correlate o interagenti (es.: accettazione, sviluppo analisi, rintracciabilità, refertazione, conservazione campioni, ecc.) che trasformano elementi in entrata (richiesta di svolgimento analisi) in elementi in uscita (rapporto analitico o referto con finalità medico-legali).

Prodotto: risultato di un processo.

Assicurazione della qualità: rigoroso rispetto delle procedure operative attraverso l'applicazione delle istruzioni operative con monitoraggio continuo delle varie fasi gestionali.

Tracce: espressione utilizzabile per indicare la presenza di una sostanza, analiticamente superiore al LOD, ma riconducibile ad una concentrazione inferiore al cut-off o al LOQ definiti, per il sistema analitico impiegato.

Rapporto analitico o Referto: è il prodotto del processo analitico svolto all'interno del laboratorio, corrispondente a tutte le attività, correlate o interagenti, che trasformano elementi in entrata in elementi in uscita.

3. PERSONALE

3.1 Direzione del laboratorio

La direzione del laboratorio di analisi tossicologiche delle droghe d'abuso, con finalità medico-legali, comporta l'assunzione di responsabilità professionali, organizzative, educazionali ed amministrative.

Per tale carica è necessaria una laurea in discipline scientifiche, accompagnata da una specifica competenza in diagnostica chimico-tossicologica, ottenuta attraverso idoneo e documentabile percorso formativo di tipo universitario, supportato da pubblicazioni attinenti all'esperienza pratica e da continuità nell'aggiornamento.

3.2 Organico del laboratorio

Il personale deve avere una educazione professionale adeguata alle particolari responsabilità all'interno del laboratorio e particolare conoscenza della normativa specifica dei laboratori di analisi delle droghe d'abuso.

Il direttore deve qualificare il personale del laboratorio allo svolgimento delle varie funzioni in base alla preparazione, alla cultura ed all'esperienza dei singoli, accertandosi che il personale sia costantemente addestrato ed aggiornato e

conservando registrazioni ed attestati dell'iter formativo. Deve assicurare, inoltre, il rispetto da parte del personale delle procedure che regolano l'attività del laboratorio.

Il personale preposto alle analisi deve essere adeguato in relazione al numero degli accertamenti e deve essere in grado di eseguire le procedure analitiche prestabilite.

Il numero dei procedimenti analitici deve essere commisurato all'organico del laboratorio ed alle apparecchiature in dotazione allo stesso.

E' indispensabile la presenza di almeno un laureato in discipline scientifiche idonee, con adeguata esperienza in tossicologia analitica (documentata dal percorso formativo, dall'esperienza pratica, dall'aggiornamento e da pubblicazioni) che supervisioni il lavoro, verifichi i risultati dei vari test eseguiti e riferisca al direttore sull'andamento del laboratorio.

Tale figura professionale, come previsto da un sistema di gestione per la qualità, dovrebbe essere formata per poter essere delegata dal direttore al ruolo di "Responsabile della Qualità" con compiti di sorveglianza sulle strumentazioni, sugli strumenti di misura, sull'adeguatezza dei processi, sulle possibilità di miglioramento e sul soddisfacimento delle richieste dei clienti.

3.3 Norme minime di sicurezza

Nel laboratorio debbono essere messe in atto procedure finalizzate alla tutela della incolumità degli operatori e, in particolare, deve essere fornita adeguata informazione ed indicazione delle misure di prevenzione 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 vengano rigorosamente rispettate.

La manipolazione e lo smaltimento dei materiali a rischio deve essere rigorosamente regolamentata e rispettata.

4. PROCEDURE

4.1 Generalità

Il laboratorio di analisi tossicologico-forensi deve raccogliere, in forma documentale, la descrizione dei criteri di svolgimento delle attività relative allo sviluppo di tutti quei processi identificati come necessari alla realizzazione del prodotto finale (rapporto analitico), a partire dalla fase di accettazione delle richieste di analisi e dei relativi campioni, per finire alla consegna dei rapporti analitici.

Tale documentazione può essere organizzata nel Manuale della qualità che raccoglie le procedure documentate e le istruzioni operative. In tale documentazione deve essere compresa una raccolta delle Procedure Operative Standard o Metodi Interni che descrivono in dettaglio tutte le operazioni analitiche necessarie al corretto svolgimento di ogni tipo di analisi che il laboratorio dichiara di effettuare.

La documentazione (criteri di svolgimento dei processi e Procedure Operative Standard per l'effettuazione di analisi) deve essere chiaramente identificata e completa nei suoi contenuti, aggiornata e sempre disponibile per il personale impegnato nell'esecuzione delle analisi. Deve essere emessa dal Responsabile della Qualità ed approvata dal direttore del laboratorio, con data della prima stesura e di ogni successiva revisione; gli elementi di revisione devono essere riportati sulla revisione stessa.

4.2 Procedure documentate

Le procedure documentate descrivono ogni processo realizzato nel laboratorio.

La disponibilità delle procedure documentate, costantemente aggiornate e controllate, assicura che, tramite la loro osservanza, tutti i processi previsti vengano realizzati in modo omogeneo e riproducibile.

Le procedure documentate devono prevedere:

- procedure per la definizione dei requisiti del prodotto da fornire (tipo di analisi e relativa finalità) con assistenza all'utente;
- procedure adottate per la catena di custodia;
- procedure di accettazione e di identificazione del campione;
- procedure per i controlli di qualità interni ed esterni;
- procedure di utilizzo e manutenzione delle apparecchiature;
- procedure di qualifica, formazione ed aggiornamento del personale;
- modalità di trascrizione dei risultati e redazione del rapporto analitico;
- procedure sulla tutela e riservatezza dei risultati dei dati personali sensibili e dei risultati;
- procedure di monitoraggio e miglioramento.

4.3 Procedure Operative Standard

Le Procedure Operative Standard descrivono in dettaglio tutte le attività necessarie al corretto svolgimento di ogni tipo di analisi od accertamento diagnostico che il laboratorio dichiara di effettuare; contengono una procedura o metodica analitica, fissano le sequenze ordinate di azioni ed eventi affinché l'analisi venga svolta in condizioni standardizzate.

4.3.1 *Requisiti delle Procedure Operative Standard*

Ciascuna Procedura Operativa Standard deve riportare dettagliatamente:

- finalità dell'analisi;
- principio del metodo analitico con eventuali riferimenti bibliografici;
- dettagli operativi con riferimento ai reagenti (composizione, preparazione, precauzione d'uso, conservazione, caratteristiche di instabilità o deterioramento);
- dettagli sulla matrice biologica e sul quantitativo minimo necessario per l'esecuzione dell'analisi ed eventuale ripetizione;
- preparazione del campione, dei calibratori e dei controlli;
- identificazione, sequenze di posizionamento e procedure per la preparazione degli standard;
- identificazione, funzionamento e modalità di calibrazione degli strumenti;
- criteri di accettabilità definiti per la produzione dei dati;
- caratteristiche di specificità, sensibilità, precisione e accuratezza.

Ciascuna Procedura Operativa Standard deve includere un controllo di qualità del sistema di analisi, al fine di assicurare una qualità di produzione di dati equivalente a quella del metodo validato e prevedere le azioni correttive da adottare qualora i risultati dei controlli esulino dai parametri di accettabilità.

4.3.2 *Gestione delle Procedure Operative Standard*

Ogni Procedura Operativa Standard contiene una procedura analitica (vedi sezione 7) utilizzata dal laboratorio che, prima di essere inserita nella raccolta ufficiale del laboratorio, deve essere accettata ed approvata dal direttore; ogni procedura utilizzata dal laboratorio, sia che riproduca una metodica sviluppata all'esterno (es. letteratura specialistica), sia che rappresenti il frutto dell'attività di ricerca del laboratorio stesso, deve essere supportata dai necessari requisiti di ufficialità rintracciabili nelle registrazioni relative alle validazioni dei metodi interni.

Ogni procedimento analitico deve essere svolto in assoluta ottemperanza alla relativa Procedura Operativa Standard presente nella raccolta ufficiale del laboratorio.

Ogni revisione delle Procedure Operative Standard deve essere registrata e le procedure modificate o sostituite devono comunque essere conservate in un archivio facilmente consultabile.

5 SINTESI dei REQUISITI PER LE ATTIVITÀ ANALITICHE

5.1 Controllo delle attività

Il laboratorio deve erogare i propri servizi e sviluppare i relativi processi in condizioni controllate; può adottare un sistema di gestione per la qualità applicato a tutte le attività svolte; tale sistema deve comunque comprendere tutte le attività relative ai processi dedicati ad indagini di tipo medico -legale.

Per tali attività il laboratorio deve dichiarare la conformità alle "Linee Guida".

Il sistema di gestione per la qualità, può essere limitato alla sola analisi di screening (con valutazione esclusivamente qualitativa), ovvero comprendere anche l'analisi di conferma con espressione del risultato in termini quantitativi.

Il laboratorio dovrà indicare, all'atto della dichiarazione dei propri requisiti, il campo d'estensione del sistema di gestione per la qualità.

5.2 Finalità diagnostiche

Le analisi tossicologiche con finalità diagnostiche prevedono l'esame di liquidi biologici (sangue ed urina) e/o matrici alternative (capelli, saliva, sudore), i cui rispettivi esiti, da soli o in combinazione tra loro, forniscono elementi utili per una corretta diagnosi con valenza medico-legale in diverse fattispecie, quali idoneità alla guida, infortunistica stradale, mansioni lavorative a rischio, porto d'armi, idoneità a specifiche norme concorsuali, affidamento di minori, annullamento di matrimonio, adozioni internazionali, etc.

Qualora il laboratorio debba valutare la "attualità d'uso di sostanze illecite", le indagini devono essere eseguite su

sangue.

Anche la saliva può essere utilizzata a tale scopo, ma il limite di sensibilità del metodo deve tenere conto delle concentrazioni estremamente basse di analiti in questo campione biologico. Per avere validità in ambito medico-legale, ogni risultato analitico ottenuto sulla saliva deve essere confermato tramite l'applicazione di metodi di conferma sul sangue.

Per la determinazione dello stato di assuntore cronico il campione d'elezione è l'urina, per la quale vanno effettuati prelievi seriati "a sorpresa".

Per la determinazione di comportamenti pregressi di abuso, l'analisi può essere effettuata su campioni di capelli, effettuando, se la lunghezza lo consente, analisi su sezioni seriate, al fine di poter ottenere elementi utili a stimare il periodo delle assunzioni. L'analisi di peli provenienti da altri distretti corporei (ascelle, pube, torace) necessita di valutazioni di tipo cronologico differenziate rispetto a quelle applicabili ai capelli.

5.3 Campioni biologici

Il laboratorio che dichiara la sua competenza nell'esecuzione di accertamenti tossicologico-forensi deve eseguire necessariamente l'analisi su almeno uno dei seguenti campioni biologici: sangue, urina, capelli.

La minima quantità di campione biologico ritenuta sufficiente per l'esecuzione di tali analisi deve essere chiaramente indicata nelle procedure operative standard relative al metodo interno del laboratorio per quella specifica analisi. Tale quantità deve essere congrua con la possibilità di ripetizione dell'analisi, con il numero degli analiti oggetto d'indagine, con la finalità qualitativa e/o quantitativa dell'esame.

Per ogni campione biologico debbono essere chiaramente indicate le modalità di prelievo, di conservazione, di trasporto, nonché le condizioni di stoccaggio.

6. ACCETTAZIONE, CONSERVAZIONE E RINTRACCIABILITÀ DEI CAMPIONI

6.1 Accesso al laboratorio

L'accesso al laboratorio dovrebbe essere limitato soltanto alle persone autorizzate; quelle non autorizzate dovrebbero essere accompagnate e registrate su un apposito registro.

6.2 Accettazione

Per i laboratori che eseguono anche analisi tossicologiche su reperti non biologici, l'acquisizione, la manipolazione e lo stoccaggio dei campioni biologici deve avvenire in ambienti separati per evitare il rischio di contaminazione ambientale.

Il laboratorio deve documentare l'adozione di procedure idonee affinché vengano rispettate le modalità di preservazione del campione in tutte le operazioni di laboratorio cui è necessario sottoporlo, dal campionamento sino alla restituzione e/o allo smaltimento dello stesso.

Il laboratorio deve, inoltre, fornire evidenza di tutte le operazioni cui il campione è sottoposto, adottando idonee procedure per la realizzazione di tutte le fasi necessarie per il completamento dell'intero processo.

Tali procedure debbono essere parte integrante della documentazione di supporto al sistema di gestione per la qualità (Procedure operative).

Con tali procedure il laboratorio deve definire le "modalità operative" per lo svolgimento delle attività descritte di seguito.

6.2.1 Accettazione di richiesta di svolgimento di analisi

Nel caso in cui il campione biologico sia prelevato in altra sede, in fase di accettazione il laboratorio deve, in primo luogo, verificare:

- la corretta modalità di conservazione del campione durante il trasporto;
- l'idoneità quali-quantitativa del campione con la specifica richiesta d'analisi;
- la corrispondenza tra i dati identificativi del campione e la documentazione di accompagnamento;
- l'avvenuta acquisizione del consenso, che in taluni casi (es. infortunistica stradale) deve rispettare le disposizioni di cui alla Legge 160/2007.

registrando

- data di consegna;
- richiedente;
- finalità dell'analisi;

- tipologia del campione, suo protocollo e ubicazione in attesa dell'analisi;
- elementi circostanziali (terapie in corso, etc.);
- chiara identificazione di chi effettua l'accettazione della richiesta con relativa firma.

Nel caso in cui i prelievi di campioni biologici vengano effettuati nella sede del laboratorio la fase di accettazione si realizza con:

- l'identificazione del paziente mediante documento d'identità in corso di validità;
- l'informativa e la raccolta del consenso informato;

e con le registrazioni di cui sopra.

6.2.2 Prelievo del campione

Per l'attività di prelievo all'interno del laboratorio devono essere rispettate le seguenti condizioni:

- l'accessibilità al luogo del prelievo è consentita al solo personale autorizzato, appartenente alla struttura ;
- il soggetto che deve sottoporsi al prelievo è tenuto a depositare borse ed ogni indumento non necessario (giacche, soprabiti, etc.) in luoghi diversi;
- prima del prelievo, il soggetto ha l'obbligo di lavarsi accuratamente le mani ed asciugarle, dopo potrà accedere nel locale e ricevere il materiale per il campionamento;
- nel caso di prelievo di urine, nel locale (che deve garantire, se necessario, anche la possibilità di osservazione diretta) non devono essere presenti fonti o materiali utilizzabili per la diluizione o l'adulterazione del campione (acqua corrente, contenitori di sapone, di disinfettanti, di detergenti per la pulizia del locale, etc.).
- il personale che svolge funzioni di supervisore al campionamento e quello autorizzato al prelievo devono informare "l'utente" riguardo alle modalità di campionamento, di suddivisione ed etichettatura del campione biologico (sangue, urina, saliva, capelli);
- il materiale necessario al prelievo deve essere fornito integro e sigillato; l'esecuzione di tutte le operazioni di suddivisione ed etichettatura del prelievo devono essere effettuate alla presenza dell'interessato;
- l'identificazione del campione deve essere riportato sulle etichette dei contenitori utilizzati;
- la corretta preservazione del campione da qualsivoglia adulterazione, inquinamento, o dispersione di parte va garantita mediante l'utilizzo di materiale idoneo, a perfetta chiusura, non suscettibile di rotture in caso di urto durante il trasporto, o per shock termico durante il congelamento;
- la rintracciabilità del campione, in ogni fase analitica deve essere annotata sulla modulistica relativa alla catena di custodia;
- nel caso di trasporto presso altra sede, diversa da quella di campionamento, devono essere previste condizioni che garantiscano la "catena del freddo" ed impediscano qualsiasi manipolazione dei campioni;
- per ciascun campione biologico deve essere prelevata un'adeguata quantità per l'allestimento del campione d'analisi, prevedendo anche eventuali ripetizioni, ed il controcampione per eventuali analisi di revisione.

6.2.3 Cause di esclusione e modalità di ricasazione dei campioni biologici

Nel caso in cui il campione biologico (sangue, urina, saliva, capelli) sia prelevato in altra sede, è possibile ricasare il materiale inviato al laboratorio se viene ravvisata ovvero è documentabile :

- la non compatibilità del campione biologico con la specifica richiesta d'analisi, sia in relazione alla matrice biologica inviata che in relazione alle caratteristiche farmacocinetiche dell'analita richiesto (es. sangue coagulato in riferimento all'assunzione di amfetamine, pregressa di 48 ore);
- non corretta modalità di conservazione del campione durante il trasporto;
- la non corrispondenza tra i dati identificativi del campione e la documentazione di accompagnamento;

In tutti i casi di ricasazione, va stilato dal Responsabile del laboratorio specifico rapporto di "non conformità" che definisca correttamente le cause di inutilizzabilità del campione biologico, in relazione alla specifica finalità d'indagine per il quale era stato prelevato (es. inidoneità temporale per difetto o per eccesso).

6.3 Conservazione, manipolazione e movimentazione del campione

All'interno del laboratorio devono essere predisposte procedure e modalità operative mirate alla buona conservazione del campione.

Tali modalità devono assicurare:

- L'identificazione dei luoghi di conservazione dei campioni, idonei al buon mantenimento degli stessi durante tutte le fasi del procedimento analitico. Per i campioni da conservare a bassa temperatura (sangue, saliva ed urine) devono essere previsti frigoriferi diversi, per lo stoccaggio a breve, ovvero a medio e lungo termine; la

quota da analizzare nell'immediato o entro le 48 ore va conservata in frigorifero (circa +4°C) mentre le aliquote destinate all'analisi di conferma/revisione vanno conservate circa -20°C;

- l'applicazione di opportune procedure trasversali documentate che permettano l'immediata rintracciabilità del campione in ogni fase di movimentazione dello stesso.

La "Catena di custodia" deve consentire di:

- identificare chi ha consegnato il campione;
- identificare chi ha accettato il campione;
- identificare l'ubicazione del campione;
- conoscere tutti i nominativi di coloro che lo hanno movimentato, fino alla restituzione od allo smaltimento;
- risalire alla data di ogni movimentazione.

Le registrazioni dell'applicazione di tali procedure devono essere mantenute almeno fino alla restituzione o smaltimento del campione:

- per i campioni risultati positivi, sia nei test di screening che nell'analisi di conferma, va prevista la conservazione dell'aliquota destinata all'eventuale analisi di revisione, per almeno un anno, o maggiore se diversamente regolamentato;
- il laboratorio deve adottare opportune procedure per la conservazione del controcampione.

6.4 Rintracciabilità delle analisi

Il laboratorio deve attuare un sistema di registrazione di tutte le informazioni relative alle analisi strumentali eseguite, in modo che ciascuna di esse sia completamente rintracciabile, per un tempo prefissato in base all'organizzazione gestionale del laboratorio.

Per l'archiviazione dei "file" va prevista una procedura per il "back-up", stabilendo l'organizzazione, le modalità e la frequenza di salvataggio.

6.5 Tenuta sotto controllo dei dispositivi di monitoraggio e misurazione

Il laboratorio deve individuare e monitorare le grandezze fisiche "critiche", aventi cioè influenza sulla qualità del risultato finale del procedimento analitico, per il buon mantenimento dei campioni e tenerle sotto controllo con opportuni dispositivi certificati.

Tale modalità operativa deve essere estesa anche alla strumentazione ausiliaria "critica" per l'ottenimento del livello di qualità voluto.

Tali controlli dovrebbero almeno riguardare:

- le temperature dei frigoriferi ove vengono conservati i campioni (ed anche i reagenti i quali, per la qualità del processo, devono essere conservati alle condizioni indicate dal fabbricante) utilizzando dispositivi (termometri certificati) periodicamente verificati;
- la strumentazione volumetrica utilizzata sia per il trattamento dei campioni che per la relativa preparazione utilizzando idonei dispositivi (ad esempio bilance, micropipette) periodicamente verificati.

7 METODICHE ANALITICHE

7.1 Generalità

Le metodiche analitiche devono essere sviluppate e validate in modo da assicurare la massima affidabilità del dato, sia in termini di identificazione che di dosaggio degli analiti di interesse.

Per tutte le metodiche analitiche deve essere definito il campo di applicazione relativamente alla matrice (urine, sangue intero, capelli, ecc.) e al tipo di determinazione del parametro analitico (analisi su vivente, esame tossicologico su cadavere); il metodo deve avere sensibilità idonea allo scopo e deve utilizzare i giusti indicatori per la finalità a cui è rivolto (si deve ad es. ricercare il maggior numero possibile di metaboliti per stabilire l'assunzione di una sostanza).

Le metodiche analitiche di screening devono essere orientate alla determinazione del maggior numero di sostanze/classi di sostanze con una elevata sensibilità garantendo allo stesso tempo la minore incidenza di falsi positivi; le metodiche di conferma devono mirare alla identificazione diretta di ciascun analita con una tecnica analitica che dia informazioni sulla struttura della sostanza (spettrometria di massa). Le metodiche di conferma debbono inoltre, ove richiesto, garantire la corretta quantificazione della sostanza.

Per ogni metodica di laboratorio deve esistere una descrizione della procedura da adottare e l'evidenza dell'avvenuta validazione del metodo.

Sarebbe auspicabile utilizzare per la redazione delle procedure analitiche il seguente schema:

- Scopo e campo di applicazione
- Riferimenti bibliografici
- Principio del metodo e trattamento del campione
- Reagenti e standard
- Apparecchiature e controlli strumentali
- Validazione del metodo
- Calcoli ed espressione del risultato
- Controllo qualità dei dati

Ogni procedura deve essere identificata, dotata di n° di revisione, data della revisione, modifiche apportate, autore della revisione, pagine numerate riconoscibili quali parti del documento.

7.2 Metodi di screening

Le metodiche di screening devono dare informazioni circa la possibile presenza di una o più sostanze/classe di sostanze con la massima sensibilità e specificità raggiungibili in questa sede preliminare; in particolare, ove si tratti di materiale cadaverico è necessario che lo screening dia informazioni sulla presenza di sostanze esogene con una elevata sensibilità. E' consigliabile validare internamente al laboratorio il metodo almeno per i parametri dell'effetto matrice, della ripetibilità e della linearità intorno al cut-off ($\pm 25\%$) (vd sez. .4).

Si deve quindi stabilire, sulla base dei risultati ottenuti in sede di validazione, il valore di concentrazione al di sopra del quale il campione deve essere sottoposto ad analisi di conferma, ossia il valore di cut-off interno per il metodo di screening. Sebbene per la maggior parte dei kit diagnostici comunemente utilizzati nei test di screening venga proposto uno specifico cut-off, sarebbe auspicabile verificarne l'attendibilità e, se necessario, modificarlo per le esigenze specifiche del tipo di determinazione da effettuare.

Se il kit diagnostico è commercializzato per l'utilizzo su una matrice biologica diversa da quella su cui viene applicata, il metodo deve essere interamente validato anche per l'applicazione su tale matrice biologica.

Per ogni batch analitico di screening devono essere sempre processati insieme ai campioni incogniti almeno un campione di controllo negativo ed uno positivo al cut-off.

Nelle metodiche di screening possono essere impiegate tecniche immunochimiche (Enzyme linked Immunoassay (ELISA), Radioimmunoassay (RIA), Fluorimetric Polarization Immunoassay (FPIA), etc.) o cromatografiche (gascromatografia (GC), cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC)), accoppiate o meno alla spettrometria di massa (MS).

I risultati delle analisi di screening, se utilizzati per finalità diagnostiche medico-legali, debbono comunque necessariamente essere confermati mediante analisi di conferma.

7.3 Metodi di conferma

I metodi di conferma debbono garantire l'identificazione ed eventualmente la quantificazione delle sostanze di interesse e dei loro metaboliti con idonea sensibilità e specificità. La metodica di conferma deve fornire indicazioni riguardo la struttura della molecola. A tale scopo devono perciò essere utilizzate tecniche basate sulla spettrometria di massa (MS, MSⁿ, MS ad alta risoluzione (HRMS), ecc.) abbinata a tecniche separative cromatografiche (GC, HPLC, elettroforesi capillare (EC)). L'impiego di tecniche immunochimiche, anche se basate su un principio diverso rispetto alle tecniche impiegate nello screening, non è accettabile nelle metodiche di conferma; non è parimenti accettabile per le analisi di conferma l'impiego di tecniche cromatografiche che non forniscano informazioni strutturali sulla molecola (GC con un rivelatore a ionizzazione di fiamma o azoto/fosforo, HPLC con rivelatore ultravioletto, ecc). Fanno eccezione le applicazioni analitiche per la determinazione dell'alcol etilico, del CO (Rif. SOFT/AAFS Forensic Laboratory Guidelines - 2006, pag 10) e della CDT (Linee guida marcatori di abuso alcolico GTFI, 2007).

Le metodiche di conferma devono garantire anzitutto la scelta dei giusti indicatori per una diagnosi di uso/abuso di sostanze di interesse tossicologico; devono quindi garantire la corretta identificazione di dette sostanze/indicatori secondo criteri minimi di seguito descritti nella sez 5.

Qualora si debba dare un risultato di positività al di sopra di un cut-off, il metodo di conferma deve inoltre garantire l'attendibilità del dato quantitativo tramite la stima dell'incertezza di misura associata alla determinazione analitica.

L'analisi di conferma, ove possibile, dovrebbe essere effettuata su una aliquota di campione diversa rispetto a quella utilizzata per lo screening. Nel caso di conferme quantitative sarebbe auspicabile utilizzare almeno due aliquote di campione ed esprimere il risultato come media dei valori, specialmente nel caso in cui il valore stimato in sede di screening sia prossimo al cut-off della sostanza.

Il metodo analitico deve essere sviluppato in modo da avere un LOQ pari almeno alla metà del cut-off stabilito per l'analisi di conferma delle sostanze di interesse in modo tale da garantirne sempre la corretta quantificazione.

Per ogni analisi di conferma devono sempre essere processati insieme ai campioni incogniti almeno un campione esente da analiti di interesse ed un campione di controllo positivo ad una concentrazione equiparabile a quella stimata nel campione in sede di screening. Per ogni batch analitico i controlli dovrebbero essere pari al 10% dei campioni analizzati.

I controlli, contenenti una quantità nota di standard (farmaco/i -droga/he - metabolita/i), devono essere il più possibile simili ai campioni biologici da analizzare e quindi, nel caso di analisi su matrici biologiche diverse da quelle per cui è prodotto il Kit, devono essere allestiti con matrici simili. Tali controlli possono essere acquisiti dal commercio o meglio preparati da campioni reali possibilmente sottoposti ad un controllo incrociato tra i laboratori afferenti al GTF al fine di certificarne le concentrazioni.

Nel caso in cui alla sostanza da confermare sia associabile un cut-off dovrebbe essere preparata contestualmente anche una curva di taratura comprendente campioni di controllo a concentrazione pari a quella di cut-off, alla metà del cut-off e al doppio della concentrazione di cut-off. E' auspicabile l'utilizzo di standard interni deuterati. Il risultato di positività dovrebbe essere fornito solo se il dato quantitativo ottenuto, sottratto (1 o due volte) dell'incertezza di misura ad esso associata, risulta comunque superiore al cut-off. I parametri utilizzati devono essere chiaramente indicati nelle procedure di laboratorio.

I valori di cut-off consigliati per i diversi campioni biologici, intesi come il valore al di sopra del quale viene stilato un referto di positività a seguito di analisi di conferma, sono riportati nella sez. 6.

7.4 Validazione dei metodi

I metodi sviluppati dal laboratorio o acquisiti dalla letteratura scientifica di merito devono essere validati internamente al fine di garantire la qualità del dato.

Il parametri minimi da considerare ai fini della validazione del metodo sono:

- Specificità: la metodica deve essere in grado di identificare univocamente la presenza di una sostanza nel campione analizzato e di distinguerla da sostanze aventi struttura simile (es. isomeri); il metodo deve inoltre essere in grado di distinguere l'analita da eventuali sostanze interferenti derivanti dalla composizione biologica della matrice su cui si opera (effetto matrice).
- Limite di determinazione (LOD) e di quantificazione (LOQ). Deve essere stabilita la sensibilità del metodo, ovvero la concentrazione alla quale, in tutte le condizioni strumentali, il metodo è sempre in grado di identificare la sostanza in esame secondo i criteri stabiliti e, ove richiesto, di quantificarla con la necessaria precisione.
- Ripetibilità: per i metodi qualitativi deve essere studiata la ripetibilità del metodo in tempi diversi anche valutando l'effetto di diversi operatori.
- Precisione e accuratezza: per le sostanze per cui è previsto un cut-off almeno a tale valore deve essere valutata la ripetibilità e l'accuratezza delle determinazioni quantitative.
- Linearità: per le sostanze per cui è previsto un cut-off deve essere valutata la linearità del metodo almeno nel range che va tra la metà ed il doppio di tale valore.
- Trascinamenti: deve essere dimostrata l'assenza di trascinamenti di analiti da un campione al successivo.
- Incertezza di misura: per le sostanze per cui è previsto un cut-off devono essere stimate le fonti di incertezza associate al risultato analitico.

7.5 Criteri minimi di identificazione e quantificazione

Prima di eseguire una analisi di conferma lo strumento utilizzato deve essere sottoposto ad un controllo per valutarne le prestazioni. I criteri di accettazione interni delle performance strumentali devono essere stabiliti.

I criteri di identificazione degli analiti devono essere stabiliti internamente. I requisiti minimi sono descritti di seguito.

7.5.1 separazione cromatografica

Il tempo di ritenzione relativo del picco dell'analita di interesse non deve differire da quello presente nel campione di controllo, analizzato contestualmente, di più dell'1%. Si possono accettare criteri meno stringenti se le

variazioni dei tempi di ritenzione sono spiegabili (es. overload del picco). In HPLC sono accettabili differenze leggermente maggiori (2%).

7.5.2 rivelazione

7.5.2.1 analisi in MS con rivelazione full scan

Nel caso l'analisi venga eseguita in MS con rivelazione full scan, si dovrebbe evitare l'acquisizione di ioni con un peso molecolare inferiore a 50. Per l'identificazione di picchi incogniti tramite il loro spettro di massa, devono essere considerati almeno tre ioni frammenti caratteristici. Le abbondanze relative di tali ioni nel campione incognito non devono differire di più del 20% rispetto al campione di riferimento, fatta eccezione per i frammenti con abbondanza relativa inferiore al 10%, per cui è accettabile una differenza relativa fino al 50%.

Relativamente ad un determinato picco, tutti gli ioni frammento con abbondanza superiore al 10% nel campione di riferimento devono essere presenti anche nel campione da confermare. Se nel campione da confermare sono presenti altri ioni frammento la loro presenza deve essere spiegata e tenuta in considerazione.

7.5.2.2 analisi in selected ion monitoring (SIM)

Nel caso lo spettrometro di massa operi in SIM devono essere monitorati almeno tre ioni significativi; per la conferma tali ioni devono avere un rapporto segnale/rumore superiore a 3 e le loro abbondanze relative devono rispettare i criteri sopra descritti.

Nel caso in cui nello spettro di massa dell'analita di interesse non sia possibile identificare almeno tre ioni significativi è consigliabile utilizzare diverse condizioni sperimentali, ad esempio procedere ad una successiva derivatizzazione dell'estratto inizialmente analizzato, o a due derivati diversi o ad una tecnica di ionizzazione alternativa.

7.5.2.3 analisi in MSⁿ (spettrometria di massa multipla)

Nel caso di MSⁿ è necessario per l'identificazione monitorare uno ione parente e due ioni prodotto, o, se non sono disponibili tre ioni, utilizzare per l'analisi due tecniche di ionizzazione.

7.5.2.4 quantificazione

Per la quantificazione degli analiti è consigliato l'utilizzo di standard interni con caratteristiche chimico-fisiche simili alle sostanze da confermare; ove possibile è pertanto raccomandato l'utilizzo degli analoghi deuterati delle sostanze stesse. Lo standard interno deve essere aggiunto al campione all'inizio del pretrattamento.

La determinazione quantitativa dovrebbe essere effettuata utilizzando uno standard certificato della sostanza da confermare; ove non fosse disponibile uno standard, è possibile utilizzare una sostanza strutturalmente simile per dare una stima semiquantitativa.

Non dovrebbe essere mai utilizzato un singolo calibratore, ma una curva che comprenda almeno il cut-off, il 50% del cut-off e il 200% del cut-off. Nel caso la concentrazione stimata nel campione si allontani molto da questi valori è consigliato preparare un ulteriore punto, più basso o più alto, a seconda del caso, o diluire il campione da quantificare.

Devono essere definiti i criteri di accettazione della curva di calibrazione. In genere il coefficiente di correlazione dovrebbe essere superiore a 0.99.

E' consigliabile effettuare l'analisi almeno in duplicato e stabilire un criterio di accettazione della deviazione standard dei risultati, generalmente paragonabile a quella ottenuta in sede di validazione. Nel caso la positività debba essere data solo al di sopra di un cut-off, al risultato quantitativo ottenuto, specie se questo è in prossimità del valore soglia, va sottratta l'incertezza di misura ad esso associata, calcolata prendendo in considerazione tutte le possibili fonti di incertezza. Solo se il valore ottenuto è ancora superiore al cut off si deve fornire la positività.

7.6 CUT-OFF

Il Cutoff è una concentrazione convenzionale (valore soglia) individuata nell'esigenza operativa di:

- Discriminare i campioni positivi dai negativi con i metodi di screening.
- Garantire la confermabilità dei risultati positivi con tecnica alternativa dotata di maggiore sensibilità e specificità.

Il cutoff per lo screening immunochimico è solitamente quello consigliato dal produttore del metodo. Perlopiù tutti i metodi in commercio sono allineati, in alcuni casi sono identificati due diversi livelli per la stessa classe di sostanze.

Il cutoff per l'analisi di conferma deve essere di norma inferiore e dipende dalla sensibilità del metodo impiegato e fa riferimento alle singole sostanze ricercate.

I criteri da applicare nella scelta dei cutoff sono, in primis, la finalità della ricerca e le caratteristiche di sensibilità e

specificità del metodo adottato, senza tralasciare però la sostanza o la classe di sostanze e la matrice oggetto dell'indagine.

A tal proposito nelle tabelle seguenti sono indicati i cutoff da applicare per screening e conferma nella ricerca di sostanze stupefacenti e psicotrope in urina, capelli e saliva.

Per quanto riguarda la tossicologia post-mortem i valori soglia utilizzati per l'interpretazione dei risultati analitici fanno riferimento ai livelli ematici terapeutici e tossici riportati in letteratura ma devono essere altresì compatibili con LOQ e LOD del metodo analitico impiegato.

Tabella 7.1 Urina.

| SCREENING | Conc. (ng/ml) | CONFERMA | Conc. (ng/ml) |
|-----------------------------|---------------|--|---------------|
| Oppiacei | 300 | Morfina totale 6Acetilmorfina | 200 10 |
| Cocaina Metaboliti | 300 | Benzoilecgonina | 150 |
| Cannabinoidi | 50 | THCCOOH | 15 |
| Amfetamine Metamfetamina | 500 | Amfetamina Metilamfetamina | 200 |
| | | MDA, MDMA, MDEA | 200 |
| Metadone | 300 | Metadone ^{a)} | 100 |
| Eddp | 100 | EDDP | 100 |
| Buprenorfina | 5 | Buprenorfina totale ^{a)} Norbuprenorfina | 5 5 |

^{a)} La presenza anche del solo metabolita in concentrazione superiore al cutoff è di per sé sinonimo di positività

Tabella 7.2 Capelli

| | | ng/mg |
|--------------|--|--------|
| oppiacei | morfina | 0,2 |
| | 6 acetilmorfina | 0,2 |
| cocaina | cocaina | 0,5 |
| | benzoilecgonina e/o altri metaboliti ^{b)} | 0,05 |
| amfetaminici | amfetamina, metamfetamina, MDA, MDMA .. | 0,2 |
| cannabinoidi | THC | 0,05 |
| | THCCOOH ^{c)} | 0,0002 |

^{b)} affinché sia positivo deve essere presente un metabolita nell'ordine di almeno il 5% della concentrazione della cocaina

^{c)} per parlare di consumo e non di esposizione deve essere presente anche il THCCOOH

Tabella 7.3 Saliva.

| SCREENING | Conc. (ng/ml) | CONFERMA | Conc. (ng/ml) |
|-----------------------|---------------|----------------------------------|---------------|
| Oppiacei | 40 | Morfina totale 6Acetilmorfina | 40 4 |
| Cocaina Metaboliti | 20 | Cocaina Benzoilecgonina | 8 8 |
| Cannabinoidi | 4 | THC | 2 |
| Amfetamina e derivati | 50 | Amfetamina e derivati | 50 |

7.7 STANDARD DI RIFERIMENTO E CONTROLLI DI QUALITA'

Gli standard, corredati di documentazione attestante la fonte e la data di preparazione, devono essere idonei al tipo di analisi effettuata. La stabilità ed integrità degli standard di riferimento devono essere preservate durante la loro

conservazione. Nel caso di preparazione degli standard in laboratorio, la ditta produttrice dei reagenti, il metodo di preparazione e la verifica del prodotto finale devono essere documentati. Gli standard di farmaci, droghe e metaboliti, acquisiti secondo la normativa vigente, hanno durata limitata. La loro degradazione alla luce, all'umidità o alle basse temperature deve essere verificata periodicamente. Gli standard in soluzione possono avere una stabilità più limitata di quella delle sostanze allo stato puro secco o solido. Nel caso non si fosse obbligati ad utilizzare gli standard dopo la data di scadenza le concentrazioni degli stessi devono essere nuovamente validate.

L'identità e il grado di purezza degli standard, comprese quelle di eventuali forme deuterate, devono essere verificate con idonee procedure, in condizioni strumentali ottimali, soprattutto se non sono corredati da adeguate certificazioni della Ditta produttrice. L'etichettatura deve essere uniforme per tutti gli standard ed i reagenti. Nelle etichette devono essere riportati la data di acquisizione e di preparazione, le iniziali del preparatore e la data di scadenza.

I Controlli Noti, contenenti una quantità nota di standard (farmaco/i -droga/he - metabolita/i), devono essere il più possibile simili ai campioni biologici da analizzare. Le concentrazioni degli analiti contenute nei controlli (acquisiti dal commercio o preparati in laboratorio) devono essere confermate. Nel caso di analisi su matrici biologiche inusuali (capelli, saliva, ect.) i controlli devono essere allestiti con matrici simili, tali e quali (controlli "negativi") o addizionati di analiti (controlli "positivi"). Di norma, una adeguata serie di controlli può limitarsi ad un campione non contenente l'analita (controllo "negativo") e ad un campione contenente l'analita (controllo "positivo"), ad una concentrazione idonea a controllare l'affidabilità dell'analisi.

Controlli aggiuntivi possono essere utilizzati per valutare la linearità della calibrazione nell'ambito dell'intervallo di concentrazione stabilita.

Per ciascun batch di campioni biologici, singoli o multipli, i controlli devono essere trattati con la medesima procedura adottata in parallelo per quelli ignoti. Ciascun batch di campioni biologici deve includere almeno il 10% di controlli, inclusi un "positivo" e un "negativo". Il "controllo" deve fornire un risultato entro una predeterminata deviazione dal suo valore medio; in caso contrario, il test è considerato "fuori controllo" ed il risultato conseguito per un campione biologico incognito è inaccettabile.

I laboratori che eseguono analisi delle droghe d'abuso hanno l'obbligo di aderire ad programmi di controllo esterno della qualità analitica, allo scopo di monitorare costantemente la performance analitica (inclusa l'efficienza della taratura strumentale) ed ottimizzarla, in modo specifico su quegli analiti e su quelle matrici biologiche che sono oggetto della attività che il laboratorio svolge.

8. ASSICURAZIONE DELLA QUALITÀ -CONTROLLI DI QUALITÀ

La gestione di un laboratorio che svolge attività tossicologica forense con finalità medico -legale deve essere in parte mirata ad assicurare che i requisiti per la qualità siano soddisfatti: deve cioè dare evidenza oggettiva di "assicurazione di qualità".

8.1 Assicurazione di qualità

L'assicurazione della qualità assume un ruolo peculiare nelle attività analitiche aventi finalità medico -legale in quanto i relativi risultati possono assumere rilevanza di "prova giudiziaria".

La finalità dell'assicurazione della qualità consiste nell'individuazione ed attuazione di meccanismi in grado d'identificare l'errore nel disporre di opportuni dispositivi per controllarlo e nell'attuare appropriati 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 di qualità è realizzata dai controlli di qualità del laboratorio.

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) e sia allo sviluppo del procedimento analitico (Procedure Operative Standard).

8.2 Controlli di qualità

I laboratori che svolgono indagini di tipo tossicologico-forense devono dedicare una parte della gestione della struttura ad attività mirate a soddisfare i requisiti per la qualità e che quindi rappresentino l'evidenza oggettiva dell'assicurazione di qualità.

Il laboratorio deve acquisire un sistema di controllo di qualità interno registrandone l'effettuazione.

Il controllo deve riguardare almeno gli aspetti descritti di seguito.

- Campioni in fase di accettazione (quantità, qualità, etc.);
- Le apparecchiature in fase di avvio e di svolgimento del processo analitico (taratura strumentale, calibratori, consenso all'operatività).
- Lo svolgimento del processo analitico con l'inserimento dei campioni di controllo, dei controlli interni ed esterni, noti e ciechi descritti al punto 7.7.
- L'attività di refertazione adottando procedure per la consegna del prodotto finale.

I risultati dei controlli effettuati devono essere registrati.

9. RAPPORTO ANALITICO O REFERTO

9.1 Requisiti del rapporto analitico

Il rapporto analitico finale deve essere prodotto esclusivamente in forma scritta e consegnato di norma a chi ha richiesto l'accertamento od a persona munita di delega.

Nel rapporto analitico finale debbono essere indicati, oltre alla data e tutti gli estremi di identificazione del campione, anche i metodi impiegati per l'analisi, il cut-off e, per le analisi quantitative, il limite di sensibilità del metodo utilizzato. In dettaglio, il rapporto analitico deve contenere i seguenti elementi:

- titolo;
- dati d'identificazione del laboratorio: nome ed indirizzo;
- univoca identificazione del documento (n° progressivo), pagine numerate riconoscibili quali parte del documento, chiara evidenza della fine del documento;
- nome ed indirizzo del cliente o eventuale codice di richiesta;
- identificazione della metodica utilizzata;
- descrizione, condizioni, e chiara identificazione dei campioni analizzati;
- data di ricevimento dei campioni e data dei processi;
- riferimenti sulla metodologia di campionamento;
- i risultati del test con le unità di misura ed i cut off;
- nomi e funzioni di chi firma (deve comunque essere firmato dal direttore del laboratorio);
- finalità dell'accertamento;
- se pertinente, dichiarazione che le conseguenze della valutazione e dell'interpretazione dei risultati si riferiscono solo ai campioni analizzati, nonché utilizzabilità e limiti del risultato;
- sul rapporto analitico (o comunque nel laboratorio) ci deve essere una traccia dell'avvenuto ritiro da parte del cliente del rapporto stesso.

9.3 Analisi qualitative

Per analisi esclusivamente qualitative il risultato deve essere fornito in termini di:

- positivo (identificazione dell'analita in accordo con i protocolli analitici propri del laboratorio);
- negativo (mancata identificazione dell'analita in accordo con i protocolli analitici propri del laboratorio).

9.4 Analisi quantitative

Per le analisi quantitative il risultato deve essere espresso con riferimento ad unità di misura appropriate (mg %, mg/mL, mg/gr, mcg/mg, mcg/mL ecc) e va riportata l'incertezza di misura ad esso associata.

Il risultato dovrebbe essere sempre espresso in termini numerici tuttavia, qualora l'identificazione positiva riguardi un analita presente a valori di concentrazione inferiori al punto di calibrazione più basso (ma superiore al cut-off previsto per la metodica di conferma) previsto dalla procedura operativa standard, è possibile utilizzare l'espressione "tracce" per indicare la risposta in termini semiquantitativi.

Per le metodiche di conferma per cui è previsto un cut-off, nel caso in cui il risultato, sottratto dell'incertezza, risulti inferiore a detto cut-off, l'analisi deve essere considerata con esito negativo.

9.5 Conservazione del rapporto analitico

Copia del rapporto analitico finale e della documentazione che ha concorso alla sua formulazione dovrebbe essere conservata per almeno 3 anni o per un periodo maggiore secondo i regolamenti sanitari vigenti.