

Procedure operative per la determinazione delle sostanze d'abuso nelle matrici biologiche

Paolo BUCCHIONI ¹, Valeria AQUILINA ², Paolo BERRETTA ³, Francesco P. BUSARDÒ ²,
Paolo FRANCHESCHINI ¹, Adele MINUTILLO ³, Simona PICHINI ³, Manuela PELLEGRINI ³ *

¹Tossicologia "Levante Ligure", ASL5 Liguria, Sarzana, La Spezia, Italia; ²Laboratorio di Tossicologia Forense, Dipartimento di Scienze Biomediche e Sanità Pubblica, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italia; ³Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

*Autore di contatto: Manuela Pellegrini, Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, viale Regina Elena 299, 00161 Roma, Italia. E-mail: manuela.pellegrini@iss.it

Introduzione

L'attività del laboratorio di tossicologia assume una duplice veste in funzione delle proprie finalità, cliniche o forensi e l'identità, l'autenticità nonché la scelta di una determinata metodologia di analisi sono presupposti indispensabili per l'attendibilità dei risultati analitici e per la loro corretta interpretazione.^{1,2} Poiché le analisi tossicologiche con valenza forense, a differenza di quelle eseguite a scopo clinico, possono assumere un valore di prova giudiziaria, devono fornire risposte certe ed univoche garantendo una rintracciabilità di ogni fase operativa in modo da risultare non contestabili in sede di dibattimento giudiziario. In generale le determinazioni delle sostanze psicotrope a scopo medico-legale riguardano per lo più casi di guida sotto l'effetto di sostanze d'abuso (articolo 187 Codice della Strada [CdS]) e/o sotto l'effetto di alcol (articolo 186 CdS), il controllo dei lavoratori addetti a mansioni a rischio (Conferenza Stato-Regioni Provvedimento del 18 settembre del 2008) e la verifica dei requisiti fisici e psichici per il conseguimento, la revisione o la conferma di validità della patente di guida per autoveicoli o motoveicoli da parte delle Commissioni Patenti.³ Inoltre non va dimenticato che anche per il rilascio del porto d'armi e nell'affidamento di minori e adozioni sono richiesti accertamenti analitici per dimostrare la non assunzione di sostanze stupefacenti e psicotrope.

La redazione di queste Procedure operative nasce dall'esigenza di avere un documento condiviso sui protocolli analitici

e sui valori soglia utilizzabili per l'analisi delle sostanze stupefacenti e psicotrope nelle diverse matrici biologiche in particolar modo quando questi accertamenti assumono carattere di prova giudiziaria. La carenza di precise normative ha infatti portato i singoli laboratori, nel corso degli anni, ad adottare delle "proprie" modalità operative adattandole alle loro esigenze e generando così una disomogeneità metodologica tra gli stessi che si occupano di accertamenti analitici anche a scopo forense. Lo scopo di questo Documento Pro è quindi quello di uniformare e armonizzare, a livello nazionale, le procedure analitiche ed organizzative dei laboratori del Servizio Sanitario Nazionale che si occupano d'analisi di sostanze, fornendo un sostegno pratico ai laboratori che progettano di effettuare (o che già effettuano) le analisi sulle sostanze stupefacenti e psicotrope nelle diverse matrici biologiche, in modo che essi possano far propri i requisiti necessari all'implementazione di un servizio all'utente di elevata qualità. In queste Procedure operative verranno quindi trattati agli aspetti di carattere generale (matrici, catena di custodia, analisi di screening e conferma), con riferimento anche agli accertamenti analitici stabiliti da normative di Legge (mansioni a rischio, articolo 187 articolo 186, rilascio/rinnovo delle patenti).

Organizzazione del laboratorio

Sicurezza del laboratorio

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca delle sostanze d'abuso nelle matrici biologiche devono disporre di

un solido sistema di sicurezza in grado di garantire il divieto di accesso al personale non autorizzato nel laboratorio o nei luoghi in cui sono conservati i campioni o documenti relativi ad essi. I documenti e i campioni devono essere conservati in armadi/frigoriferi/congelatori chiusi a chiave e con monitoraggio costante della temperatura. Il laboratorio deve possedere un registro che documenti l'entrata e l'uscita dei visitatori presso le aree protette del laboratorio stesso.

Personale di laboratorio

Solamente il personale opportunamente qualificato e la cui competenza sia stata formalmente riconosciuta può lavorare all'interno del laboratorio anche se è possibile che una stessa persona ricopra più ruoli. Il laboratorio deve possedere un registro dove vengono riportate le competenze del personale in funzione delle mansioni svolte. I documenti, cartacei o informatici, di coloro che prestano servizio nel laboratorio devono contenere un curriculum vitae aggiornato periodicamente. Ogni membro dello staff di laboratorio, deputato ad una specifica funzione, deve avere la necessaria preparazione ed esperienza commisurata alla propria responsabilità di funzione, documentata da un percorso formativo specifico per la tecnologia utilizzata in questa peculiare branca di laboratorio. Tutto il personale impiegato in laboratorio deve aver ricevuto adeguata formazione in materia di salute e sicurezza sul luogo di lavoro.⁴

Procedure per la catena di custodia

La catena di custodia è una procedura atta a documentare la raccolta, il trasporto, la conservazione, l'analisi, il referato e lo smaltimento di un determinato campione biologico. L'obiettivo è garantire che l'autenticità e l'integrità di tale campione siano mantenute dalla raccolta allo smaltimento. Un laboratorio deve essere in grado di rispondere alle seguenti domande:

- dove si trovano attualmente i campioni in fase di analisi?
- Chi possiede ora i campioni da analizzare?
- Quando il laboratorio ha ricevuto i campioni per l'analisi?
- Dove sono stati conservati i campioni?
- Chi è entrato in possesso dei campioni da analizzare?

La catena di custodia deve specificare dove e da chi i campioni sono stati raccolti, elaborati e conservati e dimostrare che non sono stati manomessi o manipolati.

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze stupefacenti indipendentemente dalla matrice biologica

utilizzata, devono poi prendere in carico la catena di custodia dei campioni inviati, al fine di documentare la tracciabilità degli stessi dal momento della loro accettazione in laboratorio fino al completamento delle analisi, inclusi la refertazione, la conservazione e l'eventuale smaltimento del materiale residuo. La registrazione dei dati relativi alla catena di custodia dovrebbe essere conservata su carta e/o su supporto informatico, per un periodo di tempo non inferiore ai 5 anni o secondo quanto raccomandato dalla normativa vigente.⁴

Modulistica

Modulo per il verbale di prelievo

Sul modulo del verbale di prelievo, che deve essere redatto in triplice copia, occorre indicare:

- i dati relativi al responsabile del prelievo;
- i dati relativi alla persona sottoposta ad accertamento analitico (generalità, residenza, numero documento d'identità etc.). Se il soggetto non possiede un documento d'identità valido, sarà possibile procedere all'identificazione dello stesso mediante l'ausilio di un supervisore autorizzato o di un testimone con documento di identità. Se l'identità del soggetto non può essere accertata, il responsabile non potrà procedere al prelievo del campione;
- i dati relativi al prelievo per l'identificazione univoca del campione (codice di identificazione, struttura/reparto ove viene effettuato il prelievo etc.);
- l'elenco dei farmaci eventualmente assunti o somministrati alla persona sottoposta ad accertamento analitico nei giorni antecedenti la raccolta del campione;
- dovrà essere apposta la firma sia di chi ha effettuato il prelievo sia della persona sottoposta ad accertamento analitico;
- delle tre copie del verbale di prelievo, una viene consegnata insieme ai campioni da analizzare e al modulo di catena di custodia alla struttura che effettua l'analisi, una copia viene conservata dalla struttura/incaricato che ha effettuato il prelievo di sangue e una copia consegnata alla persona sottoposta ad accertamento analitico.⁴

Modulo per la catena di custodia

Il modulo per la catena di custodia rende tracciabile ogni spostamento del campione, dal momento della sua raccolta all'arrivo nel laboratorio che eseguirà l'analisi.

Le informazioni che devono essere contenute nel modulo per la catena di custodia sono:

- etichette adesive con codice a barre o codice alfanumerico identiche a quelle apposte sul verbale di prelievo e sui contenitori di raccolta delle tre aliquote del campione;

- luogo, data e ora del prelievo;
- eventuali informazioni sul campione;
- nome, indirizzo, indirizzo e-mail e numero di telefono del laboratorio d'analisi;
- nome e firma di tutte le persone che hanno avuto in custodia le aliquote del campione durante il viaggio dal luogo del prelievo sino alla destinazione finale (laboratorio di analisi);⁴
- luogo, data e ora della presa in carico dei campioni in Laboratorio.

Modulo consenso informato

Il modulo per esprimere il consenso informato è un documento indispensabile poiché permette di dare forma all'espressione di volontà affermativa del paziente di accettare in piena coscienza gli accertamenti a cui deve essere sottoposto. In caso di presenza di minori, il consenso informato dovrà essere dato dai genitori o da chi esercita la responsabilità genitoriale o dal tutore tenendo conto anche della volontà del minore in relazione alla sua età ed al grado di maturità sviluppato.⁴ Poiché tali indagini sono sempre accompagnate da una richiesta specifica con relativo quesito medico legale, nel caso non venga dato l'assenso all'indagine, bisogna sempre avvisare il latore della richiesta per la gestione della criticità. Per lo stesso motivo, bisogna chiedere in via preventiva anche il consenso alla trasmissione dei dati analitici al latore della richiesta.

Tipologie di campioni biologici

Le analisi tossicologiche per la ricerca di xenobiotici (farmaci, composti tossici, sostanze stupefacenti o psicotrope) nelle matrici biologiche, vengono generalmente richieste per finalità cliniche e/o medico-legali. Poiché frequentemente tali indagini possono essere utilizzate in diversi ambiti (diagnosi di tossicodipendenza, valutazione dell'idoneità alla guida, idoneità al lavoro, idoneità al porto d'armi, idoneità a determinate norme di concorrenza e/o contrattuali, affido di minori o adozione nazionale o internazionale), o anche assumere carattere di prova giudiziaria, devono possedere precisi requisiti di certezza e di affidabilità con la evidenza della documentazione e la rintracciabilità di ogni fase analitica, nonché di trasparenza ed uniformità con l'applicazione di chiare procedure.

Alla base del quesito medico legale richiesto risulta fondamentale il tipo di matrice da utilizzare poiché tale scelta ci permette di evidenziare la finestra temporale in cui le sostanze d'abuso sono rivelabili.

Nel caso in cui si debba valutare un consumo "recente" di sostanze stupefacenti o psicotrope la matrice da utilizza-

re sarà l'urina; è bene tuttavia sottolineare che il risultato di un'analisi di una sostanza d'abuso ottenuto su campione di urina non è correlabile all'eventuale stato di alterazione psicofisica del soggetto consumatore al momento del prelievo del campione. Infatti nel caso sia necessario una valutazione di attualità d'uso la matrice da utilizzare dovrà essere il sangue.

La matrice biologica alternativa al sangue è rappresentata dalla saliva idonea per la determinazione di xenobiotici e/o delle sostanze d'abuso e/o metaboliti in campo clinico, per dimostrarne l'attualità d'uso nella guida, nello svolgimento di mansioni lavorative particolari (ad esempio prima dell'inizio del turno lavorativo) e nell'ambito medico-legale.

Qualora sia necessario incrementare la finestra temporale di rilevabilità di una determinata sostanza la matrice pilifera rappresenta la matrice idonea. Infatti, se una sostanza (per esempio una sostanza d'abuso e/o un suo metabolita) è rilevabile per alcune ore nel sangue ed alcuni giorni nell'urina, la stessa sostanza è rilevabile nella matrice cheratinica per alcuni mesi, a seconda della sede e della lunghezza della stessa.²

Urina

Le urine sono una matrice biologica di elezione nelle analisi per la ricerca delle sostanze psicoattive o psicotrope. Il loro utilizzo presenta vantaggi quali una modalità di raccolta non invasiva, la possibilità di campionare grandi volumi e la possibilità di rilevare la sostanza parente e/o i suoi metaboliti dopo diversi giorni dall'assunzione. La positività dell'analisi, infatti, indica che la sostanza è stata assunta da alcune ore ad alcuni giorni prima del prelievo, ma non può correlare l'eventuale stato di alterazione psico-fisica ad una recente assunzione.

Il principale limite di tale matrice è la scarsa rilevanza clinica dell'analisi quantitativa in quanto le concentrazioni degli analiti varia con la dose, la modalità di somministrazione, il tempo dall'assunzione e con il metabolismo individuale.^{2, 4}

Modalità di raccolta

La raccolta delle urine deve avvenire secondo una procedura che assicuri, nel rispetto della privacy della persona sottoposta a controllo, l'identità, l'integrità e l'autenticità del campione. Nel caso che il prelievo sia per motivi amministrativi e/o giudiziari, i campionamenti devono essere effettuati a vista da un operatore sanitario qualificato ed autorizzato, che deve spiegare la procedura di raccolta del campione alla persona sottoposta ad accertamento analiti-

co. I contenitori devono essere dotati di chiusura ermetica anti violazione oppure chiusi e sigillati con sigillo adesivo a nastro non rinnovabile sul quale l'interessato e l'operatore addetto ai prelievi appongono congiuntamente la propria firma. Il materiale adoperato per effettuare la raccolta deve essere integro e sigillato, fino al momento in cui viene aperto per eseguire la raccolta.

La raccolta della matrice urinaria, per un volume compreso tra i 40 mL e 60 mL deve avvenire in appositi contenitori di plastica monouso e deve essere effettuata in locali dove non siano presenti possibili fonti di inquinamento del campione quali acqua, saponi o detergenti di alcun tipo. Si ricorda infatti che uno svantaggio non trascurabile nell'analisi tossicologica su campione urinario è che questo può facilmente essere soggetto a tentativi di adulterazione e/o diluizione. Per questa ragione si raccomanda, al fine di verificare la non adulterazione del campione, il prelievo "vigilato", la misurazione della temperatura (32-38 °C) e la determinazione della creatinuria (20 mg/dL). Nel caso si riscontrasse una qualsiasi criticità sulla modalità di raccolta è necessario aprire una "non conformità". Un campione di urine raccolto con finalità medico-legali deve essere suddiviso in tre aliquote denominate A (aliquota per le analisi di screening), B (aliquota per le analisi di conferma) e C (aliquota per le analisi di revisione).

Dal momento dell'accettazione del campione da parte del laboratorio, o dal medico competente nel caso delle mansioni a rischio, è necessario attivare una procedura interna di catena di custodia.^{2, 4}

Saliva

La matrice salivare, utilizzata in fase preliminare di accertamento (test di screening), può essere considerata una matrice biologica da utilizzare per dimostrare una attualità d'uso. Il campionamento di saliva deve essere effettuato in doppio, utilizzando due diversi kit/provette di raccolta, in previsione del possibile test di conferma.

Modalità di raccolta

La raccolta della saliva deve avvenire secondo una procedura che assicuri, nel rispetto della privacy della persona sottoposta ad accertamento analitico, l'identità, l'integrità e l'autenticità del campione. È possibile raccogliere campioni di saliva, senza stimolazione, in normali provette con chiusura ermetica ma negli ultimi anni, tuttavia, sono stati commercializzati dei kit di raccolta per la saliva provvisti di contenitori specifici, sprovvisti di additivi. Questi sono capaci di raccogliere un volume noto e costante di saliva attraverso un indicatore di volume incorporato nel dispo-

sitivo di raccolta. Le ditte produttrici dei dispositivi per la raccolta della saliva devono garantire che questi ultimi non interferiscano in nessun modo con la determinazione delle sostanze d'abuso effettuata dai laboratori. Nonostante questi tentativi di standardizzazione il prelievo di saliva può richiedere maggiore tempo rispetto alle altre matrici e qualche difficoltà in più per la raccolta, spesso influenzata da una iposalivazione del soggetto, legata allo stato emotivo dello stesso. Un campione di saliva raccolto con finalità medico-legali deve infatti essere suddiviso in due aliquote denominate A e B campionando almeno 1.5 ml per ciascun campione; in alternativa, il campione di saliva raccolto deve essere suddiviso in due aliquote da almeno 1.5 mL. L'aliquota A viene immediatamente utilizzata per le analisi di screening ed in caso di positività per le analisi di conferma, l'aliquota B viene conservata in congelatore a -20 °C per eventuali analisi di revisione richiesta dal soggetto sottoposto all'accertamento analitico.⁶

Sangue

Il sangue è la matrice biologica di elezione per dimostrare l'attualità di consumo, idoneo per la determinazione di xenobiotici e/o delle sostanze d'abuso e/o metaboliti in campo clinico e in ambito medico-legale. La concentrazione ematica e/o plasmatica della sostanza ricercata, infatti, consente di stabilire o di escludere la recente assunzione ed è direttamente correlabile allo status psicofisico del soggetto al momento del prelievo. Il prelievo ematico effettuato dal personale sanitario su richiesta della Polizia Giudiziaria (es. in caso di incidente stradale), costituisce un atto di polizia giudiziaria per il compimento del quale vi è l'obbligo di dare avviso all'interessato della facoltà di farsi assistere da un difensore di fiducia (Art. 114 disp. att. CPP, Artt. 354, 356 CPP).^{7, 8} Nel caso non venga dato l'assenso all'indagine, bisogna sempre avvisare i rappresentanti della stessa Polizia Giudiziaria per la gestione della criticità.

Modalità di raccolta

La raccolta del campione deve avvenire secondo una procedura che assicuri, nel rispetto della privacy della persona sottoposta ad accertamento analitico, l'identità, l'integrità e l'autenticità del campione stesso. Il prelievo di sangue deve essere effettuato in locali dedicati esclusivamente alla raccolta nel rispetto delle norme sanitarie e di sicurezza e deve essere effettuato detergendo la cute con prodotti non alcolici. Il dispositivo per la raccolta deve contenere un anticoagulante (es. sodio fluoruro/ossalato potassio) e deve essere in grado di raccogliere un volume noto e co-

stante di sangue (almeno 5 mL). Anche in questo caso il campione raccolto con finalità medico-legali deve essere suddiviso in tre aliquote denominate A, B, C. L'aliquota A verrà utilizzata per la eventuale analisi di screening, l'aliquota B per l'analisi di conferma e l'aliquota C verrà conservata in congelatore a -20 °C per eventuali analisi di revisione richieste dal soggetto sottoposto all'accertamento analitico. A tutte e tre le provette deve essere apposto un sigillo antimanomissione, opportunamente firmato per garantire l'integrità del campione.^{7,8}

Matrice cheratinica

Le analisi per la ricerca di xenobiotici (farmaci, composti tossici, sostanze stupefacenti o psicotrope) e biomarcatori di uso e abuso alcolico nella matrice pilifera, vengono generalmente richieste per finalità cliniche e/o medico-legali. La richiesta di una analisi tossicologica sulla matrice pilifera è legata soprattutto alla possibilità di incrementare la finestra temporale di rilevanza di una determinata sostanza. Se nella parte prossimale del capello, quella cioè vicina alla cute, è possibile rilevare una esposizione temporalmente vicina all'assunzione, spostandosi nella parte distale, verso la punta, si rileva una esposizione più lontana nel tempo. Inoltre, essendo la velocità di crescita del capello in fase anagenica di circa 1 cm/mese, l'analisi segmentale per cm di capello può fornire informazioni riguardanti storia e tipologia di consumo di una sostanza in ognuno dei mesi corrispondenti al segmento analizzato. Il prelievo del campione non è invasivo e il trasporto e la conservazione non richiedono particolari accorgimenti.^{2,9}

Modalità di raccolta

È preferibile prelevare il campione dall'area corrispondente alla parte posteriore della testa (*vertex*), il più possibile vicino al cuoio capelluto; si considera infatti che questa regione della testa sia associata ad una minima variabilità interindividuale nella velocità di crescita del capello. Quando il prelievo del campione è effettuato su un bambino o su persone con un evidente diradamento dei capelli, la raccolta del campione può essere effettuata prelevando ciocche più piccole in aree differenti del capo, concentrandosi tuttavia nella zona del vertice posteriore della testa. La matrice pilifera d'elezione per le analisi delle sostanze stupefacenti è rappresentata dai capelli, tuttavia, quando il loro prelievo non è possibile (ad esempio calvizie, rasatura a zero) si può ricorrere a siti di prelievo alternativi come il torace, il pube, le ascelle o il viso (peli della barba). La raccolta dei campioni soprattutto in parti intime del corpo richiede una attenta valutazione del rispetto della privacy

del soggetto sottoposto al controllo, garantendo tuttavia che non venga compromessa la correttezza del processo di prelievo. Si ricorda inoltre che la velocità di crescita e la dormienza (fase telogenica) dei peli prelevati in queste zone del corpo sono differenti dalla velocità di crescita e dalla dormienza dei capelli. Pertanto, non è possibile risalire ad una finestra temporale di uso di sostanza, ma si può solo confermare o escludere un uso pregresso. La quantità di capelli necessaria all'analisi è una ciocca il cui spessore deve essere riconducibile allo spessore di una matita, divisibile in due parti (aliquota A e B). È importante raccogliere una quantità di capelli sufficiente ad effettuare sia le analisi di screening che le analisi di conferma (aliquota A), nonché conservare una parte del campione per una eventuale analisi di verifica (controanalisi, aliquota B). La ciocca di capelli da prelevare deve essere fissata con uno filo legato il più vicino possibile alla cute prima di eseguire il taglio. La ciocca di capelli una volta tagliata deve essere sistemata nell'apposito foglio di alluminio possibilmente millimetrato e la porzione corrispondente alle radici opportunamente legata con lo spago deve fuoriuscire dal foglio. Se la lunghezza del capello non è sufficiente da permettere la procedura sopra descritta è possibile comunque raccogliere il campione e in tal caso, la ciocca tagliata, viene fissata su un foglio con una clip indicando con una freccia la parte prossimale alla cute.⁹

Preparazione del campione di matrice pilifera

Un campione di matrice pilifera è significativamente diverso da un campione di urina, sangue o saliva perché si tratta di una matrice solida; pertanto la preparazione del campione prevede diverse fasi iniziali, tra cui il lavaggio, l'asciugatura e l'eventuale segmentazione della ciocca. La procedura di lavaggio è fondamentale per rimuovere la contaminazione superficiale e viene solitamente eseguita con solventi organici come cloruro di metilene metanolo o acetone, che interferiscono in maniera trascurabile con l'estrazione degli analiti contenuti all'interno della matrice. I lavaggi devono essere veloci (1/2 minuti massimo) e devono utilizzare un volume ridotto di soluzione di lavaggio. Il laboratorio deve comunque definire una propria procedura standardizzata per il lavaggio dei campioni di capelli prima di effettuare l'analisi quali-quantitativa dei principi attivi eventualmente contenuti in essi. I campioni vengono poi lasciati asciugare a temperatura ambiente, successivamente finemente sminuzzati mediante utilizzo di forbici e infine pesati (30-50 mg a seconda dell'analisi richiesta). La ricerca di xenobiotici in un campione di capelli prevede una fase iniziale di pretrattamento ("di-

gestione”) del campione per far sì che gli analiti siano rilasciati dalla matrice cheratinica. È importante sottolineare che l'uso di tamponi acquosi acidi o basici durante la digestione idrolizza (parzialmente o completamente) composti chimicamente labili come la cocaina e l'eroina. D'altra parte, l'incubazione della matrice dei capelli con alcool metilico o soluzioni acquose tamponate a pH neutro, pur non presentando problemi di idrolisi dei composti chimicamente labili, può influenzare la resa dell'analisi o degli analiti che possono risultare generalmente inferiori rispetto a quelli ottenuti con la digestione in tamponi acidi o basici. Tuttavia mentre la digestione in ambiente acido o basico richiede sempre una successiva estrazione liquido-liquido o in fase solida, gli estratti metanolici o acquosi a pH neutro possono essere analizzati come tali. L'estrazione successiva alla digestione assicura comunque una maggiore pulizia dell'estratto. L'efficienza di una metodologia digestiva ed estrattiva va pertanto verificata nella fase di validazione generale della metodologia d'analisi.⁹

Procedure di laboratorio

Fase pre-analitica

Accettazione dei campioni biologici

Al laboratorio di analisi le aliquote dei campioni biologici contrassegnate con le lettere A, B e C nei casi in cui è prevista la terza aliquota, devono pervenire all'interno di un contenitore termico refrigerato. Per quanto riguarda le matrici pilifere subito dopo la raccolta dovranno essere inserite all'interno di una busta che dovrà essere poi sigillata. Unitamente al contenitore termico e/o alla busta contenenti le matrici devono pervenire al laboratorio i corrispondenti moduli per la catena di custodia ed i verbali di prelievo. Al momento dell'accettazione dei campioni sono fondamentali le seguenti verifiche:

- integrità dell'imballaggio al fine di escludere una manomissione del campione durante il trasporto;
- le informazioni riportate sopra i contenitori e/o sulla busta delle aliquote relative alle matrici raccolte corrispondano alle informazioni riportate sul modulo della catena di custodia;
- presa in carico del documento della catena di custodia con data, ora di accettazione e firma del personale di laboratorio responsabile dell'accettazione del campione.

Nel caso in cui fossero riscontrate anomalie o mancanze, il laboratorio è tenuto a redigere un apposito verbale di non conformità e deve notificare tale non conformità alla struttura che ha richiesto l'accertamento analitico.

Modalità di conservazione dei campioni raccolti

Una volta raccolti i campioni biologici se il tempo che intercorre tra il prelievo e l'inizio delle procedure analitiche è di alcuni giorni è possibile conservarli ad una temperatura di +4 °C. Per quanto riguarda la conservazione a lungo termine (mesi/anni) questa deve essere effettuata alla temperatura di -18/-22 °C.^{3, 5} La matrice cheratinica dovrà invece essere conservata in luogo asciutto a temperatura ambiente.⁹ I campioni conservati devono essere chiusi a chiave e non accessibili se non al personale addetto al trattamento degli stessi.

Le non conformità che rendono inaccettabili i campioni da analizzare^{4-6, 8, 9}

Urine

- Codici a barre assenti o non identici tra loro;
- campione senza documentazione allegata;
- assenza del consenso informato della persona sottoposta ad accertamento analitico;
 - sigilli di sicurezza sui contenitori del campione o sul contenitore per il trasporto rotti o manomessi;
 - assenza dei sigilli di sicurezza;
 - ricezione di una o due sole aliquote;
 - volume del campione insufficiente al completamento delle analisi;
 - contenitori non integri con evidente perdita del campione;
 - incongruità del campione urinario con il tipo di richiesta pervenuta;
 - creatinina <20 mg/dL;
 - peso specifico <1003 mg/L o >1035 mg/L;
 - pH <3 o >10.

N.B. Un campione di urina potrebbe risultare adulterato per la presenza di nitriti ($\geq 500 \mu\text{g/mL}$), di cromo (VI) ($\geq 50 \mu\text{g/mL}$); di un alogeno (candeggina, iodio, fluoro); di glutaraldeide; di piridina (piridinio clorocromato); di un surfattante.

Sangue e saliva

- Codici a barre assenti o non identici tra loro;
- campione senza documentazione allegata;
- assenza del consenso informato della persona sottoposta ad accertamento analitico;
 - sigilli di sicurezza sui contenitori del campione o sul contenitore per il trasporto rotti o manomessi;
 - assenza dei sigilli di sicurezza;
 - ricezione di una o due sole aliquote;
 - volume del campione insufficiente al completamento delle analisi;

- contenitori non integri con evidente perdita del campione.

Capelli

- Codici a barre assenti o non identici tra loro;
- campione senza documentazione allegata;
- assenza del consenso informato del soggetto sottoposto al controllo;
- ricezione di un solo campione;
- quantitativo di campione insufficiente al completamento delle analisi;
- perdita del campione.

Indicazioni

Requisiti minimi fase preanalitica	
Locali dedicati	Nel rispetto della privacy
Personale formato	Documentazione del percorso formativo
Compilazione catena di custodia e verbale prelievo	Tracciabilità del campione a garanzia dell'autenticità dello stesso
Consenso informato	Richiesta consenso trattamento dati Richiesta consenso prelievo Richiesta consenso invio dati al latore della richiesta
Prelievo vigilato	Nel caso di prelievo urina
Conservazione dei campioni	Diversa a seconda della matrice I campioni conservati devono essere chiusi a chiave e non accessibili se non al personale addetto al trattamento degli stessi

Fase analitica

Analisi di screening

È possibile effettuare uno screening iniziale per la ricerca di classi di sostanze d'abuso utilizzando sia tecniche immunochimiche che siano state validate per le matrici in oggetto e siano commercializzate con tale indicazione, che direttamente tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa.²

I test immunochimici comunemente utilizzati per lo screening di sostanze stupefacenti utilizzano sistemi di rivelazione differenti, ma uno stesso principio di reazione antigene-anticorpo in cui gli analiti (sostanze stupefacenti e /o metaboliti) competono con un analita o enzima presenti nel test di screening. I metodi di tipo immunochimico sono generalmente caratterizzati da tempi di esecuzione

rapidi, elevata o totale automazione ma, per contro, presentano ridotta specificità ed elevata inaccuratezza del risultato quantitativo, in particolare quando nel campione sono presenti più specie chimiche in grado di essere rilevate ma non discriminate dal metodo (es. composto immutato e suoi metaboliti). Questi metodi pertanto producono un risultato di tipo qualitativo, in altre parole esprimono la probabile positività o meglio definita "non negatività" del campione per un determinato analita o più spesso per una classe di sostanze in relazione ad un valore soglia o cut-off definito dal produttore. Se l'esito di un test di screening risulta negativo è fondamentale verificare sempre che il metodo sia in grado di minimizzare il numero dei falsi negativi.

Le tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa tandem o all'analizzatore a tempo di volo (TOF), anche se meno veloci per lo screening di un gran numero di campioni, hanno il vantaggio di poter identificare simultaneamente in un'unica analisi una vasta gamma di analiti differenti. Tuttavia queste metodiche analitiche non sono frequentemente a disposizione dei laboratori e richiedono una elevata expertise da parte del personale che vi opera.

Tutti i risultati positivi al test di screening devono essere confermati mediante l'utilizzo di metodologie analitiche specifiche per gli analiti ricercati come le tecniche analitiche separative di tipo cromatografico associate a tecniche di rivelazione come la spettrometria di massa. Non deve essere refertato alcun valore semi-quantitativo ma nel referto deve essere riportata esclusivamente la "non negatività" (per es. potremmo riportare "non assente").²

VALORI SOGLIA DI SCREENING PER LE MATRICI BIOLOGICHE

Si riportano in Tabella I i valori soglia dei test di screening raccomandati nel Provvedimento «Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in laboratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi». (Rep. Atti n. 178/CSR) (GU Serie Generale n.236 del 08-10-2008),¹⁰ dalla Society of Hair Testing (SoHT)^{11, 12} e dal gruppo dei Tossicologi Forensi Italiani¹³ per le diverse matrici biologiche (Tabella II, III).

Analisi di conferma

I metodi di conferma debbono garantire l'identificazione certa e la quantificazione accurata delle sostanze di interesse (sostanze parenti e/o loro metaboliti) con idonea sensibilità e specificità. L'identificazione e la quantificazione degli analiti di interesse si ottiene utilizzando metodi se-

TABELLA I.—Valori soglia dei test di screening in per la matrice Urina indicati nel Provvedimento «Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni a rischio» (Rep. Atti n. 178/CSR) (GU Serie Generale n.236 del 08-10-2008) e dal gruppo dei Tossicologi Forensi.

Classe di sostanze	Mansioni a rischio (ng/mL)	GTFI (ng/mL)
Amfetamine	500	500
Cannabinoidi	50	50
Cocaina e metaboliti	300	300
Opiacei e metaboliti	300	300
Metadone (EDDP)	300	300
Buprenorfina	—	5

EDDP: 2-etilidene-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina.

TABELLA II.—Valori soglia dei test di screening per la matrice Saliva raccomandati dal gruppo dei Tossicologi Forensi.

Classe di sostanze	GTFI (ng/mL)
Amfetamine	40
Cannabinoidi	10
Cocaina e metaboliti	30
Opiacei 6-MAM	4
Opiacei morfina	40
Metadone	50
Buprenorfina	5

6-MAM: 6-monoacetilmorfina.

TABELLA III.—Valori soglia dei test di screening per la matrice Capelli raccomandati dalla Society of Hair Testing (SoHT).

Classe di sostanze	SOHT (ng/mg)
Amfetamine	0,2
Cannabinoidi	0,05
Cocaina e metaboliti	0,5
Opiacei e metaboliti	0,2
Metadone	0,2
Buprenorfina	0,01

parativi cromatografici accoppiati ad una tecnica identificativa specifica e sensibile quale la spettrometria di massa (MS) che identifica i composti per il loro peso molecolare ed i frammenti tipici ottenuti per collisione con un fascio di elettroni ad energia nota o con un gas a pressione elevata all'interno di una cella di collisione sottovuoto (gas cromatografia [GC-MS]) o la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS) e/o spettrometria di massa tandem (LC-MS-MS). È fondamentale l'impiego di uno standard interno (meglio se deuterato) poiché quando aggiunto prima della fase preparativa, garantisce l'affidabilità del dato analitico sia in funzione del processo estrattivo sia in funzione della separazione strumentale.

È bene ricordare che il valore soglia di un test di conferma deve essere necessariamente inferiore a quello di un

test di screening. I campioni che contengono le sostanze d'abuso e/o i loro metaboliti a concentrazioni uguali o superiori ai cut-off prestabiliti, sono considerati positivi. L'aliquota B e l'aliquota C di un campione risultato positivo vanno conservate in apposito congelatore provvisto di chiave per un periodo concordato con chi richiede l'analisi (clinico, autorità amministrativa o giudiziaria) o secondo quanto previsto dalle normative di Legge. Tale periodo di conservazione deve essere riportato nelle Procedure Operative Standard (POS).⁹

VALORI SOGLIA DI CONFERMA PER LE MATRICI BIOLOGICHE

Si riportano di seguito i valori soglia dei test di conferma raccomandati nel Provvedimento «Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi». (Rep. Atti n. 178/CSR) (GU Serie Generale n.236 del 08-10-2008)¹⁰ (Tabella IV) e i requisiti minimi* riportati nelle Linee Guida dei Tossicologi Forensi italiani per le diverse matrici biologiche¹³ (Tabella IV, V, VI) ed i valori soglia da utilizzare per individuare un consumo cronico ed eccessivo di alcol o verificare l'astinenza da sostanze d'abuso stabiliti in un documento di consenso della Society of Hair Testing (SoHT)^{11, 12} (Tabella VI e VII).

TABELLA IV.—Valori soglia dei test di conferma per la matrice Urina indicati nel Provvedimento «Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni a rischio» (Rep. Atti n. 178/CSR) (GU Serie Generale n.236 del 08-10-2008).

Analiti	Mansioni a rischio (ng/mL)
Amfetamina	250
Metamfetamina	250
MDA	250
MDMA	250
MDEA	250
THC	15
THCCOOH	15
Cocaina	100
BEG	100
Morfina	100
Codeina	100
6-MAM	100
Metadone	100
EDDP	/
Buprenorfina	5
Norbuprenorfina	/

MDA: 3,4-metilendioossianfetamina; MDMA: 3,4-metilenediossimetanfetamina; MDEA: 3,4-metilendioossi-N-etilfetamina; THC: delta-9-tetraidrocannabinolo; THCCOOH: '11-nor-9-carbossi-Delta-9-tetraidrocannabinolo; BEG: benzoilecgonina; 6-MAM: 6-monoacetilmorfina; EDDP: 2-etilidene-1, 5-dimetil-3, 3-difenilpirrolidina.

TABELLA V.—Valori soglia dei test di conferma raccomandati da SIBioOC per la matrice salivale (nuovo CdS) e quelli raccomandati da GTF secondo le linee guida EWTDS (European guidelines for Workplace in Oral Fluid 2015-11-01 version 2.0) da utilizzare per le mansioni a rischio.

Analiti	Requisiti minimi di prestazioni* Sibioc (CdS) (ng/mL)	GTF Mansioni a rischio (ng/mL)
Amfetamina	2	15
Metamfetamina	2	15
MDA	2	15
MDMA	2	15
MDEA	/	/
THC	1	2
THCCOOH	/	/
Cocaina	2	8
BEG	2	8
Morfina	2	15
Codeina	2	15
6-MAM	2	2
Metadone	2	20
EDDP	2	20
Buprenorfina	2	1
Norbuprenorfina	2	1

MDA: 3,4-metilendiossianfetamina; MDMA, 3,4-metilenediossimetanfetamina; MDEA: 3,4-metilendiossi-N-etilfetamina; THC: delta-9-tetraidrocannabinolo; THCCOOH: '11-nor-9-carbossi-delta-9-tetraidrocannabinolo; BEG: benzoilecgonina; 6-MAM, 6-monoacetilmorfina; EDDP: 2-etilidene-1, 5-dimetil-3, 3-difenilpirrolidina.
 **Requisiti minimi di prestazione", ovvero le concentrazioni degli analiti nel fluido biologico oggetto di indagine che il laboratorio deve essere in grado di quantificare, con accuratezza, ed atti a valutare l'applicabilità di un metodo rispetto ad una determinata finalità analitica tossicologico-forense, anche nel caso non sussistano specifici requisiti normativi.

In riferimento alle analisi relative alle matrici pilifere se l'accertamento riguarda un reato facilitato dal consumo inconsapevole di sostanze farmacologicamente attive da parte della vittima, si considera valore soglia il LOQ del metodo analitico utilizzato che deve avere un valore dell'ordine di picogrammi per milligrammo di capello (pg/mg). Inoltre in riferimento ad alcune sostanze che sono presenti nell'organismo (acido gamma idrossibutirico GHB, testosterone, cortisolo, ecc.) per la loro determinazione è fondamentale effettuare l'analisi segmentale del capello per dimostrare una eventuale differenza di concentrazione della sostanza tra i vari segmenti presi

TABELLA VI.—Valori soglia dei test di conferma per la matrice cheratinica raccomandati dalla Society of Hair Testing (SoHT) e quelli indicati per le mansioni a rischio (provvedimento 19/09/2008).

Analiti	SoHT (ng/mg)	Cut-off (mansioni a rischio) (ng/mg)
Amfetamina	0.2	0.2
Metamfetamina	0.2	0.2
MDA	0.2	0.2
MDMA	0.2	0.2
MDEA	0.2	0.2
THC	0.05	0.1
THCCOOH	0.0002	0.1
Cocaina	0.5	0.5
BEG	*	0.05
Morfina	0.2	0.2
Codeina	0.2	0.2
6-MAM	0.2	0.2
Metadone	0.2	0.2
EDDP	**	-
Buprenorfina	0.1	0.05
Norbuprenorfina	***	-

*La presenza di benzoilecgonina, norcocaina, cocaetilene, idrossil-cocaina o idrossibenzoilecgonina deve essere considerato per confermare l'uso; **la conferma di EDDP dimostra l'uso di metadone; ***la conferma di norbuprenorfina dimostra l'uso di buprenorfina.
 MDA: 3,4-metilendiossianfetamina; MDMA: 3,4-metilenediossimetanfetamina; MDEA: 3,4-metilendiossi-N-etilfetamina; THC: delta-9-tetraidrocannabinolo; THCCOOH: '11-nor-9-carbossi-delta-9-tetraidrocannabinolo; BEG: benzoilecgonina; 6-MAM, 6-monoacetilmorfina; EDDP: 2-etilidene-1, 5-dimetil-3, 3-difenilpirrolidina.

in esame, in modo da poter possibilmente discriminare il picco legato all'assunzione o somministrazione rispetto alla produzione endogena. Per quanto riguarda la matrice ematica la recente revisione del Codice della Strada (Legge 25 novembre 2024, n. 177 G.U. Serie generale - n. 280 del 29-11-2024) modifica in maniera sostanziale la materia. Fino ad oggi le indagini dovevano stabilire o escludere una recente assunzione correlabile con lo status psicofisico del soggetto al momento del prelievo. Nel nuovo Codice si passa dalla "guida in stato di alterazione" alla "guida con uso di sostanze", quindi va considerato come valore soglia il valore riportato nella Tabella VIII "requisiti minimi di prestazione" del metodo analitico utilizzato, indicato dai Tossicologi Forensi nelle loro Linee Guida.¹³

TABELLA VII.—Valori soglia relativi ai marcatori dell'abuso alcolico per la matrice cheratinica raccomandati Society of Hair Testing (SoHT).

Classe di sostanza	Analiti	Valore soglia per consumo cronico eccessivo (ng/mg)	Valore per verifica dell'astinenza (ng/mg)
Esteri etilici degli acidi grassi (fatty acid ethyl esters, FAEES)	Etil miristato, etil palmitato, etil oleato, etil stearato	≥0,5 (come somma delle concentrazioni dei quattro esteri etilici) nel segmento 0-3 cm prossimale ≥0,1 nel segmento 0-6 cm prossimale	≤0,2 (come somma delle concentrazioni dei quattro esteri etilici) nel segmento 0-3 cm prossimale ≤0,4 nel segmento 0-6 cm prossimale
EtG	Etil glucuronide	≥0,03 sia nel segmento 0-3 che 0-6 cm prossimale	≤0,007 sia nel segmento 0-3 che 0-6 cm prossimale

TABELLA VIII.—Valori soglia dei test di conferma relativi alle sostanze d'abuso per la matrice Sangue raccomandati dai Tossicologi Forensi (nuovo CdS).

Analytes	Minimum performance requirements GTFI (Italian Highway Code) ng/mL
Amfetamina	2
Metamfetamina	2
MDA	2
MDMA	2
MDEA	2
THC	1
THCCOOH	2
Cocaina	2
BEG	2
Morfina	2
Codeina	2
6-MAM	2
Metadone	2
EDDP	2
Buprenfina	2
Norbuprenorfina	2

MDA: 3,4-metilendiossianfetamina; MDMA: 3,4-metilenediossimetanfetamina; MDEA: 3,4-metilendiossi-N-etilfetamina; THC: delta-9-tetraidrocannabinolo; THCCOOH: '11-nor-9-carbossi-delta-9-tetraidrocannabinolo; BEG: benzoilecgonina; 6-MAM, 6-monoacetilmorfina; EDDP: 2-etilidene-1, 5-dimetil-3, 3-difenilpirrolidina.
*“Requisiti minimi di prestazione”, ovvero le concentrazioni degli analiti nel fluido biologico oggetto di indagine che il laboratorio deve essere in grado di quantificare, con accuratezza, ed atti a valutare l'applicabilità di un metodo rispetto ad una determinata finalità analitica tossicologico-forense, anche nel caso non sussistano specifici requisiti normativi.

La Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica - Medicina di Laboratorio (SIBioC) ha ritenuto opportuno uniformare i valori soglia delle matrici saliva e sangue al fine di rendere il dato analitico omogeneo per una corretta valutazione medico-legale dello stesso.

Indicazioni

Requisiti minimi fase analitica	
Locali dedicati	Per indagini di screening e di conferma
Strumentazione per indagini di secondo livello	Gas cromatografia o cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa
Personale formato	Documentazione del percorso formativo
Rispetto dei valori soglia	In base al quesito medico legale

Fase post-analitica

Comunicazione dei risultati analitici

Il risultato analitico ottenuto sia da un solo test di screening (risultato negativo) o da un test di screening ed

un'analisi di conferma (test non negativo allo screening, ma negativo alla conferma o, infine, non negativo sia allo screening e positivo alla conferma) deve essere refertato dal responsabile del laboratorio o da un collaboratore abilitato, che deve essere un esperto di analisi di sostanze d'abuso in matrice biologiche e deve tener conto di tutte le osservazioni e informazioni riportate nel verbale di prelievo riguardo ad eventuali trattamenti farmacologici del soggetto.^{2, 4, 6, 7, 9}

Il referto analitico deve contenere i seguenti dati identificativi:

- il numero identificativo del campione e i dati anagrafici del soggetto sottoposto all'accertamento;
- la data di raccolta del campione;
- la data e ora di ricezione del campione da parte del laboratorio (se diversa dalla data di raccolta);
- la data della refertazione;
- il nome dell'autorità o persona fisica che ha richiesto l'analisi.
- Il referto deve inoltre includere:
 - la matrice biologica analizzata (capelli, peli pubici, ascellari, peli della barba, del petto, delle braccia o delle gambe);
 - il tipo di analisi eseguita;
 - il metodo analitico utilizzato;
 - il risultato delle analisi eseguite. Qualora le analisi di screening e di conferma abbiano rilevato la presenza di sostanze stupefacenti e/o metaboliti al di sopra del valore soglia prestabilito, il referto deve contenere il nome della/e sostanza/e rilevata/e con le relative concentrazioni e riportare la dicitura di “presente” da associare al dato quantitativo;
 - i valori soglia utilizzati;
 - il metodo di calcolo utilizzato per la determinazione dell'incertezza analitica applicata.

Per quanto riguarda le matrici pilifere, oltre al tipo di matrice analizzata, il referto deve inoltre contenere:

- la lunghezza originale del campione;
- la lunghezza del segmento di campione analizzato (o la lunghezza dei vari segmenti analizzati);
- eventuali informazioni sulla colorazione dei capelli/peli, nonché sugli ulteriori trattamenti cosmetici (ad esempio: es. si segnala che la matrice cheratinica oggetto dell'esame ha subito un trattamento cosmetico di colorazione).

Il dato analitico deve contenere le informazioni essenziali alla sua corretta interpretazione. Non vanno aggiunti ulteriori commenti o altre informazioni, a meno che l'autorità (o persona fisica) che ha ordinato il controllo richieda un parere o un'interpretazione sul dato analitico otte-

nuto. Qualora espressamente richiesto, il responsabile del laboratorio redigerà un ulteriore parere scritto su ulteriori utili informazioni per l'interpretazione dei risultati ottenuti dall'analisi di laboratorio.

Conservazione dei campioni

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze d'abuso nelle matrici biologiche devono conservare a -20 °C le aliquote B e C dei campioni risultati positivi secondo quanto stabilito dalla Legge (o dalle circolari regionali che regolamentano l'analisi delle sostanze d'abuso nelle matrici biologiche a fini medico-legali) (minimo 12 mesi).

Per quanto riguarda la conservazione dei campioni di matrice pilifera, i laboratori che effettuano analisi delle sostanze d'abuso e dei biomarcatori dell'abuso alcolico, devono conservare in luogo asciutto a temperatura ambiente ed al buio l'aliquota B del campione di capelli secondo quanto stabilito dalle leggi (ad esempio Provvedimento 18 settembre 2008) o dalle circolari regionali che regolamentano l'analisi delle sostanze d'abuso in matrice pilifera a fini medico-legali.

Il laboratorio inoltre deve conservare e rendere sempre disponibile tutta la documentazione relativa ai procedimenti analitici utilizzati (minimo 3 anni).^{2, 4, 6, 7, 9}

La documentazione deve comprendere:

- i moduli della catena di custodia;
- le registrazioni dei controlli interni di qualità effettuati dal laboratorio e della valutazione esterna di qualità a cui il laboratorio ha partecipato;
- le Procedure Operative Standard (POS) che il laboratorio utilizza per l'analisi delle principali sostanze d'abuso nelle matrici biologiche;
- tutti i risultati analitici (compresi quelli relativi alla validazione dei metodi con le curve di calibrazione ed i calcoli utilizzati per la formulazione del risultato);

- copia del referto finale.

I campioni così come la documentazione relativa alla catena di custodia devono essere conservati in luoghi chiusi a chiave e non accessibili se non al personale addetto al trattamento degli stessi.

Contestazione dei risultati

In caso di accertata presenza di una o più sostanze stupefacenti nelle matrici biologiche esaminate, la persona sottoposta ad accertamento può richiedere l'esecuzione della controanalisi sull'aliquota B del campione biologico o sull'aliquota C, nel caso gli accertamenti analitici prevedano la raccolta di una terza aliquota.

Il test di revisione, con costo a carico del richiedente, potrà

essere eseguito presso lo stesso laboratorio che ha analizzato l'aliquota A o B del campione biologico o altro laboratorio scelto a cura del soggetto sottoposto a controllo. Tale aliquota deve essere accompagnata dalla modulistica attestante le procedure legate alla catena di custodia ed includere informazioni riguardanti i risultati dell'analisi originale nonché i cut-off utilizzati nell'analisi stessa. Tutti i laboratori che effettuano analisi sulle aliquote B o C del campione in esame, devono possedere la documentazione atta a dimostrare l'utilizzo di metodologie d'analisi validate con requisiti di precisione ed accuratezza adeguate alle analisi richieste. Nelle controanalisi (o analisi di revisione) devono essere ricercate solamente le sostanze d'abuso e/o metaboliti risultati presenti nell'aliquota A o B del campione biologico e il referto deve essere disponibile secondo le norme vigenti delle leggi e delle circolari regionali in materia.^{2, 4, 6, 7, 9}

Indicazioni

Requisiti minimi fase post analitica	
Personale dirigente formato	Documentazione del percorso formativo
Presenza degli elementi identificativi e dati analitici nel referto	In base al quesito medico legale
Conservazione campioni positivi	Minimo 12 mesi Minimo 3 anni
Conservazione documentazione "Catena di custodia"	

Assicurazione della qualità analitica

I laboratori che effettuano analisi sulle sostanze stupefacenti o psicotrope devono implementare un sistema di gestione in qualità che comprenda tutti gli aspetti del processo analitico come:

- ricezione del campione;
- catena di custodia;
- sicurezza e comunicazione dei risultati;
- test di screening e di conferma;
- certificazione dei calibratori e dei controlli;
- validazione delle procedure analitiche.

Le procedure per l'assicurazione della qualità devono essere progettate, implementate e periodicamente revisionate al fine di monitorare l'andamento di ciascuna fase all'interno del processo di analisi.^{2, 4, 6, 7, 9}

Validazione delle metodologie d'analisi

La validazione dei metodi analitici include tutte quelle procedure atte a dimostrare che un particolare metodo,

utilizzato per l'identificazione e/o la quantificazione di un analita in una data matrice biologica, è affidabile e riproducibile per l'uso per il quale è stato implementato.

Ogni metodologia d'analisi utilizzata di routine dal laboratorio deve essere preventivamente validata secondo procedure condivise a livello nazionale e internazionale. Per i metodi di screening più comunemente utilizzati non sono di solito necessarie procedure di validazione in quanto il metodo viene validato dalla ditta produttrice. Tuttavia ogni kit per le analisi è corredato da calibratori di controllo che, inseriti in ogni lotto di campioni da analizzare, verificano l'accuratezza e la precisione delle analisi all'interno di un valore prestabilito. Nel caso vengano apportate modifiche alle indicazioni fornite dalle case produttrici dei kit, (ad esempio uso del kit per una matrice biologica differente da quella indicata dal produttore, variazione del limite di quantificazione, etc.) il laboratorio deve effettuare una validazione completa del metodo/kit modificato.

È auspicabile evitare ogni modifica rispetto a quanto indicato dalla Ditta produttrice nell'utilizzo di un kit, una eventuale modifica dovrebbe essere effettuata solo nei casi in cui non si abbia la possibilità di utilizzare altre metodologie.^{2, 4, 6, 7, 9}

La procedura di validazione adottata dai laboratori deve tenere conto dei seguenti parametri:

- esattezza intesa come il grado di accordo tra il valore medio ottenuto da una serie numerosa di determinazioni di un campione e il valore vero accettato o assegnato. L'esattezza è espressa come bias o errore sistematico e viene calcolata come differenza tra il valore medio ed il valore vero o come rapporto tra questa differenza ed il valore vero moltiplicato per 100 (% di bias);
- precisione intesa come il grado di concordanza tra differenti misurazioni indipendenti in condizioni sperimentali definite. Può essere espressa in termini di imprecisione come deviazione standard, varianza e deviazione standard relativa (RSD) o coefficiente di variazione (CV);
- limite di rilevabilità o di sensibilità (LOD) rappresenta la più piccola quantità di analita presente in un campione che può essere rilevata, ma non quantificata, con una data probabilità;
- limite di quantificazione (LOQ) che rappresenta la più piccola quantità di analita che può essere quantificata con una data imprecisione;
- linearità del metodo cioè la sua capacità di dare risultati analitici che sono direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita studiato;
- effetto matrice parametro che stabilisce un'alterazione della risposta dell'analita dovuta a interferenze di

componenti non identificati all'interno di una matrice biologica. Per ogni singola matrice l'accuratezza deve essere entro $\pm 15\%$ della concentrazione nominale e la precisione (%CV) non deve essere superiore al 15%;^{1, 2, 13}

- effetto trascinalimento o carry-over rappresenta un'alterazione della concentrazione dell'analita in un campione dovuta al residuo dell'analita precedentemente analizzato e rimasto nello strumento analitico. Il carry-over dovrebbe essere valutato analizzando i campioni bianchi dopo lo standard di calibrazione; il valore di carry-over nel bianco dopo un campione ad alta concentrazione di analita non deve essere maggiore del 20% del LOQ e del 5% per lo standard interno (IS). Dunque se l'analisi di tale bianco produce un risultato inferiore al limite di identificazione, LOD, il carry-over del metodo è accettabile;^{1, 2, 15}

- recupero rappresenta un valore fondamentale per valutare l'efficienza di una procedura di estrazione del campione. Il recupero dell'analita non deve essere necessariamente al 100%, i criteri di accettazione sono soddisfatti quando i risultati sono tra 90-110%;^{1, 2, 15}

- 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/scongelo). A tal riguardo dovrebbero essere effettuate valutazioni di stabilità per garantire che ogni passo intrapreso durante la preparazione del campione, la lavorazione e l'analisi nonché le condizioni di conservazione utilizzate non influiscono sulla concentrazione dell'analita;

- test della integrità della diluizione tale valutazione è fondamentale poiché può essere necessario diluire il campione e la diluizione deve essere una parte di un metodo validato; in questo caso l'inaccuratezza e il bias che ne derivano devono essere al di sotto del 15%. La valutazione della integrità della diluizione deve dunque far parte della validazione parziale del metodo.¹⁵

Controllo di qualità interno

Utilizzare un programma di qualità interno è fondamentale al fine di garantire l'affidabilità dei risultati analitici e permettere di evitare gli errori casuali che possono avvenire in fase analitica e/o pre- o post-analitica rendendo il risultato non accurato. La frequenza è rapportata alla definizione di "seduta (serie) analitica" e quindi come minimo è giornaliera o segue la cadenza della serie analitica (bisettimanale, settimanale, ecc.), ma va comunque modulata in relazione ai carichi di lavoro, alle prestazioni strumentali e ad altre considerazioni. Nel caso di processi che si svolgano in modo continuativo nell'arco delle 24 ore è opportuno

che vi siano almeno due serie di controlli nel corso delle 24 ore. Nell'ambito della serie analitica il campione di controllo dovrebbe essere inserito ogni volta in posizione casuale rispetto ai campioni sconosciuti.^{2, 4, 6, 7, 9, 15}

Valutazione esterna di qualità (VEQ)

Un laboratorio deve partecipare ad adeguati programmi di valutazione esterna della qualità. Le performance analitiche al di fuori dei criteri stabiliti dal programma di VEQ devono essere prontamente corrette. La scelta di un programma a cui partecipare deve essere fatta sulla base del miglior riscontro scientifico ottenibile. La partecipazione può riguardare la identificazione delle classi di sostanze o delle singole sostanze e la quantificazione nel caso delle analisi di conferma secondo i cut-off di Legge o stabiliti dall'ente gestore del programma. Nel caso dei test di screening, l'espressione dei risultati è in genere in termini di "positivo" o "negativo". In caso di analisi di conferma, è necessario fornire non solo un dato qualitativo, ma anche uno quantitativo, ossia la concentrazione rilevata secondo una data curva di calibrazione per l'analita identificato come presente nella matrice biologica esaminata. I risultati della partecipazione alla VEQ costituiscono un possibile oggetto di riflessione tra il personale del laboratorio e il direttore dello stesso, sulla performance del laboratorio poiché nel caso in cui ci siano errori è fondamentale individuarne le cause e apportare le correzioni necessarie al fine di impedire il ripetersi di tali errori. È opportuno conservare i risultati in formato cartaceo e telematico per almeno tre anni.^{2, 4, 6, 7, 9}

Indicazioni

Requisiti minimi per il laboratorio di tossicologia analitica	
Assicurazione della qualità analitica	Documentazione CQI e VEQ per tutte le linee analitiche con relativa conservazione per almeno 3 anni

Accertamenti tossicologici stabiliti da normative di legge

Poiché, come detto in premessa, la analisi tossicologiche con valenza forense possono frequentemente assumere un valore di prova giudiziaria, devono fornire risposte certe ed univoche garantendo una rintracciabilità di ogni fase operativa in modo da risultare non contestabili in sede di dibattimento giudiziario. Le determinazioni delle sostanze psicotrope a scopo medico-legale riguardano per lo più casi di guida in caso di uso di sostanze d'abuso (articolo 187 C.d.S) e/o alcol (articolo 186 C.d.S.), il controllo dei lavoratori addetti a mansioni a rischio e la verifica dei re-

quisiti fisici e psichici per il conseguimento, la revisione o la conferma di validità della Patente di guida per autoveicoli o motoveicoli da parte delle Commissioni Patenti,² ma anche il rilascio del Porto d'armi e l'affidamento di minori e adozioni. Per questo motivo in questi prossimi capitoli entriamo maggiormente nello specifico di alcuni di questi punti.

Procedure accertative per lavoratori con mansioni a rischio

L'Italia è uno tra i pochi paesi europei che ha una Legge in tema di accertamenti tossicologici sui lavoratori. Il Provvedimento del 18 settembre 2008, pubblicato sulla G.U. 236 del 8/10/2008 "Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi"¹⁰ ha attuato e reso applicative le indicazioni presentate della Conferenza Unificata Stato-Regioni (Provvedimento n. 99/cu 30 ottobre 2007 - G.U. n. 266 del 15 novembre 2007). La Legge mette in evidenza l'obbligatorietà del datore di lavoro di sottoporre a specifica sorveglianza sanitaria le categorie di lavoratori che sono elencate nell'allegato I del Provvedimento. Le procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di alcol-dipendenza, consumo eccessivo di alcol, tossicodipendenza e/o assunzione di sostanze stupefacenti allo scopo di definire ed attivare procedure e misure di sicurezza rivolte a tutelare l'incolumità del lavoratore stesso e di terze persone, devono essere finalizzate primariamente a prevenire incidenti collegati allo svolgimento di mansioni lavorative a rischio. Ricordiamo che l'iter procedurale si compone di due distinti momenti; il primo momento è indicato al fine di prevenire l'inizio di una attività lavorativa a rischio sotto l'influenza di alcol e/o sostanze di natura psicotropa, mentre il secondo momento è fondamentale per escludere una condizione di consumo eccessivo di alcol o dipendenza da alcol e da sostanze anche se con assunzioni occasionali. Il medico competente, una volta ricevuto l'elenco dei lavoratori da monitorare, ha 30 giorni di tempo per determinare la data e l'ora del test e il controllo deve essere comunicato al lavoratore con un preavviso massimo di 24 ore (la Legge non prevede un limite minimo di preavviso).¹⁰

Accertamenti per la valutazione di una influenza di alcol e/o sostanze stupefacenti nel lavoratore all'inizio del turno lavorativo

Per gli accertamenti analitici eseguiti al fine di escludere una influenza di alcol e/o sostanze stupefacenti nel lavoratore all'inizio del turno lavorativo risulta fondamentale la scelta

della matrice biologica da raccogliere in modo semplice dal medico competente e correlabile alla matrice di elezione utilizzata per stabilire l'attualità d'uso cioè il sangue. A tal proposito è importante richiamare le linee di indirizzo per la "prevenzione degli infortuni gravi e mortali correlati all'assunzione di alcolici e sostanze stupefacenti, l'accertamento di condizioni di alcol dipendenza e tossicodipendenza e il coordinamento delle azioni di vigilanza", inviate nel 2018 dal Ministero della Salute alla Conferenza Permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le provincie Autonome, dove risulterebbero indicate le seguenti matrici:

- alcol: l'aria espirata attraverso l'utilizzo di strumentazioni portatili quali gli etilometri;
- sostanze psicotrope: la saliva sulla quale dovrebbero essere eseguiti inizialmente dei test di screening ed in caso di positività i test di conferma.

La normativa attuale prevede per l'alcol l'uso dell'aria espirata (etilometro), per le sostanze invece un esame su matrice urinaria (fermo restando la possibilità di eseguire test analitici immunochimici on site, il medico competente può fare ricorso a laboratori autorizzati).

Nel caso dell'urina, verranno prelevate tre aliquote indicate con le lettere A, B e C utilizzate per le analisi di screening, conferma ed eventuale revisione come riportato nei precedenti capitoli.

Il lavoratore risultato positivo a tali accertamenti viene considerato temporaneamente inidoneo e inviato dallo stesso medico competente, alla struttura sanitaria, identificata nel Servizio per le Dipendenze (SerD) che oltre agli accertamenti di natura medica effettuerà anche accertamenti chimico-tossicologici su nuovi campioni.

Accertamenti per la valutazione di assenza di alcoldipendenza, consumo eccessivo di alcol, tossicodipendenza o di assunzione di sostanze

Per gli accertamenti analitici volti a verificare uno stato di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze le matrici utilizzate sono le seguenti:

- urina: verranno prelevate tre aliquote indicate con le lettere A, B e C utilizzate per le analisi di screening, conferma ed eventuale revisione come riportato precedentemente nel capitolo 2.2;
- matrici cheratiniche: il campione deve essere raccolto da un operatore sanitario qualificato secondo le indicazioni riportate nel capitolo 2.5.1 ed inviati a laboratori di tossicologia forense autorizzati o ai laboratori delle strutture sanitarie competenti.

Per gli accertamenti volti a verificare uno stato di assenza di alcoldipendenza e consumo eccessivo di alcol le matrici biologiche utilizzate sono le seguenti:

- sangue per la ricerca del biomarcatore transferrina desialata (CDT);
- matrice pilifera per la determinazione del biomarcatore etil glucuronide (EtG).

I valori soglia da applicare per le mansioni a rischio per le diverse matrici sono stati riportati nelle tabelle precedenti.

Procedure accertative per articolo 186 e 187 del Codice della Strada

Gli accertamenti sanitari per valutare la guida sotto l'influenza di alcol e/o sostanze stupefacenti hanno lo scopo di tutelare la salute pubblica e prevenire di incidenti stradali conseguenti all'uso di tali sostanze, sia nell'interesse del conducente sia di tutti gli altri possibili soggetti implicati (altri conducenti, passeggeri, pedoni). Tali accertamenti vengono effettuati in conformità al "Protocollo Operativo Droga-Alcol" versione 2.2 del febbraio 2005 presentato dal Ministero dell'Interno, Ministero della Salute e Ministero delle Infrastrutture e Trasporti nel 2005¹⁶ e in ottemperanza alle nuove disposizioni del C.d.S. 2024 (*Gazzetta Ufficiale n. 280 del 29/11/2024 LEGGE 25 novembre 2024, n. 177*).

Matrici utilizzate in caso di fermo

- Aria espirata attraverso apparecchiature strumentali in dotazione alle Forze di Polizia per la valutazione di assunzione di alcol al momento del fermo;
- saliva raccolta mediante dispositivi commerciali strumentali in dotazione alle Forze di Polizia per valutare al momento del fermo la presenza di sostanze stupefacenti.

Matrici utilizzate in caso di incidente stradale con trasporto in struttura ospedaliera

- Sangue intero raccolto dal personale sanitario in strutture ospedaliere per stabilire la presenza di sostanze non modificate e/o loro metaboliti al fine di valutare la presenza della sostanza al momento del prelievo. Il prelievo ematico effettuato dal personale sanitario su richiesta della Polizia Giudiziaria (es. in caso di incidente stradale), costituisce un atto di polizia giudiziaria per il compimento del quale vi è l'obbligo di dare avviso all'interessato della facoltà di farsi assistere da un difensore (Art. 114 disp. att. CPP, Artt. 354, 356 CPP);
- urina raccolta contestualmente alla matrice ematica per indicare una avvenuta pregressa esposizione del soggetto a sostanze xenobiotiche che sebbene non sia utile per stabilire la cronologia può comunque essere utile per l'interpretazione dei risultati e sufficiente per procurare una sanzione amministrativa.

È importante ricordare che i prelievi effettuati dal perso-

nale sanitario (sangue e urine) dovrebbero essere effettuati nel minor tempo possibile dalla avvenuta richiesta con orari vicini tra il prelievo ematico e quello urinario.

Inoltre i campioni raccolti per gli esami tossicologici dovranno essere sempre accompagnati dalla corretta modulistica (modulo di richiesta analisi, catena di custodia, consenso informato) e conservati in contenitori termici con elementi refrigeranti fino all'arrivo e alla presa in carico del laboratorio.

È comunque fondamentale che i campioni biologici raccolti dal personale sanitario vengano inviati nel più breve tempo possibile al laboratorio stesso.

Risultati

La presenza di alcol etilico e/o sostanze psicoattive (intesa come "sostanza madre") nella matrice ematica o salivare mette in evidenza quella che si definisce "attualità d'uso". La presenza di metaboliti inattivi di sostanze psicoattive nel sangue o di principi attivi e/o metaboliti esclusivamente nelle urine non permette di affermare che il soggetto sottoposto ad esami sia in uno stato di intossicazione. In quest'ultimo caso si configurerà una sanzione di tipo amministrativo (art.128 e 119 C.d.S.), non penale (art.187 C.d.S). È comunque importante anche verificare che il soggetto non sia stato sottoposto a terapie mediche con xenobiotici durante il soccorso stradale e quindi prima del prelievo, terapie che comunque devono essere riportate in catena di custodia.

Cosa succede se in caso di fermo si è positivi ad alcol e/o sostanze stupefacenti

Quando si viene fermati per guida in stato di ebbrezza da alcol e/o stupefacenti, oltre alle sanzioni amministrative e/o penali previste, il Prefetto dispone la revisione dei requisiti psicofisici per la guida. Tale revisione è un provvedimento cautelare disposto per Legge e va effettuata presso la Commissione Medica Locale Patenti (CML) competente per territorio di residenza del sanzionato. Al fine di valutare che la persona sottoposta a fermo abbia i requisiti psicofisici di idoneità alla guida e sia in grado di dissociare la guida dal consumo di alcol e/o sostanze d'abuso la CML predispone dei controlli successivi nel tempo ai quali è obbligatorio sottoporsi.

Analisi effettuate per la valutazione del consumo di alcol

Se si usa la matrice sangue, possono essere eseguite le seguenti analisi con marcatori aspecifici: transaminasi, gamma glutamil transferasi (γ -GT); proteine, emocromo (per il volume corpuscolare medio [MCV]).

Questi accertamenti vengono effettuati per avere un quadro generale dello stato epatico e della eventuale so-

fferenza epatica che può essere indotta dall'alcol o da un volume dei globuli rossi notevolmente aumentato, ma poiché tali marcatori possono essere alterati per altre diverse patologie e sono influenzati da molti fattori biologici (età, sesso, genetica) e iatrogeni, risultano non fondamentali per valutare l'idoneità richiesta e pertanto non possono essere utilizzati da soli, senza l'utilizzo di marcatori diretti. Poiché sono marcatori aspecifici ne è sconsigliato l'utilizzo.

CDT o transferrina carboidrato carente (*carbohydrate-deficient transferrin*) è un invece un indicatore specifico di consumo recente di alcol, con un intervallo di valori considerato normale, un intervallo considerato dubbio e un intervallo considerato indice di abuso di alcol. Relativamente ai valori soglia, si raccomanda ad ogni Laboratorio di definire il proprio livello decisionale o valore soglia in base al metodo utilizzato, alla imprecisione, alla popolazione di riferimento e allo scopo per cui è eseguita la determinazione della CDT. Seguendo le linee guida IFCC è comunque consigliata la espressione in % con un cut off <2.

Se si usa la matrice pilifera, l'etilglicuronide (EtG) è un marcatore specifico e diretto poiché metabolita epatico dell'alcol, si deposita sul capello e viene richiesto per avere una visione storica del consumo di alcol. È considerato in questo caso il marcatore di elezione.

Per i valori soglia dell'EtG nella matrice pilifera è possibile fare riferimento alle tabelle riportate nei capitoli precedenti.

Analisi effettuate per la valutazione del consumo di sostanze psicotrope

Le matrici biologiche sulle quali vengono effettuato gli accertamenti analitici sono le seguenti.

URINA

Verranno prelevate tre aliquote indicate con le lettere A, B e C utilizzate per le analisi di screening, conferma ed eventuale revisione come riportato nei precedenti capitoli.

MATRICE PILIFERA

La lunghezza minima esaminata è di 3 cm. Si ricerca la presenza degli stupefacenti di maggiore diffusione e consumo:

- oppiacei (eroina, morfina, ecc.);
- cocaina;
- THC (tetraidrocannabinoidi, ovvero tutti i derivati della cannabis);
- metamfetamina;
- ecstasy;
- ketamina;
- metadone;

- buprenorfina.

La procedura prevede controlli che saranno più severi e marcati nel tempo se viene commessa una seconda infrazione (recidiva), ma comunque l'impegnativa redatta su apposito modulo dalla CML, riporterà gli esami richiesti, nonché la sede della matrice e la lunghezza del capello.

A questa richiesta il laboratorio dovrà attenersi scrupolosamente, segnalando l'eventuale impossibilità nel soddisfarla.

Da ricordare che tali esami non sono a carico del SSN e quindi sono a carico dell'utente.

Conclusioni

Le determinazioni analitiche delle sostanze stupefacenti e psicotrope nelle matrici biologiche richiedono sempre una particolare attenzione soprattutto se tali determinazioni assumono carattere medico-legale e considerate prove in ambito amministrativo o penale. Devono infatti possedere dei requisiti di attendibilità e affidabilità di un dato analitico che dovrà anche essere correttamente interpretato. Lo scopo di queste Procedure è quindi quello di fornire indicazioni di carattere generale che possano essere condivise fra i laboratori che effettuano accertamenti con finalità forensi al fine di uniformare le procedure analitiche ed organizzative dei laboratori stessi e che possano essere utilizzate come "strumento di consultazione" per quei laboratori che progettano di effettuare analisi sulle sostanze stupefacenti e psicotrope in matrici biologiche fornendo così un servizio di qualità a garanzia del dato medico-legale.

Bibliografia

1. Zuccaro P, Marchei E, Pellegrini M, Palmi I, Mortali C, Pichini S. Il dosaggio delle droghe d'abuso nelle urine e nei capelli: linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità. ESA DIA Roche; 2004 [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://publ.iss.it/ITA/Items/GetPDF?uuid=505a0e76-76c5-4cc6-8102-5691878c41b3> [citato il 26 feb 2025].
2. Favretto D, Pichini S, Bucchioni P, Pacifici R. Linee Guida in materia di analisi su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali. Documento di Consenso Gruppo Tossicologi Forensi – Gruppo di Studio di Farmacotossicologia e Doping Sibioc sulle Indagini di Laboratorio per la determinazione delle Sostanze d'Abuso. *Biochim Clin* 2017;41:91.
3. Pacifici R, Gori P, Martucci L. 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. *Biochim Clin* 2014;38:27–31.
4. Pichini S, Pacifici R, Mortali C, Gori P, Marchei E, Marchioro L,

et al. "Linee Guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nelle urine; 2013 [Internet]. Disponibile alla pagina: https://www.iss.it/documents/20126/1915304/Linee_Guida_Urine_xweb.pdf [citato il 26 feb 2025].

5. Pichini S, Pacifici R, Mortali C, Gori P, Marchei E, Martucci L, *et al.* "Linee Guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella saliva; 2013 [Internet]. Disponibile alla pagina: https://www.iss.it/documents/20126/1915304/Linee_Guida_Saliva_xweb.pdf [citato il 26 feb 2025].

6. Pichini S, Bucchioni P, Pellegrini M, Pacifici R. Procedure operative per la determinazione delle sostanze d'abuso su sangue; 2017 [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.iss.it/documents/20126/0/PROCEDURE-OPERATIVE-sangue.pdf/7d0a5216-ded9-7e23-6609-1deed0df14e1?t=1576349808583> [citato il 26 feb 2025].

7. Pichini S, Bucchioni P, Busardò FP, Bertol E, Ruggieri MP, Basili E, *et al.* Procedure analitiche e valori decisionali ematici per accertare la guida in stato di alterazione psicofisica da sostanze d'abuso. *Biochim Clin* 2023;47:370–6.

8. Pichini S, Pacifici R, Gori P, Marchei E, Martucci L, Mastrobattista L, *et al.* Linee Guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera; 2013 [Internet]. Disponibile alla pagina: https://www.iss.it/documents/20126/1915304/Linee_Guida_Capelli_xweb.pdf/88ffd26a-f665-6eab-2742-fb6f63617161?t=1576445692472 [citato il 26 feb 2025].

9. Ciancio GM, Pellegrini M, Berretta P, Minutillo A, Castaldo P, Busardò FP, *et al.* L'utilizzo della matrice urinaria in tossicologia forense. *Biochim Clin* 2023;47:SS1.

10. Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi. GU Serie Generale n.236 del 08-10-2008; [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/gu/2008/10/08/236/sg/pdf> [cited 2025, Feb 26].

11. SoHT Consensus On Drugs Of Abuse (Doa) Testing In Hair. 2021 [Internet]. Disponibile alla pagina: https://www.soht.org/images/pdf/Consensus_DoA_2021.pdf [citato il 26 feb 2025].

12. SoHT Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption; 2019 [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.soht.org/images/pdf/Use%20of%20Alcohol%20Markers%20in%20Hair%20for%20Abstinence%20Assessment%202012.pdf> [citato il 26 feb 2025].

13. Strano Rossi S, Frison G, Chericoni S, Bertol E, Favretto D, Pichini S, *et al.* Linee guida per la determinazione di sostanze stupefacenti e psicotrope su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali. *Riv Ital Med Lab* 2023.

14. Pragst F, Suesse S, Salomone A, Vincenti M, Cirimele V, Hazon J, *et al.* Commentary on current changes of the SoHT 2016 consensus on alcohol markers in hair and further background information. *Forensic Sci Int* 2017;278:326–33.

15. D'Avolio A, Cantù M, Gervasoni J, Artusi C, Marinova M, Nonnato A, *et al.* Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di Laboratorio "La spettrometria di massa: applicazioni e innovazioni diagnostiche"Validazione dei metodi quantitativi bioanalitici in spettrometria di massa: regole e protocolli sperimentali. *Biochim Clin* 2018;42.

16. Protocollo operativo per gli accertamenti richiesti ai sensi del comma 5 dell'art 186 del DL.vo 30.4.1992 n. 285 e successive modificazioni sui conducenti coinvolti in incidenti stradali e sottoposti a cure mediche presso le strutture sanitarie di base ovvero presso quelle accreditate o comunque equiparate, versione 2.2 febbraio 2005 [Internet]. Disponibile alla pagina: https://prefettura.interno.gov.it/sites/default/files/71/2024-04/2010_-_protocollo_reati_cds_186-187_13_luglio_ocr.pdf [citato il 26 feb 2025].

Conflitti di interesse

Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.

Cronologia

Publicato online: 19 marzo 2024. - Accettato: 5 febbraio 2024. - Ricevuto: 24 gennaio 2024.