

CONVEGNO

“ALCOL E SOSTANZE STUPEFACENTI”

Polidiagnostico CAM – Monza, 29 giugno 2011

Requisiti delle analisi a valenza medico legale

Marzia Bernini

Dip.to Sp. Chir., Sc. Rad. e Med. Forensi - Università degli Studi di Brescia

A. O. Spedali Civili di Brescia – Servizio di Medicina Legale

La determinazione di alcol e sostanze stupefacenti in campioni biologici, con finalità medico-legale, richiede una particolare capacità analitica ed interpretativa, al fine di corrispondere un risultato univoco.

Queste indagini, infatti, presentano la peculiarità di assumere il *valore di prova giudiziaria*, con ricaduta in campo penale, amministrativo, lavorativo per il soggetto esaminato.

Gli ambiti di applicazione di tali analisi riguardano:

Idoneità alla guida - Guida sotto l'influenza di sostanze d'abuso

Mansioni lavorative a rischio incolumità - Mansioni lavorative a rischio di terzi

Porto d'armi - Licenza di caccia

Idoneità a specifiche norme concorsuali (Forze di Polizia e Forze Armate)

Affidamento di minori - Adozioni internazionali

Annullamento di matrimonio

Diagnosi di consumo di stupefacenti/psicotropi

Diagnosi di tossicodipendenza

Diagnosi di effetto "sotto l'influenza di"

DPR 14.01.1997

DGR VIII/9097 13.03.2009 Reg. Lombardia (Accreditamento)

- La recente normativa sull'accREDITAMENTO dei laboratori ha indicato le caratteristiche formali e sostanziali che un laboratorio deve possedere per poter svolgere analisi a finalità medico-legale in Lombardia.
- La peculiarità di queste caratteristiche è legata alla necessità di affidare l'opera di prevenzione e controllo di alcuni comportamenti sociali a laboratori adeguatamente attrezzati e preparati, rendendo il più possibile omogeneo il risultato ottenuto, sull'intero territorio regionale.

- *DGR VIII/9097 del 13/3/2009 riguardante Servizi di Medicina di Laboratorio (SMeL) che effettuano la ricerca di sostanze stupefacenti e psicotrope su materiali biologici*

Insieme di:

- caratteristiche strutturali ed organizzative del laboratorio
- caratteristiche analitiche di screening e conferma delle singole sostanze, per ogni matrice biologica
- documentazione inerente le procedure pre-analitiche (raccolta e conservazione), analitiche (metodi estrattivi, di screening, di conferma), post-analitiche (refertazione)

Il Laboratorio deve indicare:

- *Molecole in grado di testare*
- *Matrici su cui eseguire l'analisi (uso attuale, recente e cronico)*
- *Metodi analitici adottati*
- *Riferimenti analitici sul referto: cut-off e LOQ*
- *Personale addetto (laureato e tecnico)*

Organizzazione del Laboratorio riguarda:

- modalità di accesso, lavorazione, conservazione dei campioni fino all'eliminazione
- metodiche preparative e strumentali per l'effettuazione delle analisi di screening e conferma
- modalità di effettuazione delle analisi e relativi parametri statistici
- tempi di conservazione dei campioni fino all'eliminazione

Il requisito fondamentale è la *Gestione della qualità* dei processi adottati, per garantire riproducibilità dell'analisi ed uniformità del risultato:

- Identificazione certa e Catena di custodia del campione
- Validazione delle indagini analitiche
- Refertazione in base alla corretta interpretazione del risultato analitico (*determinazione dei cut-off di screening e di conferma*)

Finalità medico-legale: Catena di custodia

“Procedura documentata atta a garantire l'autenticità, l'integrità e la tracciabilità di un campione dal momento del prelievo/raccolta sino allo smaltimento;..” *

**Linee Guida GFTI-SIMLA – Revisione n. 3 del 1 marzo 2010*

Riguarda:

- la modalità di identificazione e raccolta del campione e del controcampione
- la compilazione dei documenti comprovanti l'accesso, la lavorazione, la conservazione del campione/controcampione
- la conservazione della documentazione e back-up analitico

Criteri da considerare per l'eventuale ricusazione del campione:

- Corretta modalità di *conservazione* nel trasporto
- *Idoneità* della richiesta → *eseguibilità* da parte del Laboratorio
- Idoneità *quali-quantitativa* del campione
- *Corrispondenza* dei dati del campione e documentazione
- Evidenza di *manomissione*

Validazione delle indagini analitiche

La VALIDAZIONE è l'ottenimento di un risultato idoneo alle finalità per cui è concepito, dimostrando che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista sono stati soddisfatti.

Prevede:

- *Approvvigionamento di standard puri di riferimento*
- *Sviluppo del metodo analitico secondo parametri statistici e nel rispetto di Linee Guida emanate*
- *Stesura delle procedure per l'applicazione in routine dell'analisi (SOP – Standard Operating Procedures)*
- *Determinazione dei criteri di accettabilità*

Parametri obbligatori:

- specificità,
- linearità,
- accuratezza e precisione,
- limite di quantificazione (LLOQ)

Parametri relativi all'analisi:

- LLOD,
- ULOQ,
- recupero,
- stabilità,
- robustezza

Validazione delle indagini analitiche

Si realizza tenendo conto in particolare di:

- *specificità*: distinzione tra l'analita ed i suoi metaboliti, derivati, ecc
- *Curva di calibrazione*: valutazione della relazione esistente tra la quantità di analita ed il segnale prodotto, e del relativo coefficiente di regressione. *Non può esprimere concentrazioni al di fuori del proprio intervallo (estrapolazioni)*. I calibratori devono includere il LLOQ (di norma almeno 4 livelli di concentrazione)
- *Ripetibilità*: precisione intra-day ed inter-day
- *Controllo interno*: controllo noto, controllo cieco

Analisi di screening

E' l'analisi *preliminare* che fornisce un risultato *presuntivo di positività/negatività* rispetto ad una sostanza/classe di sostanze in riferimento ad un *cut-off* stabilito.

Per la caratteristica di *prova giudiziaria* dell'analisi a finalità medico-legale, un risultato positivo ottenuto con la sola analisi di screening non può assumere validità forense.

Linee Guida GFTI-SIMLA – Revisione n. 3 del 1 marzo 2010

Il **cut-off**, o valore soglia, è:

“(...) limite di concentrazione definito, in maniera convenzionale e arbitraria, per stabilire la negatività ovvero la positività (non negatività nel caso di analisi di screening) di un campione.

Il valore di cut-off, pertanto, può dipendere dall’ambito di applicazione dell’analisi. “

Linee Guida GFTI-SIMLA – Revisione n. 3 del 1 marzo 2010

I cut-off di screening urinari per le sostanze previste dal DGR VIII/9097 13.03.2009 Reg. Lombardia (SMeL) sono in linea con i valori indicati in “*Linee guida per i laboratori di analisi di sostanze d’abuso con finalità tossicologico-forense e medico-legali*” – Rev. 3 01.03.2010 GTFI – SIMLA:

Cocaina e metaboliti: 300 ng/ml

Oppiacei: 300 ng/ml

Metadone: 300 ng/ml

Cannabinoidi: 50 ng/ml

Amfetamine: 500 ng/ml

Metossiamfetamine: 500 ng/ml

Buprenorfina: 5 ng/ml

Se il test utilizzato è per “classe” di sostanze, è indispensabile controllare che sia in grado di registrare la presenza di tutte le singole sostanze richieste (indicazione della *cross-reactivity*)

- Es. per oppiacei: *morfina, 6-MAM, codeina*
- Es. per amfetamine: *Amfetamina, Metamfetamina*
- Es. per metilendioossiderivati (Ecstasy): *MDA, MDMA, MDE, MBDB*

Nelle indagini a finalità medico-legale può essere richiesta l'esecuzione di test che convalidino l'idoneità del campione urinario:

- creatinina
- peso specifico
- pH; nitriti; adulteranti aggiunti

SAMHSA*

**The U.S. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs,*
Forensic Science International 174 (2008) 111–119

Analisi di conferma

- A differenza dell' *analisi di screening* (analisi preliminare che fornisce un risultato presuntivo – positivo o negativo – rispetto ad una sostanza di riferimento od ad un cut-off),
- l'*analisi di conferma* deve essere eseguita obbligatoriamente con metodo di maggiore *specificità*, o su differente aliquota del campione, al fine di identificare specificamente una sostanza e/o i suoi metaboliti.

Linee Guida GFTI-SIMLA – Revisione n. 3 del 1 marzo 2010

Per le indagini a finalità medico-legale risulta quindi

INDISPENSABILE

eseguire l'analisi di

CONFERMA

della positività risultante dall'analisi di screening.

I laboratori che non siano in grado di eseguire l'analisi di conferma

NON POSSONO

analizzare campioni a finalità medico-legale.

- La tecnica di conferma deve fornire un risultato “indipendente” da quello di screening.
- La *spettrometria di massa*, in configurazione singola o multipla, *combinata con una tecnica separativa cromatografica* od elettroforetica (GC, LC, EC), è la tecnica di elezione per le analisi di conferma.

La finalità del test di conferma include:

- la corretta identificazione della sostanza che ha prodotto il risultato positivo di screening.

“...si ritiene accettabile un metodo di conferma in grado di raggiungere un LLOD pari ad almeno la metà del cut-off del metodo di screening.”

Linee Guida GFTI-SIMLA – Revisione n. 3 del 1 marzo 2010

- la quantificazione della singola sostanza necessaria, in considerazione dello specifico cut-off, per la valutazione di positività/negatività del risultato.

L'impiego di almeno uno *standard interno* risulta obbligatoria per conferire la necessaria precisione ed accuratezza alla misura della ritenzione cromatografica ed alla quantificazione.

La realizzazione dell'analisi di conferma

quantitativa

passa necessariamente attraverso l'allestimento di

curve di calibrazione

costruite utilizzando standard puri dei singoli analiti

(almeno 4 punti di curva)

Le sostanze da determinare nell'analisi di conferma vanno indicate singolarmente sul referto.

Ad es. su urine:

Cocaina, Benzoilecgonina

Morfina, Codeina, 6-MAM, Diidrocodeina

Metadone, EDDP

Buprenorfina, Nor-buprenorfina

delta-9-THC-COOH per cannabinoidi metaboliti

Amfetamina, Metamfetamina

MDMA, MDA, MDE, MBDB

Referto

Deve riportare:

- il risultato analitico di screening e di conferma
- il cut-off ed il LOQ del singolo test di screening e di conferma
- la notazione Negativo/Positivo in base al cut-off indicato

In sostanza il Laboratorio deve fornire un dato *oggettivo, affidabile, facilmente interpretabile* rispetto alla finalità richiesta

(Codice della Strada, idoneità alla guida o mansioni, diagnosi di dipendenza da..., ecc)

La necessità di indicare un cut-off di conferma stabilito da normativa, implica che il laboratorio sia in grado di fornire referti “diversificati” a seconda della norma di riferimento, con l’indicazione di positività/negatività del risultato in base ai diversi cut-off di conferma.

- DGR VIII/9097 13.03.2009 Reg. Lombardia (SMeL)
- L. 131/2003 (Lavoratori con mansioni a rischio)
- Accertamenti per idoneità alla guida

Nella pratica di laboratorio, in base alla finalità medico-legale della normativa di riferimento, il laboratorista può trovarsi di fronte a valutazioni “mirate”:

- campione urinario positivo per oppiacei all'analisi di screening, con risultato quantitativo all'analisi di conferma pari a morfina 80 ng/ml :

Positivo secondo SMeL, Codice della Strada, Idoneità alla guida (cut-off 50 ng/ml),

Negativo secondo la Legge 131/2003 (cut-off 100 ng/ml).

Cut-off conferme urine SMeL

Cocaina e metaboliti: **150** ng/ml

Metadone: **250** ng/ml

Morfina: **50** ng/ml

Codeina: **50** ng/ml

6-MAM: **10** ng/ml

Amfetaminici: **200** ng/ml

Cut-off conferme urine L131/2003

Cocaina e metaboliti: **100** ng/ml

Metadone: **100** ng/ml

Morfina: **100** ng/ml

Codeina: **100** ng/ml

6-MAM: **100** ng/ml

Amfetaminici: **250** ng/ml

Interpretazione qualitativa del referto:

- 1) referto positivo solo per codeina e negativo per morfina e 6-MAM: il soggetto esaminato ha assunto farmaci antidolorifici contenenti codeina.
- 2) referto negativo a fronte di screening positivo a causa di cross-reattività analitica: molto spesso l'assunzione di farmaci antiistaminici produce un risultato di screening Falso Positivo per amfetamine.

Interpretazione quantitativa del referto:

- 1) dosaggio di conferma inferiore al valore di cut-off dello screening: il risultato è positivo quando il dosaggio della singola molecola è superiore al cut-off di conferma.
- 2) test di screening positivo “border-line” e dosaggio di conferma negativo: il risultato è negativo quando il dosaggio della singola molecola è inferiore al cut-off di conferma

Mantenimento della Qualità

La Qualità analitica del Laboratorio va mantenuta con la partecipazione, ed il conseguimento di esito positivo, ad idonei Controlli Esterni della Qualità, per singola matrice:

- Stupefacenti nelle urine
- Stupefacenti nel siero/sangue
- Stupefacenti nei capelli
- Stupefacenti nella saliva
- Dosaggio dell'etanolo in siero/sangue
- Marcatori di abuso cronico di alcol in siero
- Marcatori di abuso cronico di alcol nei capelli



Grazie per l'attenzione!