

PROCEDIMIENTOS RECOMENDADOS

para la determinación de

sustancias de abuso convencionales y nuevas sustancias psicoactivas

en matrices biológicas

Guía para la toxicología clínica,
forense y epidemiológica.



SANGRE



FLUIDO ORAL



ORINA



CABELLO



Recogida de muestras, conservación
y cadena de custodia



Métodos analíticos de cribado
y confirmatorios



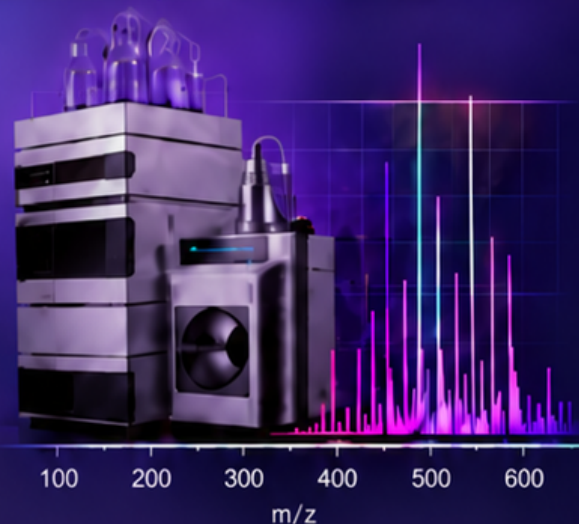
Validación de métodos
y garantía de calidad



Interpretación y emisión de informes
para resultados fiables



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ



PROCEDIMIENTOS RECOMENDADOS

**para la determinación de sustancias de abuso convencionales
y nuevas sustancias psicoactivas en matrices biológicas.**

Guía para la toxicología clínica, forense y epidemiológica.

**Emilia Marchei¹, Maria Concetta Rotolo¹, Paolo Berretta¹, Chiara Fraioli¹,
Francesco Paolo Busardò², Simona Pichini¹, Valeria Aquilina², Manuela Pellegrini¹**

1. Centro Nacional de Adicciones y Dopaje, Istituto Superiore Di Sanità, Roma, Italia

2. Departamento de Ciencias Biomédicas y Salud Pública, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italia

Resumen

Este documento proporciona orientaciones para la determinación de sustancias de abuso convencionales y nuevas sustancias psicoactivas (NPS) en las principales matrices biológicas, incluidas sangre, fluido oral, orina y cabello. Se describen los objetivos clínicos, forenses y epidemiológicos de los análisis toxicológicos, destacando la necesidad de enfoques analíticos sensibles y específicos para hacer frente a la rápida evolución del mercado de las NPS. Para cada matriz biológica se describen los procedimientos de recogida, conservación, gestión de las no conformidades y análisis, junto con los requisitos documentales, incluidos el consentimiento informado, la cadena de custodia y la emisión de informes. El documento detalla las metodologías analíticas, distinguiendo entre pruebas de cribado (screening) y análisis confirmatorios basados en técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas, y proporciona valores de corte de referencia. Se hace especial hincapié en la validación de métodos, el control de calidad interno y externo y la correcta interpretación y comunicación de los resultados. El objetivo general es armonizar los procedimientos de laboratorio, garantizando la coherencia, la fiabilidad y la validez médico-legal de los hallazgos analíticos.

Palabras clave: matrices biológicas; sustancias de abuso; nuevas sustancias psicoactivas; toxicología analítica.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento por las valiosas sugerencias, que han contribuido significativamente a mejorar la claridad y la calidad general del texto:

- Francesco Paolo Busardò, Departamento de Ciencias Biomédicas y Salud Pública, Universidad Politécnica de las Marcas, Ancona, Italia;
- Enrico Gerace, Centro Diagnóstico Avanzado “A. Bertinaria”, Laboratorio de Toxicología Forense, Orbassano, Turín, Italia;
- Emanuela Locci, Departamento de Ciencias Médicas y Salud Pública, Sección de Medicina Legal, Universidad de Cagliari, Cagliari, Italia;
- Luca Morini, Departamento de Salud Pública, Medicina Experimental y Forense, Unidad de Medicina Legal, Universidad de Pavía, Pavía, Italia;
- Valeria Ottaviani, miembro de The International Association of Forensic Toxicologists y del Grupo Italiano de Toxicólogos Forenses;
- Jennifer Pascali, Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Unidad de Medicina Legal, Universidad de Bolonia, Bolonia, Italia;
- Alberto Salomone, Departamento de Química, Universidad de Turín, Turín, Italia.

Los autores desean agradecer a la Dra. Roberta Tito el apoyo técnico.

ÍNDICE

PRESENTACIÓN	4
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	6
1. MATRICES BIOLÓGICAS	8
1.1 Matriz sanguínea	8
1.1.1 Procedimientos de recogida	8
1.1.2 Condiciones de conservación	9
1.1.3 No conformidades	10
1.2 Fluido oral	11
1.2.1 Procedimientos de recogida	11
1.2.2 Condiciones de conservación	11
1.2.3 No conformidades	12
1.3 Orina	12
1.3.1 Procedimientos de recogida	12
1.3.2 Condiciones de conservación	13
1.3.3 No conformidades	14
1.4 Matriz queratínica	14
1.4.1 Procedimientos de recogida	14
1.4.2 Condiciones de conservación	16
1.4.3 No conformidades	16
2. USO ACTUAL Y CONSUMO PASADO/CONTINUADO DE ETANOL	17
2.1 Uso actual: concentración de etanol en sangre	17
2.2 Uso reciente: etanol, etilglucurónido y etilsulfato en orina	18
2.3 Uso pasado y continuado	19
2.3.1 hEtG	19
2.3.2 FAEE en cabello	19
2.3.3 PEth en sangre	20
2.3.4 Biomarcadores indirectos del consumo crónico de etanol	20
3. DOCUMENTOS	20
3.1 Consentimiento informado	21
3.2 Política de protección de datos y consentimiento conforme al Reglamento (UE) 2016/679	21
3.3 Informe de muestreo	21
3.4 Cadena de custodia	22
3.5 Emisión de informes	22
4. MÉTODOS ANALÍTICOS: CRIBADO (SCREENING) Y ANÁLISIS CONFIRMATORIOS	22
4.1 Métodos de cribado (screening)	23
4.2 Métodos confirmatorios	24
5. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	26
6. EVALUACIÓN INTERNA Y EXTERNA DE LA CALIDAD	27
7. EMISIÓN Y COMUNICACIÓN DE LOS RESULTADOS	27
CONCLUSIONES	28
REFERENCIAS	28
APÉNDICE A – PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTÁNDAR RECOMENDADOS	34
Introducción	34
Operaciones preliminares	34
Determinación de sustancias psicoactivas en matrices biológicas	34
Análisis cuantitativo de datos	35
Referencias	36
Anexos A1–A8	39–46
APÉNDICE B – Ejemplos de formularios	47
B1. Ejemplo de formulario de consentimiento informado	47
B2. Ejemplo de formulario de política de protección de datos y consentimiento	48
B3. Ejemplo de informe de recogida de muestras biológicas	49
B4. Ejemplo de formulario de cadena de custodia	50
B5. Ejemplo de formulario de informe	51

PRESENTACIÓN

La detección de sustancias de abuso y nuevas sustancias psicoactivas en matrices biológicas es uno de los desafíos más complejos y significativos que se afrontan actualmente en los ámbitos de la toxicología clínica y forense.

Los cambios en los patrones de consumo de sustancias, la rápida aparición de nuevas sustancias y la ampliación de los ámbitos en los que es necesario determinar el consumo de sustancias (clínico, sanitario, de asistencia social, laboral y judicial) requieren herramientas analíticas rigurosas y procedimientos estandarizados capaces de garantizar la fiabilidad, la comparabilidad y la validez forense de los resultados.

Los avances científicos permiten actualmente realizar pruebas dirigidas para detectar sustancias ilícitas en diferentes muestras biológicas, confirmar el uso indebido de sustancias, identificar el tipo de sustancia, tradicional o emergente, y determinar el momento y la duración del consumo.

Estos procedimientos recomendados se han elaborado con el objetivo de proporcionar a los profesionales sanitarios y a los profesionales del sector una guía clara, actualizada y científicamente sólida para gestionar todo el proceso diagnóstico: desde la selección de la matriz biológica hasta la recogida de la muestra, desde la conservación de la muestra hasta la emisión del informe, pasando por el uso integrado de métodos de cribado (screening) y confirmatorios de acuerdo con las normas internacionales.

Este documento combina conocimientos técnicos, aspectos jurídicos y recomendaciones operativas, proponiendo procedimientos que pueden adaptarse a diferentes contextos clínicos y forenses. La creciente complejidad del mercado de sustancias psicoactivas y la introducción continua de nuevas moléculas requieren una respuesta basada en competencias multidisciplinares, metodologías avanzadas y protocolos armonizados.

Se espera que estas recomendaciones contribuyan a apoyar el trabajo cotidiano de los profesionales, garantizando la calidad, la transparencia y la trazabilidad del proceso analítico y promoviendo un enfoque coherente en todo el territorio nacional.

La exactitud de los resultados y su correcta interpretación no constituyen únicamente un requisito técnico, sino también un elemento esencial para la protección de la salud pública, la garantía de la seguridad pública y la correcta administración de justicia.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
6-MAM	6-monoacetilmorfina
11-OH THC	11-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol
ALT	alanina aminotransferasa
AST	aspartato aminotransferasa
BEG	benzoilecgonina
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CBD	cannabidiol
CDT	transferrina deficiente en carbohidratos
CV%	coeficiente de variación (%)
DBS	Dried Blood Spots (gotas de sangre seca)
DFC	Drug-Facilitated Crime (delito facilitado por drogas)
DSS	Dried Saliva Spots (gotas de saliva seca)
DUS	Dried Urine Spots (gotas de orina seca)
EDDP	2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina
EQA	evaluación externa de la calidad
EtG	etilglucurónido
EtPa	etilpalmitato
EtS	etilsulfato
EWDTs	European Workplace Drug Testing Society
GC	cromatografía de gases
GC-MS	cromatografía de gases-espectrometría de masas
GDPR	Reglamento General de Protección de Datos
GTFI	Gruppo Tossicologi Forensi Italiani
HCl	ácido clorhídrico
HRMS	espectrometría de masas de alta resolución
HS-GC	cromatografía de gases en espacio de cabeza
IQC	control interno de calidad
LC	cromatografía líquida
LC-HRMS	cromatografía líquida-espectrometría de masas de alta resolución
LC-MS/MS	cromatografía líquida-espectrometría de masas/espectrometría de masas
LOD	límite de detección
LOQ	límite de cuantificación
MBDB	3,4-metilendioxi-N-metil- α -etilfenetilamina
MBTFA	N-metil-bis(trifluoroacetamida)
MCV	volumen corpuscular medio
MDA	3,4-metilendioxi-anfetamina
MDEA	3,4-metilendioxi-N-etil-anfetamina
MDMA	3,4-metilendioxi-metanfetamina
MS	espectrometría de masas
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
NaOH	hidróxido de sodio
NPS	nuevas sustancias psicoactivas
PEth	fosfatidiletanol
PLD	fosfolipasa D
POE	procedimiento(s) operativo(s) estándar
PTCA	ácido 1H-pirrol-2,3,5-tricarboxílico
PTeCA	ácido 1H-pirrol-2,3,4,5-tetracarboxílico
QC	control de calidad
SoHT	Society of Hair Testing
THC	tetrahidrocannabinol
THC-COOH	11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol

INTRODUCCIÓN

La creciente difusión del consumo de sustancias psicoactivas constituye un importante reto para la salud pública y la sociedad moderna. La historia de las sustancias de abuso muestra una evolución continua que refleja los cambios culturales, sociales y científicos, desde las culturas antiguas que utilizaban sustancias naturales con fines rituales y terapéuticos hasta la síntesis en laboratorio de compuestos activos cada vez más potentes y diversificados (1-4).

En particular, el mercado de las nuevas sustancias psicoactivas (NPS) ha registrado un aumento sin precedentes en las últimas décadas, caracterizado por la introducción de compuestos sintéticos con estructuras químicas variables, a menudo no documentados y difíciles de detectar mediante métodos convencionales (4-10). Estos escenarios exigen que las estructuras sanitarias, forenses e institucionales desarrollen estrategias analíticas innovadoras capaces de garantizar sensibilidad, especificidad y exactitud en la identificación de sustancias en diferentes matrices biológicas (5, 10, 11).

La variabilidad continua de las NPS y de los comportamientos de consumo, junto con la rapidez con la que se introducen nuevos compuestos en el mercado, requieren la formación continua de los operadores, el intercambio de datos entre laboratorios y la adopción de protocolos metodológicos rigurosos y estandarizados (12-16).

Los análisis de sustancias psicoactivas se realizan generalmente en matrices biológicas de elección, como sangre, orina, saliva y cabello. Estas matrices no son equivalentes, sino que proporcionan información complementaria relacionada con la ingesta y el metabolismo de las sustancias, permitiendo evaluar diferentes ventanas temporales de exposición, desde la exposición aguda (sangre y saliva) hasta el consumo crónico/pasado (cabello) (17-19). La complejidad fisicoquímica de las matrices, combinada con la amplia variabilidad derivada de los distintos comportamientos individuales de consumo, exige la adopción de estrategias analíticas avanzadas. Estas se basan en el uso de técnicas de separación y detección altamente sensibles y específicas, como la cromatografía líquida y/o de gases acoplada a espectrometría de masas, y en el estricto cumplimiento de protocolos de validación que deben ajustarse plenamente a las normas internacionales (17-24).

Este documento tiene como objetivo delinear un marco metodológico compartido y científicamente riguroso para el análisis de las sustancias de abuso convencionales y de las NPS. El objetivo es proporcionar orientaciones operativas detalladas sobre el recorrido analítico: desde la correcta selección de la matriz biológica hasta los métodos de muestreo y conservación, pasando por la cadena de custodia y la preparación de la muestra, la ejecución del análisis y la interpretación de los resultados.

Mediante esta estandarización se persigue un doble propósito: promover la armonización de los métodos analíticos adoptados a nivel nacional y mejorar significativamente la comparabilidad interlaboratorio.

La aplicación de estas directrices es esencial para respaldar la calidad científica y técnico-operativa de las actividades de vigilancia e investigación en el ámbito de la toxicología analítica.

El aumento del consumo de sustancias psicoactivas ha dado lugar a un incremento significativo de las solicitudes de pruebas analíticas en diferentes matrices biológicas. Las investigaciones toxicológicas dirigidas a detectar sustancias psicoactivas constituyen una herramienta esencial tanto en el ámbito clínico como en el forense, ya que permiten identificar, cuantificar y monitorizar la ingesta de sustancias de abuso convencionales y nuevas NPS en distintas matrices biológicas. La inteligencia artificial, y en particular el aprendizaje automático, una disciplina que permite a los sistemas aprender a partir de datos e identificar patrones sin instrucciones explícitas, está emergiendo como una herramienta valiosa en la identificación y caracterización de sustancias de abuso convencionales y NPS, facilitando así la actualización continua de los métodos analíticos en respuesta a la rápida evolución del mercado de las sustancias (25, 26).

El análisis toxicológico de sustancias de abuso convencionales y NPS en matrices biológicas se aplica en diversos contextos, con objetivos diferenciados según el ámbito de investigación, que puede ser clínico, forense o estar orientado a la vigilancia de la salud pública. Esta metodología permite identificar y cuantificar el consumo de sustancias de forma precisa y fiable, contribuyendo tanto al manejo terapéutico de los pacientes como a las investigaciones judiciales y a las estrategias de prevención social. La Tabla 1 resume los principales objetivos de estos análisis en los diferentes ámbitos de aplicación.

Tabla 1. Principales objetivos del análisis toxicológico de sustancias de abuso convencionales y nuevas sustancias psicoactivas en humanos.

Ámbito	Objetivo	Acción
Clínico	Diagnóstico de intoxicación aguda	Identificar rápidamente la(s) sustancia(s) responsable(s) de un cuadro sintomático agudo (sobredosis, intoxicación, estado confusional). Es crucial para iniciar tratamiento de soporte o una terapia antidótica específica, cuando esté disponible.
Clínico	Monitorización terapéutica de fármacos	Evaluar la adherencia del paciente en programas de tratamiento farmacológico (p. ej., terapia sustitutiva para la drogodependencia) o programas de rehabilitación.
Clínico	Evaluación de la gravedad y el pronóstico	Correlacionar la concentración de la sustancia (o de su metabolito activo) en sangre con la gravedad de la intoxicación y el riesgo de complicaciones, ayudando a definir el pronóstico.
Clínico	Investigación de acontecimientos adversos	Determinar si el consumo de sustancias puede haber contribuido a traumatismos, accidentes o muertes aparentemente naturales en un entorno hospitalario.
Medicina legal y forense	Evaluación de la aptitud para conducir	Determinar si se han consumido sustancias que puedan haber deteriorado la capacidad psicofísica en relación con la conducción (art. 187 del Código de la Circulación italiano).
Medicina legal y forense	Evaluación del uso/abuso de sustancias	En casos de custodia de menores o adopción internacional.
Medicina legal y forense	Pruebas en procedimientos judiciales	Detectar sustancias en muestras biológicas obtenidas de víctimas o sospechosos para investigar delitos como agresiones sexuales o administración forzada.
Salud pública y vigilancia	Vigilancia	Epidemiológica: recopilar datos sobre el consumo de sustancias (en particular NPS y sus patrones de difusión) para comprender tendencias emergentes y apoyar la planificación de intervenciones sanitarias y legislativas.
Salud pública y vigilancia	Vigilancia ambiental	Aunque no se realiza directamente sobre matrices biológicas, la monitorización basada en aguas residuales (toxicología basada en aguas residuales) suele correlacionarse con datos clínicos y se utiliza para estimar el consumo comunitario a gran escala.
Medicina y seguridad laboral	Seguridad en el trabajo	Verificar la ausencia de sustancias de abuso en trabajadores que desempeñan tareas críticas para la seguridad, de acuerdo con la normativa vigente.

1. MATRICES BIOLÓGICAS

Las matrices biológicas son herramientas fundamentales para el análisis y la detección de sustancias de abuso convencionales y NPS. La elección de la muestra biológica debe estar estrechamente vinculada a la información buscada y/o a la pregunta que subyace a la investigación. En consecuencia, la matriz biológica utilizada variará según el objetivo de la investigación: por ejemplo, evaluar el estado psicofísico de una persona en un momento determinado requiere muestras diferentes de las utilizadas para determinar una posible dependencia de sustancias específicas.

Una de las principales diferencias entre las distintas matrices biológicas se refiere a la ventana temporal durante la cual puede detectarse la presencia de la sustancia, expresada habitualmente en horas para sangre y saliva, días para orina y hasta varios meses para matrices queratínicas (cabello). Al elegir la matriz también deben considerarse la facilidad e invasividad de la recogida, los costes del análisis, la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados, la presencia de posibles interferencias y las eventuales dificultades analíticas.

El conocimiento de las características específicas de cada matriz es esencial para la correcta aplicación de las directrices, garantizando resultados fiables y comparables en los análisis toxicológicos.

La Tabla 2 resume las principales matrices biológicas utilizadas en el análisis toxicológico, clasificándolas según su capacidad para detectar el uso actual, el uso reciente y el uso crónico o pasado de sustancias de abuso convencionales y NPS.

Tabla 2. Clasificación de las principales matrices biológicas utilizadas en los análisis toxicológicos.

Categoría	Matriz biológica	Finalidad del análisis toxicológico
Uso actual	Sangre / Saliva	Evaluación del uso actual y correlación con el estado psicofísico
Uso reciente	Orina	Evaluación de sustancias y metabolitos con una ventana de detección de días
Uso crónico o pasado	Matriz queratínica (cabello/ pelo corporal)	Reconstrucción temporal de la ingesta y evaluación del uso crónico

1.1 Matriz sanguínea

La matriz sanguínea (sangre total y plasma) desempeña un papel fundamental en el análisis toxicológico, tanto en el ámbito clínico como forense (27). El uso de esta matriz permite detectar sustancias de abuso convencionales y/o NPS muy poco tiempo después de la ingesta, proporcionando información precisa sobre el uso actual y sobre la posible presencia de efectos farmacológicos activos.

1.1.1 Procedimientos de recogida

La recogida de muestras de sangre (Tabla 3), realizada exclusivamente por personal cualificado y autorizado, es un procedimiento fundamental en el diagnóstico clínico, la investigación y la toxicología forense. La técnica correcta y el cumplimiento de estas directrices son esenciales para garantizar la calidad de la muestra, la seguridad del paciente y la fiabilidad de los resultados de laboratorio (28-31).

Las etapas clave incluyen la preparación previa al muestreo (identificación del paciente, consentimiento informado), el propio procedimiento de toma de muestra (selección del sitio, uso de sistemas cerrados de recogida, orden de extracción) y la gestión posterior al muestreo (etiquetado, transporte, cadena de custodia).

Para la desinfección de la piel se recomienda el uso de soluciones no alcohólicas, especialmente cuando el muestreo se realiza para la determinación de la alcoholemia, con el fin de evitar cualquier duda o impugnación legal (12, 13), pese a la ausencia de contaminación demostrada (32).

La elección del tubo de recogida (codificado por colores para pruebas específicas) y una mezcla correcta son esenciales para prevenir la coagulación o la contaminación.

La cantidad de sangre necesaria puede variar según el protocolo analítico y los requisitos de la prueba, pero generalmente se recogen al menos 5-10 mL de sangre total, en tubos por duplicado para las pruebas forenses.

Tabla 3. Tipos de recogida de sangre para el análisis de sustancias psicoactivas.

Tipo de recogida	Ventajas	Desventajas	Recomendaciones
Venopunción	Proporciona el mayor volumen, esencial para realizar cribado (screening), análisis confirmatorios y la alícuota de revisión.	Riesgo de contaminación externa, por ejemplo por el uso inadecuado de desinfectantes a base de alcohol (p. ej., etanol) antes de la recogida.	Desinfectar únicamente con productos no alcohólicos (p. ej., clorhexidina acuosa).
Muestreo capilar	No invasivo. Útil en situaciones de urgencia o en pacientes críticos (neonatos, pacientes con quemaduras).	Volumen de muestra limitado. La concentración de algunos analitos (p. ej., etanol) puede diferir de la sangre venosa.	Desinfectar la zona de punción. Utilizar únicamente lancetas y material de recogida adecuados (tubos capilares o tarjetas de Dried Blood Spots).

En particular, el kit de recogida de sangre para la determinación de sustancias de abuso convencionales y NPS debe contener:

- Tubos de recogida para las alícuotas de sangre destinadas al cribado, los análisis confirmatorios y los análisis de revisión (respectivamente A, B y C), con volúmenes conocidos y constantes (al menos 5 mL) por muestra y con anticoagulante. Para la determinación de la alcoholemia son obligatorios tubos específicos con anticoagulante (oxalato de potasio) y conservante/estabilizante (fluoruro de sodio) para prevenir la degradación/neoformación de etanol, especialmente si los tubos deben conservarse durante un periodo prolongado;
- Un informe de muestreo que documente los datos de la persona responsable de la recogida, de la persona sometida a la prueba, la identificación única de la muestra, la lista de medicamentos tomados o administrados a la persona examinada y las firmas de ambas partes;
- Un formulario de cadena de custodia que registre cada transferencia de la muestra y el nombre/firma de todas las personas que hayan tenido su custodia, especificando el lugar, la fecha y la hora de recogida;
- Un formulario de consentimiento informado firmado por la persona sometida a la prueba;
- Una nota informativa sobre privacidad y un formulario de consentimiento de conformidad con el Reglamento (UE) 2016/679 (Reglamento General de Protección de Datos, GDPR);
- Etiquetas adhesivas con código alfanumérico o de barras, idénticas para el informe y los recipientes, para garantizar una identificación unívoca;
- Precintos de seguridad inviolables.

El Código de Circulación italiano y la ley sobre homicidio vial (Ley 41/2016) introdujeron la posibilidad, en caso de negativa del conductor a someterse a las pruebas y después de informar al agente de policía judicial, de realizar una extracción de sangre obligatoria ordenada por la autoridad judicial, incluso verbalmente.

Si la persona sometida a la prueba no puede prestar su consentimiento a la extracción, las muestras biológicas son recogidas no obstante por el personal sanitario, correspondiendo posteriormente a la autoridad judicial valorar su legitimidad y posibilidad de utilización (12, 13, 27).

1.1.2 Condiciones de conservación

Debe garantizarse una conservación adecuada de las muestras de sangre (Tabla 4) para preservar la integridad de los analitos y garantizar la fiabilidad de los resultados analíticos en aplicaciones clínicas, de investigación y forenses.

Las condiciones de conservación, en particular la temperatura, la duración y la modalidad de almacenamiento, influyen directamente en la estabilidad de las sustancias, afectando a la calidad y reproducibilidad de las determinaciones analíticas.

Tabla 4. Efectos de la temperatura sobre la estabilidad de las sustancias de abuso convencionales y las NPS en sangre.

Condición de conservación	Efecto sobre la estabilidad	Notas
Congelación (-20 °C o inferior)	Minimiza la degradación durante periodos prolongados.	Método estándar para conservación a largo plazo y para la alícuota de revisión legal.
Refrigeración (4 °C)	Ralentiza la degradación, pero es menos eficaz que la congelación.	Adecuada únicamente para almacenamiento a corto plazo (p. ej., transporte inmediato o análisis en un plazo de 2-3 días).
Temperatura ambiente	Degradación rápida (alta inestabilidad).	Debe evitarse para almacenamiento; inaceptable en contextos forenses.
Dried Blood Spot (DBS)	Buena estabilidad a largo plazo a temperatura ambiente.	Conveniente para la recogida y el transporte; se recomienda conservar en la oscuridad y en un ambiente seco; útil para almacenamiento a largo plazo.

Los estudios de estabilidad han demostrado que la conservación de muestras de sangre a temperatura ambiente provoca una degradación significativa de los analitos, mientras que el almacenamiento a -20 °C o -80 °C preserva su estabilidad durante varios meses (33-39).

La presencia de aditivos, como fluoruro de sodio al 2% p/v, es esencial para prevenir el crecimiento microbiano (37, 39). Para evitar la coagulación de la sangre en tubos destinados a la recogida de muestras para análisis toxicológico también se utilizan anticoagulantes como el oxalato de potasio, solo o en combinación con fluoruro de sodio.

La conservación de la muestra de sangre es una etapa crítica de la cadena de custodia y debe gestionarse en entornos de acceso restringido. Las alícuotas B y C de las muestras que resulten positivas en el análisis de cribado (alícuota A), en un contexto médico-legal, deben conservarse a -20 °C durante un periodo mínimo de 12 meses.

También es esencial que la documentación (como los registros de la cadena de custodia) relativa a la conservación de las muestras se mantenga durante un periodo no inferior a tres años, o según lo establecido por la normativa vigente. Los documentos y las muestras deben conservarse en armarios, frigoríficos o congeladores cerrados con llave, con monitorización constante de la temperatura para la conservación de las muestras.

La tecnología DBS, utilizada hasta ahora principalmente en contextos de investigación, permite conservar las muestras de forma estable a temperatura ambiente o bajo refrigeración durante periodos prolongados (semanas o años), con una degradación mínima de los analitos. El uso de DBS es especialmente útil para el transporte y para reducir el riesgo biológico (40-42).

1.1.3 No conformidades

Las causas más frecuentes (Tabla 5) que hacen que una muestra de sangre sea inadecuada o inaceptable para análisis toxicológico-forenses y médico-legales se refieren principalmente al compromiso de la integridad y autenticidad de la muestra, al incumplimiento de la cadena de custodia y de la cadena de frío y a una cantidad insuficiente de muestra.

Las muestras de sangre deben estar intactas y libres de alteraciones, en particular sin signos de hemólisis, coagulación o contaminación. Su recogida, conservación y manipulación deben realizarse en pleno cumplimiento de los Procedimientos Operativos Estándar (POE), con especial atención a la elección de recipientes, anticoagulantes y condiciones de almacenamiento (Apéndice A).

Cualquier no conformidad en cualquiera de estas etapas puede comprometer la fiabilidad analítica de la muestra, dando lugar a resultados alterados, no reproducibles o inválidos.

Tabla 5. Principales no conformidades que hacen inaceptables las muestras de sangre con fines analíticos.

No conformidad	Impacto en el análisis
Hemólisis	Interferencia analítica y resultados inexactos
Volumen insuficiente	Análisis incompleto, inválido o no repetible
Recipiente o aditivo incorrecto	Incompatibilidad con la prueba; muestra que debe rechazarse

No conformidad	Impacto en el análisis
Coagulación	Pérdida de analitos e imposibilidad de cuantificación
Contaminación	Resultados falseados o interferencia instrumental
Conservación o manipulación inadecuadas	Degradación de analitos, falsos negativos

1.2 Fluido oral

El fluido oral es una matriz biológica de creciente interés en el análisis toxicológico para la determinación de sustancias de abuso convencionales y NPS (17). Su recogida no invasiva, sencilla y rápida lo hace especialmente adecuado para análisis de cribado (screening), controles en carretera, entornos laborales o contextos clínicos y forenses en los que sea necesario determinar el consumo actual de sustancias (43).

En muchos casos, la concentración de compuestos activos en el fluido oral se correlaciona con la detectable en sangre y, en ocasiones, es comparable a ella, permitiendo una evaluación oportuna de la presencia de analitos específicos en las horas posteriores a la ingesta (44-46). Sin embargo, el resultado depende de varios factores, entre ellos la dosis, el tiempo transcurrido desde la ingesta y el estado físico del individuo.

1.2.1 Procedimientos de recogida

La recogida de fluido oral, que debe ser realizada por personal cualificado y autorizado, representa una etapa crítica del proceso analítico, ya que la calidad de la muestra y la fiabilidad de los resultados analíticos dependen en gran medida del método de recogida y del dispositivo utilizado.

Por este motivo, las muestras deben obtenerse exclusivamente mediante dispositivos certificados, como hisopos o colectores con indicador de volumen, conformes con la normativa vigente y validados para aplicaciones toxicológicas (47, 48).

La elección del método (Tabla 6) y del dispositivo para la recogida de fluido oral es fundamental para la fiabilidad de las pruebas de sustancias.

Tabla 6. Tipos de recogida de fluido oral para el análisis de sustancias psicoactivas.

Método de recogida	Ventajas	Desventajas	Recomendaciones
Recogida directa (estimulada/no estimulada)	Permite la evaluación fisiológica del fluido oral.	Riesgo de contaminación; dificultad para estandarizar el volumen.	Evitar estimulantes salivales y desinfectantes antes del muestreo.
Hisopos absorbentes	No invasivos, fáciles de usar, recogida rápida.	Volumen limitado; posible adsorción de la sustancia sobre el material del hisopo.	Utilizar únicamente dispositivos certificados; evitar la contaminación por bebidas o tabaco.
Dispositivos con tampón estabilizante	Mejora la estabilidad de los analitos; facilita el transporte.	Posible dilución de la muestra; interferencia del tampón con algunas pruebas inmunoquímicas.	Registrar el volumen exacto de saliva y el tipo de tampón.

Una muestra recogida con fines de medicina legal y forense debe dividirse en dos alícuotas, denominadas A (para el análisis de cribado y, si es positiva, para el análisis confirmatorio) y B (para cualquier análisis de revisión solicitado por la persona) (16, 49).

1.2.2 Condiciones de conservación

La conservación adecuada de las muestras de fluido oral es esencial para preservar la integridad de los analitos y garantizar resultados fiables. Las condiciones de temperatura y el tiempo transcurrido entre la recogida y el análisis afectan significativamente a la estabilidad de muchas sustancias psicoactivas, en particular la cocaína, las catinonas sintéticas y los cannabinoides.

La presencia de soluciones estabilizantes en kits comerciales puede prolongar la estabilidad de los analitos (Tabla 7), pero las condiciones de conservación deben ajustarse siempre a las instrucciones del fabricante (50-53).

Tabla 7. Efectos de la temperatura sobre la estabilidad de las sustancias psicoactivas en el fluido oral.

Condición de conservación	Efecto sobre la estabilidad	Notas
Congelación (-20 °C o inferior)	Máxima estabilidad; degradación mínima durante semanas/meses.	Método preferido para almacenamiento prolongado y revisión legal.
Refrigeración (4 °C)	Estabilidad moderada para análisis en unos pocos días.	Adecuada únicamente para transporte o análisis rápido.
Temperatura ambiente	Degradación rápida; riesgo de falsos negativos.	Inaceptable para fines forenses.
Dried Saliva Spots (DSS)	Buena estabilidad a largo plazo a temperatura ambiente para muchos analitos, reduciendo la necesidad de refrigeración.	Conveniente para la recogida y el transporte; útil para almacenamiento a largo plazo.

1.2.3 No conformidades

Las muestras de fluido oral destinadas a la determinación de sustancias psicoactivas deben recogerse, conservarse y manipularse de acuerdo con protocolos estandarizados, garantizando la representatividad y estabilidad de la muestra. Las principales no conformidades, enumeradas en la Tabla 8, que pueden comprometer la fiabilidad analítica incluyen la contaminación alimentaria o ambiental, un volumen insuficiente, el uso de dispositivos no validados o una conservación inadecuada.

Tabla 8. Principales no conformidades que hacen inaceptables las muestras de fluido oral con fines analíticos.

No conformidad	Impacto en el análisis
Volumen de muestra insuficiente	Análisis incompleto o inválido.
Dispositivo inadecuado o no validado	Incompatibilidad con la prueba; riesgo de inadecuación.
Falta de adición de tampón estabilizante	Degradación de analitos, falsos negativos.
Conservación inadecuada (temperatura o tiempo no conformes)	Alteración química o microbiológica de la muestra.
Manipulación incorrecta o contaminación cruzada	Resultados distorsionados, pérdida de trazabilidad.

1.3 Orina

La orina es la matriz biológica más utilizada para la detección de sustancias psicoactivas en contextos forenses, clínicos y laborales. Su amplia ventana de detección, facilidad de recogida y elevada concentración de metabolitos la hacen especialmente adecuada para realizar el seguimiento del consumo de dichas sustancias (54, 55).

A diferencia de la sangre y el fluido oral, la orina refleja principalmente la eliminación de sustancias y de sus metabolitos, proporcionando información sobre una ingesta ocurrida en las horas o días anteriores al muestreo, sin permitir, no obstante, una determinación precisa del momento exacto del consumo. Pese a sus ventajas, persisten aspectos críticos relacionados con la posible adulteración de la muestra, las variaciones del pH y de la densidad y la estabilidad de los analitos.

Estos factores requieren una interpretación cuidadosa de los resultados y el conocimiento de las limitaciones intrínsecas de la matriz urinaria, así como de la variabilidad metabólica individual (56).

La complejidad aumenta aún más en el caso de las NPS, que a menudo se caracterizan por una rápida evolución estructural, metabolitos poco conocidos y disponibilidad limitada de estándares analíticos. Estas peculiaridades hacen de la orina una matriz útil para detectar sustancias psicoactivas y, al mismo tiempo, requieren el uso de métodos sensibles y actualizados de forma continua (24, 57).

1.3.1 Procedimientos de recogida

La recogida de orina (Tabla 9) es un procedimiento bien establecido, pero requiere precauciones específicas para garantizar la integridad de la muestra y prevenir manipulaciones (58). Las muestras deben recogerse en recipientes estériles, sellados y conformes con la normativa vigente.

Se recomienda la supervisión directa de la recogida o el uso de sistemas de control para reducir el riesgo de adulteración o dilución de la muestra, manteniendo siempre el respeto de la privacidad, y puede complementarse con la determinación de parámetros de validez como creatinina urinaria, osmolalidad, densidad y medición inmediata de la temperatura, con el fin de garantizar la fiabilidad del resultado analítico (56, 59, 60).

La estandarización de los protocolos de recogida es esencial para garantizar resultados fiables y reproducibles.

Por ejemplo, una muestra de orina recogida con fines de medicina legal y forense debe dividirse en tres alícuotas distintas: alícuota A, destinada a pruebas preliminares de cribado; alícuota B, reservada para pruebas confirmatorias; y alícuota C, conservada para cualquier análisis de revisión o control.

Tabla 9. Tipos de recogida de orina para el análisis de sustancias psicoactivas.

Método de recogida	Ventajas	Desventajas	Recomendaciones
Recogida individual no controlada	No invasiva, sencilla, permite análisis dirigidos.	Riesgo de adulteración, ventana de detección corta, cuestiones de privacidad.	Utilizar recipientes certificados; comprobar temperatura y creatinina para verificar autenticidad.
Recogida individual controlada	No invasiva, sencilla; reduce el riesgo de sustitución o adulteración; garantiza la trazabilidad.	Intrusiva; cuestiones éticas y logísticas.	Aplicar únicamente en contextos de alto riesgo e investigaciones forenses; respetar los protocolos de privacidad y consentimiento.
Muestreo agrupado	Mayor concentración de analitos (menor dilución), anónimo, permite realizar el seguimiento de grupos.	No identifica individuos; posible sesgo de género; solo datos cualitativos.	Utilizar para investigación poblacional (p. ej., festivales, eventos públicos); definir el periodo de recogida.

1.3.2 Condiciones de conservación

La conservación adecuada de las muestras de orina es esencial para garantizar la exactitud de los análisis, ya que muchas sustancias de abuso y sus metabolitos pueden degradarse rápidamente en condiciones subóptimas (Tabla 10).

Factores como la temperatura, el pH y el tiempo de almacenamiento afectan significativamente a la estabilidad de los analitos, haciendo necesarias condiciones controladas. En particular, el control del pH o el uso de conservantes puede ayudar a reducir la pérdida de compuestos especialmente lábiles (24).

Entre los métodos de almacenamiento, la congelación es el procedimiento más eficaz para preservar la integridad de la mayoría de las sustancias y sus metabolitos, mientras que la refrigeración es adecuada únicamente durante periodos cortos (17, 61-63).

Para facilitar el transporte y la conservación de las muestras también se están difundiendo formatos alternativos como los Dried Urine Spots (DUS), especialmente en contextos de investigación (64), aunque requieren una evaluación adicional de su estabilidad a largo plazo.

Esta información pone de relieve la importancia de aplicar protocolos de conservación rigurosos y adecuados, esenciales para garantizar la fiabilidad de los resultados analíticos y su solidez forense.

Tabla 10. Efectos de las condiciones de conservación sobre la estabilidad de las sustancias psicoactivas en orina.

Condición de conservación	Efecto sobre la estabilidad	Notas
Congelación (-20 °C o inferior)	Máxima estabilidad; degradación mínima hasta 12 meses.	Recomendada para almacenamiento prolongado y revisión legal.
Refrigeración (4 °C)	Estabilidad moderada para análisis en un plazo de 14 días.	Comprobar el pH; añadir conservantes para compuestos lábiles.
Temperatura ambiente	Degradación rápida; riesgo de falsos negativos.	No recomendada para fines forenses.
Dried Urine Spots (DUS)	Buena estabilidad a corto plazo (24 h) a temperatura ambiente.	Útiles para muestreo, almacenamiento y transporte a corto plazo.

1.3.3 No conformidades

Varios factores pueden comprometer la integridad de la muestra de orina o la validez de los resultados (Tabla 11). Entre los principales aspectos críticos se encuentran una recogida inadecuada, contaminación, volumen insuficiente, conservación inadecuada, incumplimiento de la cadena de custodia y variables fisiológicas que afectan a la concentración de las sustancias y de sus metabolitos (12, 13, 15, 57).

Por lo tanto, es esencial cumplir estrictamente los protocolos de recogida, manipulación y análisis para garantizar determinaciones fiables. Una gestión adecuada de las muestras reduce el riesgo de resultados no fiables o de que las muestras sean declaradas inaceptables, garantizando la validez y reproducibilidad de los análisis toxicológicos realizados.

Tabla 11. Principales no conformidades que hacen inaceptables las muestras de orina con fines analíticos.

No conformidad	Impacto en el análisis
Contaminación (p. ej., agua, detergentes, sustancias extrañas)	Dilución o enmascaramiento de sustancias; falsos negativos.
Volumen insuficiente	Análisis incompleto o imposibilidad de repetir la prueba.
Recipiente inadecuado o no validado	Riesgo de identificación errónea de la muestra y de impugnaciones legales.
Conservación inadecuada	Degradación de analitos; resultados no fiables.
Manipulación incorrecta o contaminación cruzada	Resultados no fiables, pérdida de trazabilidad.

1.4 Matriz queratínica

Las matrices queratínicas, en particular el cabello, se utilizan ampliamente en toxicología clínica y forense para la identificación de sustancias, compuestos tóxicos, estupefacientes, sustancias psicotrópicas y diversos biomarcadores, incluidos los indicativos del consumo de etanol. El análisis del cabello es especialmente útil porque amplía significativamente la ventana temporal para detectar una sustancia en los meses anteriores, en comparación con otras matrices biológicas (65-67). Además, el análisis segmentario de la muestra permite, aunque con un margen de incertidumbre, reconstruir la historia y el patrón de consumo sobre la base de la tasa media de crecimiento del cabello, estimada en aproximadamente 1 cm al mes. La porción proximal del cabello, próxima al cuero cabelludo, refleja una exposición reciente, mientras que al avanzar hacia el extremo distal es posible identificar consumos correspondientes a periodos más alejados en el tiempo (66, 68). Esto hace que el cabello sea especialmente útil para documentar el consumo crónico o pasado de sustancias, confirmar los antecedentes autodeclarados y apoyar investigaciones clínicas o forenses (24, 68-71). El análisis de cabello procedente de otras zonas corporales, como la axila, el tórax o la región púbica, puede ser útil para documentar un uso pasado o una exposición a sustancias, aunque no permite una evaluación cronológica segmentaria (67, 72, 73). En el caso del vello púbico, la interpretación de los resultados requiere especial atención, ya que la presencia de sustancias de abuso o de sus metabolitos puede estar influida por la contaminación procedente de la propia orina del sujeto. En este contexto, la evaluación cuantitativa es más compleja y debe acompañarse de un análisis exhaustivo de las condiciones de recogida y de las posibles fuentes de contaminación (74).

1.4.1 Procedimientos de recogida

La recogida de muestras de cabello para el análisis de sustancias psicoactivas, al igual que para todas las matrices de interés clínico-forense, constituye una fase crítica, ya que afecta directamente a la fiabilidad e interpretabilidad de los resultados. La recogida, manipulación y documentación de la muestra son factores fundamentales para prevenir la contaminación y garantizar un análisis exacto de las sustancias.

Las muestras de cabello se obtienen generalmente de la región del vértex posterior, preferida por la uniformidad del crecimiento y la menor variabilidad intraindividual, lo que permite una correlación más exacta entre la longitud de la muestra y los periodos de exposición. Se recogen al menos 200 mg de cabello lo más cerca posible del cuero cabelludo, marcando adecuadamente el extremo proximal para permitir la reconstrucción cronológica. La cantidad de muestra recogida debe ser suficiente tanto para realizar los

análisis de cribado y confirmatorios (alícuota A) como para conservar una parte de la muestra para cualquier análisis de verificación (contraanálisis, alícuota B). En ausencia de cabello, pueden utilizarse muestras de otras regiones corporales, respetando debidamente la privacidad de la persona sometida a la prueba (14, 75-76). La Figura 1 muestra un ejemplo de muestreo de matriz queratínica. Cuando se solicita un análisis de cabello para investigar un Drug-Facilitated Crime (DFC) que implique el consumo de sustancias o medicamentos sin conocimiento de la víctima (77-81), la recogida de la muestra debe seguir las recomendaciones generales, complementadas con los puntos clave adicionales enumerados en la Tabla 12.

Figura 1.



Figura 1. Instrucciones para la recogida de cabello (75).

Paso	Instrucción
1	Enrollar y fijar con un trozo de hilo un mechón de cabello (o más, si es necesario) de aproximadamente el ancho de un lápiz fino desde la parte posterior de la cabeza.
2	Cortar el cabello justo por encima de la piel, lo más cerca posible del cuero cabelludo, y anotar la longitud del cabello.
3	Colocar el/los mechón(es) de cabello en hojas de aluminio separadas. La parte correspondiente a las raíces debe sobresalir más allá de la hoja.
4	Doblar cada hoja de aluminio una vez, como se muestra.
5	Introducir la hoja de aluminio en el sobre. Cerrar el sobre.
6	El sobre debe ir acompañado de: el informe de recogida de la muestra, el consentimiento informado y el formulario de cadena de custodia.

Tabla 12. Recomendaciones para la recogida de muestras de cabello en casos de DFC.

Aspecto	Detalles y recomendaciones
Recogida	La muestra de cabello debe recogerse entre 30 y 45 días después del presunto delito. Este periodo es adecuado para garantizar que el tallo piloso, tras haber incorporado la droga, emerja de la zona del bulbo del folículo a una altura suficiente para su recogida por encima de la superficie cutánea.
Número de muestras	Se recomienda recoger una muestra cuantitativamente adecuada, que pueda dividirse para cualquier análisis confirmatorio en caso de un resultado positivo.
Análisis	Se recomienda el análisis segmentario debido a la posible diferenciación de la concentración de la sustancia a lo largo del tallo piloso.
Cuidado del cabello	La víctima debe evitar tratamientos cosméticos o cortes de cabello desde el momento del hecho delictivo hasta el momento del muestreo.

1.4.2 Condiciones de conservación

Para garantizar la fiabilidad de los análisis (Tabla 13), es esencial adoptar, al igual que para todas las matrices utilizadas en contextos clínico-forenses, procedimientos de conservación adecuados. Las muestras de cabello deben conservarse en un ambiente seco y oscuro a temperatura ambiente. Debe evitarse la exposición directa a la luz solar. No se recomienda el almacenamiento a bajas temperaturas ni en ambientes de alta humedad relativa, ya que puede provocar hinchamiento del cabello, crecimiento de moho y pérdida de sustancias.

La conservación en bolsas de plástico podría afectar a los resultados analíticos, ya que algunos materiales plásticos contienen aditivos que pueden ser absorbidos por la muestra; además, el plástico puede extraer sustancias lipofílicas. Por lo tanto, siempre que sea posible, se aconseja preferir otros tipos de material. Un procedimiento sencillo de conservación consiste en envolver la muestra de cabello en papel de aluminio y sellarla en un sobre de papel.

Tabla 13. Efectos de las condiciones de conservación sobre la estabilidad de las sustancias psicoactivas en la matriz queratínica.

Condición de conservación	Efecto sobre la estabilidad	Notas
Congelación (-20 °C o inferior)	Puede provocar hinchamiento del cabello, crecimiento de moho y pérdida de la sustancia.	Conservación no recomendada.
Refrigeración (4 °C)	Con el tiempo puede provocar hinchamiento del cabello, crecimiento de moho y pérdida de la sustancia.	No recomendada.
Temperatura ambiente	Mantiene una buena estabilidad si se conserva adecuadamente.	Evitar la luz solar directa; envolver en papel de aluminio y colocar en un sobre de papel.

1.4.3 No conformidades

Las principales no conformidades (Tabla 14) que hacen que las muestras de matriz queratínica (cabello) sean inaceptables para el análisis de sustancias psicoactivas se relacionan principalmente con la contaminación externa, los tratamientos cosméticos o químicos y la degradación de la matriz. Los tratamientos capilares fuertemente oxidantes, como la decoloración y determinados tintes, y el uso de sustancias como bicarbonato de sodio o ácido salicílico pueden reducir significativamente la concentración de sustancias psicotrópicas en el cabello sin dañar visiblemente la matriz queratínica, complicando la interpretación y pudiendo dar lugar a falsos negativos (60).

Además, una cantidad insuficiente de muestra, una recogida inaceptable o la degradación debida a la exposición ambiental pueden comprometer la integridad de la propia muestra. Se aconseja incluir en el informe información relativa a elementos útiles para identificar posibles tratamientos adulterantes (p. ej., coloración de la solución de extracción, positividad para ácido 1H-pirrol-2,3,5-tricarboxílico (PTCA) y ácido 1H-pirrol-2,3,4,5-tetracarboxílico (PTeCA).

Tabla 14. Principales no conformidades que hacen inaceptables las muestras de matriz queratínica con fines analíticos.

No conformidad	Impacto en el análisis
Recogida inaceptable (cantidad insuficiente, zona inadecuada, contaminación)	Imposibilidad de realizar el análisis, resultados inexactos o no representativos.
Conservación inadecuada (luz, humedad, plástico, bajas temperaturas)	Degradación o pérdida de la sustancia, alteración del perfil analítico, resultados no fiables.

2. USO ACTUAL Y CONSUMO PASADO/CONTINUADO DE ETANOL

El consumo de etanol representa un problema de salud pública, al estar asociado con una amplia gama de efectos adversos sobre el hígado, el sistema cardiovascular, el sistema nervioso y el bienestar psicosocial (82). La evaluación de la ingesta de etanol en contextos clínicos y toxicológico-forenses requiere el uso combinado de biomarcadores directos e indirectos, cada uno caracterizado por ventanas temporales de detección específicas y diferentes significados interpretativos (Tabla 15).

El objetivo es distinguir entre:

- uso actual (ingesta en las últimas horas);
- uso reciente (últimos días);
- uso pasado y/o continuado (semanas/meses).

Tabla 15. Evaluación del consumo de etanol.

Objetivo clínico/forense	Principales biomarcadores	Ventanas temporales
Uso actual	Etanol en sangre/aliento/orina + cuestionarios/entrevistas	Horas
Uso reciente	EtG/EtS en orina + cuestionarios/entrevistas	1-3 días (hasta ~80 h)
Uso pasado	PEth en sangre + cuestionarios/entrevistas	2-4 semanas
Uso crónico	hEtG, FAEE, historia clínica + cuestionarios/entrevistas	Meses/años

Abreviaturas: EtG: etilglucurónido; EtS: etilsulfato; FAEE: ésteres etílicos de ácidos grasos; hEtG: etilglucurónido en cabello; PEth: fosfatidiletanol.

Aunque la sangre sigue siendo la matriz más utilizada para las pruebas de laboratorio en la práctica clínica y la atención primaria (83), la elección de las matrices y de los biomarcadores relacionados (84-86) está determinada por los requisitos normativos (p. ej., Código de Circulación, tareas críticas para la seguridad), las necesidades clínicas (monitorización terapéutica, seguimiento) y las necesidades forenses (evaluación de aptitud, procedimientos administrativos y penales). Finalmente, para una correcta evaluación clínico-forense del consumo de etanol, resulta útil integrar cuestionarios/entrevistas, información de la historia clínica y biomarcadores.

2.1 Uso actual: concentración de etanol en sangre

La sangre total es la matriz de referencia para determinar la concentración de alcohol en sangre con fines toxicológico-forenses, ya que refleja de forma directa y fiable el estado psicofísico del sujeto en el momento del muestreo. La determinación de etanol debe realizarse de acuerdo con procedimientos rigurosos dirigidos a garantizar la validez analítica y médico-legal del resultado (12, 13).

La medición forense de etanol debe realizarse exclusivamente en sangre total; el análisis de derivados sanguíneos como plasma o suero no está permitido en contextos regulados, ya que produce una sobreestimación sistemática de los valores, por término medio entre el 12 y el 18%. Estas determinaciones pueden utilizarse exclusivamente con fines diagnóstico-clínicos y no deben emplearse para evaluaciones reglamentarias (12, 13).

La extracción de sangre debe ir precedida de la desinfección de la piel con productos exentos de alcohol etílico y debe realizarse mediante una única venopunción, recogiendo simultáneamente al menos dos alícuotas de sangre (muestras A y B) en tubos de vacío separados. Los tubos deben contener un conservante y un anticoagulante adecuados y cumplir los requisitos de la cadena de custodia. En particular:

- los tubos deben contener fluoruro de sodio como conservante y oxalato de potasio como anticoagulante;

- los tubos deben estar equipados con sistemas a prueba de manipulaciones y un etiquetado de identificación adecuado;
- las muestras deben invertirse varias veces después de la recogida para evitar la separación del suero;
- las muestras deben conservarse, junto con la contramuestra, de acuerdo con las condiciones de tiempo y temperatura especificadas en los protocolos de referencia.

Durante las fases preanalíticas deben prevenirse las principales fuentes de interferencia, en particular:

- contaminación de la muestra debida al uso de desinfectantes cutáneos que contengan alcohol etílico;
- neoformación in vitro de etanol;
- evaporación del etanol durante o después del muestreo.

La determinación instrumental de la concentración de etanol en sangre debe realizarse mediante métodos analíticos validados, específicos y reproducibles. El método de referencia de elección en toxicología forense es la cromatografía de gases en espacio de cabeza (HS-GC), acoplada a detección por ionización de llama (FID) o espectrometría de masas (MS) (12, 13). El método analítico debe validarse de acuerdo con los criterios de aceptación indicados en la Tabla 16.

Tabla 16. Parámetros de aceptación para la validación del método de determinación de la concentración de etanol en sangre.

Parámetro	Requisito	Criterio de aceptación
Intervalo de calibración	Intervalo de validación	0.05-3.0 g/L de etanol
Precisión (CV%)	Repetibilidad	≤ 10%
Exactitud (sesgo, E%)	Error sistemático	≤ 10%
Límite de detección (LOD)	Sensibilidad del método	< 0.05 g/L

A efectos reglamentarios, los valores de concentración de etanol en sangre¹ deben interpretarse con referencia a los límites establecidos por la legislación vigente (p. ej., el *Código de Circulación*) y comunicarse de forma clara, completa y trazable en el informe analítico. A efectos interpretativos, la incertidumbre de medida debe restarse siempre del valor determinado cuando este se compare con los distintos valores umbral establecidos en el *artículo 186 del Código de Circulación* (87).

La determinación de la concentración de etanol en sangre documenta únicamente una ingesta reciente de alcohol y no permite una evaluación fiable del consumo pasado ni de los hábitos de consumo a medio o largo plazo. Para una evaluación completa del comportamiento de consumo de alcohol del sujeto, debe considerarse la integración con otras matrices biológicas y biomarcadores específicos.

¹ Anexo 2 de la nota circular prot. n.º 11280 de 11/04/2025. El resultado de las pruebas realizadas en muestras biológicas se considera positivo para etanol en sangre cuando se detectan concentraciones de etanol iguales o superiores a las establecidas en el *artículo 186, apartado 2, letras a), b) y c), del Código de Circulación para las categorías correspondientes; e iguales o superiores a 0.1 g/L en relación con el artículo 186-bis del Código de Circulación*.

2.2 Uso reciente: etanol, etilglucurónido y etilsulfato en orina

La orina es una matriz de elección para evaluar el consumo reciente de etanol, permitiendo identificar una ingesta ocurrida en las horas o días anteriores al muestreo, incluso en ausencia de etanol detectable en sangre. La determinación de etanol urinario está influida por variables como el estado de hidratación, el tiempo de vaciado vesical y la posible contaminación de la muestra.

Además, la presencia de etanol en orina no permite estimar directamente la concentración sanguínea en el momento de la ingesta. En general, el etanol urinario desciende por debajo del límite de detección aproximadamente 6.5 horas después de la ingesta (84, 88).

Los metabolitos directos del etanol, el etilglucurónido (EtG) y el etilsulfato (EtS), son biomarcadores altamente específicos de la ingesta de etanol y pueden detectarse en orina durante un periodo más prolongado que el etanol no metabolizado, generalmente hasta 24-72 horas después de la ingesta, dependiendo de la cantidad ingerida y de las características individuales del sujeto (88).

El uso combinado de EtG y EtS se recomienda en contextos clínicos y toxicológico-forenses porque:

- reduce el riesgo de resultados falsos negativos, ya que el EtG puede sufrir degradación bacteriana en la muestra de orina, por ejemplo en presencia de infecciones del tracto urinario, con la posible aparición de falsos negativos, mientras que el EtS es más estable y no está sujeto a estos fenómenos, permitiendo confirmar la ingesta de etanol incluso en ausencia de EtG;
- reduce el riesgo de resultados falsos positivos, ya que permite discriminar la ingesta real de etanol de una posible neoformación bacteriana de etanol en la muestra de orina, distinguiendo el consumo real de la síntesis bacteriana in vitro;
- permite identificar la exposición involuntaria al etanol o condiciones caracterizadas por efectos residuales de la ingesta de etanol, incluso en ausencia de un resultado positivo de alcoholemia, que podrían comprometer potencialmente la seguridad, especialmente en contextos relacionados con la conducción y actividades peligrosas.

No obstante, los resultados deben interpretarse con cautela debido a la elevada variabilidad interindividual y a la influencia de factores externos. La concentración urinaria puede reducirse drásticamente por diuresis forzada (ingesta de grandes cantidades de agua), que disminuye los niveles de EtG y creatinina. Además, una positividad de bajo nivel puede derivar del consumo de determinados alimentos o bebidas (88).

2.3 Uso pasado y continuado

La evaluación del uso pasado y continuado de etanol requiere el uso de biomarcadores caracterizados por una ventana temporal ampliada, capaces de documentar hábitos de consumo mantenidos a lo largo del tiempo. En este contexto, el análisis de EtG en cabello (hEtG) representa, junto con otros biomarcadores directos e indirectos, como los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) en cabello, el fosfatidiletanol (PEth) en sangre y la transferrina deficiente en carbohidratos (CDT) en suero, el enfoque de referencia en contextos clínicos y toxicológico-forenses (86).

2.3.1 hEtG

El cabello es una matriz biológica privilegiada para la evaluación retrospectiva del consumo de etanol, ya que permite reconstruir la ingesta ocurrida durante semanas o meses, dependiendo de la longitud del segmento analizado. El EtG, metabolito directo y específico del etanol, se incorpora al tallo piloso durante la fase de crecimiento, permaneciendo relativamente estable con el tiempo (89, 90).

El análisis se realiza generalmente en un segmento de 0-3 cm, correspondiente a un periodo de observación de aproximadamente tres meses. La interpretación de los resultados se basa en valores de corte compartidos internacionalmente (91), que permiten distinguir entre:

- abstinencia o uso ocasional ($\text{hEtG} \leq 5.0 \text{ pg/mg}$);
- consumo moderado ($5.0 < \text{hEtG} < 30.0 \text{ pg/mg}$);
- consumo excesivo crónico ($\text{hEtG} \geq 30.0 \text{ pg/mg}$).

Es esencial considerar factores potencialmente interferentes, como tratamientos cosméticos agresivos (p. ej., decoloración), características individuales del cabello y correcta ejecución del procedimiento de muestreo (84).

2.3.2 FAEE en cabello

Los FAEE son biomarcadores directos del etanol producidos por una vía no oxidativa mediante la reacción del etanol con ácidos grasos endógenos o triglicéridos. Entre los principales compuestos monitorizados, el etilpalmitato (EtPa) se considera la referencia analítica más relevante (91). La Tabla 17 muestra los valores de corte compartidos internacionalmente.

Tabla 17. Valores de corte para etilpalmitato (EtPa) (en pg/mg) en segmentos de cabello: 0-3 cm y 0-6 cm.

Segmento de cabello	Abstinencia	Consumo repetido	Consumo excesivo crónico
0-3 cm	≤ 120	> 120	≥ 350
0-6 cm	≤ 150	> 150	≥ 450

La determinación de FAEE en cabello está indicada especialmente para identificar el consumo crónico y excesivo de etanol y, cuando sea posible, debe estar respaldada por EtG y otros datos clínicos/forenses (86).

2.3.3 PEth en sangre

El PEth es un biomarcador directo del consumo de alcohol que se forma exclusivamente en presencia de etanol en las membranas de los eritrocitos, mediante una reacción mediada por la fosfolipasa D (86). Los distintos homólogos de PEth difieren en su composición de ácidos grasos; entre ellos, PEth 16:0/18:1 es el más abundante y constituye el homólogo de referencia para la interpretación clínico-forense.

El PEth se forma rápidamente tras la ingesta de etanol, alcanzando niveles en sangre total en aproximadamente 8 horas, y se degrada lentamente, por lo que constituye un indicador fiable del consumo pasado de etanol.

Puede detectarse en sangre durante 3-12 días después de una ingesta única y presenta una ventana de detección de 2-4 semanas, con una persistencia media de hasta 28 días en casos de consumo moderado o repetido (85, 92-94). Su formación exclusiva en presencia de etanol confirma su elevada especificidad como biomarcador directo, sin falsos positivos conocidos (86).

La interpretación de los resultados sigue umbrales específicos:

- Abstinencia o consumo bajo: concentraciones de PEth 16:0/18:1 inferiores a 20 ng/mL.
- Consumo moderado o social: valores entre 20 y 200 ng/mL.
- Consumo excesivo crónico: valores superiores a 200 ng/mL, que sugieren una exposición crónica, definida como un consumo diario medio igual o superior a 60 g de etanol para los hombres y 40 g para las mujeres.

En el contexto de la evaluación clínico-forense del consumo de etanol, el PEth sanguíneo representa un complemento ideal del análisis de EtG en cabello y de los biomarcadores indirectos, contribuyendo a una evaluación más sólida e integrada del consumo pasado y continuado (86).

2.3.4 Biomarcadores indirectos del consumo crónico de etanol

Los biomarcadores indirectos reflejan las consecuencias biológicas de una ingesta prolongada de etanol, más que la presencia directa de la sustancia o de sus metabolitos. Entre los más utilizados se encuentran:

- CDT;
- γ -glutamyltransferasa (γ -GT);
- aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT);
- volumen corpuscular medio (MCV).

La CDT es el biomarcador más consolidado para identificar el consumo crónico de etanol. Se utiliza en contextos clínicos y forenses, por ejemplo para evaluar la aptitud para conducir o para desempeñar tareas críticas para la seguridad, y en procedimientos de custodia o litigios civiles (86). La CDT está estandarizada internacionalmente (IFCC), con valores de corte clínicos definidos: 1.7% (CDT% respecto a la transferrina total) en contextos clínicos y 2.0% (CDT% respecto a la transferrina total) en contextos forenses (95).

Puede determinarse mediante LC/HPLC o electroforesis capilar (CE), técnicas que permiten distinguir las diferentes glicoformas de la transferrina y mejorar la especificidad respecto de los métodos inmunoquímicos (96, 97).

Los biomarcadores indirectos presentan menor sensibilidad y especificidad diagnósticas que los biomarcadores directos, ya que también pueden alterarse en presencia de enfermedad hepática, trastornos metabólicos o consumo de fármacos.

Por lo tanto, su uso se recomienda exclusivamente con una función complementaria, como apoyo a los biomarcadores directos del etanol, especialmente en los casos en que la matriz queratínica no esté disponible o resulte inadecuada.

3. DOCUMENTOS

Los documentos necesarios para la correcta determinación de sustancias de abuso convencionales y NPS en matrices biológicas incluyen procedimientos como el consentimiento informado para las pruebas analíticas, un aviso de privacidad y un formulario de consentimiento de conformidad con el Reglamento (UE) 2016/679, el informe de muestreo para la identificación y recogida de la muestra, el formulario de cadena de

custodia y el informe analítico. Estos se complementan con información detallada sobre métodos analíticos validados, procedimientos de preparación de muestras y condiciones de conservación. El conjunto completo de la documentación, respaldado por protocolos analíticos actualizados y conformes con las normas, garantiza la calidad, trazabilidad, fiabilidad y valor médico-legal del proceso analítico (12-16, 27, 49, 75, 98).

3.1 Consentimiento informado

El formulario de consentimiento informado es un documento fundamental y esencial, ya que formaliza la voluntad consciente y afirmativa del paciente de aceptar, con conocimiento de causa, los procedimientos de muestreo y los análisis posteriores a los que será sometido, protegiendo al mismo tiempo los aspectos éticos y jurídicos asociados.

El formulario debe informar al sujeto de manera clara y comprensible sobre el tipo de matriz biológica recogida (sangre, orina, saliva, cabello, etc.), la finalidad del análisis, los posibles riesgos y las implicaciones de los resultados, incluida la posible transmisión y divulgación de datos a terceros en contextos médico-legales o judiciales.

En el caso de menores, el consentimiento informado debe ser otorgado por los padres, por quien ejerza la responsabilidad parental o por el tutor, teniendo en cuenta, no obstante, la voluntad del menor en relación con su edad y nivel de madurez. Dado que estas investigaciones van siempre acompañadas de una solicitud específica con una cuestión médico-legal asociada, en caso de que no se otorgue el consentimiento es necesario informar oportunamente a la parte que presentó la solicitud, con el fin de gestionar adecuadamente la cuestión resultante; por la misma razón, también debe obtenerse previamente el consentimiento para la transmisión de los datos analíticos a la parte solicitante.

La cumplimentación correcta y completa del formulario de consentimiento informado es especialmente importante en contextos clínicos y forenses, en los que la validez jurídica, la trazabilidad de la muestra y la fiabilidad del resultado analítico son elementos esenciales. En el Apéndice B1 se proporciona un ejemplo del formulario.

3.2 Política de protección de datos y consentimiento conforme al Reglamento (UE) 2016/679

Los datos personales y sanitarios de la persona deben tratarse de conformidad con el *Reglamento (UE) 2016/679*.

De acuerdo con el Reglamento, la política de protección de datos debe ser concisa, transparente, inteligible y fácilmente accesible para el interesado. Por lo tanto, debe explicar que los datos y las muestras se utilizarán exclusivamente con fines sanitarios, diagnósticos o de investigación, de manera que se garantice la seguridad, confidencialidad y protección de la información. Además, los datos y las muestras se conservarán únicamente durante el tiempo necesario para alcanzar los fines para los que fueron recogidos, salvo que la ley disponga lo contrario.

También debe quedar claro que el sujeto tiene derecho a acceder a sus propios datos, solicitar su rectificación, supresión o limitación del tratamiento y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin perjuicio de la licitud del tratamiento realizado antes de la retirada. En el Apéndice B2 se proporciona un ejemplo.

3.3 Informe de muestreo

El informe de muestreo, que debe redactarse por triplicado, es un documento esencial para garantizar la correcta recogida, identificación, trazabilidad y conservación de las muestras biológicas destinadas a la determinación de sustancias de abuso convencionales y NPS.

El formulario debe incluir los datos relativos a la persona responsable de la recogida y a la persona sometida a las pruebas analíticas (datos personales, dirección, datos del documento de identidad); si el sujeto no dispone de un documento de identidad válido, la identificación puede ser realizada por un supervisor autorizado o por un testigo que posea un documento de identidad, mientras que, en ausencia de una identificación cierta, no es posible proceder a la recogida de la muestra.

El informe debe contener necesariamente los datos para la identificación unívoca de la muestra (código de identificación, centro o departamento donde se realiza la recogida), el tipo de matriz biológica utilizada (sangre, orina, saliva, cabello, etc.), la hora de recogida, la finalidad del análisis, la lista de los medicamentos

que se hayan tomado o administrado en los días anteriores a la recogida, así como información relativa a los métodos de recogida, las condiciones de conservación y las precauciones adoptadas para evitar la contaminación o alteración de la muestra. En los casos de DFC también deben añadirse la fecha y las circunstancias del hecho delictivo.

El formulario debe ser firmado tanto por el operador que realizó la recogida como por la persona sometida a las pruebas analíticas, certificando asimismo la existencia del consentimiento informado, elemento esencial especialmente en contextos clínicos y forenses. De las tres copias del informe de muestreo, una se transmite, junto con las muestras y el formulario de cadena de custodia, al centro responsable del análisis; otra se conserva en el centro o por la persona que realizó la recogida; y otra se entrega a la persona sometida a las pruebas analíticas. En el Apéndice B3 se proporciona un ejemplo del formulario.

3.4 Cadena de custodia

El formulario de cadena de custodia es un documento esencial para garantizar la trazabilidad de cada movimiento de la muestra biológica, desde el momento de la recogida hasta su llegada al laboratorio responsable del análisis, previniendo la contaminación, las manipulaciones o las confusiones de muestras y garantizando la validez jurídica de los resultados, especialmente en contextos clínicos, forenses y judiciales. El formulario muestra detalladamente cada fase de la gestión de la muestra, incluidas etiquetas adhesivas con código de barras o alfanumérico idénticas a las colocadas en el informe de muestreo y en los recipientes de recogida de las tres alícuotas correspondientes, así como información relativa al tipo de matriz biológica (sangre, orina, saliva, cabello, etc.), la identidad del sujeto, el lugar, la fecha y la hora de recogida y cualquier nota sobre la muestra.

También deben registrarse el nombre, la dirección, la dirección de correo electrónico y el número de teléfono del laboratorio de análisis, junto con el lugar, la fecha y la hora en que las muestras fueron recibidas por el laboratorio. El formulario debe llevar el nombre y la firma de todas las personas que hayan tenido la custodia de las alícuotas de la muestra durante el traslado desde el lugar de recogida hasta el destino final, garantizando así la trazabilidad completa de las responsabilidades. La adopción de formularios estandarizados de cadena de custodia facilita la gestión de las muestras, reduce el riesgo de errores o litigios legales y constituye un requisito esencial para la aceptación y fiabilidad de los datos analíticos. En el Apéndice B4 se proporciona un ejemplo del formulario.

3.5 Emisión de informes

El formulario de informe debe proporcionar una visión clara y completa de los resultados analíticos, incluido el tipo de matriz biológica analizada, los métodos utilizados, la lista de sustancias investigadas, las detectadas y los respectivos niveles de detección con las unidades de medida adecuadas (46). El informe también debe incluir información sobre el contexto clínico o forense, la fecha y hora de recogida y la cadena de custodia, con el fin de garantizar la validez jurídica de los resultados. El uso de formularios estandarizados facilita la comunicación entre el laboratorio, los clínicos y las autoridades, mejorando la exactitud y oportunidad de las decisiones basadas en datos analíticos.

Por último, el informe debe ser claro y accesible incluso para no especialistas, con el fin de apoyar eficazmente el tratamiento médico o las investigaciones forenses. En el Apéndice B5 se proporciona un ejemplo.

4. MÉTODOS ANALÍTICOS: CRIBADO (SCREENING) Y ANÁLISIS CONFIRMATORIOS

El laboratorio debe utilizar métodos analíticos validados descritos en procedimientos documentados que incluyan etapas operativas, criterios de aceptabilidad y control de calidad (12-16).

Los resultados obtenidos mediante pruebas de cribado enzimáticas o inmunoquímicas deben confirmarse siempre utilizando técnicas basadas en principios fisicoquímicos diferentes, como la espectrometría de masas combinada con técnicas cromatográficas, incluida la cromatografía líquida o de gases.

El proceso analítico está respaldado por procedimientos de control de calidad, que incluyen el análisis de muestras de control y una secuencia estructurada de inyección para garantizar la ausencia de interferencias

y el correcto funcionamiento del instrumento. Todos los métodos deben validarse antes de su uso rutinario, y cualquier modificación o revisión requiere una nueva validación, con resultados documentados, archivados y conservados para garantizar la trazabilidad y el cumplimiento normativo.

Por último, la acreditación ISO² de los laboratorios que determinan sustancias de abuso (drug testing, toxicología forense y clínica) es esencial para garantizar la exactitud, reproducibilidad y validez jurídica de los resultados.

² UNI CEI EN ISO/IEC 17025: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración; UNI EN ISO 15189: Laboratorios clínicos — Requisitos de calidad y competencia.

4.1 Métodos de cribado (screening)

Los métodos de cribado se utilizan en toxicología forense y clínica para analizar rápidamente grandes cantidades de muestras a bajo coste, principalmente mediante técnicas inmunoquímicas/enzimáticas o, en algunos casos, técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas. Las pruebas inmunoquímicas ofrecen rapidez y automatización, pero se caracterizan por una especificidad reducida y una escasa exactitud cuantitativa, proporcionando únicamente resultados presuntivos, expresados como negativos o “no negativos” respecto a un valor umbral o de corte (Tabla 18).

Tabla 18. Valores umbral de cribado para sustancias estupefacientes y psicotrópicas en diferentes matrices biológicas, según lo definido por la legislación o por sociedades científicas.

Clase de sustancia	Orina DL.vo 81/2008* (ng/mL)	Orina EWDTS (ng/mL)	Fluido oral EWDTS (ng/mL)	Cabello EWDTS (ng/mg)
Anfetaminas	500	500	40	0.2
Cannabinoides (THC)	50	50	10	0.1
Cocaína y metabolitos	300	150	30	0.5
Opiáceos	300	300	-	0.2
6-MAM	-	-	4	-
Morfina	-	-	40	-
Metadona (EDDP)	300	300 (100)	50	0.2
Buprenorfina	-	5	5	0.01
Ketamina	-	-	-	0.5

EDDP: 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina. EWDTS: European Workplace Drug Testing Society. * Acuerdo de 30 de octubre de 2007, Acuerdo Estado-Regiones-Provincias Autónomas; procedimientos para comprobar la ausencia de drogodependencia.

La detección de NPS representa un reto importante para los métodos de cribado convencionales: muchas NPS no son detectables mediante pruebas inmunoquímicas tradicionales debido a su variabilidad estructural y a la falta de anticuerpos específicos (18).

Por lo tanto, se recomienda encarecidamente el uso de técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas, ya que permiten la identificación simultánea de un amplio espectro de NPS, incluidos sus metabolitos, incluso en ausencia de kits comerciales específicos.

Un resultado positivo de cribado carece de validez forense si no se confirma mediante espectrometría de masas acoplada a técnicas cromatográficas en una nueva alícuota de muestra.

Los resultados de cribado no deben comunicarse de forma cuantitativa, sino, como se ha señalado, expresarse como “no negativos”. Aunque los resultados negativos se consideran generalmente indicativos de ausencia de la sustancia investigada, es esencial minimizar el riesgo de falsos negativos.

Si se sospecha el consumo de una sustancia, las muestras inicialmente negativas en el cribado también pueden someterse a análisis confirmatorio.

Los valores umbral o de corte definidos por los fabricantes de kits diagnósticos no deben adoptarse de forma incondicional, sino que deben adaptarse a la finalidad del análisis; si se modifican para responder a las necesidades del laboratorio, el método debe volver a validarse utilizando calibradores específicamente preparados para ese fin.

Las técnicas cromatográficas permiten la identificación simultánea de numerosos analitos, incluidas las NPS, pero requieren instrumentación y experiencia específicas (13, 99). En cualquier caso, únicamente los resultados confirmados mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas pueden tener valor toxicológico-forense o médico-legal.

Los kits inmunoquímicos comerciales para el cribado de sustancias de abuso están validados principalmente para matrices biológicas convencionales, como orina y fluido oral.

El uso de estos sistemas en matrices alternativas es menos frecuente; sin embargo, existen kits específicos para la matriz sanguínea. También pueden aplicarse enfoques similares a la matriz queratínica.

4.2 Métodos confirmatorios

Los análisis confirmatorios deben garantizar la identificación inequívoca y la cuantificación exacta de las sustancias de interés, tanto los compuestos parentales como sus metabolitos, con sensibilidad y especificidad adecuadas, produciendo un resultado analítico independiente del obtenido en la fase de cribado, especialmente si esta última se realizó mediante técnicas enzimáticas o inmunoquímicas.

Por este motivo, es necesario utilizar métodos basados en principios fisicoquímicos diferentes de los empleados para el cribado, con selectividad y sensibilidad superiores y un límite de cuantificación más bajo, adecuado a la finalidad del análisis (p. ej., diferentes requisitos de sensibilidad según el Decreto Legislativo 81/2008 frente a las investigaciones de DFC) (12-16).

En toxicología forense, la separación cromatográfica es siempre necesaria, y el uso de espectrometría de masas acoplada a técnicas cromatográficas está reconocido como estándar internacional.

El uso de estándares internos, preferiblemente deuterados, añadidos antes de la fase preparativa, es esencial para garantizar la fiabilidad de los datos analíticos tanto en la fase de extracción como en la instrumental.

El uso de la misma técnica cromatográfica empleada en el cribado es aceptable únicamente si el método de detección es diferente.

El valor umbral para la prueba confirmatoria (Tabla 19) debe ser siempre inferior al utilizado para el cribado, y las muestras positivas deben conservarse en alícuotas específicas durante el periodo establecido por la normativa o acordado con la parte solicitante, tal como se indica en los POE del laboratorio.

Tabla 19. Valores umbral confirmatorios para sustancias estupefacientes y psicotrópicas en diferentes matrices biológicas, según lo definido por la legislación o por sociedades científicas.

Sustancia	Orina DL.vo 81/2008* (ng/mL)	Orina EWDTS (ng/mL)	Orina SIBioC (ng/mL)	Fluido oral DL.vo 81/2008 (ng/mL)	Fluido oral EWDTS (ng/mL)	Cabello DL.vo 81/2008 (ng/mg)	Cabello EWDTS (ng/mg)	Cabello SoHT (ng/mg)
Anfetamina	250	200	2	15	15	0.2	0.2	0.2
Metanfetamina	250	200	2	15	15	0.2	0.2	0.2
MDA	250	200	2	15	15	0.2	0.2	0.2
MDMA	250	200	2	15	15	0.2	0.2	0.2
MDEA	250	200	-	-	-	0.2	0.2	0.2
THC	15	-	1	2	2	0.1	0.05	0.05
THC-COOH	15	15	-	-	-	0.1	0.0002	0.0002
Cocaína	100	-	2	8	8	0.5	0.5	0.5
BEG	100	100	2	8	8	0.05	0.05	#
Morfina	100	300	2	15	15	0.2	0.2	0.2
Codeína	100	300	2	15	15	0.2	0.2	0.2
6-MAM	100	10	2	2	2	0.2	0.2	0.2
Metadona	100	250	2	20	20	0.2	0.2	0.2
EDDP	-	75	2	20	20	-	0.05	**
Buprenorfina	5	2	2	1	1	0.05	0.01	0.01
Norbuprenorfina	-	2	2	1	-	-	0.01	***
Ketamina	-	-	-	-	-	-	0.5	0.2
Norketamina	-	-	-	-	-	-	0.1	-

6-MAM: 6-monoacetilmorfina. BEG: benzoilecgonina. EDDP: 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina. EWDTs: European Workplace Drug Testing Society. MDA: 3,4-metilendioxianfetamina. MDEA: 3,4-metilendiox-N-etilamfetamina. MDMA: 3,4-metilendioximetanfetamina. SIBioC: Sociedad Italiana de Bioquímica Clínica y Biología Molecular Clínica – Medicina de Laboratorio. SoHT: Society of Hair Testing (directrices de consenso). THC: delta-9-tetrahidrocannabinol. THC-COOH: 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahidrocannabinol.

*Acuerdo de 30 de octubre de 2007, Acuerdo Estado-Regiones-Provincias Autónomas; procedimientos para comprobar la ausencia de drogodependencia. **La confirmación de EDDP demuestra el uso de metadona. ***La confirmación de norbuprenorfina demuestra el uso de buprenorfina. # La presencia de benzoilecgonina, norcocaína, cocaetilo, hidroxycocaína o hidroxibenzoilecgonina debe considerarse para confirmar el uso de cocaína.

Para la matriz sanguínea debe hacerse referencia a los “requisitos mínimos de rendimiento” (Tabla 20), es decir, las concentraciones de analitos que el laboratorio debe ser capaz de cuantificar, con la exactitud del método analítico utilizado, tal como se indica en las “Directrices para la determinación de sustancias estupefacientes y psicotrópicas en muestras biológicas con fines toxicológico-forenses y médico-legales” elaboradas por el Gruppo Tossicologi Forensi Italiani³ (100).

Tabla 20. Valores umbral confirmatorios para sustancias de abuso en la matriz sanguínea.

Sustancia	Concentración correspondiente a los requisitos mínimos de rendimiento (ng/mL)
Anfetamina	2
Metanfetamina	2
MDMA	2
MDA	2
MDEA	2
MBDB	2
THC	1
11-OH-THC	0.1
THC-COOH	2
Cocaína	2
BEG	2
Cocaetilo	2
Norcocaína	2
Morfina	2
Codeína	2
6-MAM	2
Metadona	2
EDDP	2
Buprenorfina	2
Norbuprenorfina	2

11-OH-THC: 11-hidroxi-delta-9-tetrahidrocannabinol; 6-MAM: 6-monoacetilmorfina; BEG: benzoilecgonina; EDDP: 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina; MBDB: 3,4-metilendiox-N-metil- α -etilfenetilamina; MDA: 3,4-metilendioxianfetamina; MDEA: 3,4-metilendiox-N-etilamfetamina; MDMA: 3,4-metilendioximetanfetamina; THC: delta-9-tetrahidrocannabinol; THC-COOH: 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahidrocannabinol.

³ Los requisitos mínimos de rendimiento y los valores de concentración adoptados por el Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI), así como los valores de corte de cribado y confirmatorios establecidos en las principales referencias técnico-reglamentarias nacionales e internacionales (Decreto Legislativo 81/2008, EWDTs, SoHT), se indican en las tablas de la versión completa de las “Directrices para la determinación de sustancias estupefacientes y psicotrópicas en muestras biológicas con fines toxicológico-forenses y médico-legales”.

5. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico consiste en demostrar que el método es adecuado para su finalidad y produce resultados precisos, exactos y reproducibles en las condiciones operativas previstas. Toda metodología analítica utilizada rutinariamente por el laboratorio debe someterse a una validación previa, de

acuerdo con procedimientos y criterios nacionales e internacionales (101-107). Los métodos de cribado inmunoenzimáticos son generalmente validados por el fabricante y no requieren procedimientos de validación adicionales. Sin embargo, cualquier modificación de las condiciones de uso especificadas por el fabricante requiere la validación completa del método o kit, que debe realizarse únicamente en ausencia de metodologías alternativas (13).

El procedimiento de validación del método adoptado por los laboratorios debe considerar una serie de parámetros fundamentales que garanticen la fiabilidad, reproducibilidad y adecuación al uso previsto (Tabla 21).

Tabla 21. Puntos clave de la validación de métodos bioanalíticos.

Parámetro	Descripción	Criterios de aceptación
Selectividad	Capacidad del método para distinguir el analito de los interferentes endógenos	-
Exactitud (sesgo)	Concordancia entre el valor medido y el valor verdadero	$\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ en el LOQ)
Precisión (CV%)	Reproducibilidad de las mediciones	$\leq 15\%$ ($\leq 20\%$ en el LOQ)
LOD	Cantidad mínima detectable	Determinada experimentalmente
LOQ	Cantidad mínima cuantificable	sesgo $\pm 20\%$; CV $\leq 20\%$
Curva de calibración	Relación concentración/respuesta	-
Linealidad	Proporcionalidad respuesta/concentración	Demostrada dentro del intervalo de calibración validado
Efecto matriz	Influencia de los componentes de la matriz	sesgo $\pm 15\%$; CV $\leq 15\%$
Arrastre (carryover)	Contaminación cruzada entre muestras	$\leq 20\%$ LOQ (analito); $\leq 5\%$ IS
Recuperación	Eficiencia de extracción	Reproducibile y consistente (no se requiere un valor porcentual fijo)

IS: estándar interno.

Entre los parámetros fundamentales para la validación de métodos bioanalíticos se encuentran: la exactitud, que indica cuán próximos están los resultados al valor verdadero; la precisión, que evalúa la repetibilidad y reproducibilidad de las mediciones; el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), que definen respectivamente la cantidad mínima de analito que puede detectarse y cuantificarse de forma fiable; la linealidad en el intervalo de calibración, que describe la proporcionalidad de la respuesta analítica con la concentración del analito; y el efecto matriz, que permite identificar cualquier interferencia derivada de los componentes de la matriz biológica.

Otros parámetros esenciales incluyen el arrastre (carryover), la recuperación del analito, la estabilidad de la muestra durante el almacenamiento y la manipulación y la integridad de la dilución, necesaria cuando las muestras deben diluirse porque la concentración del analito supera el intervalo de calibración. La evaluación de estos parámetros permite establecer criterios de aceptación claros y uniformes, garantizando que el método pueda producir resultados fiables en diferentes condiciones operativas. Los valores específicos y los límites aceptables para cada parámetro pueden resumirse en una tabla de referencia, útil para la monitorización de la calidad y para documentar las validaciones realizadas.

6. EVALUACIÓN INTERNA Y EXTERNA DE LA CALIDAD

El Control Interno de Calidad (IQC) y la Evaluación Externa de la Calidad (EQA) constituyen la base del sistema de garantía de calidad en los laboratorios de toxicología clínica y forense (Tabla 22), garantizando la fiabilidad, corrección y coherencia de los datos analíticos en un contexto crítico como la determinación de sustancias de abuso convencionales, NPS y biomarcadores del consumo de etanol en matrices biológicas (13, 106).

El IQC es el conjunto de procedimientos que el laboratorio utiliza para realizar un seguimiento continuo del rendimiento y la fiabilidad de sus propios análisis. En el contexto de las sustancias psicoactivas en matrices biológicas, el IQC garantiza que cada lote analítico sea verificado mediante controles de concentración conocida, una muestra en blanco (matriz libre del/de los analito(s) de interés) y estándares independientes, garantizando la estabilidad del rendimiento instrumental y metodológico. De este modo, el laboratorio puede confirmar la reproducibilidad de los resultados a lo largo del tiempo, identificar rápidamente cualquier desviación y aplicar las acciones correctivas necesarias, manteniendo así altos estándares de exactitud y conformidad.

La EQA es la evaluación periódica del rendimiento de un laboratorio en relación con otros participantes, mediante el análisis de muestras desconocidas proporcionadas por un organismo organizador independiente y/o acreditado. La EQA es fundamental para:

- determinar la exactitud (sesgo) del laboratorio en una comparación interlaboratorio;
- garantizar la trazabilidad metrológica del resultado, esencial para su validez en contextos médico-legales y forenses;
- promover la armonización de métodos entre laboratorios.

Tabla 22. Resumen de los procedimientos internos y externos de calidad en los procesos analíticos.

Sistema de calidad	Función principal	Metodología y materiales	Objetivo
Evaluación interna	Monitorización diaria de la estabilidad del proceso	Controles Internos de Calidad y calibradores trazables	Garantizar precisión, exactitud y robustez analítica para cada corrida analítica
Evaluación externa	Comparación periódica y verificación de la exactitud frente al consenso	Muestras de control conmutables proporcionadas por un organismo tercero	Garantizar la exactitud y la trazabilidad metrológica del resultado

El objetivo de la participación en programas de EQA es alcanzar una garantía de calidad total, dirigida al mantenimiento continuo de la validación y verificación de los métodos analíticos adoptados. La consecución de estos objetivos permite obtener resultados fiables, técnicamente sólidos y jurídicamente defendibles, de conformidad con los requisitos y normas internacionales de acreditación aplicables a los laboratorios de toxicología clínica y forense.

El laboratorio debe conservar la documentación relativa al IQC y a la EQA de todas las líneas analíticas durante al menos tres años, con el fin de garantizar la trazabilidad y la calidad analítica de su desempeño.

7. EMISIÓN Y COMUNICACIÓN DE LOS RESULTADOS

La emisión de informes, es decir, la elaboración de un informe analítico que contenga los resultados de las pruebas realizadas por el laboratorio, y la comunicación de los resultados analíticos constituyen etapas fundamentales del proceso diagnóstico en toxicología clínica y forense, ya que representan la interfaz entre el laboratorio y la parte solicitante.

El informe, en el contexto de la determinación de sustancias de abuso convencionales y NPS en matrices biológicas, debe redactarse de acuerdo con criterios de claridad, exhaustividad y conformidad con los estándares de calidad. Es esencial distinguir los resultados de cribado de los resultados confirmatorios, indicar los métodos utilizados y señalar los límites analíticos del método. Cuando los análisis de cribado y confirmatorios detecten la presencia de sustancias estupefacientes o psicotrópicas y/o de sus metabolitos en concentraciones superiores a los umbrales analíticos definidos, el informe debe incluir la identificación de la(s) sustancia(s) detectada(s), los correspondientes resultados cuantitativos y los valores de corte aplicados, a fin de garantizar la exactitud, trazabilidad y valor probatorio de los datos comunicados. En contextos forenses, el documento debe ser verificable y jurídicamente defendible, con trazabilidad completa de los procedimientos adoptados.

Los resultados deben comunicarse dentro de un plazo adecuado y a través de canales seguros, de conformidad con la normativa sobre confidencialidad de los datos. En caso de resultados positivos o de particular relevancia clínica o médico-legal, se requiere una transmisión rápida, acompañada de notas interpretativas para facilitar su comprensión.

La entrega puede realizarse en papel a la parte solicitante (o a una persona delegada) y, previo consentimiento escrito, por vía electrónica mediante sistemas que garanticen la integridad y seguridad del documento.

CONCLUSIONES

La determinación analítica de sustancias estupefacientes y psicotrópicas en matrices biológicas no es meramente un procedimiento técnico: representa una herramienta fundamental para la protección de la salud pública y para la administración de justicia.

En contextos médico-legales, administrativos y penales, cada dato producido debe ser fiable, exacto y plenamente defendible, ya que puede tener consecuencias directas sobre decisiones clínicas, procedimientos jurídicos y responsabilidades individuales.

Los procedimientos descritos en este informe pretenden promover la uniformidad, transparencia y calidad en las actividades de los laboratorios forenses⁴, proporcionando procedimientos operativos que puedan compartirse con el fin de garantizar resultados coherentes, trazables e interpretables.

El cumplimiento riguroso de estos principios no constituye únicamente una buena práctica, sino también un imperativo ético y profesional.

Solo mediante estándares elevados y procedimientos consolidados es posible garantizar que los datos analíticos aporten valor real, fiabilidad y peso probatorio forense.

⁴ Debe tenerse en cuenta que los casos clínicos también pueden adquirir interés jurídico (accidentes de tráfico, accidentes laborales, administración encubierta de sustancias, etc.); por lo tanto, todos los casos que impliquen la búsqueda de xenobióticos deben tratarse como posibles casos forenses.

REFERENCIAS

1. Miller MJ, Albarracin-Jordan J, Moore C, Capriles JM. Chemical evidence for the use of multiple psychotropic plants in a 1,000-year-old ritual bundle from South America. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(23):11207-12.
2. Tanasi D, van Oppen de Ruiter BF, Florian F, Pavlovic R, Chiesa LM, Fochi I, Stani C, Vaccari L, Chaput D, Samorini G, Pallavicini A, Semeraro S, Gaetano AS, Lichen S, Barbieri P, Greco E. Multianalytical investigation reveals psychotropic substances in a ptolemaic Egyptian vase. *Sci Rep*. 2024;14(1):27891.
3. Madras BK. The growing problem of New Psychoactive Substances (NPS). *Curr Top Behav Neurosci*. 2017;32:1-18.
4. Simão AY, Antunes M, Cabral E, Oliveira P, Rosendo LM, Brinca AT, Alves E, Marques H, Rosado T, Passarinha LA, Andraus M, Barroso M, Gallardo E. An update on the implications of New Psychoactive Substances in Public Health. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(8):4869.
5. Shafi A, Berry AJ, Sumnall H, Wood DM, Tracy DK. New psychoactive substances: a review and updates. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2020;10:2045125320967197.
6. Awuchi C, Aja M, Mitaki N, Morya S, Amagwula I, Echeta C, Igwe V. New psychoactive substances: major groups, laboratory testing challenges, public health concerns, and community-based solutions. *Journal of Chemistry*. 2023;5852315, 36 pages.
7. United Nations Office on Drugs and Crime. UNODC early warning advisory on new psychoactive substances. Vienna: UNODC; 2013. Available at: <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS>.

8. European Union Drugs Agency. EU Drug Market: New psychoactive substances — In-depth analysis. Lisbon: EUDA; 2024. Available at: <https://www.euda.europa.eu/system/files/documents/2025-05/2025-edmr-nps-full-pdf-31800-book.pdf>.
9. Sajwani HS. The dilemma of new psychoactive substances: a growing threat. *Saudi Pharm J*. 2023;31(3):348-50.
10. Berretta P, Minutillo A, Vari MR, Graziano S, Rotolo MC, Pellegrini M, Cassano T. New psychoactive substances: a descriptive review. *Biochim Clin*. 2022;46(4):283-91.
11. Marandiuc IM, Docea AO, Hîrjău AC, Avram OR, Matei CŞ, Tsatsakis A, Arsene AL. New psychoactive substances: a multidisciplinary review of challenges and their diverse character. *Daru*. 2025;33(2):29.
12. Strano Rossi S, Frison G, Chericoni S, Bertol E, Favretto D, Pichini S, Salomone A, Tagliaro F, Vignali C. 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;19:192-205.
13. Bucchioni P, Aquilina V, Berretta P, Busardò FP, Francheschini P, Minutillo A, Pichini S, Pellegrini M. Standard operating procedures for the determination of abuse substances in biological matrices. *Biochim Clin*. 2025;49(2):191-206.
14. Salomone A, Tsanaclis L, Agius R, Kintz P, Baumgartner MR. European guidelines for workplace drug and alcohol testing in hair. *Drug Test Anal*. 2016;8(10):996-1004.
15. Taskinen S, Beck O, Bosch T, Brçak M, Carmichael D, Fucci N, George C, Piper M, Salomone A, Schielen W, Steinmeyer S, Weinmann W. European guidelines for workplace drug testing in urine. *Drug Test Anal*. 2017;9(6):853-65.
16. Brçak M, Beck O, Bosch T, Carmichael D, Fucci N, George C, Piper M, Salomone A, Schielen W, Steinmeyer S, Taskinen S, Weinmann W. European guidelines for workplace drug testing in oral fluid. *Drug Test Anal*. 2018;10(3):402-15.
17. de Campos EG, da Costa BRB, Dos Santos FS, Monedeiro F, Alves MNR, Santos Junior WJR, De Martinis BS. Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. *Forensic Toxicol*. 2022;40(1):1-18.
18. Graziano S, Anzillotti L, Mannocchi G, Pichini S, Busardò FP. Screening methods for rapid determination of new psychoactive substances (NPS) in conventional and non-conventional biological matrices. *J Pharm Biomed Anal*. 2019;163:170-9.
19. Scanferla DTP, Lini RS, Marchioni C., Mossini SAG. Drugs of abuse: a narrative review of recent trends in biological sample preparation and chromatographic techniques. *Forensic Chem*. 2022;30:100442.
20. Panuwet P, Hunter RE Jr, D'Souza PE, Chen X, Radford SA, Cohen JR, Marder ME, Kartavenka K, Ryan PB, Barr DB. Biological matrix effects in quantitative tandem mass spectrometry-based analytical methods: advancing biomonitoring. *Crit Rev Anal Chem*. 2016;46(2):93-105.
21. Navarro-Tapia E, Codina J, Villanueva-Blasco VJ, García-Algar Ó, Andreu-Fernández V. Detection of the synthetic cannabinoids AB-CHMINACA, ADB-CHMINACA, MDMB-CHMICA, and 5F-MDMB-PINACA in biological matrices: a systematic review. *Biology (Basel)*. 2022;11(5):796.
22. Birk L, Santos SO, Eller S, Merib J, Oliveira T. Determinations of new psychoactive substances in biological matrices with focus on microextraction techniques: a review of fundamentals and state-of-the-art extraction methods. *Forensic Toxicol*. 2021;39:350-67.
23. Rivai SN, Kristianto S, Putri RE, Fatiqin A, Abidin MHZ. Modification of the QuEChERS method for drug analysis in biological sample: a review. *J Multidiscip Appl Nat Sci*. 2025;5(2):523-35.
24. Wagmann L, Jacobs CM, Meyer MR. New psychoactive substances: which biological matrix is the best for clinical toxicology screening? *Ther Drug Monit*. 2022;44(5):599-605.
25. El Bèze N, Hamzi K, Henry P, Trimaille A, El Ouahidi A, Zakine C, Nallet O, Delmas C, Aboyans V, Goralski M, Albert F, Bonnefoy-Cudraz E, Bochaton T, Schurtz G, Lim P, Lequipar A, Gonçalves T, Gall E, Pommier T, Lemarchand L, Meune C, Azzakani S, Bouleti C, Amar J, Dillinger JG, Steg PG, Vicaut E, Toupin S, Pezel T. ADDICT-ICCU investigators. Machine learning to detect recent recreational drug use in intensive cardiac care units. *Arch Cardiovasc Dis*. 2025;118(5):277-86.
26. Di Giorgi A, Pichini S, Busardò FP, Basile G. Artificial intelligence (AI) in New Psychoactive Substances (NPS) analysis: state-of-art and future perspectives. *J Anal Toxicol*. 2025;bkaf071. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaf071>.
27. Pichini S, Bucchioni P, Pellegrini M, Pacifici R. Procedure operativa per la determinazione delle sostanze d'abuso su sangue. Roma: Istituto Superiore di Sanità; Anno 2017. Available at: <https://www.iss.it/documents/20126/0/PROCEDURE-OPERATIVE-sangue.pdf/7d0a5216-ded9-7e23-6609-1deed0df14e1?t=1576349808583>.

28. Lima-Oliveira G, Lippi G, Salvagno GL, Picheth G, Guidi GC. Laboratory diagnostics and quality of blood collection. *J Med Biochem* 2015;34(3):288-94.
29. Simundic AM, Bölenius K, Cadamuro J, Church S, Cornes MP, van Dongen-Lases EC, Eker P, Erdeljanovic T, Grankvist K, Guimaraes JT, Hoke R, Ibarz M, Ivanov H, Kovalevskaya S, Kristensen GBB, Lima-Oliveira G, Lippi G, von Meyer A, Nybo M, De la Salle B, Seipelt C, Sumarac Z, Vermeersch P. Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE), of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) and Latin American Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE-LATAM) of the Latin America Confederation of Clinical Biochemistry (COLABIOCLI). Joint EFLM-COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(12):2015-38.
30. Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol*. 2021;43(4):571-80.
31. Hoffman MSF, McKeage JW, Xu J, Ruddy BP, Nielsen PMF, Taberner AJ. Minimally invasive capillary blood sampling methods. *Expert Rev Med Devices*. 2023;20(1):5-16.
32. Kılıç D, Aksoy A, Sivil R, Kılıç T, Avcı A, Keşaplı M, Aykal G. Does cleaning of venipuncture site with alcohol affect blood ethanol concentration? *Heliyon*. 2024;10(10):e31517.
33. Busardò FP, Kyriakou C, Tittarelli R, Mannocchi G, Pantano F, Santurro A, Zaami S, Baglio G. Assessment of the stability of mephedrone in ante-mortem and post-mortem blood specimens. *Forensic Sci Int*. 2015;256:28-37.
34. Glicksberg L, Kerrigan S. Stability of synthetic cathinones in blood. *J Anal Toxicol*. 2017;41(9):711-9.
35. Adamowicz P, Malczyk A. Stability of synthetic cathinones in blood and urine. *Forensic Sci Int*. 2019;295:36-45.
36. Truver MT, Swortwood-Gates MJ. Long-term stability of novel synthetic opioids in blood. *Forensic Sci Int*. 2020;308:110175.
37. Huertas T, Jurado C, Salguero M, Soriano T, Gamero J. Stability of cocaine compounds in biological fluids during post-analytical sample storage. *J Anal Toxicol*. 2020;44(8):864-70.
38. Banaszkiwicz L, Woźniak MK, Domagalska E, Kaliszan M, Kot-Wasik A. Long-term stability of benzodiazepines and z-hypnotic drugs in blood samples stored at varying temperatures. *J Anal Toxicol*. 2023;46(9):1073-8.
39. Aldubayyan AA, Castrignanò E, Elliott S, Abbate V. Influence of long-term storage temperatures and sodium fluoride preservation on the stability of synthetic cathinones and dihydro-metabolites in human whole blood. *Forensic Toxicol*. 2023;41(1):81-93.
40. Sadler Simões S, Castañera Ajenjo A, Dias MJ. Dried blood spots combined to an UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of drugs of abuse in forensic toxicology. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;147:634-44.
41. Massano M, Incardona C, Gerace E, Negri P, Alladio E, Salomone A, Vincenti M. Development and validation of a UHPLC-HRMS-QTOF method for the detection of 132 new psychoactive substances and synthetic opioids, including fentanyl, in dried blood spots. *Talanta*. 2022;241:123265.
42. Vitrano A, Di Giorgi A, Abbate V, Basile G, La Maida N, Pichini S, Di Trana A. Evaluation of short-term stability of different nitazenes psychoactive opioids in dried blood spots by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Int J Mol Sci*. 2024;25(22):12332.
43. Nguyen TA, Chen RH, Hawkins BA, Hibbs DE, Kim HY, Wheate NJ, Groundwater PW, Stocker SL, Alffenaar JC. Can we predict drug excretion into saliva? a systematic review and analysis of physicochemical properties. *Clin Pharmacokinet*. 2024;63(8):1067-87.
44. Schramm W, Smith RH, Craig PA, Kidwell DA. Drugs of abuse in saliva: a review. *J Anal Toxicol*. 1992;16(1):1-9.
45. Langel K, Gjerde H, Favretto D, Lillsunde P, Øiestad EL, Ferrara SD, Verstraete AG. Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. *Drug Test Anal*. 2014;6(5):461-71.
46. Bakke E, Høiseth G, Furuhaugen H, Berg T, Arnestad M, Gjerde H. Oral fluid to blood concentration ratios of different psychoactive drugs in samples from suspected drugged drivers. *Ther Drug Monit*. 2020;42(5):795-800.
47. Sobczak Ł, Goryński K. Evaluation of swabs from 15 commercially available oral fluid sample collection devices for the analysis of commonly abused substances: doping agents and drugs of abuse. *Analyst*. 2020;145(22):7279-88.
48. Bellagambi F, Lomonaco T, Salvo P, Vivaldi F, Hangouët M, Ghimenti S, Biagini D, Di Francesco F, Fuoco R, Errachid A. Saliva sampling: methods and devices. An overview. *TrAC Trends Anal Chem*. 2020;124:115781.
49. Pichini S, Pacifici R, Mortali C, Gori P, Marchei E, Martucci L, Palmi I, Pellegrini M, Rotolo MC. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella saliva. Roma: Istituto Superiore di Sanità; Anno 2013. Available at: https://www.iss.it/documents/20126/1915304/02_Linee_Guida_Saliva.pdf/10d8034d-361b-c1f2-072b-fb84a3d83631?version=1.2&t=1576445439440&download=true.

50. Riggio M, Dave KA, Koscak B, Blakey M, Appleton C. Impact of quantisal® oral fluid collection device on drug stability. *Front Toxicol.* 2021;3:670656.
51. Marchei E, Malaca S, Graziano S, Gottardi M, Pichini S, Busardò FP. Stability and degradation pathways of different psychoactive drugs in neat and in buffered oral fluid. *J Anal Toxicol.* 2020;44(6):570-9.
52. Almeida E, Soares S, Gonçalves J, Rosado T, Fernández N, Rodilla JM, Passarinha LA, Barroso M, Gallardo E. Stability of cocaine, opiates, and metabolites in dried saliva spots. *Molecules.* 2022;27(3):641.
53. Gameiro C, Gonçalves J, Soares S, Rosado T, Araujo ARTS, Passarinha LA, Barroso M, Gallardo E. Evaluation of antipsychotic drugs' stability in oral fluid samples. *Molecules.* 2023;28(5):2030.
54. Dolan K, Rouen D, Kimber J. An overview of the use of urine, hair, sweat and saliva to detect drug use. *Drug Alcohol Rev.* 2004;23(2):213-7.
55. Tamama K. Advances in drugs of abuse testing. *Clin Chim Acta.* 2021;514:40-7.
56. Ciancio GM, Pellegrini M, Berretta P, et al. L'utilizzo della matrice urinaria in tossicologia forense. *Biochim Clin.* 2023;47(Suppl 1):S119-S126.
57. Vaccaro G, Massariol A, Guirguis A, Kirton SB, Stair JL. NPS detection in prison: a systematic literature review of use, drug form, and analytical approaches. *Drug Test Anal.* 2022;14(8):1350-67.
58. Owen GT, Burton AW, Schade CM, Passik S. Urine drug testing: current recommendations and best practices. *Pain Physician.* 2012;15(3):ES119-33.
59. Bijlsma L, Celma A, Castiglioni S, Salgueiro-González N, Bou-Iserte L, Baz-Lomba JA, Reid MJ, Dias MJ, Lopes A, Matias J, Pastor-Alcañiz L, Radonić J, Turk Sekulic M, Shine T, van Nuijs ALN, Hernandez F, Zuccato E. Monitoring psychoactive substance use at six European festivals through wastewater and pooled urine analysis. *Sci Total Environ.* 2020;725:138376.
60. Al-Asmari AI. A critical review of workplace drug testing methods for old and new psychoactive substances: gaps, advances, and perspectives. *Saudi Pharm J.* 2024;32(5):102065.
61. Aldubayyan AA, Castrignanò E, Elliott S, Abbate V. Short- and long-term stability of synthetic cathinones and dihydro-metabolites in human urine samples. *Forensic Toxicol.* 2024;42(2):172-180.
62. Yang FS, Lee HH, Tseng LP, Lee YH, Lan YS, Lee YC, Chou YC, Lin YC. Simultaneous Determination and stability analysis of ten new psychoactive substances including synthetic cathinones, phenethylamines, and ketamine substitutes in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int J Anal Chem.* 2023;2023:9895595.
63. Rotter M, Brandmaier S, Prehn C, Adam J, Rabstein S, Gawrych K, Brüning T, Illig T, Lickert H, Adamski J, Wang-Sattler R. Stability of targeted metabolite profiles of urine samples under different storage conditions. *Metabolomics.* 2017;13(1):4.
64. Moretti M, Freni F, Carelli C, Previderé C, Grignani P, Vignali C, Cobo-Golpe M, Morini L. Analysis of cannabinoids and metabolites in Dried Urine Spots (DUS). *Molecules.* 2021;26(17):5334.
65. Henderson GL. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci Int.* 1993;63(1-3):19-29.
66. Kintz P. Hair analysis in forensic toxicology: an updated review with a special focus on pitfalls. *Curr Pharm Des.* 2017;23(36):5480-6.
67. Cuypers E, Flanagan RJ. The interpretation of hair analysis for drugs and drug metabolites. *Clin Toxicol (Phila).* 2018;56(2):90-100.
68. Florou VA, Manaprasertsak A, Slyusarenko M, Amend SR, Kazi JU, Hammarlund EU, Pienta KJ. Human hair as a diagnostic tool in medicine. *Biochem Biophys Rep.* 2025;43:102129.
69. Janousch C, Eggenberger L, Steinhoff A, Johnson-Ferguson L, Bechtiger L, Loher M, Ribeaud D, Eisner M, Baumgartner MR, Binz TM, Shanahan L, Quednow BB. Words versus strands: reliability and stability of concordance rates of self-reported and hair-analyzed substance use of young adults over time. *Eur Addict Res.* 2025;31(1):60-74.
70. Rotolo MC, Pacifici R, Pellegrini M, Cardullo S, Pérez LJG, Cuppone D, Gallimberti L, Madeo G. Hair testing for classic drugs of abuse to monitor cocaine use disorder in patients following transcranial magnetic stimulation protocol treatment. *Biology (Basel).* 2021;10(5):403.
71. García-Caballero C, Martínez-González MA. Children victims of drug abuser parents: hair testing as a forensic tool to assess exposure-a cohort of 37 cases from Spain. *Drug Test Anal.* 2023;15(9):941-52.
72. Kuwayama K, Miyaguchi H, Kanamori T, Tsujikawa K, Yamamuro T, Segawa H, Okada Y, Iwata YT. Distribution profiles of diphenhydramine and lidocaine in scalp, axillary, and pubic hairs measured by micro-segmental hair analysis: good indicator for discrimination between administration and external contamination of the drugs. *Forensic Toxicol.* 2022;40(1):64-74.

73. Tzatzarakis MN, Alegakis AK, Kavvalakis MP, Vakonaki E, Stivaktakis PD, Kanaki K, Vardavas AI, Barbounis EG, Tsatsakis AM. Comparative evaluation of drug deposition in hair samples collected from different anatomical body sites. *J Anal Toxicol.* 2017;41(3):214-23.
74. Lee S, Han E, In S, Choi H, Chung H, Chung KH. Analysis of pubic hair as an alternative specimen to scalp hair: a contamination issue. *Forensic Sci Int.* 2011;206(1-3):19-21.
75. Pichini S, Pacifici R, Gori P, Marchei E, Martucci L, Mastrobattista L, Palmi I, Pellegrini M, Rotolo MC. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera. Roma: Istituto Superiore di Sanità; Anno 2013 Available at: https://www.iss.it/documents/20126/1915304/Linee_Guida_Capelli_xweb.pdf/88ffd26a-f665-6eab-2742-fb6f63617161?t=1576445692472.
76. United Nations Office on Drugs and Crime. Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and oral fluid. New York: United Nations; 2014 Available at: https://www.unodc.org/documents/scientific/ST_NAR_30_Rev.3_Hair_Sweat_and_Oral_Fluid.pdf.
77. Ji JJ, Xu D, Yan H, Xiang P, Shen M. Micro-segmental analysis of the entry pathway and distribution of zolpidem in hair from different scalp regions after a single dose. *Front Chem.* 2023;11:1115247.
78. Xiang P, Shen M, Drummer OH. Review: drug concentrations in hair and their relevance in drug facilitated crimes. *J Forensic Leg Med.* 2015;36:126-35.
79. Wang X, Johansen SS, Nielsen MKK, Linnet K. Hair analysis in toxicological investigation of drug-facilitated crimes in Denmark over a 8-year period. *Forensic Sci Int.* 2018;285:e1-e12.
80. Melchior SE, Nielsen MKK, Oropeza AR, Banner J, Johansen SS. Detection of scopolamine in urine and hair in a drug-facilitated sexual assault. *Forensic Sci Int.* 2023;347:111678.
81. Sasaki K, Shima N, Kamata T, Ishikawa A, Nitta A, Wada M, Nakano-Fujii S, Kakehashi H, Sato T, Katagi M. Incorporation of five common hypnotics into hair after a single dose and application to a forensic case of drug facilitated crimes. *Forensic Sci Int.* 2021;325:110881.
82. Marchei E, Gomez-Ruiz LM, Acosta-López A, Ramos-Gutiérrez RY, Varela-Busaka MB, Lombroni C, Andreu-Fernandez V, Pichini S, Garcia-Algar O. Assessment of alcohol consumption in Mexican pregnant women by hair testing of ethyl glucuronide. *Alcohol.* 2023;111:59-65.
83. Harris JC, Leggio L, Farokhnia M. Blood biomarkers of alcohol use: a scoping review. *Curr Addict Rep.* 2021;8(4):500-8.
84. Jones AW. Brief history of the alcohol biomarkers CDT, EtG, EtS, 5-HTOL, and PEth. *Drug Test Anal.* 2024;16(6):570-580.
85. Tawiah KD, Riley SB, Budelier MM. Biomarkers and clinical laboratory detection of acute and chronic ethanol use. *Clin Chem.* 2022;68(5):635-45.
86. Morini L, Casati S, Favretto D, Poriglia N, Tagliaro F, Vincenti M. Accertamenti tossicologico-forensi di uso pregresso e/o continuativo a rischio di alcol etilico Biomarcatori del consumo alcolico, procedure analitiche, aspetti interpretativi. Documento di consenso. Associazione Scientifica Tossicologi Forensi Italiani; 2024. Available at: https://www.gtfl.it/wp-content/uploads/2026/03/DocumentoConsensoGTFL-Biomarcatori-consumo-alcolico_rev00-09nov2024.pdf.
87. Italia. Testo aggiornato del decreto legislativo 30 aprile 1992, n. 285, recante il nuovo codice della strada. Art. 186 (Guida sotto l'influenza dell'alcool). *Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.67 del 22 marzo 1994 - Suppl. Ordinario n. 49.*
88. Mercurio I, Politi P, Mezzetti E, Agostinelli F, Troiano G, Pellegrino A, Gili A, Melai P, Rettagliata G, Mercurio U, Sannicandro D, Lancia M, Bacci M. Ethyl glucuronide and ethyl sulphate in urine: caution in their use as markers of recent alcohol use. *Alcohol Alcohol.* 2021;56(2):201-9.
89. Biondi A, Freni F, Carelli C, Moretti M, Morini L. Ethyl glucuronide hair testing: a review. *Forensic Sci Int.* 2019;300:106-19.
90. Skopp G, Schmitt G, Pötsch L, Drönner P, Aderjan R, Mattern R. Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol Alcohol.* 2000;35(3):283-5.
91. Society of Hair Testing. Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption. Strasbourg: SoHT; 2019. Available at: https://www.soht.org/images/pdf/Alcohol%20consensus_final_aug19.pdf.
92. Schröck A, Thierauf-Emberger A, Schürch S, Weinmann W. Phosphatidylethanol (PEth) detected in blood for 3 to 12 days after single consumption of alcohol-a drinking study with 16 volunteers. *Int J Legal Med.* 2017;131(1):153-60.

93. Dumitrascu C, Gys C, Wille SMR, Del Mar Ramir  z-Fernand  z M, D'Hondt D, Van Goethem A, Van Rafelghem B, Baetens E, Jacobs W, Neels H, Covaci A, van Nuijs ALN. The complementarity of phosphatidylethanol in whole blood and ethyl glucuronide in hair as biomarkers for the monitoring of alcohol use. *Drug Test Anal.* 2024;16(4):398-405.
94. Ashiru S, Banham J, Webster E, Saskoy L, Trotter G, Wade M, Rooney B. Evaluation and comparison of sensitivity of alcohol biomarkers PEth, EtG and EtPa in civil cases in England 2022-2023. *Forensic Sci Int.* 2024;363:112173.
95. Schellenberg F, Wielders J, Anton R, Bianchi V, Deenmamode J, Weykamp C, Whitfield J, Jeppsson JO, Helander A. IFCC approved HPLC reference measurement procedure for the alcohol consumption biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT): Its validation and use. *Clin Chim Acta.* 2017;465:91-100.
96. Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem.* 2003;49(11):1881-90.
97. Lanz C, Kuhn M, Deiss V, Thormann W. Improved capillary electrophoresis method for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in patient sera. *Electrophoresis.* 2004;25(14):2309-18.
98. Pichini S, Pacifici R, Gori P, Marchei E, Marchioro L, Martucci L, Mastrobattista L, Palmi I, Pellegrini M, Rotolo MC. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nelle urine. Roma: Istituto Superiore di Sanit  ; Anno 2014 Available at: https://www.iss.it/documents/20126/1915304/Linee_Guida_Urine_xweb.pdf/644c57ab-deff-451e-6e98-d281a5a5039e?t=1576445696204.
99. Cieri G, Mohr ALA, Mastrovito R, Logan BK. Evaluating cross-reactivity of new psychoactive substances (NPS) in human whole blood by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Anal Toxicol.* 2024;48(3):191-6.
100. Associazione Scientifica Tossicologi Forensi Italiani. Linee guida per la determinazione di sostanze stupefacenti e psicotrope su campioni biologici con finalit   tossicologico-forensi e medico-legali. GTFI; 2022. Available at: <https://www.gtfi.it/wp-content/uploads/2026/03/LineeGuidaGTFI-MaterialeBiologico-rev06-08giu2022.pdf>;
101. European Medicines Agency. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Amsterdam: EMA; 2023. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf.
102. European Medicines Agency. ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures. Available at: Amsterdam: EMA; 2023. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf.
103. Food and Drug Administration. M10 bioanalytical method validation and study sample analysis. Silver Spring, Maryland: FDA; 2022. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/m10-bioanalytical-method-validation-and-study-sample-analysis>;
104. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
105. American Academy of Forensic Sciences. Standard practices for method validation in forensic toxicology. Colorado Springs: AAFS; 2019. Available at: https://www.aafs.org/sites/default/files/media/documents/036_Std_e1.pdf;
106. Favretto D, Pichini S, Bucchioni P, Pacifici R. Linee Guida in materia di analisi su campioni biologici con finalit   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.* 2019;43(4) 449-452.
107. D'Avolio A, Cant   M, Gervasoni J, Artusi C, Marinova M, Nonnato A, Cangemi G, Persichilli S. Validazione dei metodi quantitativi bioanalitici in spettrometria di massa: regole e protocolli sperimentali. *Biochim Clin.* 2018;42(2):149-61.

APÉNDICE A

PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTÁNDAR RECOMENDADOS

Introducción

Estos POE proporcionan ejemplos prácticos para el análisis cualitativo y cuantitativo de sustancias psicoactivas en diversas matrices biológicas, incluidas sangre, saliva, orina y matrices queratínicas, y describen protocolos específicos aplicables en contextos clínicos y forenses.

Estos POE tienen carácter orientativo y deben ser adaptados por personal de laboratorio cualificado en función de las características de la muestra, las tecnologías disponibles y los recursos operativos. Cualquier modificación de los protocolos propuestos, realizada para responder a necesidades específicas, no debe comprometer la validez de los resultados, que deben cumplir siempre los requisitos de exactitud, reproducibilidad y trazabilidad.

Cada laboratorio es responsable de la validación y/o verificación de los métodos analíticos antes de su uso rutinario. El objetivo principal es estandarizar los procedimientos analíticos y organizativos para garantizar resultados fiables y defendibles en contextos médico-legales y proporcionar herramientas metodológicas para aplicaciones clínicas, forenses y de investigación.

Operaciones preliminares

Las siguientes operaciones describen sistemáticamente las etapas de preparación y análisis de las muestras necesarias para realizar un método analítico cualitativo y cuantitativo en una matriz biológica. Estos procedimientos incluyen la preparación de soluciones de referencia y muestras de control de calidad, la preparación de calibradores en matriz y el análisis de muestras desconocidas, garantizando la trazabilidad, exactitud y reproducibilidad de los resultados. La aplicación de las condiciones operativas descritas es esencial para garantizar la fiabilidad de la curva de calibración, la corrección de la cuantificación y la validez global del método analítico. En detalle:

- Preparar soluciones de trabajo, calibradores en matriz y controles de calidad (concentración alta, media y baja) a partir de soluciones madre.
- Conservar las soluciones de trabajo a -20 °C hasta su uso.
- Preparar una muestra en blanco (muestra biológica libre del/de los analito(s) de interés y del estándar interno), una muestra negativa (muestra biológica libre del/de los analito(s) de interés pero que contenga el estándar interno), calibradores y controles de calidad en la matriz biológica de acuerdo con un procedimiento que, cuando sea posible, reproduzca el de la muestra desconocida.
- Añadir el estándar interno a la muestra en blanco, a la muestra negativa, a los calibradores, a los controles de calidad y a las muestras desconocidas en la misma cantidad.
- Realizar la extracción de la muestra en blanco, la muestra negativa, los calibradores, los controles de calidad y las muestras desconocidas de acuerdo con un procedimiento validado.
- Analizar las muestras en una única secuencia que comprenda: blanco instrumental, blanco de matriz, muestra negativa, calibradores en orden ascendente, controles de calidad y, después de un lavado instrumental para evitar el arrastre (carryover), las muestras desconocidas.
- Registrar y archivar los datos analíticos de conformidad con los requisitos de integridad de los datos.

Determinación de sustancias psicoactivas en matrices biológicas

A continuación se presentan los POE recomendados para la determinación de sustancias psicoactivas en diferentes matrices biológicas, desarrollados sobre la base de la evidencia científica y de las buenas prácticas en toxicología.

Los diagramas de flujo adjuntos al Apéndice A resumen, en formato operativo, un ejemplo de las principales etapas de los procedimientos analíticos utilizados para la determinación de sustancias psicoactivas en las distintas matrices biológicas. Cada diagrama de flujo representa esquemáticamente las etapas esenciales del flujo de trabajo analítico, incluidos el pretratamiento de la muestra, la extracción, cualquier derivatización, la resuspensión y el análisis instrumental final. El objetivo es proporcionar a los operadores una herramienta de apoyo inmediata y de fácil consulta, útil para identificar rápidamente la secuencia de operaciones y los puntos críticos del proceso, a fin de garantizar la uniformidad de los procedimientos, la reproducibilidad de los resultados y la trazabilidad de todo el recorrido analítico.

Se hace especial hincapié en las NPS, un grupo extremadamente heterogéneo que comprende numerosas clases químicas. La rápida evolución de este fenómeno, la facilidad de modificación estructural y la introducción continua de nuevas moléculas en el mercado hacen que las NPS sean especialmente difíciles de detectar mediante métodos analíticos convencionales. Este contexto requiere la adopción de protocolos altamente sensibles y selectivos, la actualización constante de las bibliotecas espectrales y el uso de técnicas cromatográficas y espectrométricas avanzadas, a menudo indispensables para la identificación de sustancias que todavía no están plenamente caracterizadas desde el punto de vista químico y toxicológico.

Por último, se recomienda la consulta periódica de la literatura científica nacional e internacional para garantizar la actualización continua de los conocimientos sobre las características químicas, los retos analíticos y las metodologías más adecuadas para la determinación de sustancias de abuso convencionales y NPS (1-21).

Análisis cuantitativo de datos

El análisis cuantitativo de datos permite procesar las señales instrumentales obtenidas durante el análisis con el fin de determinar con exactitud la concentración de analitos en las muestras examinadas. Este proceso se basa en la construcción y validación de la curva de calibración, la aplicación de modelos de regresión apropiados y la verificación de criterios específicos de aceptabilidad, esenciales para garantizar la fiabilidad y robustez de los resultados analíticos.

a) Construcción de la curva de calibración:

- Representar un gráfico con las concentraciones calculadas de los calibradores en el eje X y la relación entre la señal analítica de cada analito y la del estándar interno correspondiente en el eje Y.
- Construir una curva de calibración independiente para cada analito objeto de estudio.
- Evaluar el modelo de regresión más adecuado para obtener una relación lineal entre la concentración y la respuesta instrumental.
- Determinar la ecuación de la curva de calibración para cada analito.

b) Cuantificación de los analitos mediante la curva de calibración:

- Determinar la concentración del/de los analito(s) de interés en las muestras desconocidas aplicando la ecuación de la curva de calibración correspondiente.

c) Verificación y validación de los resultados analíticos. Para que los resultados se consideren válidos, es necesario comprobar:

- La presencia del estándar interno en todas las muestras analizadas.
- La ausencia de los analitos en la(s) muestra(s) negativa(s).
- La presencia y la concentración correcta de todos los analitos en los calibradores y en las muestras de control de calidad.

d) Una muestra puede considerarse positiva para un analito específico únicamente si se cumplen los siguientes criterios:

- Presencia de un pico cromatográfico para cada uno de los iones seleccionados en el tiempo de retención correspondiente al observado en los calibradores, con una tolerancia de $\pm 0.5\%$.
- Señal analítica superior al LOD para el análisis cualitativo o al LOQ para el análisis cuantitativo del método.
- Correspondencia de la relación entre las señales analíticas de los iones seleccionados para cada analito con las obtenidas en los calibradores o muestras de control de calidad, dentro de una tolerancia de $\pm 20\%$.

Para más detalles, debe consultarse la DECISIÓN 2002/657/CE DE LA COMISIÓN, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en lo relativo al rendimiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (21).

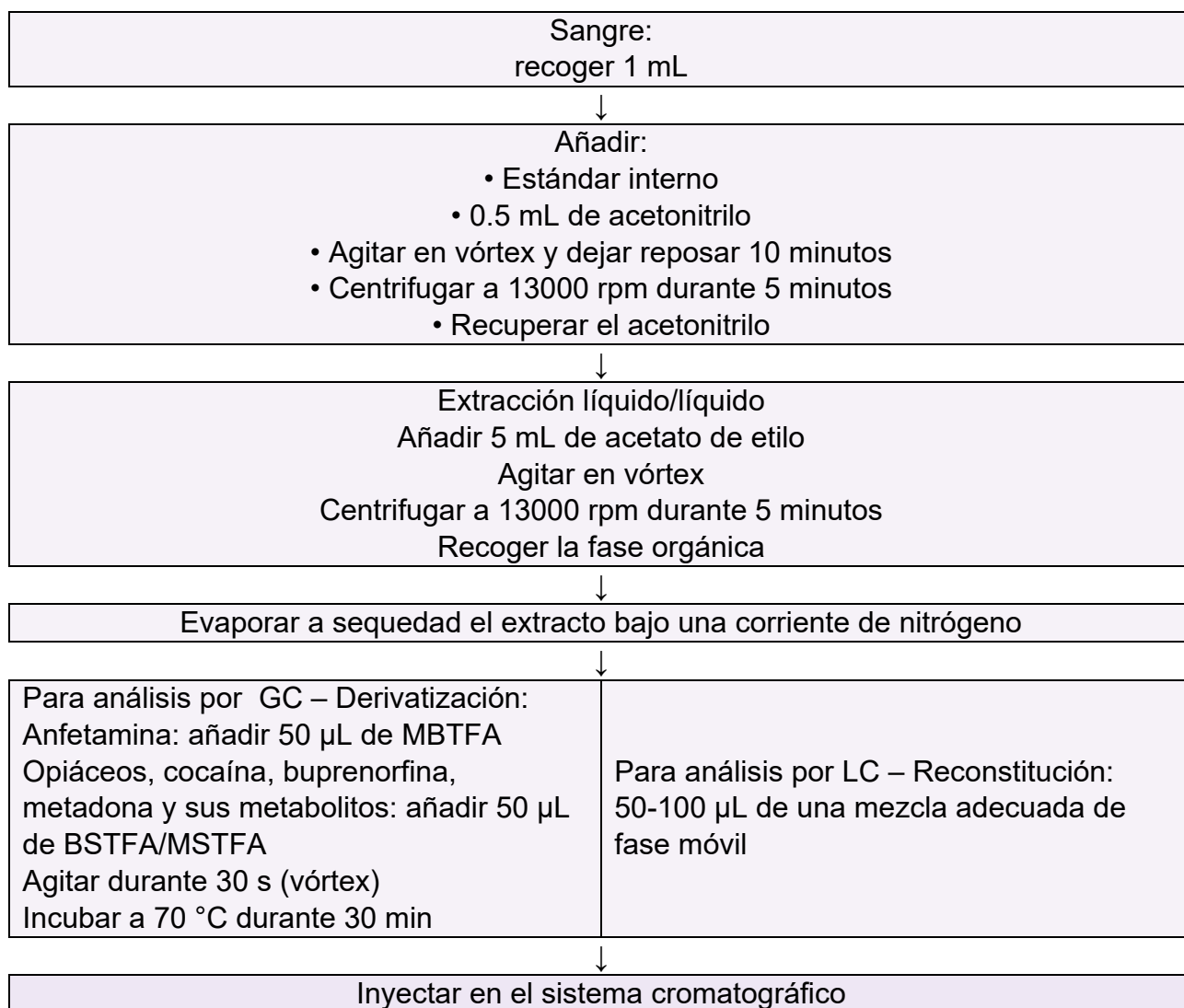
Referencias

1. Świątek S, Czyrski A. Analytical methods for determining psychoactive substances in various matrices: a review. *Crit Rev Anal Chem.* 2026;56(1):76-102.
2. Mannocchi G, Di Trana A, Tini A, Zaami S, Gottardi M, Pichini S, Busardò FP. Development and validation of fast UHPLC-MS/MS screening method for 87 NPS and 32 other drugs of abuse in hair and nails: application to real cases. *Anal Bioanal Chem.* 2020;412(21):5125-45.
3. Cláudia M, Pedro A, Tiago R, Francisco CR, Eugenia G. Determination of new psychoactive substances in whole blood using microwave fast derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2020;44(1):92-102.
4. Giorgetti A, Barone R, Pelletti G, Garagnani M, Pascali J, Haschimi B, Auwärter V. Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for the detection of 182 novel psychoactive substances in whole blood. *Drug Test Anal.* 2022;14(2):202-23.
5. Lee S, Lee J, Ok H, Ryu E, Koo W, Lee YH, Pyo J, Lim NY, Kwon CH, Park SJ, Jung K, Eom Y, Chon Y, Song MK, Hong Y, Han E. Multi-residue screening method of 195 drugs of abuse and metabolites in whole blood using LC-MS/MS and application to real blood samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2025;266:117096.
6. Pereira JRP, Antunes M, Neng NR, Mustra C, Franco J, Fonseca S. Development and validation of a simple and fast method for routine analysis of new synthetic opioids and hallucinogens in whole blood using protein precipitation and UHPLC-MS/MS. *Forensic Sci Int.* 2026;378:112713.
7. Di Corcia D, Lisi S, Pirro V, Gerace E, Salomone A, Vincenti M. Determination of pharmaceutical and illicit drugs in oral fluid by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013;927:133-41.
8. Borges GR, Dos Santos BP, de Gouveia GC, Dalanhol CS, Scherer JN, Eller S, de Oliveira TF. Determination of drugs of abuse in oral fluid using dried oral fluid spot assisted by 24-well plate and LC-MS/MS. *Bioanalysis.* 2025;17(9):595-605.
9. Zheng Y, Axelsson MAB, Andresen Bergström M. Validation of an LC-MS-MS method for analysis of 58 drugs of abuse in oral fluid and method comparison with an established LC-HRMS method. *J Anal Toxicol.* 2025;49(1):14-25.
10. Florou D, Orfanidis A, Boumba VA. Development and validation of a 'dilute and shoot' LC-MS/MS method in urine suitable for screening and confirmation analyses in a clinical setting. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2025;1265:124750.
11. Rossi B, Freni F, Vignali C, Ortu S, Morini L. Short-term stability evaluation of synthetic opioids, cathinones and ketamine in dried urine spots. Method validation and application to real cases. *Forensic Sci Int.* 2025;377:112622.
12. Czarny J, Musiał J, Powierska-Czarny J, Raczkowski M, Galant N, Buszewski B, Gadzała-Kopciuch R. Determination of 465 psychoactive substances, drugs and their metabolites in urine by LC-MS/MS. *Anal Methods* 2024;16(31):5426-32.
13. Dos Santos BP, Birk L, Pôrto VC, Nascimento SN, Sebben VC, Eller S, de Oliveira TF. A sensitive and comprehensive lc-ms/ms method for the analysis of hallucinogens, synthetic cathinones, and synthetic cannabinoids in urine samples. *J Mass Spectrom.* 2025;60(10):e5178.
14. Gerace E, Bakanova SP, Di Corcia D, Salomone A, Vincenti M. Determination of cannabinoids in urine, oral fluid and hair samples after repeated intake of CBD-rich cannabis by smoking. *Forensic Sci Int.* 2021;318:110561.
15. Marchei E, Rotolo MC, Mannocchi G, Capomassi A, Gómez-Ruiz LM, Acosta-López A, Ramos-Gutiérrez RY, Varela-Busaka MB, Pichini S, García-Algar Ó. Assessment of licit and illicit drugs consumption during pregnancy by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (UHPLC-HRMS) target screening in Mexican women hair. *J Pharm Biomed Anal.* 2022;211:114607.
16. Marchei E, Ferri MA, Torrens M, Farré M, Pacifici R, Pichini S, Pellegrini M. Ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and high-sensitivity gas chromatography-mass spectrometry screening of classic drugs and new psychoactive substances and metabolites in urine of consumers. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):4000.
17. Trana AD, Mannocchi G, Pirani F, Maida N, Gottardi M, Pichini S, Busardò FP. A comprehensive hplc-ms-ms screening method for 77 new psychoactive substances, 24 classic drugs and 18 related metabolites in blood, urine and oral fluid. *J Anal Toxicol.* 2020;44(8):769-83.

18. Dimić D. Emerging novel psychoactive substances (2020–2025): GC-MS approaches for separation, detection, and characterization. *Chemosensors*. 2025; 13(12):426.
19. Al-Asmari AI. Analytical methods for the determination of diamorphine (Heroin) in biological matrices: a review. *Toxics*. 2025;13(10):867.
20. Di Francesco G, Vincenti F, Montesano C, Bracaglia I, Croce M, Napoletano S, Lombardozzi A, Sergi M. Target and suspect screening of psychoactive substances in seizures and oral fluid exploiting retention time prediction and LC-MS/MS analysis. *Anal Chim Acta*. 2024;1303:342529.
21. Europa. Decisione della Commissione del 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (2002/657/CE). *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 221, 17.8.2002.

Anexo A1

Ejemplo de determinación de opiáceos, cocaína, buprenorfina, metadona, anfetaminas y sus metabolitos en sangre.



Anexo A2

Ejemplo de determinación de delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahidrocannabinol (THC-COOH) y 10-hidroxi-delta-9-tetrahidrocannabinol (10-OH THC) en sangre.

Sangre:
recoger 1 mL

Nota editorial de la versión española: se mantiene «10-OH THC» tal como figura en el original inglés; en otras secciones del documento se utiliza «11-OH THC».



Añadir:
• Estándar interno
• 2 mL de agua bidestilada
• 800 µL de ácido acético al 10%



Realizar la extracción y repetir el proceso dos veces



Combinar los extractos y evaporar hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno



Para análisis por GC –

Derivatización:

- Añadir 50 µL de BSTFA/MSTFA
- Agitar durante 30 s (vórtex)
- Incubar a 70 °C durante 30 min

Para análisis por LC –

Reconstitución:

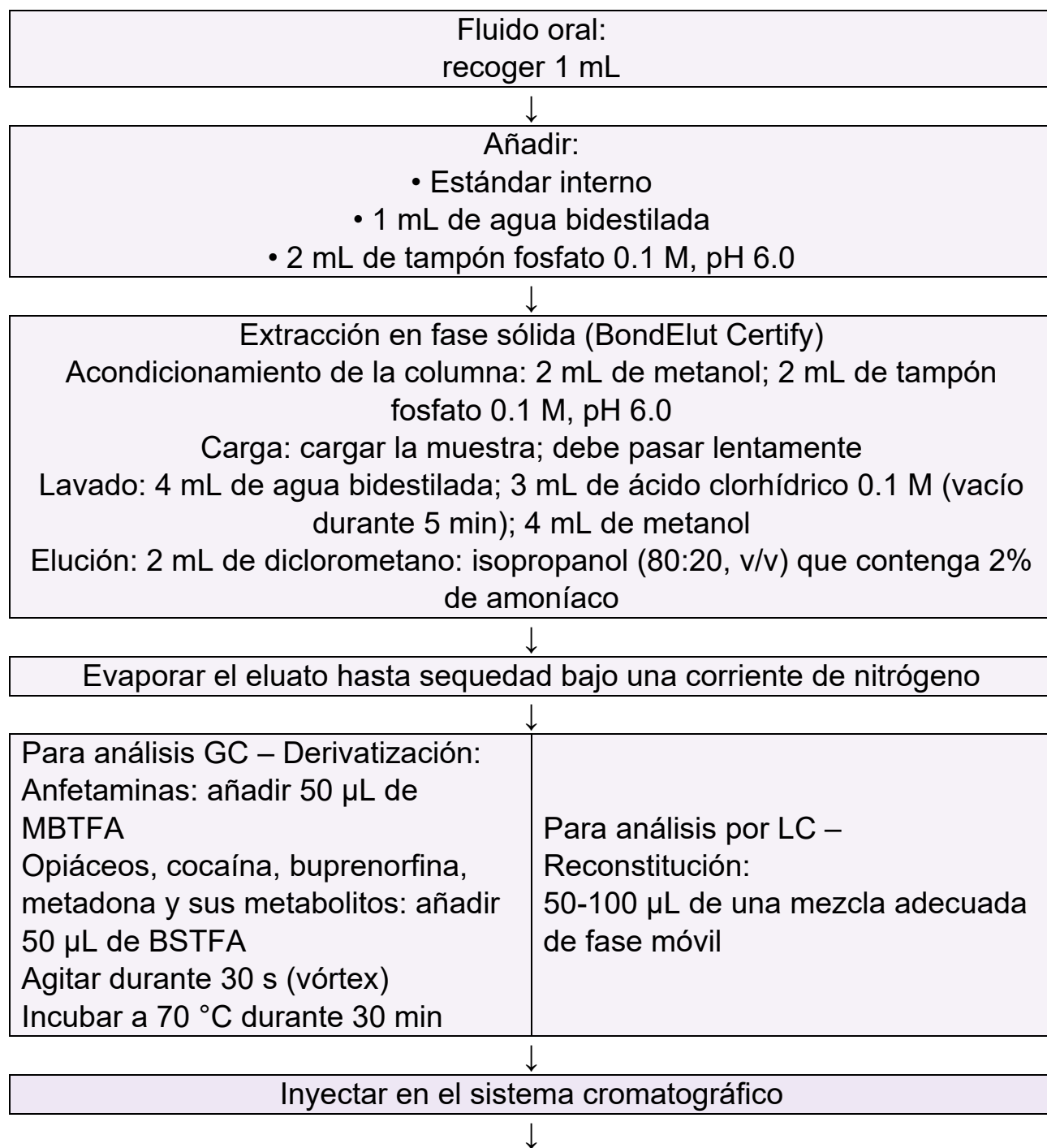
50-100 µL de una mezcla adecuada de las fases móviles



Injectar en el sistema cromatográfico

Anexo A3

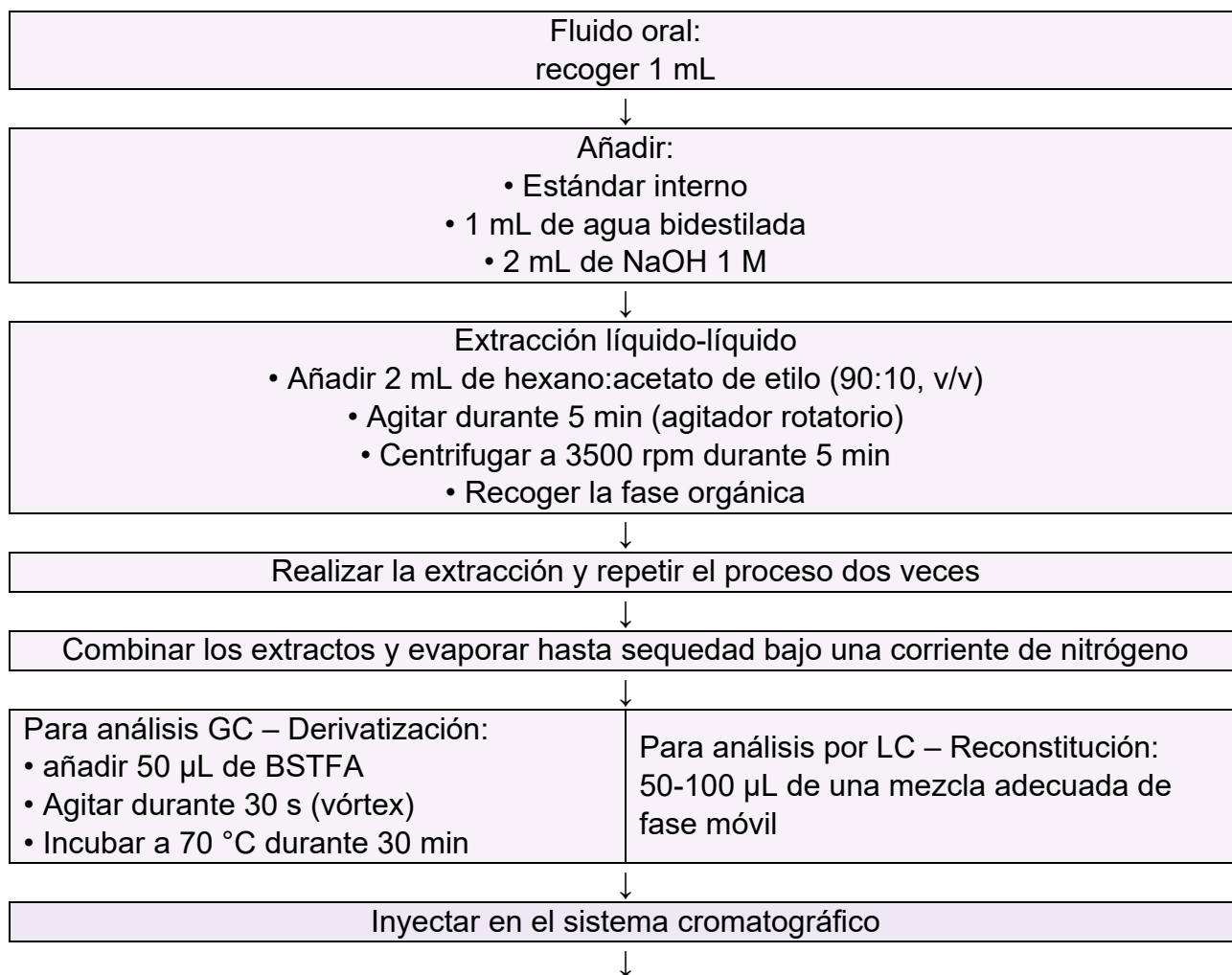
Ejemplo de determinación de anfetaminas, opiáceos, cocaína, buprenorfina, metadona y sus metabolitos en fluido oral*.



* Los procedimientos analíticos basados en LC utilizan actualmente el enfoque “dilute and shoot”, que consiste en una simple dilución de la muestra seguida de inyección directa en el sistema instrumental.

Anexo A4

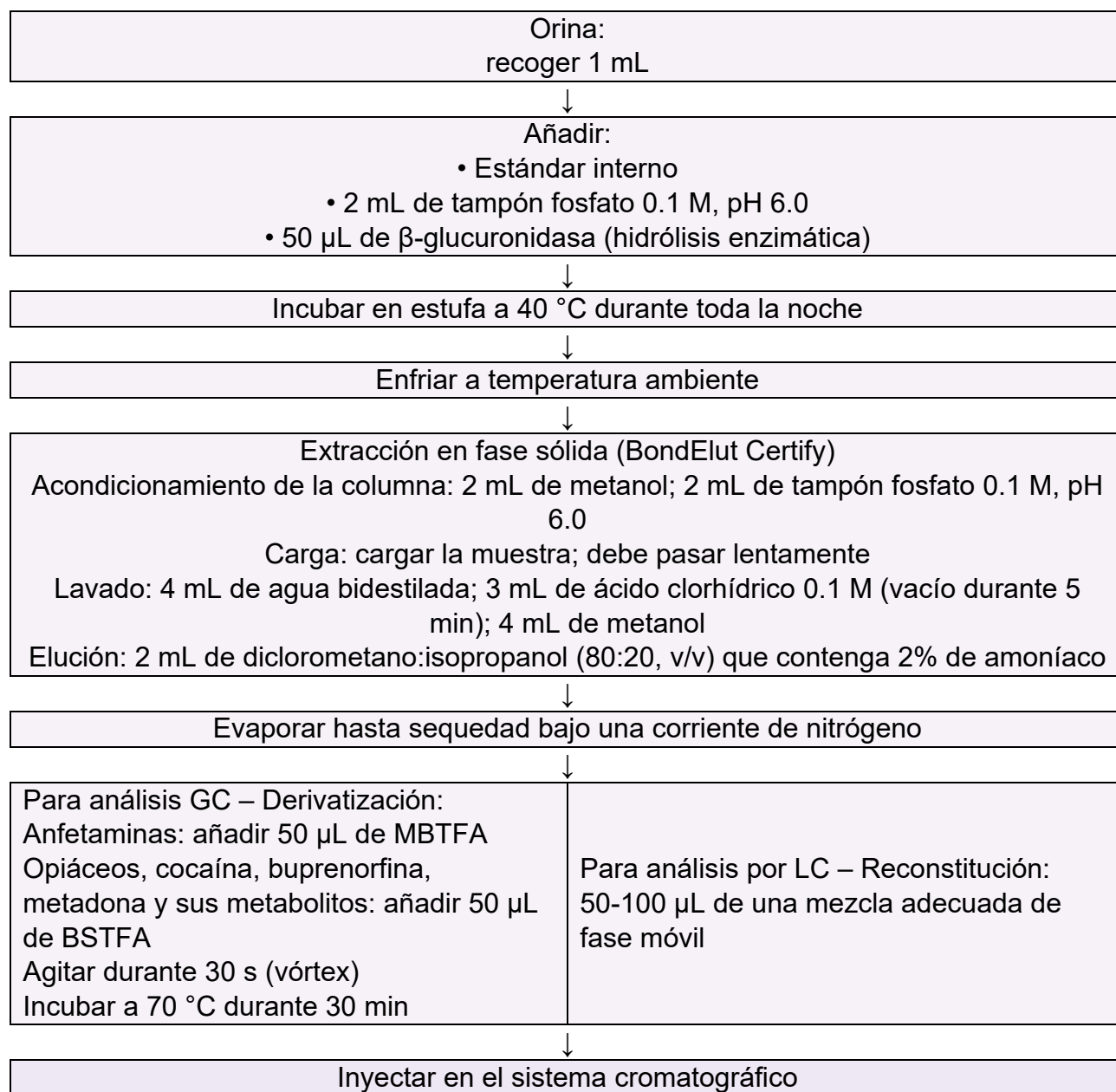
Ejemplo de determinación de THC en fluido oral*.



* Los procedimientos analíticos basados en LC utilizan actualmente el enfoque “dilute and shoot”, que consiste en una simple dilución de la muestra seguida de inyección directa en el sistema instrumental.

Anexo A5

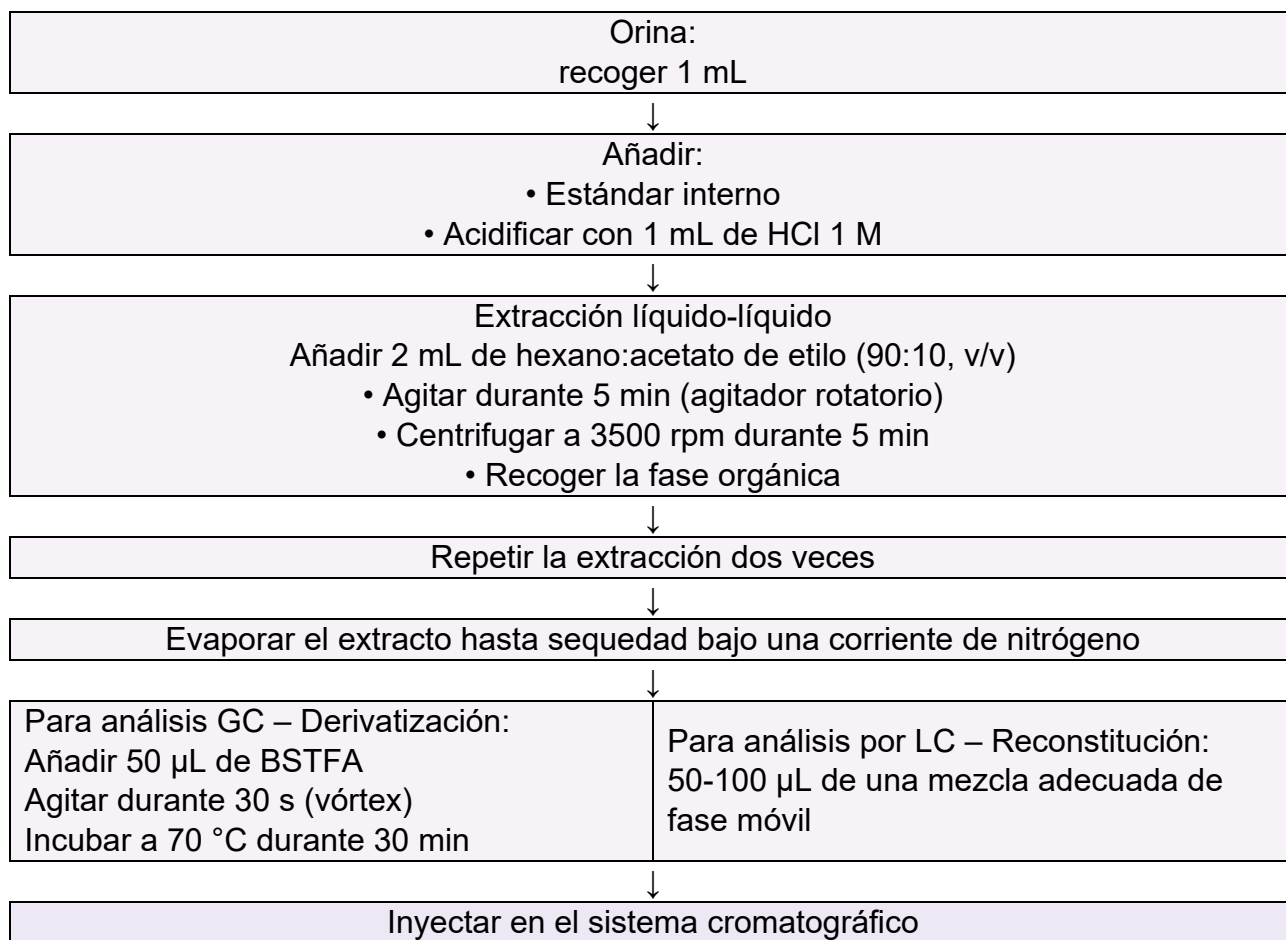
Ejemplo de determinación de anfetaminas, opiáceos, cocaína, buprenorfina, metadona y sus metabolitos en orina*.



* Los procedimientos analíticos basados en LC utilizan actualmente el enfoque “dilute and shoot”, que consiste en una simple dilución de la muestra seguida de inyección directa en el sistema instrumental.

Anexo A6

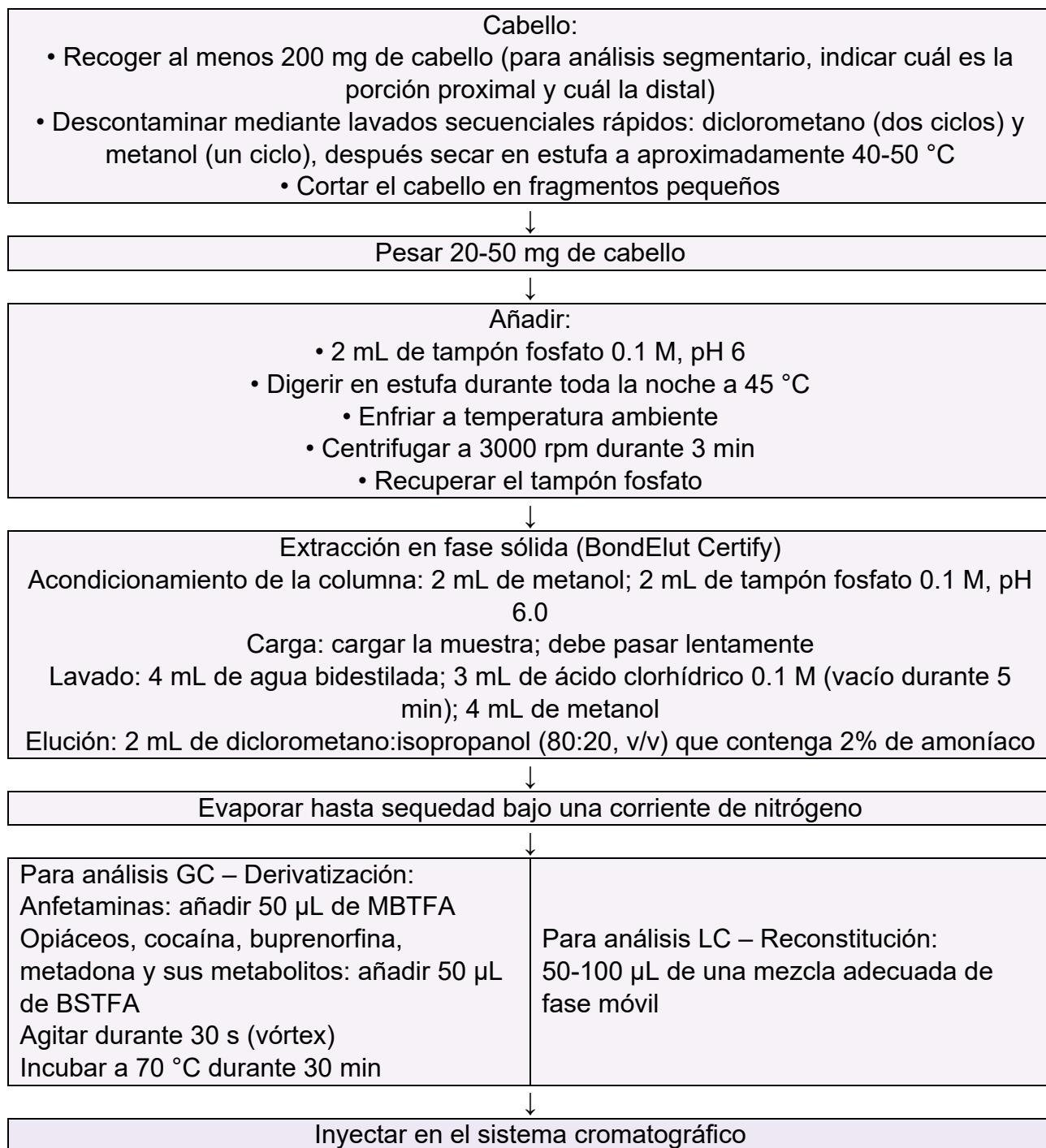
Ejemplo de determinación de THC-COOH en orina*.



* Los procedimientos analíticos basados en LC utilizan actualmente el enfoque “dilute and shoot”, que implica una simple dilución de la muestra seguida de inyección directa en el sistema instrumental.

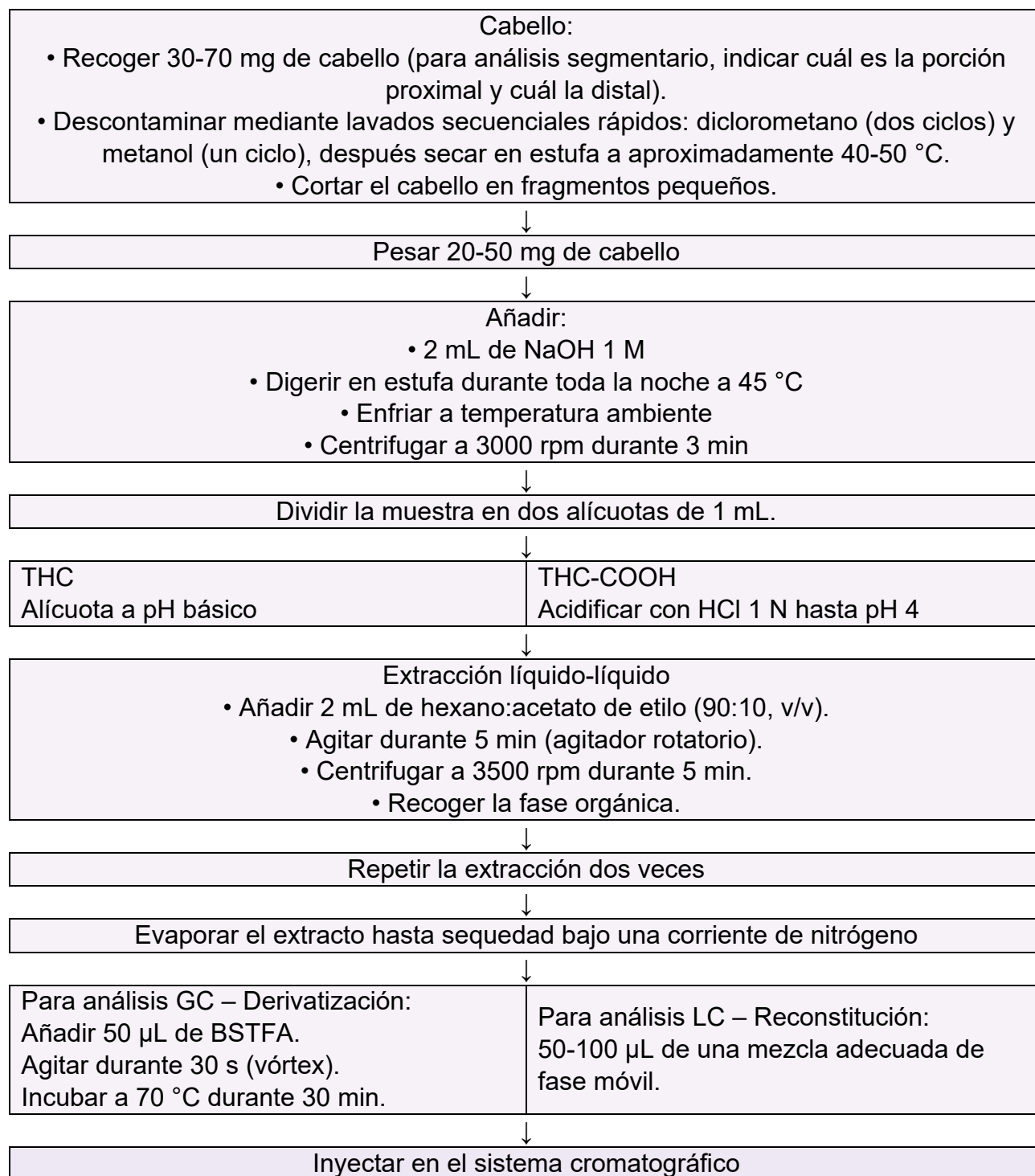
Anexo A7

Ejemplo de determinación de anfetaminas, opiáceos, cocaína, buprenorfina, metadona y sus metabolitos en cabello.



Anexo A8

Ejemplo de determinación de THC, THC-COOH y 11-OH THC en cabello.



APÉNDICE B

Ejemplos de formularios

B1. Ejemplo de formulario de consentimiento informado

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Determinación de sustancias de abuso convencionales y nuevas sustancias psicoactivas (NPS) en matrices biológicas

Información del centro/laboratorio:

Nombre: _____

Dirección: _____

Teléfono/Correo electrónico: _____

Información del interesado

Nombre completo: _____

Fecha de nacimiento: _____

Documento de identidad (tipo y número): _____

Dirección: _____

Correo electrónico: _____

Finalidad del examen

El examen solicitado implica el análisis de una o más matrices biológicas (cabello, orina, sangre, saliva, otras) con el fin de identificar la posible presencia de sustancias de abuso convencionales y/o nuevas sustancias psicoactivas (NPS).

Este examen se realiza con las siguientes finalidades:

- ☐ Clínica
- ☐ Diagnóstica
- ☐ Forense / Médico-legal
- ☐ Administrativa / Laboral
- ☐ Otra (especificar): _____

Descripción del procedimiento

La recogida de la muestra será realizada por personal sanitario cualificado de conformidad con las normas de buena práctica clínica y la normativa de salud y seguridad. La cantidad de muestra recogida se limitará al mínimo necesario para realizar los análisis.

Todas las muestras serán etiquetadas, registradas y conservadas de acuerdo con procedimientos destinados a garantizar su integridad, trazabilidad y seguridad.

Posibles riesgos y molestias

Los riesgos asociados al procedimiento son mínimos:

- En caso de extracción de sangre: dolor leve, enrojecimiento o pequeño hematoma en el lugar de punción;
- En caso de recogida de cabello: ningún riesgo significativo;
- En caso de recogida de orina o saliva: ningún riesgo.

Confidencialidad y tratamiento de datos

Los datos personales y los resultados analíticos serán tratados de conformidad con la legislación aplicable en materia de protección de datos personales (Reglamento (UE) 2016/679 (GDPR)) y se utilizarán exclusivamente para las finalidades indicadas anteriormente. También podrán comunicarse a las autoridades competentes cuando así lo exija la ley.

Consentimiento

La persona abajo firmante declara:

- haber leído la política de protección de datos relativa al tratamiento de datos personales (de conformidad con el *artículo 13 del Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo*), haber comprendido su contenido y haber dispuesto de tiempo suficiente para reflexionar antes de expresar esta declaración;
- haber sido informada de forma clara y comprensible sobre las finalidades, los procedimientos y los riesgos asociados al examen;
- comprender que la negativa a proporcionar la muestra puede tener consecuencias jurídicas o administrativas en los casos previstos por la legislación aplicable.

y consiente voluntariamente en:

- ☐ la recogida y el análisis de muestras biológicas;
- ☐ la conservación de la muestra durante el periodo necesario para completar los procedimientos de verificación analítica;
- ☐ la comunicación de los resultados a las entidades/personas autorizadas indicadas.

Firma del sujeto	En caso de menor o persona sujeta a medidas de apoyo / representación legal	Firma del operador autorizado
Declaro haber leído atentamente este formulario, haber recibido explicaciones satisfactorias y comprender plenamente su contenido. Firma: _____ Fecha: ____ / ____ / ____	Yo, _____, actuando como (padre/madre/tutor legal/curador / guardador de hecho), consiento la recogida de una muestra biológica del menor/persona incapacitada _____ para las finalidades descritas anteriormente. Firma: _____ Fecha: ____ / ____ / ____	Nombre y apellidos: _____ Firma: _____ Fecha: ____ / ____ / ____

B2. Ejemplo de formulario de política de protección de datos y consentimiento

POLÍTICA DE PROTECCIÓN DE DATOS Y FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Detección de sustancias de abuso convencionales y nuevas sustancias psicoactivas (NPS) en matrices biológicas

Información del interesado:

Nombre completo: _____

Dirección: _____

Teléfono/Correo electrónico: _____

Finalidad del examen:

- ☐ Pruebas clínicas y diagnósticas
- ☐ Investigaciones médico-legales
- ☐ Investigación científica autorizada
- ☐ Vigilancia sanitaria

Datos personales:

Información del interesado

• Nombre completo: _____

Muestras biológicas recogidas:

- ☐ Sangre
- ☐ Fluido oral
- ☐ Orina
- ☐ Matrices queratinizadas (cabello y/o uñas)
- ☐ Otras (especificar): _____

Tratamiento de datos:

Los datos personales y los datos de las muestras biológicas serán tratados en formato papel o electrónico por personal autorizado, garantizando la confidencialidad, integridad y seguridad.

Comunicación de datos:

Los datos podrán comunicarse únicamente a profesionales sanitarios autorizados, laboratorios acreditados o autoridades sanitarias competentes, cuando así lo exija la legislación aplicable.

Conservación de los datos:

Los datos personales y los resultados analíticos relacionados se conservarán de conformidad con los requisitos legales y reglamentarios vigentes y únicamente durante el periodo necesario para cumplir las finalidades para las que fueron recogidos.

Derechos del interesado:

El interesado tiene derecho a acceder a sus datos personales, rectificarlos, suprimirlos, limitar su tratamiento u oponerse a él, así como el derecho a la portabilidad de los datos y a retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que ello afecte a la licitud del tratamiento realizado antes de la retirada.

Consentimiento:

Por la presente declaro haber recibido, leído y comprendido la política de protección de datos. Consiento voluntariamente la recogida y el análisis de mis muestras biológicas y el tratamiento de mis datos personales para las finalidades especificadas anteriormente.

☐ Sí, consiento ☐ No, no consiento

Lugar y fecha: _____

Firma del interesado: _____

Firma del operador responsable: _____

B3. Ejemplo de informe de recogida de muestras biológicas

FORMULARIO DE RECOGIDA DE MUESTRAS

Determinación de sustancias de abuso convencionales y nuevas sustancias psicoactivas (NPS) en matrices biológicas

Información del centro/laboratorio:

Nombre: _____

Dirección: _____

Teléfono/Correo electrónico: _____

Información del interesado

Nombre completo: _____

Fecha de nacimiento: _____

Documento de identidad (tipo y número): _____

Dirección: _____

Correo electrónico: _____

Tipo de matriz recogida

Matriz	Datos de recogida
☐ Sangre	Tipo de tubo: ☐ EDTA ☐ Heparina ☐ Fluoruro/oxalato ☐ Otro Volumen recogido: _____ mL Hora: _____ Fecha: _____
☐ Orina	Volumen recogido: _____ mL Temperatura en el momento de la entrega: _____ °C Hora: _____ Fecha: _____
☐ Saliva	Dispositivo utilizado: _____ Hora: _____ Fecha: _____
☐ Cabello	Lugar de recogida: _____ Longitud de la muestra: _____ cm Cantidad aproximada (peso/mechones): _____ Hora: _____ Fecha: _____

Posibles anomalías observadas: _____

Conservación y transporte

Número de muestra / etiqueta: _____

Método de conservación: ☐ Temperatura ambiente ☐ Refrigerado (4 °C) ☐ Otro: _____

Laboratorio de destino: _____

Notas adicionales: _____

Firma del sujeto	persona sujeta a medidas de apoyo / representación legal
Declaro que la recogida de la muestra se realizó en mi presencia y que la información proporcionada es verdadera y correcta. Firma del sujeto: _____ Fecha: ____ / ____ / ____	Yo, _____, actuando como (padre/madre/tutor legal/administrador de apoyo), declaro que la recogida de la muestra del menor/ persona sujeta a medidas de apoyo / representación legal se realizó en mi presencia y que la información proporcionada es verdadera y correcta. Firma del representante legal: _____ Fecha: ____ / ____ / ____

Firma del operador autorizado

Yo, operador autorizado para recoger la muestra, declaro que la muestra fue recogida de acuerdo con procedimientos estandarizados, garantizando la trazabilidad, integridad y cadena de custodia.

Nombre y apellidos: _____

Firma del operador: _____ Fecha: ____ / ____ / ____

B4. Ejemplo de formulario de cadena de custodia

FORMULARIO DE CADENA DE CUSTODIA

Determinación de sustancias de abuso convencionales y nuevas sustancias psicoactivas (NPS) en matrices biológicas

Tipo de examen: _____

Tipo de matriz: ☐ Sangre ☐ Orina ☐ Saliva ☐ Cabello ☐ Otra: _____

Código único de la muestra: _____

Fecha y hora de recogida: ____ / ____ / ____ : ____

Estado de la muestra en el momento de la recogida: ☐ Íntegra ☐ No íntegra (especificar): _____

Embalaje: ☐ Recipiente estéril ☐ Bolsa de papel ☐ Papel de aluminio ☐ Otro: _____

Actividad	Fecha y hora	Entrega (nombre, firma)	Recepción (nombre, firma)	Estado de la muestra / Notas
Recogida → Entrega 1				
Entrega 1 → Entrega 2				
Entrega 2 → Laboratorio				
Procesamiento analítico				
Conservación/Archivo				
Eliminación (si procede)				

Transporte

Método de transporte: ☐ Manual ☐ Empresa de mensajería ☐ Cadena de frío ☐ Otro: _____

Temperatura de transporte (si procede): _____ °C Posibles anomalías: _____

Notas adicionales: _____

Firma del operador final responsable

Declaro que todas las operaciones relativas a la muestra se realizaron de conformidad con los procedimientos y que se garantizó la trazabilidad en cada etapa.

Nombre y apellidos: _____

Firma del operador: _____ Fecha: ____ / ____ / ____

B5. Ejemplo de formulario de informe

FORMULARIO DE INFORME ANALÍTICO

Determinación de sustancias de abuso convencionales y nuevas sustancias psicoactivas (NPS) en matrices biológicas

Información del centro/laboratorio:

Nombre: _____

Dirección: _____

Responsable del laboratorio: _____

Teléfono/Correo electrónico: _____

Información del interesado

Nombre completo: _____

Fecha de nacimiento: _____

Documento de identidad (tipo y número): _____

Dirección: _____

Correo electrónico: _____

Tipo de muestra analizada

☐ Orina ☐ Sangre ☐ Saliva ☐ Cabello ☐ Sudor ☐ Otra: _____

Código de muestra: _____

Fecha y hora de recogida: ____ / ____ / ____ : ____

Fecha y hora de recepción en el laboratorio: ____ / ____ / ____ : ____

Metodología analítica

Técnica utilizada: ☐ LC-MS/MS ☐ GC-MS ☐ GC-FID ☐ Inmunoquímica ☐ Otra: _____

Método validado n.º: _____

Límite de detección (LOD): _____

Límite de cuantificación (LOQ): _____

Analitos investigados

(Lista completa o selección de categorías)

☐ Opioides

☐ Cocaína y metabolitos

☐ Anfetaminas / Metanfetaminas

☐ Cannabis (THC, THCA, metabolitos)

☐ Benzodiazepinas

☐ Alcohol / EtG / EtS

☐ nuevas sustancias psicoactivas (NPS): _____

☐ Otros: _____

Resultados del análisis

(Indicar concentraciones, unidades de medida o resultado cualitativo) Interpretación preliminar:

Analito	Resultado	Valor de referencia / Límite de decisión	Unidad de medida	Incertidumbre de medida

Interpretación y conclusiones

Indicar claramente el resultado del análisis.

☐ Resultado negativo: no se detecta ninguna sustancia por encima del límite de decisión.

☐ Resultado positivo: presencia de _____

• Niveles detectados compatibles con _____

☐ El resultado no puede interpretarse debido a:

☐ Muestra insuficiente

☐ Degradación de la muestra

☐ Interferencias analíticas

☐ Otro: _____

Firma del operador autorizado

Yo, operador autorizado para recoger la muestra, declaro que la muestra fue recogida de acuerdo con procedimientos estandarizados, garantizando la trazabilidad, integridad y cadena de custodia.

Nombre y apellidos: _____

Firma del operador: _____ Fecha: ____ / ____ / ____