

One step

MANUALE D'ISTRUZIONE

Codice C9501

b

USO

Dispositivo medico-diagnostico in vitro, su supporto immunocromatografico (card), per la determinazione rapida e qualitativa delle Benzodiazepine (BZO) in campioni di urine umane

PRINCIPIO del METODO

La procedura analitica si basa sul principio della cromatografia a flusso laterale. La velocità di esecuzione e la sensibilità analitica rendono questa metodologia la più diffusa negli screening qualitativi in merito all'assunzione di droghe d'abuso. Il sistema diagnostico permette la ricerca della **Benzodiazepine** nelle urine umane alla concentrazione soglia (cut-off) di 300 ng/ml

Il presente metodo fornisce risultati qualitativi e preliminari che dovrebbero essere sempre confermati con metodi di riferimento, quali la gaschromatografia/spettrometria di massa (gasmasse, GC/MS). Inoltre, i risultati positivi dovrebbero sempre essere supportati da evidenze cliniche o valutazioni specialistiche: infatti non risulterebbe corretto effettuare considerazioni cliniche e giudizi medico legali basati su test relativi a droghe d'abuso soprattutto qualora si tratti di risultati positivi preliminari.

CONSIDERAZIONI CLINICHE

Le Benzodiazepine (BZO) sono farmaci frequentemente prescritti per il trattamento sintomatico dell'ansia e dei disturbi del sonno. Le BZO producono i loro effetti su specifici recettori per un neurotransmettore denominato GABA (acido γ-aminobutyrico). Poiché tali farmaci risultano più sicuri ed efficaci, le benzodiazepine hanno sostituito i barbiturici nel trattamento sia dell'ansia che dell'insonnia. Questi farmaci vengono anche impiegati come sedativi prima di interventi medico-chirurgici e nel trattamento di accessi o della disassuefazione da alcool. Il rischio di dipendenza fisica aumenta qualora le BZO vengano assunte giornalmente per più di pochi mesi, soprattutto se a dosi elevate. La brusca sospensione della terapia può provocare sintomatologie varie, quali disturbi del sonno, alterazioni gastrointestinali, sensazioni di malessere, perdita di appetito, sudorazione, tremori, debolezza, ansia ed alterazioni della percezione. Soltanto piccole quantità (inferiori all'1%) della maggior parte delle benzodiazepine vengono escrete inalterate nelle urine; le maggiori concentrazioni sono rappresentate da conjugati; la finestra di rilevazione delle BZO nelle urine risulta di circa 3-7 giorni. La presente metodologia analitica rappresenta un valido test di screening che può essere eseguito senza l'ausilio di alcuna apparecchiatura di Laboratorio. Viene impiegato un anticorpo che rileva selectivamente elevate concentrazioni di BZO in campioni di urine umane. Il valore soglia (cut-off) del presente metodo, ovvero la minima concentrazione urinaria di Benzodiazepine (BZO) che produce un risultato positivo, è di 300 ng/ml

PRINCIPIO DEL METODO

La procedura analitica utilizza una tecnologia immunocromatografica su membrana (immunosassaggio con flusso laterale del campione): l'analita, qualora presente nel campione, compete con molecole del medesimo composto chimico (antigene), immobilizzate sulla membrana porosa (zona reattiva T della membrana) e coniugate con cromogeno, per il legame con anticorpi anti-BZO presenti in concentrazione limitata. Quando l'analita è presente nel campione a concentrazione superiore o uguale al valore di cut-off vengono bloccati tutti i siti di legame dell'anticorpo; in conseguenza di ciò l'anticorpo stesso non potrà formare immunocompleSSI con le molecole del composto chimico coniugato con cromogeno ed immobilizzate sul supporto (zona reattiva T della membrana) e, pertanto non si formerà la banda di colore rosa in corrispondenza di tale zona (zona del Test); la banda colorata, per contro, sarà visibile quando la concentrazione dell'analita nel campione risulterà inferiore ai limiti di sensibilità del metodo. Il campione, indipendentemente dalla sua concentrazione in BZO, dovrà sempre sviluppare una banda colorata in rosa nella zona del controllo (zona contrassegnata con C), in quanto il coniugato si legherà comunque al reagente ivi immobilizzato, dimostrando che il sistema ha funzionato correttamente (controllo procedurale). Un campione negativo produrrà due distinte bande colorate, rispettivamente nelle zone del test e del controllo; un campione positivo produrrà una banda colorata soltanto in corrispondenza della zona del controllo. Il supporto reattivo contenente la membrana immunocromatografica (card) è pronto all'uso. Il campione, indipendentemente dalla concentrazione di specifico analita, dovrà sempre produrre una banda colorata nella zona del controllo (contrassegnata con C), dimostrando che il sistema ha funzionato correttamente (controllo procedurale).

REAGENTI

Il supporto di reazione immunocromatografico (card) contiene microparticelle rivestite con anticorpi monoclonali di topo anti-Benzodiazepine coniugato protein-Benzodiazepine. Nella zona del controllo sono presenti anticorpi di capra

CONTENUTO DEL KIT

- 20 Supporti di reazione (card)
- 20 Pipette contagocce

10

ATTREZZATURA RICHIESTA (non a corredo)

Timer

PRECAUZIONI

1. Tutti campioni biologici, le cards ed il monouso devono essere considerati potenzialmente infetti e, come tali, smaltiti secondo la normativa vigente
2. Per uso esclusivamente *in vitro*
3. Indossare guanti protettivi: lavarsi le mani alla fine della seduta analitica
4. Il kit è stato formulato esclusivamente per determinazioni *in vitro*
5. Portare tutto il materiale reagentario a T. A. prima della seduta analitica
6. Non utilizzare la card qualora il sacchetto risulti danneggiato

STABILITÀ DEI REAGENTI

Il kit deve essere conservato a 2-30°C. I supporti immunocromatografici (cards) sono sensibili all'umidità ed al calore eccessivo. Si consiglia di effettuare il test subito dopo aver estratto la card dal sacchetto sigillato. Non utilizzare dopo la data di scadenza. **NON CONGELARE**

RACCOLTA DEL CAMPIONE

I campioni di urina devono essere raccolti in contenitore specifico monouso, senza aggiunta di stabilizzanti. I campioni di urina possono essere conservati fino a 48 ore a 2-8°C prima del test; per periodi prolungati di conservazione è necessario congelare a -20°C. Campioni contenenti precipitati visibili devono essere centrifugati, filtrati o lasciati decantare. Qualora venga utilizzato un campione refrigerato o congelato, portarlo a T. A. prima di analizzarlo, solo dopo averlo risospeso accuratamente.

PROCEDURA ANALITICA

1. Portare i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente
2. togliere il supporto di reazione dall'involucro di protezione, tagliando il sacchetto lungo il bordo sigillato e poro su una superficie piana. Utilizzare entro breve tempo
3. Riempire la pipetta contagocce con il campione da analizzare. Tenendo la pipetta verticale, dispensare esattamente 3 gocce di urina (circa 100 µl), evitando la formazione di bolle d'aria, nel pozzetto del campione (contrassegnati con dicitura "3 gocce")
4. Far partire il timer: leggere il risultato dopo 5 minuti

AVVERTENZA: per evitare una lettura errata, non interpretare mai il risultato oltre 10 minuti dalla dispensazione del campione.

INTERPRETAZIONE dei RISULTATI

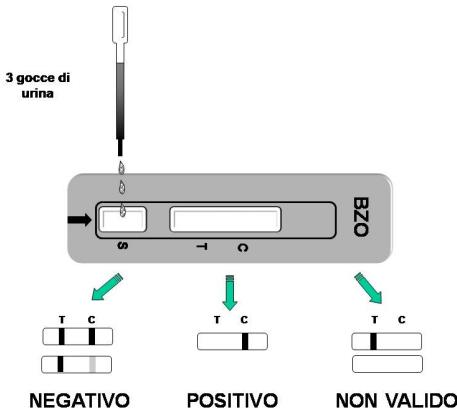
Fare riferimento alle illustrazioni riportate di seguito

NEGATIVO: in aggiunta alla banda del controllo (C), si evidenzia una banda colorata nella zona Test (T). n.b.: anche la formazione di una banda debolmente colorata nella zona T è indice di risultato NEGATIVO

POSITIVO: si sviluppa la banda colorata soltanto nella zona di controllo (C); non appare la banda nella zona Test (T). Un risultato POSITIVO indica una concentrazione di BZO nel campione superiore a 300 ng/ml

NON VALIDO (RIPETERE): se si evidenzia soltanto una banda colorata nella zona (T) o non si evidenziano distinte bande colorate, sia nella zona del controllo che nella zona (T), il test è da considerarsi "non valido": si raccomanda di ripetere il test **IMPONGANDO UNA NUOVA CARD**. N.B.: le cause più frequenti di un risultato NON VALIDO possono essere un volume insufficiente di campione dispensato e/o errori procedurali.

Il controllo interno della procedura è incluso nel metodo stesso: lo sviluppo di una banda rosata nella zona del controllo (C) rappresenta il controllo procedurale, a conferma di una corretta esecuzione della metodica.



CONTROLLO DI QUALITÀ

1. La formazione o meno della banda colorata nella zona del controllo è da considerarsi di per sé stessa una procedura di controllo di qualità interna.
2. L'utilizzo di un controllo esterno (urine a titolo certificato per i diversi analiti) è raccomandabile per valutare ulteriormente la correttezza dei dati analitici.

LIMITAZIONI DEL METODO

1. Il presente kit è stato formulato esclusivamente per la ricerca di BZO in campioni di urine umane e fornisce risultati analitici **esclusivamente qualitativi e preliminari**. Utilizzare metodiche secondarie di riferimento, quali la gaschromatografia-spettrometria di massa (gasmasse, GC/MS)^{2,3} per confermare i risultati
2. Sebbene questa procedura analitica sia particolarmente accurata nel riscontro di BZO nelle urine, sostanze potenzialmente interferenti potrebbero causare risultati errati
3. Composti chimici, quali agenti sbiancanti o fortemente ossidanti, qualora presenti nel campione di urina, possono provocare risultati errati con qualsiasi metodica analitica impiegata: qualora si suspecti una tale contaminazione, viene consigliato di impiegare un nuovo campione di urina.
4. Un risultato positivo indica la presenza di marijuana o di suoi metaboliti ma non fornisce informazioni sulla relativa concentrazione, vie di somministrazione o livello di intossicazione.
5. Un risultato negativo non indica necessariamente l'assenza di BZO nel campione: infatti, è possibile ottenere risultati negativi per campioni contenenti l'analita a concentrazioni inferiori al cut-off (300 ng/ml)
6. Il test non è in grado di distinguere la droga d'abuso da farmaci che eventualmente la contengano

Pertanto, come tutti i test di laboratorio, l'interpretazione ai fini della diagnosi deve essere supportata da tutte le altre indagini necessarie e disponibili, nonché dalle informazioni cliniche ottenibili

PRESTAZIONI DEL METODO

Accuratezza

Uno studio di correlazione è stato condotto utilizzando la presente procedura analitica ed analogo prodotto (test rapido) commerciale: sono stati impiegati campioni provenienti da soggetti già verificati in precedenza. Per i campioni inizialmente POSITIVI con test di screening preliminare, è stato effettuato dosaggio con GC/MS.

Nella Tabella sottoelencata sono riportati i risultati

Metodo	Test rapido del commercio			Risultati totali	
	Risultati				
		Positivi	Negativi		
Test BZO	Positivi	130	5	135	
	Negativi	14	149	163	
	Risultati totali	144	154	298	
	Correlazione tra i 2 metodi %	90%	97%	94%	

Quando correlati al cut-off di 300 ng/ml con GC/MS sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Metodo	GC/MS			% di correlazione con GC/MS	
	Risultati				
		Positivi	Negativi		
Test BZO	Positivi	130	6	136	
	Negativi	5	159	164	
	Totali	135	165	300	
				96%	

Sensibilità analitica

Ad un pool di urine privo di BZO è stato aggiunto l'analita (Oxazepam[®]) alle seguenti concentrazioni: 0 ng/ml, 150 ng/ml, 225 ng/ml, 300 ng/ml, 375 ng/ml e 450 ng/ml. I risultati ottenuti hanno definito un'accuratezza del 100% per concentrazioni comprese tra ±50% il valore di cut-off. I dati sono riportati nella Tabella sottostante

BZO (Oxazepam) (ng/ml)	% di cut-off	n	RISULTATO VISIVO	
			Negativo	Positivo

0	0	30	30	0
150	-50%	30	30	0
225	-25%	30	26	4
300	Cut-off	30	12	18
375	+25%	30	3	27
450	+50%	30	0	30

Specificità analitica

I sottolocati composti chimici, quando presenti nel campione di urina, evidenziano risultato positivo al test BZO dopo 5 minuti

Composto	Concentrazione (ng/ml)
Alprazolam	196
α-idrossialprazolam	1262
Bromazepam	1562
Clordiazeposido	1562
Clobazam	98
Clonazepam	781
Potassio clorazepato	195
Delorazepam	1562
Desalchiflurazepam	390
Diazepam	195
Estazolam	2500
Flunitrazepam	390
(±)-lorazepam	1562
RS-lorazepam glucuronide	156
Midazolam	12500
Nitrazepam	98
Norclordiazeposido	195
Nordiazepam	390
Oxazepam	300
Temazepam	98
Triazolam	2500

Precisione analitica

Uno studio è stato condotto in 3 Laboratori (A, B e C) analizzando i risultati ottenuti da operatori inesperti che hanno utilizzato 3 lotti diversi del kit BZO, per valutare la precisione intrassoggetto, intersoggetto e intraoperatorio. A ciascun Laboratorio è stato assegnato identico pannello di campioni codificati in accordo con GC/MS (assenza di BZO, BZO a concentrazione ±25% al cut-off, BZO a concentrazione ±50% al cut-off di 300 ng/ml) contenenti BZO alle concentrazioni sotto riportate

BZO (ng/dl)	n	Laboratorio A		Laboratorio B		Laboratorio C	
		-	+	-	+	-	+
0	15	15	0	15	0	15	0
150	15	14	1	14	1	15	0
225	15	11	4	14	1	14	1
375	15	0	15	1	14	3	12
450	15	0	15	0	15	0	15

Effetti relativi al peso specifico del campione di urina

15 campioni di urina di peso specifico compreso tra 1.001 e 1.032 sono stati addizionati con 150 e 450 ng/ml di BZO. Utilizzando il presente metodo sono state eseguite analisi in duplice usando i 15 campioni sia addizionati che non. I risultati dimostrano che diversi valori di peso specifico non interferiscono con la determinazione analitica.

Effetti relativi al pH del campione di urina

Il pH di aliquote da un pool di campioni negativi è stato aggiustato in un intervallo di valori compreso tra 5 e 9 con incrementi di 1 unità e le aliquote addizionate con 150 e 450 ng/ml di BUP (Oxazepam). Utilizzando il presente metodo sono state eseguite analisi in duplice usando le aliquote addizionate. I risultati dimostrano che diversi valori di pH non interferiscono con la determinazione analitica.

INTERFERENZE ANALITICHE (cross-reactività)

È stato eseguito uno studio finalizzato alla valutazione delle possibili interferenze analitiche causate da particolari composti sia su campioni di urine prive di droghe da abuso che contenenti BZO (Oxazepam) I composti elencati di seguito non hanno mostrato alcuna interferenza crociata, quando testati con il presente metodo alla concentrazione di 100 µg/ml:

(-)-cotinina
(-)- <i>u</i> -efedrina
[(1R,2S)](-)-lefedrina
(±)-bromofenirammmina
(±)-clorfenirammmina
(±)-isoproterenolo
(±)-3,4-metilendiossi-amfetamina idrocloruro
(±)-3,4-metilendiossi-metil-amfetamina idrocloruro
3-idrostirrammina
Acetaminofene
Acetonfenetidina
Acido acetilsalicilico
Acido benzillico
Acido benzoico
Acido gentisico
Acido L-ascorbico
Acido nalidixico
Acido O-drossipiruro
Acido ossalico
Acido oxalico
Acido salicilico
Acido urico
Amitriptilina
Aminopirina
Amobarbital
Amoxicillina
Ampicillina
Apomorfina
Aspartame
Atropina
B-estradiolo
B-feniletilamina
Benzefatamina
Benzollecgonina
Bilirubina
Caffeina
Cannabidiolo
Cannabinolo
Chetamina
Chetoprefene
Chinacrina
Chindina
Chinino
Clomipramina
Clonidina
Cloralidato
Cloramfenicolo
Clorochina
Clorotiazide
Clorpromazina

Cocacetilene
Cocaina idrocloruro
Codeina
Colesterolo
Cortisone
Creatinina
D-norpropoisofene
DL-amfetamina soffato
DL-octopamina
D,L-propanolo
D,L-tirosina
D,L-triptofano
Deossicorticosterone
Destrometofan
Diclofenac
Difenidramina
Difunisal
Digossina
Doxilammina
D-propoisofene
D-pseudoebefrina
Econina idrocloruro
Econina metil-estere
Emoglobina
Entromicina
Estrone-3-soffato
Etil- <i>p</i> -aminobenzoato
Fenciclidina
(L)-epinefrina
Fenelzina
L-Fenilefrina
Fenilpropanolamina
Fenobarbital
Fenopropene
Fentermina
Furosemide
Ibuprofene
Idralazina
Idrocicloriazide
Idrocodone
Idrocortisone
Imipramina
Iproniazide
Isosuprina
Labetalolo
L-Metanfetamina
Loperamide
Maprotolina
MDE
Meperidina
Meprobamato
Metadone
Metossifemamina
Morfina-3-β-D-glucuronide
Morfina soffato
N-acetilprocainamide
Naloxone
Naltrexone
Naprosene
Niacinamide
Nifedipina
Nordeineina
Noreindrone
Noscapina
Ossicodone
Ossimetazolina
Papaverina
para-Idrossiamfetamina
para-Idrossimetamfetamina
Penicillina-G
Pentazocina
Pentobarbital
Perfenzaina
Prednisolone
Prednisone
Procaina
Promazina
Prometazina
Ranitidina
Secobarbital
Serotonina
Sulfametazina
Sulindac
Tetraciclina
Tetraidrocortisone 3-acetato
Tetraidrocortisone 3-(β-D-glucuronide)
Tetraidrozolina
Tiamina
Tioridazina
Tiramina
Tolbudamide
Trans-2-fernilciclo-propilamina idrocloruro
Triamterene
Trifluoperazina
Trimetoprim
Trimipramina
Triptamina
Verapamil
Zomepirac

BIBLIOGRAFIA

- Baselt, R.C., Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man 2nd Ed. Biomedical Publ., Davis, CA 1982, 488
- Hawks, R.L. and Chiang, C.N., Urine Testing for Drugs of Abuse. National Institute for Drug Abuse (NIDA), Research Monograph 73, 1986

Codici di Riordino:
C9501 BENZODIAZEPINES DRUG TEST

20 Tests

BioPlastic
Roma