Valutazione di un nuovo metodo "on-site" per la determinazione della chetamina urinaria

Lucio Marchioro, Laura Bologna, Isabella Pavan, Carlo Artusi, Mariela Ivanova, Anna Liverani, Giulia Polo, Martina Zaninotto, Mario Plebani
Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova

ABSTRACT

Evaluation of a new point-of-care assay for urinary ketamine detection. Ketamine is a synthetic anesthetic primarily used in veterinary medicine. In recent years, its abuse has dramatically increased worldwide among teenagers as a "club drug". Determination of ketamine in urine is, however, difficult because screening methods are not available. Aim of this work was the evaluation of a new on-site assay (QuickPac II OneStep Ketamine test, Syntron Bioresearch, Inc.) in comparison with our routine rapid test (Drug-Screen - Rapid Drug test, Nal Von Minden), and the verification of obtained results by HPLC-tandem mass spectrometry. A total of 38 urine samples were analyzed. For 12 samples both rapid assays gave the same results, whereas for 26 samples results were discordant (i.e positive with Drug-Screen and negative with QuickPac II). On these samples, HPLC-tandem mass spectrometry confirmed the results obtained by QuickPac II assay. The false positive results obtained with Drug-Screen - Rapid Drug test were probably due to some cross-reactivity of methadone and its metabolite 2-ethyl-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine with ketamine.

INTRODUZIONE

La chetamina [2-(o-clorofenil)-2-metilamminacicloesanone] cloridrato è un anestetico derivato dalla fenciclidina dotato di proprietà dissociative, analgesiche e psichedeliche. E' usato principalmente in ambito veterinario, ma trova utilizzo anche in chirurgia pediatrica. Gli effetti della chetamina sono diretti verso differenti siti d'azione, ma l'inibizione del recettore N-metil-D-aspartato (NMDA) sembra essere il più importante meccanismo neurofarmacologico della sostanza. A questa specifica azione come antagonista non competitivo del glutammato, si devono aggiungere gli effetti diretti che la chetamina esercita sui sistemi dopaminergico, colinergico, adrenergico e sui recettori degli oppiacei e dei cannabinoidi endogeni (1).

Numerosi effetti della chetamina sono dose-dipendenti. Alle dosi più basse (0,2 mg/kg), considerate non allucinogene, sono riferiti elevazione del tono dell'umore, sogni piacevoli e/o spiacevoli e deficit delle funzioni cognitive, della memoria e dell'attenzione. A dosi più alte (>2 mg/kg), considerate allucinogene, sono state descritte esperienze extracorporee e di "pre-morte", sensazioni di distorsione nella percezione della forma e dimensione di parti corporee, sensazione di "entità disincarnate" e apparenti visioni del futuro ("flashforward") (2). Lo stato catalettico causato dalla sua somministrazione, associato ad amnesia e difficoltà di reazione, ha fatto identificare la chetamina come sostanza che facilita atti di violenza sessuale ("drug facilitated sexual assault") (3, 4).

La chetamina nella sua forma pura è una polvere cristallina bianca, ma è disponibile illecitamente anche sottoforma di liquido o di capsule/pillole; la forma in pasticca è generalmente formata da chetamina miscelata con cocaina ed è facilmente riconoscibile per un logo CK. La via d'assunzione prevalente è quella nasale (può anche essere ingerita, iniettata o fumata) e con questa modalità il picco di concentrazione plasmatica è raggiunto dopo circa un'ora. Risulta anticipato a ~22 min se l'assunzione è per via intramuscolare (5). Negli ultimi anni tra i giovani si è riscontrato un drammatico aumento dell'abuso di cetamina come "club drug". Infatti, essa risulta facilmente reperibile durante i "rave parties" e nelle discoteche sotto vari nomi (Special K, Vitamina K, Ket, KitKat, Purple, Super Acid) (6).

La chetamina si distribuisce rapidamente nell'encefalo e successivamente viene ridistribuita a organi meno perfusi, seguendo una cinetica di distribuzione di tipo bi-compartimentale. E' sottoposta a un intenso metabolismo epatico, dove il citocromo P450 per demetilazione la converte a norchetamina, che ha effetti simili alla stessa chetamina; la norchetamina viene deidrogenata a deidronorchetamina. La chetamina e i suoi principali metaboliti vengono idrossilati e coniugati

Corrispondenza a: Mario Plebani, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova, Via Giustiniani 2, 35128 Padova. Tel. 0498212792, Fax 049663240, E-mail mario.plebani@unipd.it

Ricevuto: 21.01.2011 Revisionato: 12.05.2011 Accettato: 06.07.2011

con acido glucuronico prima della loro eliminazione renale. Nelle urine se ne riscontra circa il 95% (il rimanente 5% nelle feci), nelle seguenti percentuali: chetamina 2%, norchetamina 2%, deidronorchetamina 16% e composti glucuronati 80% (7). L'emivita è in genere di 1-3 ore, anche se dipende dalla dose assunta. Per quanto riguarda la finestra di rilevabilità, recentemente è stato dimostrato che, mediante cromatografia liquida ad alta prestazione con rilevazione in spettrometria di massa "tandem" (HPLC-MS/MS), la chetamina può essere determinata nelle urine dopo 3-5 giorni dalla sua assunzione, la norchetamina dopo 4-6 giorni e la deidronorchetamina fino a 10 giorni (8). Tuttavia, la determinazione della chetamina nelle urine non è di facile esecuzione e, attualmente, i test di screening commerciali non sono ancora molto diffusi. Le uniche opportunità sono rappresentate dai metodi "on-site". Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare un nuovo metodo immunocromatografico (QuickPac II OneStep Ketamine test, Syntron Bioresearch, Inc.) per la determinazione della chetamina urinaria, con confronto dei risultati ottenuti con il metodo attualmente in uso presso il nostro laboratorio (Drug-Screen – Rapid Drug test, Nal Von Minden). Tutti i risultati sono stati poi sottoposti ad analisi di conferma mediante HPLC-MS/MS.

MATERIALI E METODI

Campioni

Nel rispetto della Dichiarazione di Helsinki e applicando i suoi principi, durante il periodo della nostra sperimentazione è stata eseguita nel nostro laboratorio la ricerca della chetamina su 753 campioni di urina provenienti dal Servizio per le Tossicodipendenze di Padova (SerT). In considerazione del numero limitato di determinazioni a disposizione con il nuovo metodo in valutazione, tra questi sono stati scelti 6 campioni positivi (sia al metodo di screening in uso che alla conferma con HPLC-MS/MS), 6 campioni negativi (sia al metodo di screening in uso che alla conferma con HPLC-MS/MS) e 26 campioni, classificati come falsi positivi (positivi al metodo di screening in uso, ma negativi alla conferma con HPLC-MS/MS).

Metodi "on-site"

La determinazione della chetamina urinaria è stata eseguita con i metodi "on-site" Drug-Screen – Rapid Drug test e QuickPac II OneStep Ketamine test. In entrambi i casi si tratta di dosaggi rapidi immunocromatografici per la rilevazione qualitativa della chetamina nell'urina con livelli di cut-off di 1000 e 100 μg/L, rispettivamente.

Il principio di rilevazione dei due metodi è simile. Entrambi sono costituiti da un dispositivo cromatografico che implica l'utilizzo di anticorpi specifici. Il farmaco/droga o i suoi metaboliti presenti nel campione competono con il farmaco/droga immobilizzato su una membrana porosa per un numero limitato di siti. Se nel campione di urina sono presenti chetamina o i suoi metaboliti in quantità superiore al cut-off, questi agiranno tramite un meccanismo di competizione con la sostanza stessa immobilizzata sulla membrana.

Come indicato dalle istruzioni contenute nei foglietti illustrativi forniti dalle case produttrici, i campioni di urina sono stati portati a temperatura ambiente prima dell'esecuzione della determinazione. Nel Drug-Screen era eseguita una dispensazione di ~200 μL di urina nel pozzetto del dispositivo con lettura del risultato dopo 5-10 min. Per il QuickPac II era dispensata una quantità di 150 μL di urina e la lettura eseguita in media dopo 5 min (comunque non oltre 8 min).

Anche l'interpretazione dei risultati è uguale per entrambi i dispositivi. In caso di risultato positivo, si nota la comparsa di due bande di colore rosa sia nella zona di controllo (C) che nella zona test (T), mentre in caso di risultato negativo appare una linea solo nella zona C. Il test risulta non valido se non appare alcuna linea nella zona C. Nella Tabella 1 sono riportate le specificità dichiarate dai rispettivi produttori per ciascuno dei due metodi "on-site".

Controllo di qualità

A causa della mancanza di specifici materiali di controllo, come CQI è stato utilizzato (campione negativo) "Liquichek Urine Toxicology Negative Control" (Bio-Rad). I due metodi "on-site" sono stati anche valutati sulla base dei risultati ottenuti su 4 campioni del programma di VEQ UK-NEQAS per le sostanze d'abuso.

Interferenze (cross-reattività)

Per la valutazione di possibili interferenze da metadone sono stati utilizzati i materiali di calibrazione del metodo di determinazione del metadone utilizzato nel nostro laboratorio (vedi sotto), aventi concentrazioni di 300, 600 e 2000 μg/L, rispettivamente.

Metodologia HPLC-MS/MS

L'analisi cromatografica era eseguita su HPLC 1200 Series LC (Agilent Technologies, Inc.). Come rivelatore è stato usato uno spettrometro di massa 6410 a triplo quadrupolo (Agilent Technologies, Inc.), mentre per l'analisi dei dati è stato utilizzato il "software" dedicato

Tabella 1
Specificità dichiarate per i due metodi "on-site"per la determinazione della chetamina urinaria utilizzati in questo studio

Sostanza	Concentrazione (μg/L)
Drug-Screen - Rapid Drug test	
Norchetamina	>2.000
Fenciclidina	>10.000
QuickPac II OneStep Ketamine test	
Norchetamina	>10.000
Fenciclidina	>200.000

"MassHunter Workstation" (Agilent Technologies, Inc.). La fase preparativa dei campioni comportava una diluizione 1:5 [200 µL urina o calibratore + 200 µL di standard interno contenente 50 µg/L di chetamina-D_4 (Cerilliant, Analytical Reference Standards) + 600 µL di una soluzione acquosa 0,1% di acido formico]. La separazione cromatografica è stata effettuata utilizzando una colonna Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HT Threaded Column 2,1 mm x 50 mm (1,8 µm) (Agilent Technologies, Inc.), con dimensioni delle particelle di 1,8 µm. Metanolo (fase A) e acqua (fase B), contenenti entrambi 0,1% di acido formico, hanno costituito le fasi mobili. Il gradiente di tipo lineare prescelto è stato così realizzato: 95% di fase B e 5% di fase A da 0,0 min fino 5% di fase B al quarto minuto. Per riequilibrare la colonna, la fase B viene aumentata al 95% in 2 min. Durante l'analisi, il flusso è di 0,4 mL/min con una temperatura in colonna di 40 °C. Ogni corsa analitica, avente una durata di 6 min, prevede un volume di iniezione di 2 µL. Le analisi sono state completate in ESI ("electrospray ionization mass spectrometry") in "positive-ion mode", con flusso e temperatura del "drying" gas (N_2) rispettivamente di 11 L/min e 250 °C (pressione del nebulizzatore: 35 psi, voltaggio del capillare: 4000 V). L'energia impiegata nel frammentatore e quella di collisione sono state di 140 V e 20 V ciascuna.

Con questa metodologia, l'acquisizione dei dati è realizzata utilizzando il monitoraggio delle reazioni multiple (MRM) dei prodotti di frammentazione selettiva degli ioni protonati molecolari (*m/z* 238,1 → 124,9 e 179,0 per chetamina e *m/z* 242,1 → 129,0 e 183,0 per chetamina-D_4). La curva di taratura prevedeva materiali di calibrazione con concentrazioni di 0, 48,5, 97,0 e 194,5 µg/L, mostrando una buona linearità ($r \geq 0{,}999$). Iniettando più campioni di urina privi di chetamina non sono state rilevate tracce di composti interferenti. Lo standard interno utilizzato è stato solo quello di chetamina, per la non disponibilità al tempo della sperimentazione di uno standard di norchetamina. I limiti di rilevabilità e di quantificazione della metodica erano rispettivamente 0.54 µg/L e 2,5 µg/L (9). L'imprecisione tra le serie (CV) era <5%. Per valutare l'esattezza del metodo erano eseguite 20 determinazioni di una soluzione di urina a cui era stata aggiunta chetamina alle concentrazioni di 48,5, 97,0 e 145,5 µg/L. L'inesattezza è stata calcolata come valore percentuale del rapporto tra differenza tra media e valore atteso e il valore atteso. I valori ottenuti erano rispettivamente 1,2%, 0,2% e 0% per le tre concentrazioni di chetamina valutate. Infine, il metodo non mostrava interferenze da metadone fino a concentrazioni di almeno 1000 µg/L.

Il cut-off di positività utilizzato è 100 µg/L. Tale scelta è stata fatta su base arbitraria, poichè attualmente non esistono indicazioni specifiche da parte di organismi internazionali di riferimento, società scientifiche o normative di legge. La scelta effettuata, comunque, corrisponde al cut-off del metodo "on-site" oggetto di questa valutazione.

Altri metodi

Per la determinazione del metadone è stato utilizzato un metodo basato sull'interazione cinetica di microparticelle in soluzione ("kinetic interaction of microparticles in solution", KIMS) commercializzato da Roche Diagnostics. 2-etil-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP) è stata determinata mediante metodologia CEDIA ("cloned enzymatic immuno assay") Microgenetics. Entrambi i metodi sono sati eseguiti su strumentazione Cobas c 501 (Roche Diagnostics).

RISULTATI

Per tutti i 38 campioni valutati, il dispositivo in valutazione ha fornito risultati concordanti con HPLC-MS/MS. Nella Tabella 2 sono riportati i risultati concordanti tra i due metodi di screening utilizzati. Nella Tabella 3 sono invece riportati gli esiti discordanti,

Tabella 2
Campioni con risultati concordanti per i due metodi "on-site"per la chetamina urinaria utilizzati

Campione no.	Drug-Screen	QuickPac II	HPLC-MS/MS
1	Negativo	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo
7	Positivo	Positivo	Positivo (10.960 µg/L)
8	Positivo	Positivo	Positivo (239 µg/L)
9	Positivo	Positivo	Positivo (154 µg/L)
10	Positivo	Positivo	Positivo (196 µg/L)
11	Positivo	Positivo	Positivo (2570 µg/L)
12	Positivo	Positivo	Positivo (225 µg/L)

Tabella 3
Campioni con risultati discordanti per i due metodi "on-site"per la chetamina urinaria utilizzati

Campione no.	Drug-Screen	QuickPac II	HPLC-MS/MS	Metadone (µg/L)	EDDP (µg/L)
1	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	1644
2	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	1369
3	Positivo	Negativo	Negativo	1460	ND
4	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	1292
5	Positivo	Negativo	Negativo	581	2290
6	Positivo	Negativo	Negativo	128	538
7	Positivo	Negativo	Negativo	2207	ND
8	Positivo	Negativo	Negativo	1233	ND
9	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	2510
10	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	1813
11	Positivo	Negativo	Negativo	3644	ND
12	Positivo	Negativo	Negativo	8366	1453
13	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	2496
14	Positivo	Negativo	Negativo	497	1186
15	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	1407
16	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	1480
17	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	1237
18	Positivo	Negativo	Negativo	4861	1273
19	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	1212
20	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	1028
21	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	1708
22	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	1471
23	Positivo	Negativo	Negativo	>10.000	1070
24	Positivo	Negativo	Negativo	656	1267
25	Positivo	Negativo	Negativo	581	290
26	Positivo	Negativo	Negativo	2589	1418

EDDP, 2-etil-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina; ND, risultato non disponibile.

assieme ai risultati ottenuti sugli stessi campioni per metadone e EDDP. Le Tabelle 2 e 3 riportano, inoltre, il riscontro ottenuto con la metodologia di conferma in HPLC-MS/MS.

L'ipotizzata interferenza del metadone sui metodi "on-site" è stata valutata utilizzando i materiali di calibrazione del metodo per il dosaggio del metadone. Inoltre, si è anche voluto valutare se una concentrazione di 8.500 µg/L in matrice urinaria confermasse i risultati ottenuti in precedenza. Tali risultati sono riportati nella Tabella 4. A conferma di queste osservazioni sono stati anche i risultati ottenuti nella VEQ UK-NEQAS (Tabella 5). Infatti, per i campioni no. 3 e 4 contenenti metadone (rispettivamente alle concentrazioni di 2900 µg/L e 3010 µg/L) e EDDP (5390 µg/L e 5460 µg/L) e privi di chetamina, il metodo "on-site" in uso ha fornito risultati falsamente positivi per la chetamina, diversamente dal metodo in valutazione. Per i campioni di VEQ privi di metadone e EDDP (no. 1 e 2), entrambi i metodi "on-site" hanno invece fornito un risultato corretto.

DISCUSSIONE

Nel laboratorio di tossicologia clinica l'accertamento di un eventuale stato di tossicodipendenza rappresenta un aspetto fondamentale e in questo contesto le procedure utilizzate devono essere il più possibile rigorose e affidabili. A fronte di queste importanti esigenze, il laboratorio deve disporre di metodi di screening e di conferma in grado di rispondere alle sempre più frequenti richieste da parte dei SerT, dei Servizi di Medicina Preventiva e dei reparti di cura, in un

Tabella 4
Prove di interferenza da metadone

Metadone (µg/L)	Drug-Screen	QuickPac II
300	Dubbio	Negativo
600	Dubbio	Negativo
2000	Dubbio	Negativo
8500	Positivo	Negativo

Tabella 5
Risultati della VEQ UK-NEQAS per la chetamina urinaria

Campione no.	Risultato assegnato	Drug-Screen	QuickPac II	HPLC-MS/MS
1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo

ambito della diagnostica in cui gli analiti da ricercare sono in continua evoluzione. In linea con questi principi, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di verificare e quindi migliorare la diagnostica utilizzata nel nostro laboratorio per lo screening dell'impiego della chetamina. In particolare, ciò che ha portato alla nostra decisione di cercare e valutare un metodo "on-site" alternativo a quello in uso è stato l'elevato numero di risultati positivi per chetamina riscontrati in routine con quest'ultimo. Infatti, durante il periodo di osservazione per la raccolta della casistica da sottoporre al nuovo dispositivo "on-site", su un totale di 753 campioni, 324 di questi sono risultati positivi. Tutti sono stati in seguito sottoposti ad analisi di conferma con HPLC-MS/MS, che tra questi ha individuato solo 7 campioni positivi per la chetamina, classificando gli altri 317 come falsi positivi al test di screening in uso. La caratteristica che accomuna tutti i campioni risultati falsi positivi alla chetamina con il metodo di screening in uso è la presenza di metadone (e EDDP) a concentrazioni superiori ai loro rispettivi cut-off. Al contrario, il nuovo metodo di screening valutato ha fornito per gli stessi campioni un risultato in linea con l'analisi di conferma in HPLC-MS/MS. Ciò ha fatto ipotizzare che gli anticorpi presenti del metodo di screening in uso interagissero con il metadone (e/o l'EDDP) fornendo quindi risultati falsi positivi. Tale ipotesi ha trovato conferma dalla valutazione dell'interferenza da metadone eseguita in vitro.

Una criticità che si riscontra spesso nella scelta di metodi immunocromatografici qualitativi è rappresentata dalle scarse informazioni reperibili sulla tipologia e specificità degli anticorpi utilizzati. Una maggior possibilità di accedere a informazioni di questo tipo potrebbe meglio orientare verso una scelta più appropriata, con minor dispendio di risorse in termini economici e di tempo da parte del laboratorio. Sulla base dei risultati ottenuti, seppur preliminari, è possibile concludere che il dispositivo QuickPac II OneStep Ketamine test è da preferire al Drug-Screen – Rapid Drug test nell'impiego come esame di screening per la presenza di concentrazioni significative di chetamina nelle urine.

BIBLIOGRAFIA

1. Wolff K, Winstock AR. Ketamine, from medicine to misuse. CNS Drugs 2006;20:199-218.
2. Katzung BG, ed. Basic & clinical pharmacology. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2007.
3. Smith KM, Larive LL, Romanelli F. Club drugs: methylenedioxymethamphetamine, flunitrazepam, ketamine hydrochloride, and gamma-hydroxybutyrate. Am J Health Syst Pharm 2002;59:1067-76.
4. Smith KM. Drugs used in acquaintance rape. J Am Pharm Assoc (Wash) 1999;39:519-25.
5. Mozayani A. Ketamine – Effects on human performance and behavior. Forensic Sci Rev 2002;14:123.
6. Jansen KL. A review of non medical use of ketamine: use, users and consequences. J Psichoact Drugs 2000;32:419-33.
7. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, eds. Clarke's analysis of drugs and poisons. 3th ed. London: Pharmaceutical Press, 2004.
8. Parkin MC, Turfus SC, Smith N, et al. Detection of ketamine and its metabolites in urine by ultra high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2008;876:137-42.
9. Guideline on validation of analytical procedures: methodology; The European Agency for the Evaluation of Medical Products Veterinary Medicines Evaluation Unit (EMEA). VICH Topic GL2, 1998.