

Tecnica EMIT II: ottimizzazione delle misure di sostanze d'abuso nelle urine

Giovanni Cangiano¹, Annunziata Ciafrone², Rossella Garofano³, Daniela Giardiello¹, Rosario Romano¹, Mario Petrella², Luigi Vrenna¹

Dipartimento Farmacodipendenze A.S.L. Napoli 1

¹Polo Laboratoristico Tossicologico "P.O. Ascalesi"

²Coordinamento Area Farmacodipendenze

³Servizio Tossicodipendenze Distretto 47

ABSTRACT

EMIT II technique: optimization of drugs-of-abuse measurements in urine

Aim of this work was to optimize the application of the EMIT II technique to the measurement of drugs-of-abuse concentrations in urine, in the context of the activities of Drug Addiction Services (SERT). The modifications of the analytical protocols, concerning the analytical volumes (samples and reagents) and the intervals of calibrators concentrations, led to analytical conditions more suitable for a correct evaluation of therapeutic monitoring.

RIASSUNTO

Con questo lavoro si è ottimizzata l'applicazione della tecnica EMIT II alla determinazione di droghe d'abuso nelle urine, nell'ambito dei Servizi Tossicodipendenza. Le modifiche apportate ai volumi analitici (campioni e reagenti) ed agli intervalli di calibrazione di alcuni metaboliti urinari hanno permesso di ottenere condizioni analitiche più idonee ad una corretta valutazione del monitoraggio terapeutico.

INTRODUZIONE

Per la diagnosi di dipendenza o abuso di sostanze non si può prescindere dal riscontro laboratoristico rivolto sia a stabilire la presenza nelle urine di sostanze illecite o loro metaboliti che a controllare nel tempo l'efficacia della terapia farmacologica e del programma terapeutico-riabilitativo (1, 2 e 3).

Generalmente, lo screening laboratoristico si effettua con l'utilizzo di tecniche immunometriche quantitative (4). Per le esigenze dei SERT è consigliabile l'uso di metodiche rapide e pratiche, in fase omogenea, con segnale direttamente proporzionale alla concentrazione e quindi più idonee alla valutazione di concentrazioni anche elevate, facilmente eseguibili in automazione su analizzatori per biochimica clinica, ed a costi contenuti (5, 6, 7, 8).

Col presente lavoro si propongono nuovi procedimenti di utilizzo della metodica EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) di II generazione (9, 10, 11, 12), variati rispetto a quelli consigliati dal produttore per i volumi impiegati. Tali variazioni, unite all'uso di calibratori ad alta concentrazione, consentono l'ampliamento degli intervalli analitici, con risparmio sia di tempo sia di reagenti impiegati.

Vengono inoltre identificate alcune problematiche analitiche utili ad una più corretta valutazione del monitoraggio terapeutico del Paziente Tossicodipendente.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto determinando sostanze d'abuso in urine provenienti dal Centro Diurno Palomar (Distretto 44) e dal SERT del Distretto 47 dell'Azienda Sanitaria Locale Napoli 1 (ASL NA 1).

Le determinazioni delle classi di sostanze d'abuso (amfetamine, barbiturici, benzodiazepine, cocaina, cannabinoidi, metadone ed oppiacei) sono state effettuate utilizzando metodiche da noi proposte e completamente automatizzate sullo strumento Viva (tabella 1) della ditta Dade Behring (Milano, Italia), in dotazione presso il Presidio Ospedaliero "C. Ascalesi" dell'ASL NA 1. Il calcolo dell'assorbanza/minuto alla lunghezza d'onda di 340 nm si effettua con rilevazioni a 50 ed a 106 secondi dall'inserimento del reagente 2 (G6PD-droga) in una soluzione contenente reagente 1 (anticorpo/G6P/NAD/tampone) ed urina.

I calibratori ed i reagenti EMIT II sono stati ricostituiti rispettivamente con 5 ml e 100 ml di acqua bidistillata mentre i controlli Liphocheck Urine Toxicology Control della ditta Biorad (Milano, Italia), opportunamente ricostituiti (tabella 2), sono serviti sia per costituire punti aggiuntivi di calibrazione, sia per il controllo di qualità interno. Il controllo Liphocheck viene diluito 1:16 con acqua bidistillata per la determinazione della morfina e 1:4 per tutte le altre determinazioni.

Per la determinazione degli oppiacei urinari ad alta

Tabella 1

Metodi EMIT II. Principali parametri dei metodi modificati, confrontati con i rispettivi originali

Analita	Reagente 1		Reagente 2		Campione (urina)
	Volume di ricostituzione (mL)	Volume analitico (μ L)	Volume di ricostituzione (mL)	Volume analitico (μ L)	Volume analitico (μ L)
Metadone					
EMIT II originale	100	180	100	180	18
modificato	100	180	100	180	12
EMIT I modificato*	51	120	51	120	12
Oppiacei					
EMIT II originale	100	180	100	180	18
modificato	100	180	100	180	15
EMIT II "300/2000"***	---	260	--	100	15
Benzodiazepine					
EMIT II originale	100	180	100	180	18
modificato	100	180	100	180	14
Amfetamine, Cocaina e Barbiturici					
EMIT II originale	100	180	100	180	18
modificato	100	180	100	180	16
Cannabinoidi 20 ng/ml					
EMIT II originale	100	180	100	180	18
modificato	100	180	100	180	18

*La metodica originale - a tre reattivi - è applicata sullo strumento RANDOM 100 ed i reagenti sono ricostituiti aggiungendo 45 ml di tampone TRIS a 6 ml di reattivo ricostituito

**I reagenti sono già pronti all'uso

Tabella 2

Concentrazione dei calibratori (Dade Behring) e dei controlli (Biorad) liofilizzati dopo ricostituzione

Calibratore	Classi di sostanze d'abuso urinarie (ng/ml)						
	Amfetamine (3 punti)	Barbiturici (3 punti)	Benzodiazepine (6 punti)	Cannabinoidi (3 punti)	Cocaina (6 punti)	Metadone (6 punti)	Oppiacei (5 punti)
Zero	0	0	0	0	0	0	0
A1/2*	-	-	-	-	150	-	-
A1	1000	200	200	-	300	-	300
A1+A2**	-	-	600	-	-	-	-
A2/6*	-	-	-	-	500	-	-
A2/3*	-	-	-	-	1000	-	-
A2	3000	1000	1000	-	3000	-	1000
B1	-	-	-	-	-	300	2000
B1+B2**	-	-	-	-	-	650	-
B2	-	-	-	-	-	1000	4000
LIPH.1°	-	-	2000	-	-	2000	-
LIPH.2°°	-	-	4000	-	-	4000	-
THC20	-	-	-	20	-	-	-
THC50	-	-	-	50	-	-	-

*calibratori ricostituiti e diluiti successivamente con soluzione fisiologica

**calibratori ricostituiti ed uniti successivamente in parti uguali

°°,°°controlli della ditta BIORAD ricostituiti rispettivamente con 25 ml (LIPH.1)* e 12.5 ml (LIPH.2)** di acqua bidistillata

concentrazione (fino a 40000 ng/ml) si è utilizzato il kit EMIT II "300/2000 Oppiacei", pronto all'uso (12), con l'ausilio del controllo Lipocheck, dei calibratori Dade-Behring e di alcuni campioni urinari a concentrazione elevata, opportunamente diluiti ed analizzati con tecnica cromatografica (HPLC), per eseguire punti di calibrazione aggiuntivi (150, 10000, 20000 e 40000 ng/ml) rispetto a quelli usati nella metodica EMIT II. Per la determinazione del metadone urinario fino a 40000 ng/ml si sono utilizzati: il kit "EMIT d.a.u.", con alcune modifiche rispetto alla metodica consigliata (7,8); i controlli Lipocheck e i calibratori Dade-Behring; alcuni campioni urinari a titolo elevato, opportunamente diluiti ed analizzati con tecnica cromatografica (HPLC), per eseguire punti di calibrazione aggiuntivi.

Per le elaborazioni statistiche è stato utilizzato il programma in basic della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare (13).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il software dell'analizzatore Viva consente di calcolare le curve di calibrazione con la migliore interpolazione, in

relazione al numero dei calibratori ed allo scarto di errore scelto dall'utente.

La rappresentazione grafica delle calibrazioni per amfetamine, barbiturici, benzodiazepine, cocaina, metadone ed oppiacei appare nella figura 1. L'analisi dei dati di tale figura evidenzia che, pur riducendo il volume del campione nelle metodiche, così come segnalato in tabella 1, si ottiene comunque una discreta variazione di segnale tra i differenti punti di calibrazione. I relativi profili di imprecisione di figura V, indicano coefficienti di variazione accettabilmente bassi (circa il 5%) per un intervallo analitico sufficientemente ampio. La riduzione del volume analitico del campione urinario permette quindi di misurare concentrazioni elevate di sostanze d'abuso di interesse per il monitoraggio del soggetto in terapia.

La concentrazione del metadone urinario sembra essere correlata alla dose somministrata (6, 8): risulta pertanto utile poterne misurare la concentrazione nel campione, senza pre-diluzione, fino a 4000 ng/ml. Tali valori sono ricorrenti specialmente in pazienti tossicodipendenti in trattamento per os con 20-40 mg/ml di metadone cloridrato (6). La calibrazione fino a 4000 ng/ml è possibile solo introducendo ulteriori calibratori con concentrazione di

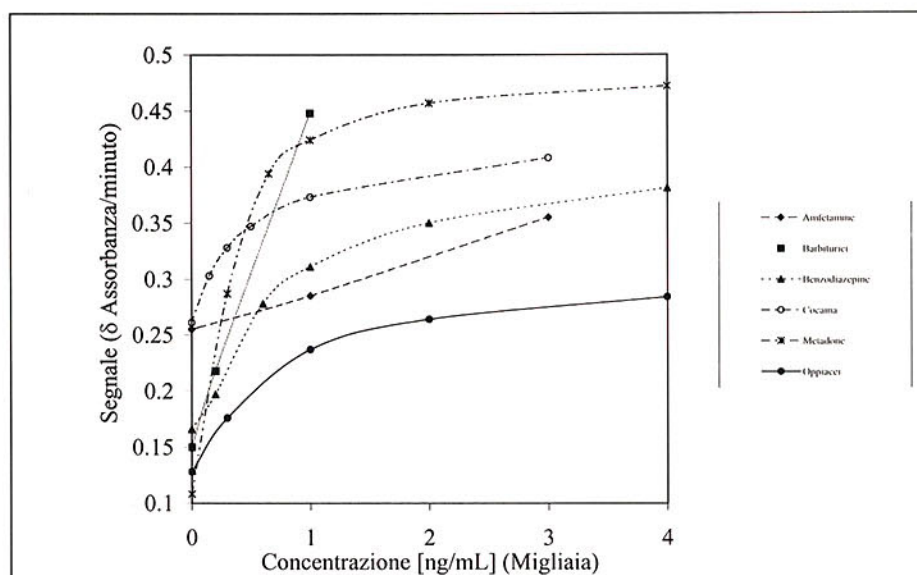


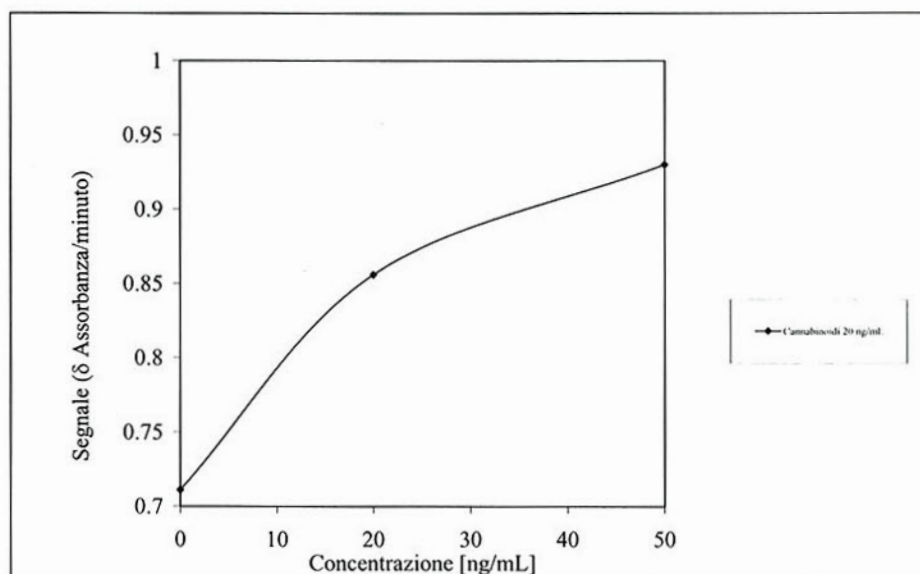
Figura 1

Curve di calibrazione per differenti componenti: metodi EMIT II modificati per il volume del campione (tabella 1) e per il numero dei punti di calibrazione (tabella 2)

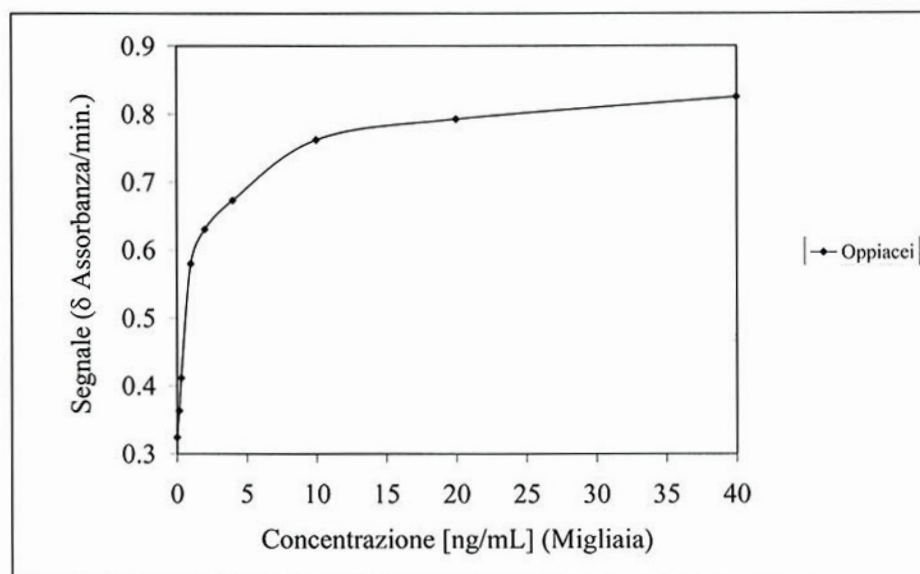
Tabella 3

Recuperi percentuali dei punti a concentrazione 150, 500 e 1000 ng/mL di benzoilecgonina ottenuti con la metodica originale e modificata

Valore teorico ng/mL	Metodica modificata		Metodica originale	
	Val. sperim. ng/mL	recupero %	Val. sperim. ng/mL	recupero %
150	147	98.0	69	46.0
500	522	104.4	392	78.4
1000	1065	106.5	1384	138.4

**Figura II**

Curva di calibrazione per il metodo EMIT II "cannabinoidi 20 ng/ml"

**Figura III**

Curva di calibrazione per gli oppiacei con il metodo EMIT II "300-2000", con calibratori aggiuntivi (tabella 2)

650 e 2000 ng/ml al fine di evitare una errata interpolazione della curva di calibrazione. Anche per le benzodiazepine risulta indispensabile calibrare con campioni noti aggiuntivi a concentrazione di 600 e 2000 ng/ml.

Identiche considerazioni vanno fatte per il dosaggio della benzoilecgonina ove è necessario utilizzare calibratori aggiuntivi aventi concentrazione di 150, 500 e 1000 ng/ml: la tabella 3 evidenzia il diverso comportamento, in termini di recupero percentuale, delle due metodiche (ori-

ginali e modificate) per la misura della benzoilecgonina alle concentrazioni aggiuntive sopracitate.

La metodica per la determinazione dei cannabinoidi (20 ng/mL) non ha subito variazioni rispetto a quella proposta dalla Ditta produttrice: in figura II ne viene riportata la curva di calibrazione. Appaiono discrete le variazioni di assorbanza e meno soddisfacenti i relativi coefficienti di variazione percentuale (intervallo analitico tra 20 e 50 ng/ml), scaturiti dall'analisi del profilo di imprecisione di

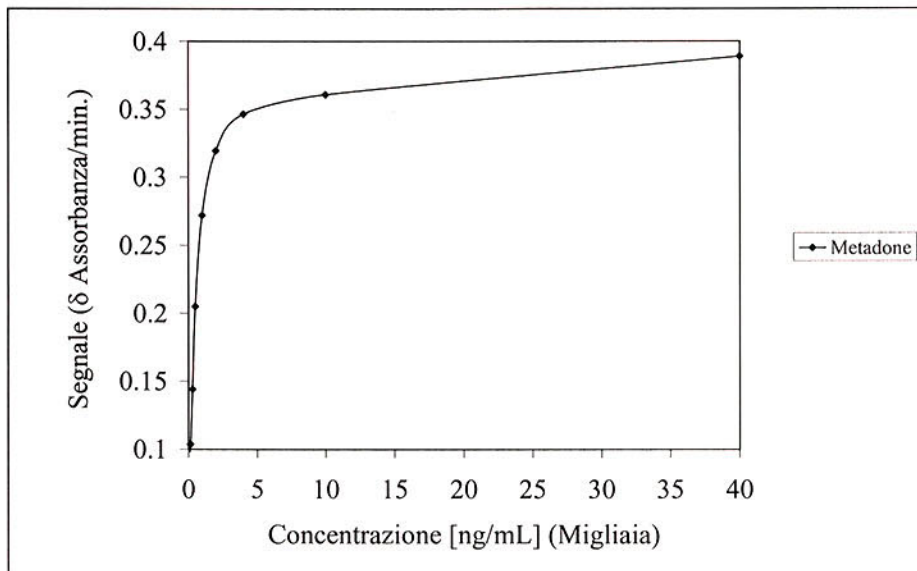


Figura IV
Come figura III, relativa al metadone, metodo EMIT "dau"

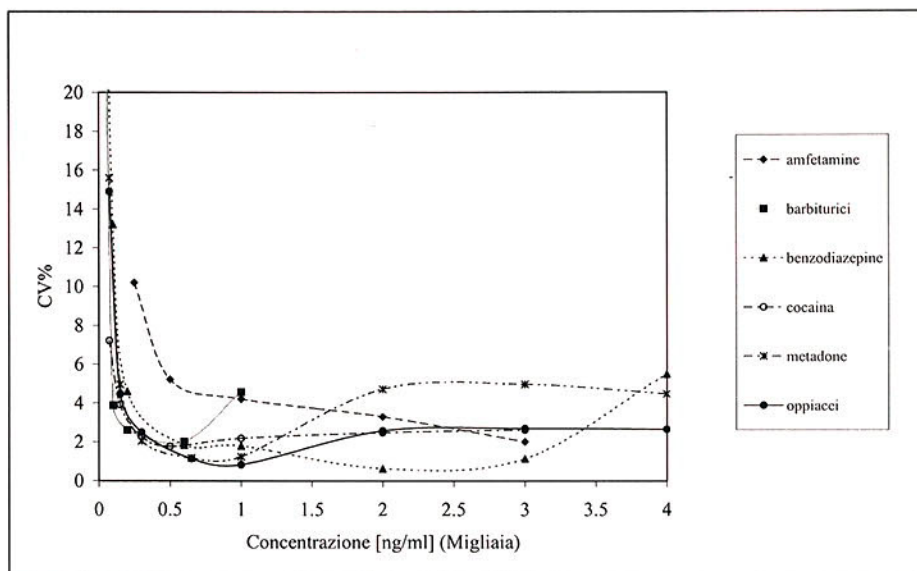


Figura V
Profilo di imprecisione per differenti componenti, metodo EMIT II

figura VI.

Buone appaiono le variazioni di assorbanza (figure III e IV) ottenute con le metodiche metadone d.a.u. e con oppiacei EMIT II "300/2000", utilizzate per la misura di elevate concentrazioni di droga nelle urine, fino a 40000 ng/ml. I relativi profili di imprecisione (figura VII) evidenziano valori di CV% di circa il 25% per il metadone e 20% per gli oppiacei. Le prove di recupero illustrate in figura VIII evidenziano recuperi percentuali compresi tra il 77 ed il

120%.

Aumenti di segnale analitico, e quindi la possibilità di estendere la misura a valori superiori di 4000 ng/ml, per le determinazioni di oppiacei, metadone e benzodiazepine, possono ottenersi anche ricostituendo i reagenti liofilici con volumi di acqua bidistillata inferiori ai 100 ml previsti.

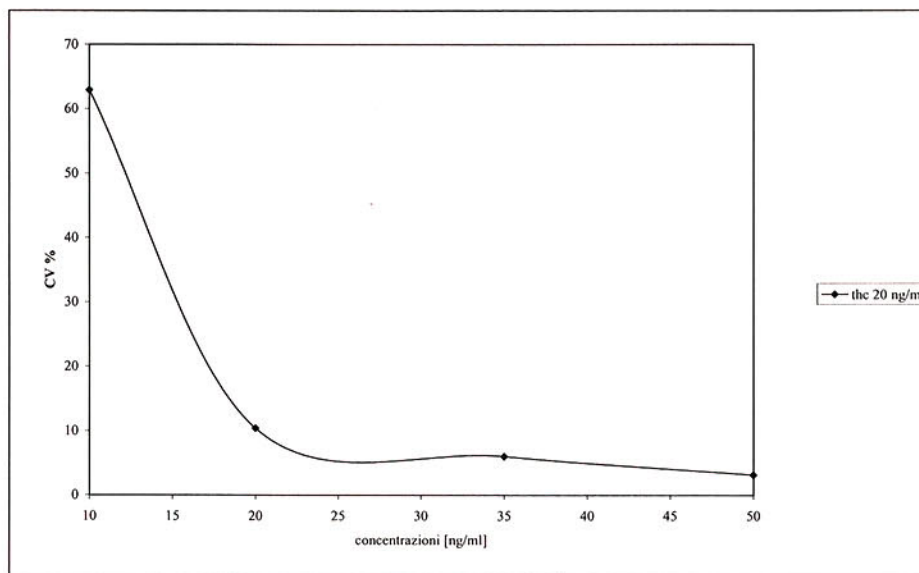


Figura VI
 Profilo di imprecisione per i cannabinidi, metodo EMIT II "THC 20 ng/ml"

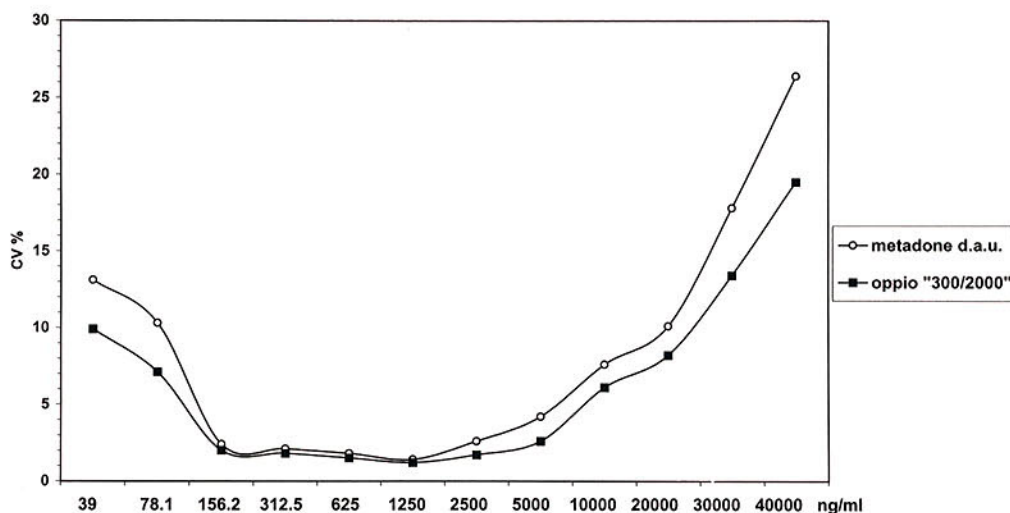


Figura VII
 Profilo di imprecisione per metadone (metodo d.a.u.) ed oppiacei (metodo 300/2000)

CONCLUSIONI

La tecnica EMIT, particolarmente con i reagenti di seconda generazione, è facilmente adattabile a qualsiasi strumentazione di chimica clinica. La misura di valori elevati di concentrazione urinaria di oppiacei, metadone e benzodiazepine, comporta l'uso di calibratori aggiuntivi a concentrazione più elevata (2000 e 4000 ng/ml) rispetto a quelli normalmente proposti dalla ditta Dade-Behring.

Nel caso di "Emit II oppiacei" la curva di calibrazione può essere in tale modo estesa ai valori di 2000 e 4000 ng/ml. Tuttavia, se è necessario evidenziare un'assunzione recente di eroina, ad es. per il controllo della congruità di un programma terapeutico, è preferibile effettuare la

determinazione con la metodica "300/2000" EMIT II capace di rilevare concentrazioni elevate di morfina fino a 40000 ng/ml.

Per il metadone e le benzodiazepine viene utilizzato il controllo Lipocheck della ditta Biorad, opportunamente diluito con acqua distillata. Problemi di linearità e di calibrazione vengono risolti modificando il volume del campione urinario ed immettendo punti aggiuntivi di calibrazione. Per quanto concerne il metadone, la sua concentrazione urinaria è riportata essere correlata alla dose somministrata per os. Concentrazioni urinarie fino a 4000 ng/ml bene rappresentano le somministrazioni orali comprese tra 20 e 40 mg/die; somministrazioni terapeutiche

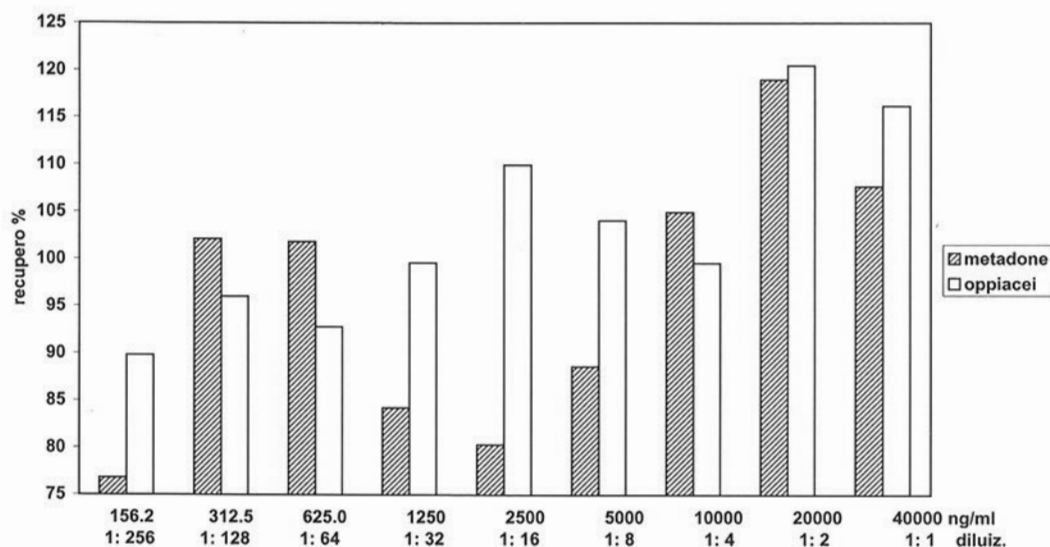


Figura VIII

Prove di recupero per metadone ed opiacei, metodi EMIT d.a.u. ed EMIT II "300/2000"

superiori a 40 mg/die determinano elevate concentrazioni urinarie meglio determinabili con kit "EMIT d.a.u.", adeguando la metodica ed il relativo procedimento di calibrazione come precedentemente discusso.

Per quanto riguarda le benzodiazepine, il riscontro di valori elevati può suggerire la avvenuta assunzione di diazepam o dei suoi derivati, a causa della elevata affinità di questa sostanza per l'anticorpo (anticorpo anti-diazepam). Altre benzodiazepine, come il 7-amino flunitrazepam (ROIPNOL) il lorazepam (es. TAVOR) ed il lormetazepam (MINIAS), danno risposte diverse, maggiori o minori. Pertanto, in caso di sospetta assunzione illecita, data la grande varietà di sostanze con simili caratteristiche farmacologiche ma con grande diversità di risposta immunochimica, è utile poter affiancare la determinazione cromatografica alla analisi immunochimica.

BIBLIOGRAFIA

1. Tagliamonte A. Trattamenti della dipendenza da oppiacei con farmaci sostitutivi. Basi biologiche e farmacologiche della tossicodipendenza. Pythagora Press. 1992; 279-284.
2. Boccalon R. Tossicodipendenze e Servizi Sanitari. Medicina delle Tossicodipendenze 1995; 2: 64-69.
3. Ferrara SD. Reprimere, prevenire, riabilitare. L'esperienza padovana del Laboratorio di Tossicologia. Medicina delle Tossicodipendenze 1993; 1: 38-45.
4. Avico U, Macchia T, Dell'Utri A, Mancinelli R. et al. La determinazione delle droghe d'abuso. Ed. Clas International 1991; 39.
5. Cangiano G, Lombardi L, Landi G. Dosaggio degli oppiacei urinari: caratteristiche metodologiche e valutazione costo/beneficio di tecniche immunologiche in un Servizio Tossicodipendenze. Biologi Italiani 1995; 4: 47-50.
6. Cangiano G, Coppola A, D'Aniello MA, Lombardi L. Immunometria delle tossicodipendenze: caratteristiche metodologiche del dosaggio EMIT e suo utilizzo nelle terapie metadoniche [abstract]. Biochim Clin 1998; 396: G097.
7. Cangiano G, Coppola A, D'Aniello MA, Landi G et al. I dosaggi tossicologici per i Servizi Tossicodipendenze. Biologi Italiani 1998; 5: 28-34
8. Cangiano G, Ciafrone A, Coppola A, D'Aniello MA et al. The methadone's dosage and the urinary creatinine in the therapies of methadone [abstract]. Clin Chem 1999; 305: T352.
9. Baccini C, Zuccaro P, Pacifici R, Pistocchi E et al. Sostanze d'abuso. Trattato Italiano di Medicina di Laboratorio. Ediz. Piccin 1993; 2: 46-52.
10. Vital Scientific. Manuale di introduzione al Vitalab Selectra 2. Dokumentations Service GmbH 1996.
11. Cangiano G, Coppola A, D'Aniello MA, Lombardi L. Automazione in Tossicologia. Biologi Italiani 1997; 2: 21-24
12. Cangiano G. Lo stato dell'arte della Farmacotossicologia nei SERT in Campania. Atti del Convegno Dade Behring - Napoli 24 giugno 1999.
13. Besozzi M, Bianchi P, Giordano P. Labstat - manuale d'uso. Quaderni di laboratorio della S.I.Bio.C.. Ediz. Emmezeta 1989; 3: 30-37