

Metodologia KIMS: valutazione dei reagenti di I^a generazione per la misura di oppiacei e amfetamine e dei reagenti di II^a generazione per metadone, cocaina e cannabinoidi su analizzatore Hitachi 912

Lucio Marchioro, Silvia Ponchia, Mario Plebani

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova

ABSTRACT

KIMS methodology: evaluation of 1st generation reagents for the measurement of opiates and amphetamines and IInd generation reagents for methadone, cocaine and cannabinoids on the Hitachi 912 analyzer. We evaluated reagents of Ist and IInd generation for the determination of several drugs of abuse in urine samples, based on the KIMS technique (Kinetic Interaction of Microparticles in a Solution). All determinations were performed on the Roche Hitachi 912 analyzer. We evaluated the imprecision, the functional reproducibility and the limit of detection of all parameters. We also determined the performance of methadone assay in comparison with results obtained for the reagent previously used (1st generation). In summary, we obtained good results for all the new KIMS reagents, with excellent performance characteristics.

INTRODUZIONE

Sebbene l'andamento dell'abuso di sostanze illecite nella popolazione giovanile mostri una variazione rispetto al tipo di sostanza (aumento del consumo di cannabis e cocaina e diminuzione o stabilità per eroina e amfetamine), il fenomeno dell'abuso di sostanze a scopo voluttuario rimane molto rilevante. Per questo motivo la ricerca ed la determinazione delle sostanze illecite si sta confermando una attività molto importante per il laboratorio, sia in ambito clinico che forense. Numerose richieste provengono dai centri di trattamento e cura della popolazione tossicodipendente (Ser.T. o Servizi per le Tossicodipendenze), i quali richiedono la determinazione su campione di urina delle consuete droghe d'abuso: metadone, oppiacei, amfetamine, cocaina, cannabinoidi (THC), alcool e, talvolta, benzodiazepine.

I metodi utilizzati per la misura di queste sostanze possono essere classificati in qualitativi, semiquantitativi e quantitativi, comprendendo nel loro insieme sia analisi di primo che di secondo livello (analisi di conferma). Le aziende diagnostiche hanno messo a disposizione numerose metodiche di screening per le sostanze d'abuso, rappresentate per lo più da test immunochimici. Il pregio di queste tecniche risiede nell'elevata velocità e semplicità di esecuzione, solo in parte giustificata dalla mancanza di procedure di pretrattamento dei campioni. Queste tecniche sfruttano la reazione che avviene tra antigene (sostanza da individuare) e suo specifico anticorpo. Data la loro ampia applicazione in un laboratorio clinico (es. sui più recenti analizzatori ad elevata produttività), queste tecniche, che forniscono un indispensabile contributo nella gestione di pazienti tossicodipendenti, devono essere il più affidabili possibili, in modo da limita-

re il numero dei risultati falsi positivi o negativi che andrebbero ad influenzare l'utilizzo del dato ottenuto.

Le analisi di conferma vengono richieste per scopi amministrativi o medico-legali, come per la determinazione dei requisiti psico-fisici per il rilascio del porto d'armi (G.U. 304/1991) o per l'accertamento dello stato di ebbrezza o dell'assunzione di sostanze stupefacenti durante la guida (D.L. 285/1992). La metodica di conferma è comunemente rappresentata dalla gas-cromatografia associata alla spettrometria di massa (GC/MS).

Due fondamentali aspetti che caratterizzano i metodi di screening sono la scelta dei cut-off d'impiego e la specificità degli anticorpi utilizzati. Per cut-off si intende un determinato valore soglia che definisce l'esito delle analisi eseguite in termini di positivo o negativo. Il cut-off può essere soggetto a modifiche o revisioni, come è avvenuto in passato per gli oppiacei e i cannabinoidi (1).

Il completo possesso delle conoscenze del sistema (strumentazioni e reagenti) a disposizione si attua solo con l'effettuazione di adeguati protocolli di valutazione. In questa maniera si può soddisfare quanto raccomandato dal gruppo di lavoro di Esperti in Tossicologia dell'Unione Europea relativamente all'uso di metodi immunochimici per lo screening delle sostanze d'abuso (2, 3). A tal proposito abbiamo voluto valutare la metodologia KIMS ("Kinetic Interaction of Microparticles in a Solution") di I^a e II^a generazione (Roche Diagnostics) applicata su strumentazione Hitachi 912.

MATERIALI E METODI

Metodi

Per ciascun metodo (metadone, amfetamine, cocaina, cannabinoidi ed oppiacei) sono state eseguite le

seguenti prove: imprecisione nella e tra le serie, riproducibilità funzionale (o imprecisione al livello di cut-off) e verifica del limite di rivelabilità (LOD), rispetto a quanto dichiarato nelle note illustrative dei test (Tabella 1).

Solo per il metadone è stato eseguito un confronto con il metodo di I^a generazione (Abuscreen OnLine®, Roche Diagnostics) ed una verifica del carry-over.

Tutte le determinazioni sono state eseguite sullo strumento Hitachi 912 (Roche Diagnostics) con l'utilizzo di reagenti OnLine DAT II (Roche Diagnostics) di II^a generazione. La valutazione è stata allargata ai reagenti Abuscreen OnLine® (Roche Diagnostics) per la determinazione degli oppiacei e delle amfetamine (che non hanno subito alcuna modifica alla formulazione) secondo lo stesso schema descritto per le altre sostanze. Sono stati utilizzati calibratori DAT PLUS I (Roche Diagnostics) per metadone, amfetamine, cocaina e cannabinoidi, calibratori DAT II per oppiacei, 3 materiali di controllo Liquichek™ (Bio-Rad) S1 (low opiate), S2 (high opiate) e N (negative control).

La tecnologia KIMS si basa sull'interazione cinetica in soluzione tra gli anticorpi specifici anti-sostanza d'abuso e microparticelle coniugate con la droga, misurata come

variazione dell'estinzione della soluzione in esame rilevabile con misura spettrofotometrica a 505 nm (4).

Se la droga non è presente nel campione, l'anticorpo libero si lega alle microparticelle coniugate con la droga provocando la formazione di aggregati di particelle. In questo caso si verifica un aumento dell'assorbanza. Se invece il campione di urina contiene la droga in questione, tale sostanza compete per l'anticorpo libero con il derivato della droga legato alle microparticelle. L'anticorpo legato alla droga del campione, quindi, non è più a disposizione per provocare l'aggregazione e la formazione del reticolo di particelle è inibita. La presenza di droga nell'urina provoca così la diminuzione dell'assorbanza in proporzione alla sua concentrazione (5).

Campioni

L'imprecisione nella serie è stata valutata eseguendo 20 determinazioni consecutive di controllo basso (S1) e controllo alto (S2) nella stessa seduta analitica in 3 giorni diversi. L'imprecisione tra le serie è stata completata con gli stessi materiali di controllo, ma in sedute analitiche diverse (10 giorni lavorativi non consecutivi). La riproducibilità funzionale, o imprecisione al livello di cut-

Tabella 1

Prestazioni analitiche del metodo KIMS dichiarate dal produttore

METADONE II (cut-off 300 µg/L)	
Precisione nella serie (2 livelli: 225-375 µg/L) come CV:	1,3-2,1%
Precisione tra le serie (2 livelli: 225-375 µg/L) come CV:	2,5-2,8%
Limite di rivelabilità:	7,0 µg/L
COCAINA II (cut-off 300 µg/L)	
Precisione nella serie (2 livelli: 225-375 µg/L) come CV:	1,0-1,7%
Precisione tra le serie (2 livelli: 225-375 µg/L) come CV:	1,4-1,9%
Limite di rivelabilità:	8,0 µg/L
CANNABINOIDI II (cut-off 50 µg/L)	
Precisione nella serie (2 livelli: 37,5-62,5 µg/L) come CV:	3,9-4,0%
Precisione tra le serie (2 livelli: 37,5-62,5 µg/L) come CV:	4,1-4,8%
Limite di rivelabilità:	3,0 µg/L
AMFETAMINE (cut-off 1000 µg/L)	
Precisione nella serie (2 livelli: 750-1250 µg/L) come CV:	2,0-2,6%
Precisione tra le serie (2 livelli: 750-1250 µg/L) come CV:	2,3-3,5%
Limite di rivelabilità:	40 µg/L
OPPIACEI (cut-off 300 µg/L)	
Precisione nella serie (2 livelli: 225-375 µg/L) come CV:	1,3-3,1%
Precisione tra le serie (2 livelli: 225-375 µg/L) come CV:	2,5-6,0%
Limite di rivelabilità:	26 µg/L

off, è stata determinata eseguendo 20 replicati del metodo sul calibratore con concentrazione di analita pari al cut-off di ciascun metodo. Per i cannabinoidi è stata testata per tutti e 3 i cut-off proponibili per l'uso.

LOD è stato determinato eseguendo 20 replicati del metodo sul calibratore con concentrazione di droga d'abuso pari a 0 µg/L e stimato come media +3DS.

Per il metadone sono stati anche raccolti campioni urinari (50 positivi e 50 negativi) precedentemente analizzati e resi anonimi, utilizzati per il confronto con il metodo di I^a generazione ancora a disposizione al momento della sperimentazione. I campioni selezionati sono stati conservati a -20 °C e ridosati con il vecchio metodo prima di determinarli con il metodo di II^a generazione.

Il carry-over (campione-campione) è stato calcolato secondo Broughton et. (6), analizzando 3 successive aliquote di campione con un'elevata concentrazione di metadone (circa 130.000 µg/L) seguite da 3 successive aliquote con concentrazione di analita <100 µg/L (campione negativo), per dieci volte nella stessa seduta analitica.

Analisi statistica

La sensibilità e la specificità del test metadone, posto a confronto con il reagente della precedente generazione (qui considerato come riferimento), sono state calcolate secondo Kim et al. (7). Lo stesso per l'efficienza.

$$\text{Sensibilità} = \frac{VP}{VP + FN} * 100$$

$$\text{Specificità} = \frac{VN}{FP + VN} * 100$$

$$\text{Efficienza} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} * 100$$

(VP = Veri Positivi; VN = Veri Negativi; FP = Falsi Positivi; FN = Falsi Negativi)

Il carry-over è stato calcolato applicando la seguente formula:

$$K = \frac{l_1 - l_3}{h_3 - l_3}$$

dove K = carry-over ratio (l_1 = 1° valore basso; l_3 = 3° valore basso; h_3 = 3° valore alto), ed espresso con il valore medio K di 10 determinazioni (6). Il risultato ottenuto esprime la possibilità che possa intervenire un inquinamento campione-campione quando un campione elevato ed uno negativo sono esaminati in sequenza.

RISULTATI

Nella Tabella 2 sono riportati i risultati relativi ai reagenti per le droghe d'abuso prese in esame.

Per il metadone si sono inoltre rilevate sensibilità, specificità ed efficienza pari al 100%, quando i nuovi reagenti sono stati posti a confronto con quelli precedentemente in uso.

DISCUSSIONE

L'accertamento dello stato di tossicodipendenza assume un aspetto fondamentale e in questo contesto le procedure utilizzate devono essere il più rigorose possibile. A fronte di queste importanti esigenze, il laboratorio deve disporre di metodi di screening affidabili. Per test di screening si intendono quei test utilizzati al fine di analizzare in breve tempo un elevato numero di campioni in maniera efficace, standardizzata e completamente automatizzata, con il fine ultimo di garantire una corretta informazione clinica. Nella maggior parte dei casi essi si basano su tecniche immunochimiche e consentono, utilizzando una matrice facilmente disponibile quale è l'urina, il loro impiego senza alcuna preparazione del campione su strumentazioni automatiche e a costi ridotti. L'impiego della linea Abuscreen OnLine® (Roche Diagnostics), basata sulla tecnologia KIMS, presenta notevoli vantaggi, sia dal punto di vista analitico che pratico, consolidati con la recente introduzione dei reagenti di II^a generazione, che sono stati oggetto di questa valutazione, e dei quali possiamo trarre le seguenti conclusioni.

Metadone. Per questo metodo, le prove di imprecisione nella serie confermano i dati dichiarati dal produttore. L'imprecisione tra le serie, invece, indica un aumento (circa il doppio) dei CV ottenuti per entrambi i livelli di controllo. Anche LOD è risultato superiore a quanto dichiarato. La riproducibilità funzionale è risultata essere buona.

I campioni testati con questo reagente di II^a generazione hanno fornito risultati dal significato clinico perfettamente coerente con quello ottenuto con il reagente della generazione precedente.

Infine, il carry-over trovato indica che questo non influisce in modo significativo sul risultato di questa determinazione.

Cocaina. Le prove di imprecisione nella serie e tra le serie hanno fornito risultati peggiori rispetto a quanto dichiarato nelle note illustrative del test, così come LOD è risultato essere ben superiore a quanto dichiarato. La riproducibilità funzionale è risultata comunque ottima.

Cannabinoidi. Le prove di imprecisione hanno fornito risultati che ci permettono di esprimere un giudizio positivo nei riguardi del metodo. Il LOD ottenuto si è dimostrato superiore rispetto al valore atteso. Considerando i cut-off proponibili d'uso (100, 50 e 20 µg/L), le riproducibilità funzionali ottenute presentano CV che dimostrano prestazioni più che soddisfacenti del reagente.

Amfetamine. I risultati ottenuti relativi all'imprecisione sono leggermente più elevati, ma comunque buoni ai fini

dell'impiego del reagente. La riproducibilità funzionale è risultata essere buona.

Oppiacei. Per questa determinazione (come per le amfetamine) è stato valutato il reagente di 1ª generazione, tutt'ora in commercio. L'imprecisione nella serie con-

ferma le performance dichiarate del test. L'imprecisione tra le serie indica un aumento dei valori di CV ottenuti rispetto a quelli attesi. LOD è migliore rispetto al valore dichiarato. La riproducibilità funzionale è risultata essere buona.

Tabella 2

Risultati della valutazione

METADONE II			
Imprecisione nella serie	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	173,4	4,7	2,7
	513,8	11,9	2,3
Imprecisione tra le serie	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	167,5	8,7	5,2
	510,7	27,9	5,5
Riproducibilità funzionale	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	305,7	8,2	2,7
Limite di rivelabilità	14,3 $\mu\text{g/L}$		
Carry-over*	0,0049269		
COCAINA II			
Imprecisione nella serie	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	215,7	6,6	3,1
	368,9	7,8	2,1
Imprecisione tra le serie	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	215,5	8,7	4,0
	367,9	6,6	1,8
Riproducibilità funzionale	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	330,0	4,8	1,5
Limite di rivelabilità	38,6 $\mu\text{g/L}$		
CANNABINOIDI II			
Imprecisione nella serie	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	37,6	1,6	4,2
	59,7	2,1	3,5
Imprecisione tra le serie	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	35,7	2,0	5,7
	56,1	5,0	9,0
Riproducibilità funzionale	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	118,3	4,3	3,6
	56,3	2,2	4,0
	21,6	1,3	6,1
Limite di rivelabilità	7,6 $\mu\text{g/L}$		

continua

AMFETAMINE

Imprecisione nella serie	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	495,6	15,8	3,2
	1486,4	50,4	3,4
Imprecisione tra le serie	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	492,8	19,7	4,0
	1501,0	74,3	5,0
Riproducibilità funzionale	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	1018,2	26,3	2,6
Limite di rivelabilità	33,1 $\mu\text{g/L}$		

OPPIACEI

Imprecisione nella serie	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	150,9	5,0	3,3
	416,5	5,5	1,3
Imprecisione tra le serie	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	148,3	13,6	9,2
	407,3	15,9	3,9
Riproducibilità funzionale	media ($\mu\text{g/L}$)	DS	CV%
	317,4	12,5	3,9
Limite di rivelabilità	13,2 $\mu\text{g/L}$		

* *Pari a circa il 5 per mille.*

I dati da noi ottenuti ci permettono di esprimere un giudizio globalmente positivo nei riguardi del sistema costitutivo dei reagenti KIMS di I^a e II^a generazione applicati su strumentazione Hitachi 912. I reagenti presentano delle ottime caratteristiche, non solo per quanto riguarda la riproducibilità dei risultati, ma anche in termini di praticità operativa. I reagenti infatti sono tutti liquidi e pronti all'uso. Tutti i CV risultanti dalla valutazione sono inferiori al 10%, ben al di sotto di quanto previsto dalle linee guida della Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) e dell'Istituto Superiore della Sanità (8).

Per i metodi di screening non esiste il metodo ideale: CEDIA, EMIT, KIMS, biochips, ecc. presentano tutte buone proprietà applicative. Molto utili al riguardo possono essere gli studi comparativi che compaiono in letteratura, dove si possono riscontrare gradi di concordanza globale tra metodiche variabili dal 97-100% (EMIT II vs KIMS) (9) al 93-100% (CEDIA vs KIMS) (10). I risultati discrepanti generalmente incorrono in quei campioni dove la concentrazione di droga è prossima al livello di cut-off (10).

Ulteriori approfondimenti presenti in letteratura sono finalizzati allo studio delle interferenze, in gran parte determinate da contemporanea assunzione di farmaci (11). Per queste ragioni gli aspetti migliorativi di queste

metodiche dovrebbero anche riguardare il perfezionamento delle proprietà anticorpali dei reagenti.

Alla luce dei risultati ottenuti, il ruolo dei metodi di screening andrebbe in generale rivalutato, senza naturalmente aver la pretesa di toglierli dalla loro corretta collocazione. Un esempio di questa rivalutazione potrebbe essere l'appellativo di metodo quantitativo, considerato entro i limiti dettati dalla curva di calibrazione, come del resto già accade per la determinazione dei farmaci a scopo terapeutico.

BIBLIOGRAFIA

1. Luzzi V, Saunders Al N, Koenig JW, et al. Analytic performance of immunoassays for drugs of abuse below established cutoff values. *Clin Chem* 2004;50:717-22.
2. De la Torre R, Segura J, De Zeeuw R, Williams J. Recommendations for the reliable detection of illicit drugs in urine in the European Union, with special attention to the workplace. *Ann Clin Biochem* 1997;34:339-44.
3. Ferrara SD, Tedeschi L, Brusini G. Documento europeo sull'analisi delle droghe d'abuso. *Biochim Clin* 1997;21:483-90.
4. Adler FL, Liu CT. Detection of morphine by hemagglutination-inhibition. *J Immunol* 197;106:1684-5.
5. Rouse S, Motter K, McNally A, et al. An Abuscreen OnLine immunoassay for the detection of amphetamine in urine on the COBAS MIRA automated analyzer. *Clin*

- Chem 1991;37:995.
6. Broughton PMG, Gowenlock AH, McCormack JJ, Neill DW. A revised scheme for the evaluation of automatic instruments for use in clinical chemistry. *Ann Clin Biochem* 1974;11:207-18.
 7. Kim I, Barnes AJ, Schepers R, et al. Sensitivity and specificity of the Cozart microplate EIA cocaine oral fluid at proposed screening and confirmation cutoffs. *Clin Chem* 2003;49:1498-503.
 8. Zuccaro P, Pichini S, Altieri I, Pacifici R. Proposte di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici. *Rapporti ISTISAN*. 1996. 96/29.
 9. Schwettmann L, Kulpmann WR, Vidal C. Drug screening in urine by cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA) and kinetic interaction of microparticles in solution (KIMS): a comparative study. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:479-87.
 10. Lu NT, Taylor BG. Drug screening and confirmation by GC-MS: comparison of EMIT II and Online KIMS against 10 drugs between US and England laboratories. *Forensic Sci Int* 2006;157:106-16.
 11. De Giovanni N, Fucci N. Hypothesis on interferences in kinetic interaction of microparticles in solution (KIMS) technology. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:894-7.