

## Biochips e droghe d'abuso: valutazione del sistema Evidence in confronto con la metodologia KIMS

Lucio Marchioro<sup>1</sup>, Angela Trombin<sup>1</sup>, Franca Castagna<sup>2</sup>, Sergio Maietti<sup>2</sup>, Mario Plebani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova

<sup>2</sup>U.O. di Tossicologia Forense e Antidoping, Università degli Studi di Padova

### ABSTRACT

**Biochips and drugs of abuse: evaluation of the Evidence system and comparison with KIMS methodology.** We evaluated the analytical and diagnostic performances of a multiparameter technique (Evidence®). This is a new generation automatic analyser that employs biochips technology to determine drugs of abuse in urine samples. As comparison method, we used KIMS technology. The Evidence Drugs of Abuse assay panel is measured with an indirect chemiluminescent competitive immunoassay. DTRs (Discrete Test Regions) are generated on the biochip surface, where specific antibodies bind some substances of abuse: amphetamines, cocaine, barbiturates, cannabinoids, opiate, methadone, phencyclidine and benzodiazepines. A total of 322 urine samples were compared with the two technologies. 15 samples with significant differences between the two evaluated methods were assayed using the gas chromatography/mass spectrometry technique (GC-MS). The obtained results show a good analytical performance of Evidence that was found easy to use and very useful for laboratories with a medium-high workload.

### INTRODUZIONE

Vi è sempre maggior evidenza dell'importanza di pannelli diagnostici appropriati per dare risposte alle esigenze cliniche in particolari settori quali l'endocrinologia, la tossicologia e la medicina legale e gli screening allergenici e trasfusionali, nei quali un unico esame non è spesso in grado di risolvere il quesito clinico (1, 2).

Lo sviluppo di dosaggi a "microspot" miniaturizzati e multiparametrici risale alla fine degli anni '80 (3-6) ed ha condotto, all'inizio degli anni '90, alla realizzazione di una nuova tecnologia di dosaggi su "microarrays" ultrasensibili ad anticorpi ed oligonucleotidi (2). Tuttavia, le complessità riscontrate nella costruzione degli "arrays" (attribuite alla suscettibilità dei ligandi alla denaturazione) e altre difficoltà legate alla superficie chimica, al legame dell'anticorpo, alla marcatura, alla rilevazione e stabilizzazione hanno rallentato per molti anni l'impiego e la commercializzazione di tale prodotto (1).

Sono oggi disponibili analizzatori completamente automatizzati che sfruttano la tecnologia del "biochip". Questo può essere costituito da un supporto solido di 9 mm<sup>2</sup> contenente un "array" con zone discrete di reazione (microspot) ordinatamente disposte su una superficie preattivata, ognuna delle quali è indirizzata verso un particolare analita. Il biochip multiparametrico o "protein chip" è diventato una realtà anche tra i metodi di screening per la determinazione di sostanze illecite e droghe d'abuso (2).

Scopo del presente lavoro è stata la valutazione delle prestazioni dello strumento Evidence (Randox) per la misura di sostanze d'abuso. Questo analizzatore di recente introduzione utilizza il principio del "biochip multitest", grazie al quale è possibile effettuare la rilevazione

quantitativa simultanea di un'ampia gamma di analiti proteici e non proteici in un formato multi-analitico. La sperimentazione ha riguardato sia la valutazione delle caratteristiche tecniche dell'analizzatore, sia la valutazione delle performance analitiche dei reagenti impiegati, in confronto con metodi validati ed utilizzati nella pratica clinica.

### MATERIALI E METODI

#### Metodo Evidence

La tecnologia "Biochip Array" Evidence (Randox) esegue immunodosaggi convenzionali per la rilevazione quantitativa di specifici e simultanei profili di marcatori biologici. Per quanto riguarda il pannello sostanze d'abuso (Drugs of Abuse Assay Panel Evidence) il sistema è in grado di identificare sostanze quali amfetamine, cocaina, barbiturici, cannabinoidi, oppiacei, metadone, fenciclidina (PCP), benzodiazepine (oxazepam e lorazepam) eventualmente presenti in campioni di urina, fornendo una misura in chemiluminescenza semi-quantitativa finalizzata solamente ad un uso clinico-diagnostico.

La metodologia "Biochip assay" si basa su tecniche consolidate per immunodosaggi. Il biochip rappresenta il principale componente del sistema: esso è costituito da una superficie solida di 9 mm<sup>2</sup> nella quale vengono generate attraverso metodologie nanotecnologiche di dispersione delle regioni discrete a disposizione predefinita (DTRs = discrete test regions) sulla superficie del biochip. Ciascuna DTR rappresenta la zona di legame di differenti anticorpi (o altre specie reattive) specifiche per il legame con determinati analiti in esame. I dosaggi possono essere in formato competitivo o sandwich (o in caso

di allergeni in formato a cattura degli anticorpi) a seconda del peso molecolare e dalla natura dell'analita di interesse.

Il pannello sostanze d'abuso si basa su una metodica di immunodosaggio competitivo in chemiluminescenza indiretta (Figura 1). Anticorpi specifici vengono legati nelle DTR sulla superficie del biochip e, successivamente, viene aggiunto un derivato dell'analita marcato con un enzima (perossidasi di rafano, HRP). Se la droga non è presente nel campione, l'analita marcato si lega ai siti anticorpali sulla superficie del biochip e, in seguito all'aggiunta del reagente di segnale, l'intensità luminosa sarà proporzionale alla concentrazione dell'analita marcato che si è legato. Quando la droga è presente nel campione di urina in esame, l'intensità luminosa del segnale prodotto è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita presente, a causa della competizione per i siti di legame anticorpali liberi tra l'analita e il derivato marcato con l'enzima coniugato.

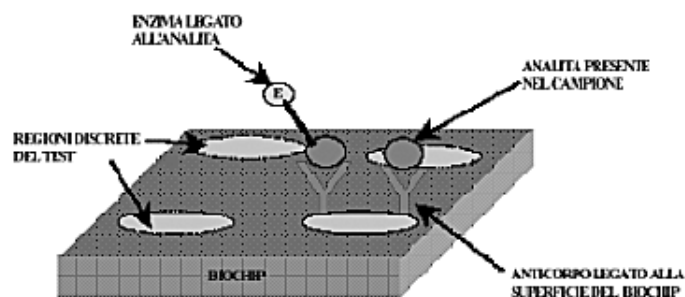
Il reagente di segnale utilizzato dal sistema Evidence deriva dall'unione di una soluzione mista di "luminol/enhancer solution" e di una soluzione di HRP in rapporto 1:1. Il meccanismo di reazione della chemiluminescenza è basato su reazioni di riduzione-ossidazione tra substrati chemiluminescenti "attivati" e HRP, con

conseguente formazione di composti intermedi a radicali liberi ed emissione del segnale luminoso. L'emissione del segnale luminoso della reazione chemiluminescente che avviene nelle DTR sulla superficie del biochip viene rilevata e quantificata attraverso un dispositivo ad accoppiamento di carica (charge coupled device (CCD) camera). La CCD camera registra simultaneamente la luce emessa da tutte le DTR di ognuno dei 9 biochips contenuti in un carrier. Un software d'immagine è infine utilizzato per quantificare e validare il segnale.

I risultati ottenuti sono espressi in termini di negatività o positività rispetto a valori di cut-off predefiniti (Tabella 1).

### Strumentazione Evidence

Lo strumento Evidence è un analizzatore che permette un continuo caricamento dei campioni, grazie alla presenza di 2 caroselli portacampioni, ciascuno dei quali dotato di un lettore barcode per una rapida identificazione dei campioni in esame. In ogni carosello, facilmente removibile anche durante il funzionamento dell'analizzatore, è possibile caricare fino ad un massimo di 90 campioni. Lo strumento accetta sia tubi primari da 12 o 16 mm sia coppette di trasferimento.



**Figura 1**

Biochip ad immunodosaggio competitivo.

**Tabella 1**

Valori di cut-off delle sostanze analizzate con sistema Evidence

Sostanza	Cut-off ( $\mu\text{g/L}$ )
Amfetamine (AMPH)	1000
Cocaina (BZG)	300
Barbiturici (BARB)	200
Cannabinoidi (THC)	50
Metadone	300
Benzodiazepina (Benzo)	200
Fenciclidina (PCP)	25
Lorazepam (Loraz)	200
Oppiacei (Opiat)	300

L'analizzatore utilizza volumi di reazione che vanno da 7 a 100  $\mu\text{L}$ , in relazione allo specifico pannello analitico impostato. Lo strumento è dotato di siringhe ("probe arms") per i campioni e per i reagenti, incorporate in un sistema di lavaggio.

Ogni biochip rappresenta un campione di un paziente con uno specifico pannello di risultati (per ciascun biochip può essere richiesto da un minimo di 7 fino ad un massimo di 11 esami). Questi vengono inseriti nello strumento con una modalità molto semplice rappresentata da "multi-chip carriers", supporti quadrati contenenti 9 biochip ciascuno, che servono a veicolare i biochips, in modo completamente automatizzato, nelle diverse stazioni di operazione all'interno dello strumento. I "carriers" vengono forniti completi di biochip in pacchi da 10 (per un totale di 90 biochip) all'interno di "cassette" dotate di

barcode, che vengono caricate all'interno dello strumento nell'apposita torre di caricamento. Tale compartimento è in grado di conservare 4 cassette alla volta, per un totale di 360 biochips.

Lo strumento è inoltre dotato di un compartimento refrigerato in grado di alloggiare i substrati chemiluminescenti (HRP + luminol) e reagenti, anch'essi dotati di barcode.

### Metodologia KIMS

La metodologia per la determinazione delle sostanze d'abuso KIMS (Kinetic Interaction of Microparticles in a Solution) 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 (7).

Tutte le determinazioni sono state eseguite sullo strumento Hitachi 912 con l'utilizzo di reagenti Abuscreen OnLine (Roche Diagnostics), di calibratori Preciset DAT I e Preciset DAT II (Roche Diagnostics) e di 3 materiali di controllo Liquicheck™ (Bio-Rad): S1 (low opiate), S2 (high opiate) e N (negative control).

### Gas cromatografia-Spettrometria di massa

*Determinazione di oppiacei e cocaina.* La gas-cromatografia (GS), in particolare se associata alla spettrometria di massa (MS), rimane la tecnica raccomandata per l'analisi di conferma delle sostanze d'abuso (8-14). In particolare, la determinazione di oppiacei e cocaina prevede una preliminare estrazione liquido-liquido o una estrazione SPE ("solid phase extraction"), tecnica che permette di ottenere estratti particolarmente puliti ed evita la formazione di emulsioni, che molto spesso si verifica con l'estrazione liquido-liquido.

Il metodo utilizzato impiega, per la preliminare estra-

zione, una colonna SPE (Bond Elut Certify, Varian) secondo quanto raccomandato in letteratura (15-17). Alla fase di estrazione segue una fase di derivatizzazione finale con BSTFA (*N*, *O*-bis (Trimethylsilyl)trifluoroacetamide) 1%, la quale permette una ottimale determinazione degli analiti (la cocaina non subisce alcuna reazione di derivatizzazione).

L'uso di standard interni deuterati consente di ottenere risultati quantitativi.

L'analisi GC-MS è stata condotta con gas-cromatografo Hewlett-Packard 5890 interfacciato con un rilevatore HP 5971/A MSD MS ed equipaggiato con un 7673A Hewlett-Packard "autosampler". La colonna GC utilizzata era una HP-Ultra1 100% methylsilicone (12m x 0,2mm ID x 0,33mm film thickness), mentre il gas di trasporto utilizzato era elio ad un flusso di 0,5 mL/min (velocità lineare: 40,5 cm/s). La quantità di campione iniettata è di 1 µL in modalità "splitless" (0,75 min).

Il programma di temperatura adottato è il seguente: 50 °C (1 min), 35 °C/min → 200 °C, 15 °C/min → 290 °C (2 min). La temperatura della sorgente è di 280 °C e quella dell'iniettore di 250 °C (Figura 2).

*Determinazione di amfetamine.* Il metodo prevede l'estrazione degli analiti con tecnica SPE (15, 17). Importante risulta l'aggiunta di una miscela di metanolo-acido cloridrico alle provette di raccolta per limitare le perdite di amfetamine nella forma base che risultano particolarmente volatili. La fase di derivatizzazione finale viene realizzata con una miscela di etile acetato e anidride trifluoroacetica (4:1). Il residuo infine va portato a secco in corrente d'azoto a bassa temperatura e ripreso con 100 µL di etile acetato.

I trifluorocromi derivati permettono una buona separazione degli analiti considerati. La procedura estrattiva ha buoni recuperi anche per altri amfetaminici quali ad esempio MBDB (N-metil-3,4-metilendiosifenil-2-butamina).

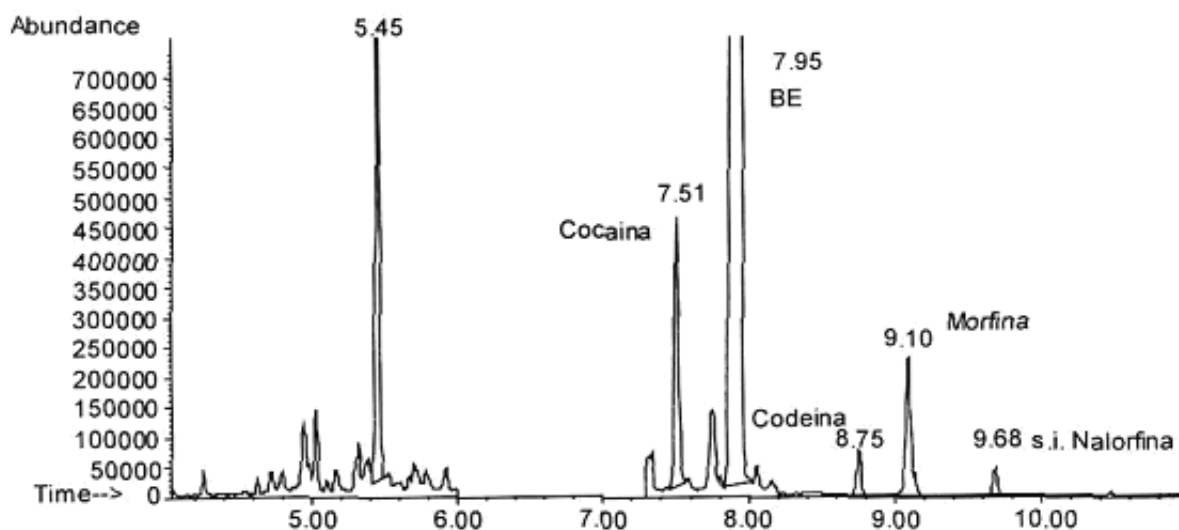


Figura 2

Tracciato GC-MS di campione di urina positivo per cocaina, benzoilecgonina (BE) e oppiacei (morfina e codeina).

L'analisi GC-MS è stata condotta con la strumentazione precedentemente descritta. In tale determinazione la quantità di campione iniettato è pari a 1 µL in modalità "splitless" (0,50 min).

Il programma di temperatura adottato è il seguente: 50 °C (0,50 min), 15 °C/min → 220 °C, 40 °C/min → 290 °C. La temperatura della sorgente è sempre di 280 °C mentre quella dell'iniettore è di 225 °C (Figura 3).

**Determinazione di cannabinoidi.** Nell'urina il principale metabolita è il 11-nor-9-carbossi-tetraidrocannabinolo (THC-COOH), sia nella forma libera che coniugata con acido glucuronico (18). Il metodo adottato prevede una idrolisi alcalina preliminare (per liberare THC-COOH glucuronico) ed una estrazione liquido-liquido, condotta in ambiente moderatamente acido. La derivatizzazione finale viene realizzata con BSTFA 1% TMCS (Trimethylchlorolisane). In particolare, 2 mL di urina (standard interno THC-COOH-d<sub>3</sub>) a cui sono stati aggiunti 200 µL di KOH 10 M, vengono idrolizzati in stufa a 60 °C per 20 min. Dopo l'idrolisi il pH della soluzione viene riportato a 4,5 con acido acetico glaciale. Alla soluzione si aggiungono 2 mL di acido fosforico 0,05 M. Si conducono successivamente due estrazioni con una miscela esano: etilacetato (80:20) con 0,4% di acido acetico glaciale. La fase organica si porta a secco in corrente di azoto e si derivatizza il residuo con 40 µL di BSTFA 1% TMCS a 90 °C per 15 min.

L'analisi strumentale eseguita con GC-MS in modalità SIM ("Single Ion Monitoring") completa la determinazione. In tale determinazione il gas di trasporto utilizzato è elio ad un flusso di 0,8 mL/min (velocità lineare: 52,0 cm/s). La quantità di campione iniettato è pari a 1 µL in modalità "splitless" (1,00 min).

Il programma di temperatura adottato è il seguente: 80 °C (1 min), 25 °C/min → 300 °C (2 min). La temperatura della sorgente è sempre di 280 °C mentre quella dell'iniettore di 270 °C.

### Casistica clinica

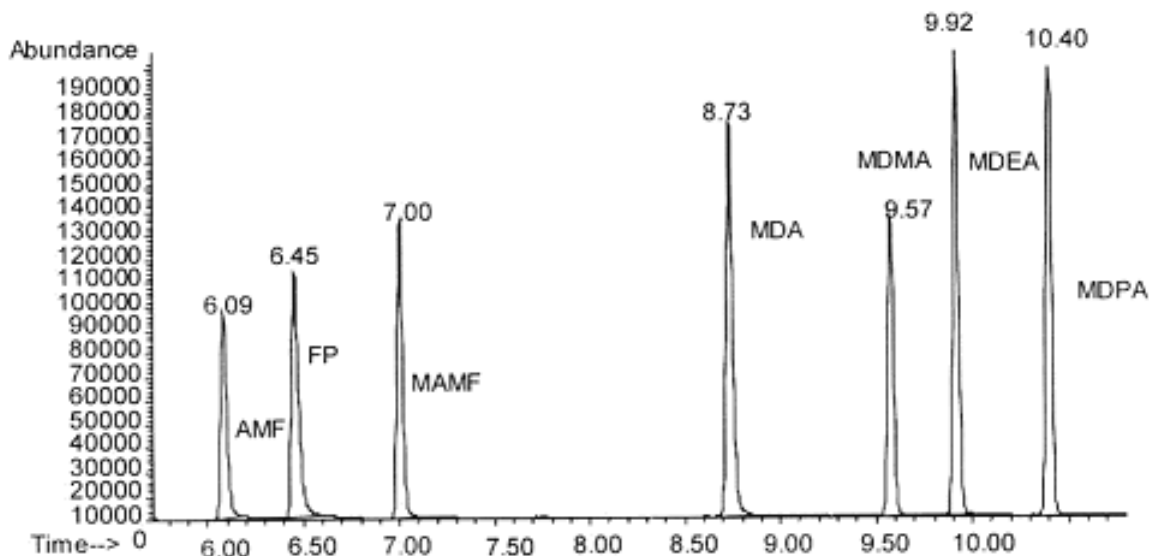
Sono stati selezionati un totale di 322 campioni di urina raccolti presso il Servizio delle Tossicodipendenze (Ser.T.) di Padova e pervenuti presso il Servizio Medicina di Laboratorio per la determinazione di sostanze d'abuso. Di questi, 100 campioni erano negativi per tutte le sostanze testate e 222 campioni erano positivi per le seguenti sostanze: metadone, oppiacei, cannabinoidi, cocaina, amfetamine e 3,4-metilendioossimetamfetamina (MDMA).

Tutti i campioni resi anonimi, dopo essere stati processati sull'analizzatore Hitachi 912 mediante metodologia KIMS, sono stati conservati a -20 °C per le successive analisi. Per eliminare dubbi riguardanti l'effetto del congelamento, al momento del loro riutilizzo, i campioni sono stati ridosati con metodologia KIMS e immediatamente dopo sottoposti ad analisi attraverso l'analizzatore Evidence.

Una volta completata la sperimentazione, 15 campioni risultati discordanti con le due diverse metodologie dal punto di vista del significato clinico del risultato sono stati inviati presso la Unità Operativa di Tossicologia Forense e Antidoping dell'Istituto di Medicina Legale dell'Università di Padova per l'effettuazione di analisi di conferma mediante GC-MS (Tabella 2).

### Prove di imprecisione

Le prove di imprecisione nella e tra la serie sullo strumento Evidence sono state condotte secondo le indicazioni del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (19). Successivamente alla loro ricostituzione, Drugs of Abuse Control 1 (C1) e Drugs of Abuse Control 2 (C2) (Lot n° 0716, 1115EV e 1116EV) sono stati suddivisi in 17 aliquote da 1 mL e congelati a -20 °C. Ogni mattina, alla stessa ora, una volta scongelata, è stata analizzata un' aliquota di C1 e una di C2 su Evidence (18



**Figura 3**

Tracciato GC-MS relativo alla miscela standard di amfetamine su urina.

AMF, amfetamina; FP, fenilpropanolamina; MAMF, metamfetamina; MDA, 3,4-metilendioossiamfetamina; MDMA, 3,4-metilendioossimetamfetamina; MDEA, 3,4-metilendioossietilamfetamina; MDPA, 3,4-metilendioossipropilamfetamina.

**Tabella 2**

Numero totale dei risultati positivi al metodo KIMS e numero di risultati discordanti tra metodo KIMS ed Evidence per classe di sostanza analizzate

Sostanza	Risultati positivi (tot campioni = 222)	Risultati discordanti
Metadone	191	0 (0%)
Oppiacei	129	7 (5,4%)
Cocaina	117	1 (0,8%)
Cannabinoidi	79	3 (3,8%)
Amfetamine e MDMA	24	4 (16,6%)

replicati per ogni sostanza indagata). La prova di imprecisione è stata condotta per 16 giorni lavorativi consecutivi.

### Verifica esterna di qualità (VEQ)

Durante la sperimentazione sono stati sottoposti a valutazione 3 campioni della VEQ UK NEQAS (n° 202-203-204) per le seguenti sostanze: metadone, oppiacei, cocaina, cannabinoidi, amfetamine e creatinina. Le analisi sono state condotte sia con metodologia Evidence che KIMS.

### RISULTATI

100 campioni di urina esaminati con il metodo KIMS e risultati negativi per tutte le sostanze indagate (metadone, oppiacei, cocaina, cannabinoidi ed amfetamine) sono stati analizzati con la metodica in valutazione (Evidence). Nessuno dei campioni ha fornito risultati discordanti.

La Tabella 2 riassume i campioni risultati positivi con il metodo KIMS. Gli stessi campioni sono stati poi analizzati con il sistema Evidence. La concordanza è risultata del 97,3% con 15 risultati discordanti (2,7%). In particolare, per gli oppiacei 3 campioni sono risultati positivi per metodo KIMS e negativi per Evidence e 4 campioni sono invece risultati negativi per KIMS e positivi per Evidence. Per la cocaina, un solo risultato è risultato discordante. Tale campione è risultato negativo per KIMS e positivo per Evidence. Per i cannabinoidi si sono ottenuti 3 risultati discordanti sul totale di campioni analizzati. I 3 campioni sono risultati negativi per KIMS e positivi per Evidence. Per amfetamine e MDMA tutti i campioni discordanti sono risultati positivi per KIMS e negativi per Evidence.

I 15 campioni risultati discordanti sono stati sottoposti a GC-MS. Nella Tabella 3 viene descritto quanto ottenuto per le diverse classi di sostanze.

Nella Tabella 4 sono riassunti i risultati relativi ai CV ottenuti per le singole sostanze oggetto della sperimentazione.

In seguito all'analisi dei 3 campioni di urina della VEQ UK NEQAS con entrambi gli strumenti Hitachi 912 ed Evidence non sono stati riscontrati falsi-positivi o falsi-negativi per tutte le sostanze sottoposte alla verifica di qualità. Nella Tabella 5 sono riportati i risultati relativi

alla creatinina urinaria ottenuti con le due strumentazioni sui campioni della VEQ. I risultati sono riportati come percentuale di scostamento calcolata rispetto alla media di consenso del rispettivo gruppo.

Durante la sperimentazione è stato eseguito anche un confronto tra la produttività (esami eseguiti/ora) dello strumento in uso presso il nostro laboratorio (Hitachi 912) e quella di Evidence. Effettuando varie serie di determinazioni in condizioni ideali, per Hitachi 912 abbiamo ottenuto una produttività media di 240 test/h. Per Evidence è stata riscontrata una produttività variabile da 101 a 156 test/h (con 6 test selezionati per campione) fino ad una produttività da 186 a 293 test/h (con 11 test selezionati). Per quest'ultimo sistema, qualsiasi sia il numero di esami richiesto (da un minimo di 1 fino ad un massimo di 11) i primi risultati sono disponibili dopo 65 min, con produzioni successive di 5 min, a differenza del Hitachi 912 dove la disponibilità dei primi risultati si ha dopo 14 min dall'inizio delle misure.

### DISCUSSIONE

La miniaturizzazione di processi analitici e bioanalitici è diventata un'importante area di ricerca e sviluppo durante gli ultimi 10 anni, in linea con la tendenza generale rivolta alla riduzione delle dimensioni degli analizzatori in uso presso i laboratori clinici (20-22). Notevoli benefici sono identificabili nel processo di miniaturizzazione: una significativa riduzione dei costi di fabbricazione, semplicità nei trasporti e spedizione, diminuzione degli spazi richiesti in un laboratorio (23). In aggiunta, un sistema microminiaturizzato risulta più semplice da manipolare, riduce la richiesta energetica ed il consumo di reagenti, offre la possibilità di eseguire esami ad alta densità (permette cioè l'esecuzione di un elevato numero di esami concentrato in un supporto di piccole dimensioni) oltre che la possibilità di integrare step individuali all'interno di un processo analitico multistep (22).

L'ultimo traguardo raggiunto dal processo di miniaturizzazione è rappresentato dalla tecnologia "microarray" su microchip. Questa tecnologia rappresenta uno dei settori in rapida crescita nelle scienze analitiche (24) e permette la misurazione simultanea con elevate produttività di analiti multipli, attraverso l'uso di supporti solidi porosi e non porosi combinati con un sistema di rilevazione a fluorescenza (25,26). Tale sistema offre inoltre la possibilità di miniaturizzare i vari procedimenti della

determinazione e la riduzione dei volumi dei campioni e dei reagenti. Gli immunodosaggi a biochip promettono, quindi, una rivoluzione sia in campo diagnostico e clinico, sia in campo tossicologico, situazioni in cui è spesso necessaria la rilevazione simultanea di analiti multipli (27,28). Per citare solo alcuni recenti esempi: in micobat-

teriologia per l'identificazione di micobatteri e studio delle resistenze agli antibiotici (29), studio di anomalie cromosomiche, diagnosi genetiche di cardiomiopatia ipertrofica e di altre malattie cardiovascolari, tecnologia "microarrays" applicata allo studio di mutazioni e di polimorfismi del DNA (30).

**Tabella 3**

*Dati di conferma in GC-MS relativi ai risultati discordanti ottenuti con metodi KIMS ed Evidence*

Sostanza	N° campione	KIMS	Evidence	GC-MS	Sostanza identificata
Oppiacei	1				
	2	POS	neg	neg	–
	3	POS	neg	neg	–
	4	neg	POS	POS	Morfina libera, 6-AM
	5	neg	POS	POS	Morfina libera, 6-AM
	6	neg	POS	POS	Morfina libera, 6-AM
	7	neg (233 µg/L)	POS	POS	Morfina libera
Cocaina	1	neg (290 µg/L)	POS	POS	Cocaina
Cannabinoidi	1	neg (46 µg/L)	POS	POS	THC-COOH
	2	neg (46 µg/L)	POS	POS	THC-COOH
	3	neg (45 µg/L)	POS	POS	THC-COOH
MDMA	1	POS	neg	neg	–
	2	POS	neg	neg	–
	3	POS	neg	neg	–
	4	POS	neg	POS	Amfetamina, MDA, MDMA

GC-MS, Gas cromatografia-spettrometria di massa; POS, Positivo; neg, Negativo; 6-AM, 6-acetilmorfina; THC-COOH, 11-nor-9-carbossi-tetraidrocannabinolo; MDMA, 3,4-metilendiossimetamfetamina; MDA, 3,4-metilendiossiamfetamina; MDEA, 3,4-metilendiossietilamfetamina

**Tabella 4**

*Risultati relativi alle prove di imprecisione*

Sostanza	Livello (media, µg/L)	CV nella serie (%)	CV tra le serie (%)
Metadone	Liv. 1 (225)	3,9	5,1
	Liv. 2 (375)	4,1	4,3
Oppiacei	Liv. 1 (225)	3,7	4,1
	Liv. 2 (375)	4,3	4,8
Cocaina	Liv. 1 (225)	4,3	6,3
	Liv. 2 (375)	5,5	7,1
Cannabinoidi	Liv. 1 (37,5)	4,4	4,6
	Liv. 2 (62,5)	4,1	4,7
Amfetamine	Liv. 1 (750)	11,5	11,8
	Liv. 2 (1250)	11,5	12,0

**Tabella 5**

*Risultati relativi alla creatinina urinaria ottenuti con le due metodologie valutate sui campioni della VEQ UK-NEQAS. I risultati di scostamento riportati sono stati calcolati rispetto alla media di consenso del rispettivo gruppo di metodo così come elaborata dall'organizzatore*

Campione	Scostamento	
	Hitachi 912	Evidence
UK NEQAS 202	+ 6%	+ 44%
UK NEQAS 203	+ 7%	+ 29%
UK NEQAS 204	+ 7%	+ 22%

Anche in campo tossicologico, il biochip multiparametrico rappresenta il punto di arrivo nell'evoluzione dei metodi di screening per la misura di sostanze d'abuso. Il "protein chip" può essere applicato per la rilevazione di un'ampia gamma di sostanze, inclusi stimolanti, narcotici, agenti anabolizzanti ed ormoni peptidici. In linea di principio, praticamente tutte le sostanze proibite possono essere testate con questa tecnologia. Il sistema di profilo clinico Evidence rappresenta il principale esempio di sistema commerciale a "protein chip" di analisi multiparametrica inteso per applicazioni diagnostiche cliniche (2).

Come evidente dai risultati ottenuti, la produttività rispetto ai consueti analizzatori di biochimica clinica sembra posizionare Evidence in un piano inferiore. Evidence può ritenersi uno strumento utile per la diagnostica, pur mancando delle caratteristiche tecnologiche necessarie per eseguire analisi in regime di urgenza. Esso si presta a supportare grandi carichi di lavoro, risultando maggiormente idoneo a laboratori di dimensione medio-grandi.

In termini di prestazioni analitiche, il risultato dell'applicazione della misura di droghe d'abuso su "microarray" è sicuramente positivo, sia dal punto di vista della precisione che dell'esattezza. Nel confronto con GC-MS si è ottenuto un'ottima prestazione in quanto i risultati ottenuti con GC-MS per i 15 campioni discordanti hanno confermato quelli di Evidence in una percentuale di casi maggiore di quella dei dati ottenuti con KIMS. In ogni caso il confronto tra Evidence ed il sistema in uso presso il nostro laboratorio ha portato ad una coerenza clinica dei risultati pari al 100% per i campioni negativi e del 97,3% per i campioni risultati positivi per le sostanze oggetto dello studio.

In relazione alle prove di imprecisione condotte sulla strumentazione Evidence, queste hanno fornito risultati più che soddisfacenti. Per ciascuna delle classi di sostanze testate si sono ottenuti CV inferiori a 10%, ad eccezione delle amfetamine per le quali si sono ottenuti CV più elevati, ma ancora in conformità con quanto proposto dalle linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità ("la precisione (CV) intorno al valore medio non dovrebbe eccedere il 15%") (31).

In sintesi, nella problematica delle droghe d'abuso la tecnologia su microchip può avere una concreta possibilità di sviluppo, in particolar modo in quei Servizi di Medicina di Laboratorio dove la complessità dei campioni e degli esami da eseguire risulta elevata, non solo da un punto di vista numerico, ma anche sotto l'aspetto clinico-diagnostico.

## REFERENCES

1. Fitzgerald SP, Lamont JV, McConnel RI, Benchikh E. Development of a high-throughput automated analyser using biochip array technology. *Clin Chem* 2005;51:1165-76.
2. Du H, Wu M, Yang W, et al. Development of miniaturized competitive immunoassay on a protein chip as a screening tool for drugs. *Clin Chem* 2005;51:368-75.
3. Ekins RP. Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clin Chem* 1998;44:2015-30.
4. Ekins RP, Chu F, Biggart E. Multispot, multianalyte immunoassay. *Ann Biol Clin* 1990;48:655-66.
5. Ekins RP, Chu FW. Multianalyte microspot immunoassay-microanalytical "compact disk" of the future. *Clin Chem* 1991;37:1955-67.
6. Ekins RP, Chu FW. Microspot®, array-based, multianalyte binding assays: the ultimate microanalytical technology? In: Price CP, Newman DJ, eds. *Principles and practice of immunoassay*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Stockton. 1997:625-46.
7. Marchioro L, Ponchia S, Plebani M. Metodologia KIMS: valutazione dei reagenti di I<sup>a</sup> generazione per la misura di oppiacei e amfetamine e dei reagenti di II<sup>a</sup> generazione per metadone, cocaina e cannabinoidi su analizzatore Hitachi 912. *Biochim Clin* 2007;31:191-6.
8. Weinmann W, Renz M, Vogt S, Pollak S. Automated solid-phase extraction and two-step derivatisation for simultaneous analysis of basic illicit drugs in serum by GC/MS. *Int J Leg Med* 2000;113:229-35.
9. Cheung S, Nolte H, Otton SV, et al. Simultaneous gas chromatographic determination of methamphetamine, amphetamine and their p-hydroxylated metabolism in plasma and urine. *J Chromatogr B* 1997;690:77-87.
10. Van Thuyne W, Van Eenoo P, Delbeke FT. Urinary concentrations of morphine after the administration of herbal teas containing *Papaveris fructus* in relation to doping analysis. *J Chromatogr B* 2003;785:245-51.
11. Meatherall R. GC/MS confirmation of codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and oxymorphone in urine. *J Anal Toxicol* 1999;23:177-86.
12. Meadway C, George S, Braitwaite R. A rapid GC/MS method for the determination of dihydrocodeine, codeine, norcodeine, morphine, normorphine and 6-MAM in urine. *Forensic Sci Int* 2002;127:136-41.
13. Ceder G, Jones AW. Concentrations of unconjugated morphine, codeine and 6-acetylmorphine in urine specimens from suspected drugged drivers. *J Forensic Sci* 2002;47:366-8.
14. Yonamine M, Silva OA. Confirmation of cocaine exposure by gas chromatography-mass spectrometry of urine extracts after methylation of benzoylecgonine. *J Chromatogr B* 2002;773:83-7.
15. Hawks RL, Chiang CN. NIDA Research Monograph 73: Urine testing for drugs of abuse. Maryland: US Dept. of Health and Human Services. 1986.
16. United Nations International Drug Control Programme. Recommended methods for the detection and assay of heroin and cannabinoids in biological specimens. New York: United Nations. 1993.
17. United Nations International Drug Control Programme. Recommended methods for the detection and assay of cocaine, amphetamine, methamphetamine, and ring-substituted amphetamine derivatives in biological specimens. New York: United Nations. 1993.
18. Staub C. Chromatographic procedures for determination of cannabinoids in biological samples, with special attention to blood and alternative matrices like hair, saliva, sweat and meconium. *J Chromatogr B* 1999;733:119-26.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices. NCCLS approved guideline EP5-A. Wayne, PA: NCCLS, 1999.
20. Kricka LJ, Wilding P. Micromechanics and nanotechnology. In: Kost GJ, ed. *Handbook of clinical automation, robotics, and optimization*. New York: John Wiley & Sons. 1996:45-77.

21. Kricka LJ, Nozaki O, Wilding P. Micro-mechanics and nanotechnology-implications and applications in the clinical laboratory. *J Int Fed Clin Chem* 1994;6:54-9.
22. Van den Berg A, Bergveld P, eds. *Micro total analysis systems*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1995:311.
23. Kricka LJ. Miniaturization of clinical systems. *Clin Chem* 1998;44:2008-14.
24. Van Ingen C. Biology's century: just the beginning for microarrays. *Nat Genet* 2002;32(Suppl):463.
25. Lander ES. Array of hope. *Nat Genet* 1999;21(Suppl):3-4.
26. Stahler P. Microarray technology. An array of opportunities. *Nature* 2002;416:885-91.
27. Cahill DJ. Protein and antibody arrays and their medical applications. *J Immunol Methods* 2001;250:81-91.
28. Birchard K. Past, present, and future of drug abuse at the Olympics. *Lancet* 2000;356:1008.
29. Tortoli E, Bernabini S, Mariottini A, Torricelli F. Impiego di microchip per l'identificazione dei micobatteri e per lo studio della resistenza ai farmaci del *Mycobacterium tuberculosis*. *Ligandassay* 2004;9:12-7.
30. Torricelli F. Microarray: applicazioni alla diagnostica. Lo stato dell'arte della tecnologia microarray applicata alla diagnostica. *Ligandassay* 2004;9:9-11.
31. Zuccaro P, Pichini S, Altieri I, et al. Proposal of guidelines for drugs of abuse testing in biological fluids. ISSN. 1996, ii, 26 p. *Rapporti ISTISAN* 96/29.