

Metodi immunochimici rapidi (*on site*) per lo screening tossicologico delle urine (Rassegna)

Mirella Filocamo

Medicina di Laboratorio, Ospedale Infermi, AUSL Rimini

RIASSUNTO *I dispositivi on site trovano oggi larga applicazione sia in campo clinico che extra ospedaliero. Un esempio è il loro utilizzo per il rilascio dell'idoneità per alcune "categorie di lavoratori destinati a mansioni che comportano rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute dei terzi". Se utilizzati correttamente da personale competente, hanno prestazioni analitiche globali accettabili. Le problematiche connesse con il loro utilizzo sono legate alle interferenze, alle reattività crociate, all'interpretazione del test, che può a volte rivelarsi complessa se non si hanno adeguate conoscenze di farmacocinetica e sul metabolismo delle sostanze da ricercare. Tutti i test di screening forniscono risultati preliminari, in caso di positività è necessario un riscontro con un metodo di conferma basato sulla cromatografia associata a spettrometria di massa.*

Parole chiave: On site; Cross-reattività; Test di screening

ABSTRACT *Immunochemical fast method for toxicological screening on urine. The consumption of drugs is in continuous increase, consequently is assisted to an increased demand of toxicological analyses. In this context the expansion is placed on the market of devices on site that, without the instrumentation aid, permits to find, on conventional biological matrices and not, the substances of abuse in base to a prearranged cut-off. The devices on site are now widely used both in clinical and non-hospital. The devices of screening on site are simple to use, rapid, accurate, sensitive with acceptable global analytical performance if they come used correctly, from qualified staff and inside of a standardized quality process. The problems associated with their use are related to cross reactivity: interfering substances and/or molecules of the same class come recognized from antibodies and generate falsely positive results. The interpretation of results cannot be based on the single reading of the test but is essential to know the pharmacokinetic and the metabolism of the single substances. The necessity of periodic check of the reliability of the analytical data by means of adhesion to external verification quality (VEQ). For being able to supply useful and reliable analytical data is indispensable the confirmation with a chromatographic method of samples with positive results at screening, and professional competence for the interpretation of the data in the light of the knowledge of the potentialities and the limits of the method used to avoid misleading interpretations.*

Key words: On site; Drugs; VEQ

INTRODUZIONE

Alla luce di quanto si legge e si vede tutti i giorni possiamo dire che, nonostante campagne di informazione di educazione e di prevenzione, il consumo di stupefacenti in Italia non si è fermato né accenna ad arrestarsi¹. La tossicodipendenza crea problemi medici e sociali di non facile soluzione. In questo contesto si assiste ad un'esplosione sul mercato di dispositivi *on site* che consentono la rilevazione, su matrici biologiche convenzionali e non, delle sostanze d'abuso in base ad un cut-off prestabilito. I dispositivi *on site* trovano largo utilizzo:

- nei controlli su strada da parte delle Forze dell'Ordine, per l'identificazione dei soggetti che hanno assunto sostanze stupefacenti e si sono messi alla guida di veicoli
- nell'adempiere alla normativa prevista per la sicurezza dei luoghi di lavoro (intesa governo-regioni del 30 ottobre 2007 e successivo accordo dell'8 ottobre 2008.)
- nelle indagini epidemiologiche e statistiche atte a rilevare l'entità del fenomeno "droga".
- in campo clinico, in situazioni di emergenza, per una conferma diagnostica di pazienti con anamnesi muta.

- per monitorare le terapie farmacologiche di disassuefazione nei servizi ambulatoriali specialistici, centri di recupero, comunità.
- per rilevare l'eventuale assunzione di stupefacenti da parte dei propri figli senza coinvolgere una figura medica.

MATERIALI E METODI

In tale contesto, è più che ragionevole l'impegno dell'industria diagnostica nello sviluppo e produzione di sistemi per la determinazione rapida dello screening di droghe d'abuso. Sono disponibili sul mercato diverse linee, a seconda delle esigenze, dal test singolo a test multipli, in forma di card o cassetta, stick ad immersione o coppetta². Esistono in commercio alcune linee che hanno una striscia termometrica per verificare l'idonea temperatura del campione e il dosaggio della creatinuria come test anti adulterazione. Sono disponibili kit che utilizzano diverse matrici: urina, saliva, sangue, sudore e alcuni offrono la possibilità di analizzare la presenza di droghe su sostanze quali polveri, liquidi e superfici. Gran parte dei dispositivi attualmente in commercio possono essere ricondotti a due tec-

niche analitiche:

a) Metodo immunocromatografico basato sul principio del legame competitivo: le droghe presenti nel campione di urina competono con il relativo coniugato per i medesimi siti di legame dell'anticorpo. Durante il test un campione di urina migra, per capillarità, lungo la membrana. La sostanza stupefacente ricercata, se è presente nel campione di urina, a concentrazione inferiore al proprio cut-off, non sarà in grado di saturare tutti i siti di legame delle particelle legate agli anticorpi presenti sulla striscia. Le particelle legate agli anticorpi, verranno catturate dal coniugato immobilizzato e una banda colorata visibile comparirà nella zona del risultato del test; questa banda non si formerà se il livello della droga sarà superiore al proprio cut-off, in quanto tutti i siti di legame degli anticorpi relativi saranno saturati.

b) Metodo immunofluorimetrico con l'impiego di anticorpi monoclonali specifici. Il campione di urina dal pozzetto campione passa attraverso un filtro, per capillarità arriva nella camera di reazione dove reagisce con coniugati anticorpali fluorescenti, dopo un periodo di incubazione, la miscela di reazione fluisce verso la zona di rivelazione del dispositivo. La presenza di droga o suoi metaboliti impedisce che i coniugati fluorescenti si leghino alla fase solida presente nella regione di rilevamento; i coniugati fluorescenti non legati vengono eliminati e il legame di fluorescenza viene letto (non sono leggibili ad occhio nudo e richiedono l'uso di appositi lettori) dando un risultato negativo o positivo. Con questa tipologia di dispositivi *on site* si elimina il problema dovuto all'interpretazione soggettiva da parte dell'operatore.

POTENZIALITA' E LIMITI DEI DISPOSITIVI *ON SITE*

I test rapidi attualmente presenti sul mercato hanno livelli di sensibilità e specificità paragonabili a quelli dei metodi immunochimici utilizzati in laboratorio per lo screening di sostanze illecite³⁻⁵. I vantaggi di questi dispositivi derivano dalla celerità del risultato, dalla conservazione dei reattivi a temperatura ambiente, dalla scarsa manipolazione del campione al fine di proteggere l'esecutore del test e dall'esecuzione dell'analisi nella stessa sede di raccolta del campione, diminuendo le problematiche legate alla "catena di custodia". Il loro utilizzo per monitorare l'efficacia dei vari trattamenti terapeutici offre il vantaggio di coinvolgere il paziente in un'immediata discussione dei risultati. Possibili limiti sulla validità di questi test sono quelli legati a tutti i test di screening. Chiariamo innanzitutto che la funzione primaria di tutti i test di screening è di escludere i campioni che risultano negativi, ossia quei campioni che non contengono sostanze stupefacenti e loro metaboliti, oppure quelli in cui la loro concentrazione è al di sotto del cut-off. I cut-off sono diversi per le varie classi di sostanze e spesso variano da metodo a metodo; poiché il cut-off determina l'esito delle analisi in termini di positività o negatività è fondamentale la scelta di un cut-off appropriato. Altro fattore importante è la cross-reattività, la possibilità cioè che molecole con strutture chimiche simili a quella delle molecole bersaglio presentino reazioni crociate. Ad esempio alcuni antibiotici mostrano reattività crociata determinando positività per la classe di sostan-

ze "oppiacei"; in altri casi se la reattività crociata è bassa alcune molecole possono non essere rilevate (es. 3,4-metilenediossimetamfetamina - MDM - per la classe amfetamine). A mio avviso, è necessario tenere ben presente che la risposta positiva può anche essere dovuta alla presenza di sostanze interferenti che danno reattività crociata con la sostanza in esame e non sottovalutare la dicitura che compare sul foglio illustrativo della maggior parte dei prodotti: "Questo test fornisce dei dati analitici preliminari, metodi chimici più specifici devono essere utilizzati per la conferma, preferibilmente cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa".

LA PROCEDURA

Una fase pre-analitica corretta è presupposto essenziale per fornire un dato di qualità. È noto che, un campione urinario per la ricerca di sostanze d'abuso è un campione unico, non ripetibile, in quanto l'eliminazione urinaria avverrà in tempi diversi, più o meno brevi, a seconda della sostanza; ne consegue che devono essere messe in atto tutte le procedure di raccolta, stoccaggio, conservazione necessarie per evitare la richiesta di un secondo campione che non sarà mai uguale al primo. La procedura standardizzata dovrà prevedere una raccolta "a vista" del campione, una corretta identificazione dello stesso, una aliquotazione del campione in modo da poter eseguire il test di conferma sui campioni risultati positivi. Nei casi in cui la normativa lo preveda dovrà essere applicata la "catena di custodia". Il referto dovrà riportare il metodo ed un commento da parte del professionista in modo che sia chiaro all'utilizzatore dell'analisi che si tratta di un referto preliminare in attesa di un test di conferma.

CONTROLLO DI QUALITA'

La maggior parte dei test include un sistema di controllo interno della procedura a conferma che il test è stato eseguito correttamente con un volume di campione sufficiente, che il tempo di incubazione è stato sufficientemente lungo e che l'assorbimento della membrana è risultato adeguato. Controlli standard (negativo e positivo) non sono in genere forniti con i kit, ma sarebbe utile eseguire questi controlli (CQI) soprattutto utilizzando un valore noto vicino al cut off, parametro quest'ultimo da tenere sotto controllo costantemente. Sottolineo l'importanza della partecipazione a programmi di Verifica Esterna di Qualità (VEQ), strumento di aggiornamento culturale poiché l'aggiunta nei materiali di controllo di sostanze interferenti e di adulteranti permette la valutazione delle caratteristiche del metodo in uso, allargando i margini di affidabilità e di efficacia della nostra attività.

INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO

Per fornire un risultato affidabile e certo la sola tecnologia non è sufficiente; l'interpretazione del risultato non può basarsi solo sulla lettura del test, ma sono indispensabili nozioni di farmacocinetica e conoscenze sul metabolismo delle singole sostanze d'abuso⁶. Il responso Positivo o Negativo deve essere rapportato ed illustrato alla luce di considerazioni e conoscenze precise circa le

potenzialità e i limiti del metodo utilizzato al fine di evitare interpretazioni fuorvianti.

CONCLUSIONI

L'utilizzo dei *drug test* è ormai consolidato sia nell'ambito clinico che extra ospedaliero. E' evidente che può essere considerato una grande risorsa in grado di fornire dati analitici utili ed affidabili se vengono rispettati alcuni parametri, ovvero: una corretta procedura di campionamento, che tutti i risultati positivi vengano sottoposti a conferma cromatografica accoppiata a spettrometria di massa, che vengano eseguiti con la dovuta professionalità e che la valutazione dei risultati venga affidata a professionisti competenti. Il criterio di scelta del dispositivo on site è rilevante e deve tenere conto della finalità di utilizzo e delle caratteristiche di sensibilità e specificità.

BIBLIOGRAFIA

1. **C. Giovanard.** Relazione annuale al Parlamento sullo stato delle tossicodipendenze in Italia nel 2008
2. **Jane Ellen Phillips, Theresa M. Ambrose Catherine Hammett –Stable.** Le tecnologie di dosaggio con ligando nei dispositivi di point of care per lo screening delle droghe d'abuso. *Journal of Clinical Ligand Assay* 2002;25:370-5
3. **M. Filocamo, Tura M., Arlotti C., et al.** Test di screening droghe d'abuso: metodi a confronto. *Ligand Assay* 2007; 12: 217
4. **Peace MR, Tarnai LD, Poklis A.** Performance evaluation of four on-site drug-testing devices for detection of drugs of abuse in urine. *J Anal Toxicol.* 2000; 24:589-94
5. **Kedehjian LJ.** Performance of five non-instrumented urine drug-testing devices with challenging near-cut off specimens. *J Analytical Toxicology* 2001;25:670-9
6. **M. Filocamo.** On site drug testing: use, abuse and misuse. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2007; 45: 160

Per corrispondenza:

Dott.ssa Mirella Filocamo
Medicina di Laboratorio
Ospedale Infermi di Rimini
Via Settembrini 2 - 47900 Rimini
Tel.: 0541705364
e-mail: mfilocam@auslrm.net