

USO

Dispositivo medico-diagnostico in vitro, su supporto immunocromatografico (card), per la determinazione rapida e qualitativa della benzoeleognina, metabolita della cocaina (COC) in campioni di urine umane con valore soglia (cut-off) di 300 ng/ml

PRINCIPIO del METODO

Questa procedura analitica, qualitativa, si basa sul principio della cromatografia a flusso laterale. La velocità di esecuzione e la sensibilità analitica rendono questa metodologia la più diffusa negli screening qualitativi in merito all'assunzione di droghe d'abuso. Il presente sistema diagnostico permette la ricerca della benzoeleognina (metabolita della cocaina) nelle urine umane

Il presente metodo fornisce risultati qualitativi e preliminari che dovrebbero essere sempre confermati con metodiche di riferimento, quali la gascromatografia/spettrometria di massa (gasmassa, GC/MS). Inoltre, i risultati positivi dovrebbero sempre essere supportati da evidenze cliniche o valutazioni specialistiche. Si consiglia di non formulare considerazioni cliniche e giudizi medico legali definitivi, basandosi soltanto su test relativi a droghe d'abuso, soprattutto nel caso di risultati positivi preliminari

CONSIDERAZIONI CLINICHE

La cocaina è un potente stimolatore del sistema nervoso centrale (SNC) ed un anestetico locale. L'assunzione provoca inizialmente uno stato di notevole energia ed agitazione nel soggetto, che gradualmente evolve in tremori, iperattività e spasmi. In molti casi si riscontrano febbre, insensibilità, difficoltà respiratorie stato di incoscienza.

La cocaina viene spesso assunta per via inalatoria (nasale), endovenosa e con i fumi. Viene rapidamente escreta nelle urine soprattutto come benzoeleognina², che ne rappresenta il metabolita principale: questo presenta una emivita maggiore (5-8 h) della stessa cocaina (0.5-1.5 h) e viene generalmente rilevato nelle urine per 24-48 h dopo l'assunzione di cocaina².

Il test COC ha un limite di rilevabilità di 300 ng/ml, che rappresenta il cut-off indicato per lo screening, anche dal SAMHSA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration-USA). La presente metodologia analitica rappresenta un valido test di screening che può essere eseguito senza l'ausilio di alcuna apparecchiatura di Laboratorio. Viene impiegato un anticorpo che rivela selettivamente elevate concentrazioni di COC in campioni di urine umane. Il valore soglia (cut-off) del presente metodo, ovvero la minima concentrazione urinaria di benzoeleognina (COC) che produce un risultato POSITIVO, è di 300 ng/ml

PRINCIPIO DEL METODO

La procedura analitica utilizza una tecnologia immunocromatografica su membrana (immunodosaggio per inibizione competitiva). Durante il test, il campione di urina migra lungo la membrana per azione capillare l'analita, qualora presente nel campione, compete con molecole del medesimo composto chimico (antigene), immobilizzate sulla membrana porosa (linea T della membrana) e coniugate con cromogeno, per il legame con anticorpi anti-COC presenti in concentrazione limitata. Quando l'analita è presente nel campione a concentrazione superiore o uguale al valore di cut-off (300 ng/ml) verranno saturati tutti i siti di legame dell'anticorpo: in conseguenza di ciò l'anticorpo stesso non potrà formare immunocomplessi con le molecole del composto chimico coniugato con cromogeno ed immobilizzate sul supporto (linea T della membrana) e, pertanto non si formerà la linea di colore rosa in corrispondenza di tale regione (regione del Test): la banda colorata, per contro, sarà visibile quando la concentrazione dell'analita nel campione risulterà inferiore al cut-off.

Il campione, indipendentemente dalla sua concentrazione in benzoeleognina, dovrà sempre sviluppare una linea colorata in rosa nella regione del Controllo (linea C), in quanto il coniugato si legherà comunque al reagente ivi immobilizzato.

Un campione negativo produrrà due distinte linee colorate, rispettivamente nelle regioni dei test e del controllo; un campione positivo produrrà una linea colorata soltanto in corrispondenza della regione del controllo.

Il campione, indipendentemente dalla concentrazione di specifico analita, dovrà sempre produrre una banda colorata nella zona del controllo (contrassegnata con C), dimostrando che il sistema ha funzionato correttamente (controllo procedurale). Il supporto reattivo contenente la membrana immunocromatografica (card) è pronto all'uso.

REAGENTI

Il supporto di reazione immunocromatografico (card) contiene microparticelle rivestite con anticorpi monoclonali di topo anti-benzoeleognina e coniugato proteina-benzoeleognina. Nella regione del controllo sono presenti anticorpi di capra

MATERIALE A CORREDO

- Card
- Contagocce
- Manuale d'istruzione

MATERIALE NECESSARIO NON A CORREDO

- Contenitori monouso per campioni di urina
- Timer

PRECAUZIONI

1. Tutti i campioni biologici, le cards ed i monouso devono essere considerati potenzialmente infetti e, come tali, smaltiti secondo la normativa vigente
2. Per uso esclusivamente in vitro. Non utilizzare il kit oltre la data di scadenza
3. Indossare guanti protettivi; lavarsi le mani alla fine della seduta analitica
4. Il kit è stato formulato esclusivamente per determinazioni in vitro
5. Portare tutto il materiale reattivo a T. A. prima della seduta analitica
6. La card deve rimanere sigillata fino al momento dell'uso. Non utilizzare la card qualora il relativo involucro risulti danneggiato.

STABILITÀ DEI REAGENTI

Il kit deve essere conservato a 2-30°C. I supporti immunocromatografici (cards) sono sensibili all'umidità ed al calore eccessivo. Si consiglia di effettuare il test al più presto dopo aver estratto la card dal sacchetto sigillato. Non utilizzare dopo la data di scadenza. **NON CONGELARE**

RACCOLTA DEL CAMPIONE

I campioni di urina devono essere raccolti in contenitore specifico monouso, senza aggiunta di stabilizzanti. I campioni di urina possono essere conservati fino a 48 ore a 2-8°C prima del test: per periodi prolungati di conservazione è necessario congelare a -20°C. Possono essere utilizzate urine raccolte in qualunque ora della giornata. Campioni contenenti precipitati visibili devono essere centrifugati, filtrati o lasciati decantare. Qualora venga utilizzato un campione refrigerato o congelato è necessario portarlo a T. A. prima di analizzarlo, solo dopo averlo rioscopato accuratamente.

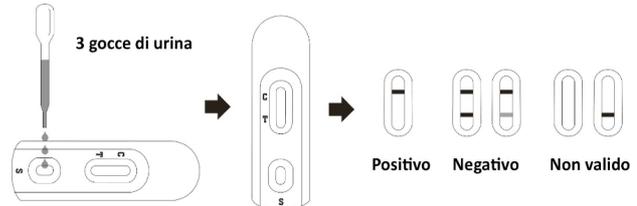
PROCEDURA ANALITICA

1. Portare i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente
2. Togliere il supporto di reazione dall'involucro di protezione, tagliando il sacchetto lungo il bordo sigillato e porlo su una superficie piana. Utilizzare entro breve tempo
3. Riempire la pipetta contagocce con il campione da analizzare. Tenendo la pipetta verticale, dispensare esattamente 3 gocce di urina (circa 120 µl), evitando la formazione di bolle d'aria, nel pozzetto del campione (S)
4. Far partire il timer: leggere il risultato dopo 5 minuti

AVVERTENZA: per evitare una lettura errata, non interpretare mai il risultato oltre 10 minuti dalla dispensazione del campione.

INTERPRETAZIONE dei RISULTATI

Fare riferimento alle illustrazioni riportate di seguito



NEGATIVO: in aggiunta alla linea del controllo (C), si evidenzia una linea colorata nella zona Test (T). n.b.: anche la formazione di una linea debolmente colorata nella regione T è indice di risultato NEGATIVO, ovvero una concentrazione di COC inferiore a 300 ng/ml

POSITIVO: si sviluppa la linea colorata soltanto nella regione di controllo (C); non appare la linea nella zona Test (T). Un risultato POSITIVO indica una concentrazione di COC nel campione superiore a 300 ng/ml

NON VALIDO (RIPETERE): se si evidenzia soltanto una linea colorata nella zona (T) o non si evidenziano distinte linee colorate, sia nella zona del controllo che nella regione (T), il test è da considerarsi "non valido": si raccomanda di ripetere il test **IMPIEGANDO UNA NUOVA CARD**. N.B.: le cause più frequenti di un risultato NON VALIDO possono essere un volume insufficiente di campione dispensato e/o errori procedurali. Il controllo interno della procedura è incluso nel metodo stesso: lo sviluppo di una linea rosata nella regione del controllo (C) rappresenta il controllo procedurale, a conferma di una corretta esecuzione della metodica.

CONTROLLO DI QUALITÀ

1. La formazione o meno della linea colorata nella regione del controllo è da considerarsi di per se stessa una procedura di controllo di qualità interno.
2. L'utilizzo di un controllo esterno (urine a titolo certificato per i diversi analiti) è raccomandabile per valutare ulteriormente la correttezza dei dati analitici.

LIMITAZIONI DEL METODO

1. Il presente kit è stato formulato esclusivamente per la ricerca di COC in campioni di urine umane e fornisce risultati analitici **esclusivamente qualitativi e preliminari**. Utilizzare metodiche secondarie di riferimento, quali la gascromatografia-spettrometria di massa (gasmassa, GC/MS)² per confermare i risultati
2. Sebbene questa procedura analitica sia particolarmente accurata nel riscontro di COC nelle urine, sostanze potenzialmente interferenti potrebbero causare risultati errati
3. Composti chimici, quali agenti sbiancanti o fortemente ossidanti, qualora presenti nel campione di urina, possono provocare risultati errati con qualsiasi metodica analitica impiegata: qualora si sospetti una tale contaminazione, sarà necessario impiegare un nuovo campione di urina
4. Un risultato positivo indica la presenza di benzoeleognina ma non fornisce informazioni sulla relativa concentrazione, vie di somministrazione o livello di intossicazione
5. Un risultato negativo non indica necessariamente l'assenza di benzoeleognina nel campione: infatti, è possibile ottenere risultati negativi per campioni contenenti l'analita a concentrazioni inferiori al cut-off (300 ng/ml)
6. Il test non è in grado di distinguere la droga d'abuso da farmaci che eventualmente la contengano.

Pertanto, come tutti i test di Laboratorio, l'interpretazione ai fini della diagnosi deve essere supportata da tutte le altre indagini necessarie e disponibili, nonché dalle informazioni cliniche ottenibili

RISULTATI

Un risultato negativo indica che la benzoeleognina è assente nel campione o al di sotto del limite di sensibilità del metodo (300ng/ml). Un risultato positivo indica che la concentrazione di benzoeleognina è superiore a 300ng/ml. La sensibilità del metodo risulta, pertanto, di 300ng/ml

PRESTAZIONI DEL METODO

Sensibilità e specificità

Uno studio di correlazione è stato condotto utilizzando la presente procedura analitica ed analogo prodotto (test rapido) commerciale; sono stati impiegati 110 campioni provenienti da soggetti sottoposti a test di screening.

Nella Tabella sottoelencata sono riportati i risultati:

Metodo	Test commerciale analogo		Risultati totali
	Positivi	Negativi	
Cocaine Test Device (COC)	50	0	50
	0	60	61
Risultati totali	50	60	110
% Correlazione	>99.9%	>99.9%	>99.9%

Uno studio di correlazione è stato condotto utilizzando la presente procedura analitica e GC/MS, impostando il cut-off a 300 ng/ml; sono stati impiegati 300 campioni provenienti da soggetti sottoposti a test di screening. Nella Tabella sottoelencata sono riportati i risultati:

Metodo	GC/MS		Risultati totali
	Positivi	Negativi	
Cocaine Test Device (COC)	120	8	128
	3	169	172
Risultati totali	123	177	300
% Correlazione	97.6%	95.4%	96.3%

Sensibilità analitica

Ad un pool di urine privo di benzoeleognina è stato aggiunto l'analita alle seguenti concentrazioni: 0 ng/ml, 150 ng/ml, 225 ng/ml, 300 ng/ml, 375 ng/ml, 450 ng/ml e 900 ng/ml. I risultati ottenuti hanno definito un'accuratezza >99% per concentrazioni comprese tra ±50% il valore di cut-off. I dati sono riportati nella Tabella sottostante

Oxazepam aggiunto (ng/mL)	Percentuale del Cut-off	n	Risultato visivo	
			Negativo	Positivo
0	0%	30	30	0
150	-50%	30	30	0
225	-25%	30	26	4
300	Cut-off	30	14	16
375	+25%	30	5	25
450	+50%	30	0	30
900	3X	30	0	30

Specificità analitica

I sottoelencati composti chimici, quando presenti nel campione di urina, evidenziano risultato positivo al test COC dopo 5 minuti

Composto	Concentrazione (ng/ml)	Composto	Concentrazione (ng/ml)
Benzoilecgonina	300	Cocaeetilene	12500
Cocaina HCl	200	Ecgonina HCl	30000

Precisione analitica

Uno studio è stato condotto in 3 ospedali (A, B e C) analizzando i risultati ottenuti da operatori inesperti che hanno utilizzato 3 lotti diversi del kit COC, per valutare la precisione intrasaggio, intersaggio e intraoperatore. A ciascun Laboratorio è stato assegnato identico pannello di campioni codificati (assenza di benzoilecgonina, benzoilecgonina a concentrazione $\pm 25\%$ al cut-off, benzoilecgonina a concentrazione $\pm 50\%$ al cut-off di 300 ng/ml); i risultati sono riportati nella tabella sottostante:

Benzoilecgonina (ng/mL)	n per Ospedale	Ospedale A		Ospedale B		Ospedale C	
		-	+	-	+	-	+
0	10	10	0	10	0	10	0
150	10	10	0	10	0	10	0
225	10	9	1	8	2	9	1
375	10	2	8	1	9	2	8
450	10	0	10	0	10	0	10

Effetti sul peso specifico del campione di urina

15 campioni di urina di peso specifico normale, alto e basso sono stati addizionati con 150 e 450 ng/ml di benzoilecgonina. Utilizzando il presente metodo sono state eseguite analisi in duplicato usando i 15 campioni sia addizionati che non. I risultati dimostrano che diversi valori di peso specifico non interferiscono con la determinazione analitica.

Effetti sul pH del campione di urina

Il pH di aliquote da un pool di campioni negativi è stato aggiustato in un intervallo di valori compreso tra 5 e 9 con incrementi di 1 unità e le aliquote addizionate con 150 e 450 ng/ml di benzoilecgonina. Utilizzando il presente metodo sono state eseguite analisi in duplicato usando le aliquote addizionate. I risultati dimostrano che diversi valori di pH non interferiscono con la determinazione analitica.

INTERFERENZE ANALITICHE (cross-reattività)

È stato eseguito uno studio finalizzato alla valutazione delle possibili interferenze analitiche causate da particolari composti sia su campioni di urine prive di droghe da abuso che contenenti benzoilecgonina. I composti elencati di seguito non hanno mostrato alcuna interferenza crociata, quando testati con il presente metodo alla concentrazione di 100 µg/ml:

Acetaminofene	Deossicorticosterone	Meperidina	β -Fenitilamina
Acetofenetidina	Detrometorfan	Meprobamate	Fenilpropranolamina
N-Acetilprocainamide	Diclofenac	Metadone	Prednisolone
Acido acetilsalicilico	Diffunisal	L-Metamfetamina	Prednisone
Aminopirina	Digossina	Metossifenamina	Procaina
Amitriptilina	Difenidramina	(\pm)-3,4-Metilenediossi- amfetamina	Promazina
Amobarbital	Doxilamina	(\pm)-3,4-Metilenediossi- metamfetamina	Prometazina
Amoxicillina	Ecgonina	(\pm)-3,4-Metilenediossi- metamfetamina	D,L-Propranololo
Ampicillina	Ecgoninametilistere	Morfina-3- β -D glucuronide	D-Propossifene
Acido L-ascorbico	(-)- ψ -Efedrina	Morfina solfato	D-Pseudofedrina
D,L-Amfetamina solfato	Eritromicina	Acido nalidixico	Chinidina
Apomorfina	Diazepam	Naloxone	Chinina
Aspartame	Estrone-3-solfato	Naltrexone	Ranitidina
Atropina	Etil-p-aminobenzoato	Naproxen	Acido salicilico
Acido benzilico	Fenopropene	Niacinamide	Secobarbital
Acido benzoico	Furosemide	Nifedipina	Serotonina
Benzoilecgonina	Acido gentisico	Norcodeina	Sulfametazina
Benzfetamina	Emoglobina	Noretindrone	Sulindac
Bilirubina	Idralazina	D-Norpropossifene	Tetraciclina
(\pm)-Bromfeniramina	Idroclorotiazide	Noscapina	Tetraidrocortisone
Caffeina	Idrocodone	D,L-Octopamina	3-Acetato
Cannabidiolo	Idrocortisone	Acido ossalico	Tetraidrocortisone
Cannabinolo	Acido O-idrossipirrico	Oxazepam	3-(β -D-glucuronide)
Cloralidrato	p-idrossiamfetamina	Acido ossolinico	Tetraidrocolina
Cloramfenicolo	p-idrossi-metamfetamina	Ossicodone	Tiamina
Clorotiazide	3-idrossitramina	Ossimetazolina	Tioridazina
(\pm)-Clorfeniramina	Ibuprofen	Papaverina	D,L-Tirosine
Clorpromazina	Imipramina	Penicillina-G	Tolbutamide
Clorchina	Iproniazide	Pentazocina	Triamterene
Colesterolo	(\pm)-Isoproterenolo	Pentobarbital	Trifluoperazina
Clomipramina	Isosuprina	Perfenazina	Trimetoprim
Clonidina	Ketamina	Fenciclidina	Trimipramina
Cocaeetilene	Ketoprofene	Fenelzina	Triptamina
Cocaina	Labetalolo	Fenobarbital	D,L-Triptofano
Codeina	Levorfanolo	Fentermina	Tiramine
Cortisone	Loperamide	L-Fenilefrina	Acido urico
(-) Cotinina	Maprotilina	Tebaina	Verapamil
Creatinina	β -Estradiolo		Zomepirac

BIBLIOGRAFIA

- Stewart DI, T Inoba, M Ducassen, W Kalow. Clin. Pharmacol. Ther. 1979; 25:264
- Ambre J. J. Anal. Toxicol. 1985; 9:241
- Baselt RC. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 2nd Ed. Biomedical Publ., Davis, CA. 1982: 488
- Hawks RL, CN Chiang. Urine Testing for Drugs of Abuse. National Institute for Drug Abuse (NIDA), Research Monograph 73. 1986

Indice dei Simboli

	Attenzione, seguire le istruzioni per l'uso		Test per kit		Rappresentante Autorizzato
	Per uso esclusivo "in vitro"		Utilizzare entro		Non riutilizzare
	Conservare a 2-30°C		Numero di Lotto		N. Catalogo #
	Non utilizzare se la confezione è danneggiata				

Codici di Riordino:

C2174 COCAINE DRUG TEST (COC)

20 Test



Bio Plastic Sas - 00100 Roma

Numero: RP5016502
Data effettiva: 2013-09-28