

USO

Dispositivo medico-diagnostico in vitro, su supporto immunocromatografico (card), per la determinazione rapida e qualitativa dell'11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH, (metabolita del tetraidrocannabinolo - THC) in campioni di urine umane con valore soglia (cut-off) di 50 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 dell' 11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH (metabolita del tetraidrocannabinolo) 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

Il THC (Δ^9 -tetraidrocannabinolo) è il principio attivo presente nei cannabinoidi (Marijuana). Se assunto attraverso il fumo o oralmente, produce effetti euforizzanti. L'abuso compromette la memoria a breve termine e diminuisce le capacità di apprendimento. I tossicodipendenti manifestano altresì episodi di confusione mentale ed ansietà e l'assunzione cronica di marijuana può addirittura provocare turbe del comportamento. Gli effetti acuti, nel fumatore di marijuana, si manifestano entro 20-30 minuti dall'assunzione e si protraggono per 90-120 minuti. Elevate concentrazioni dei metaboliti sono riscontrabili entro poche ore e sono rilevabili nelle urine per 3-10 giorni dopo l'assunzione; il metabolita escreto in maggior quantità risulta essere l'acido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocannabinolo-9-carbossilico (Δ^9 -THC-9 COOH). Il test THC ha un limite di rilevabilità di 50 ng/ml, che rappresenta anche il cut-off indicato per lo screening, stabilito 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 THC in campioni di urine umane. Il valore soglia (cut-off) del presente metodo, ovvero la minima concentrazione urinaria di 11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH (THC) che produce un risultato POSITIVO, è di 50 ng/ml.

PRINCIPIO DEL METODO

La procedura analitica utilizza una tecnologia immunocromatografica su membrana (immunodosaggio per inibizione competitiva). Durante il test, il campione di urine migra lungo la membrana per azione capillare (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-THC presenti in concentrazione limitata. Quando l'analita è presente nel campione a concentrazione superiore o uguale al valore di cut-off (50 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 11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH, 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 tipo anti-11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH e coniugato proteina-11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH. Nella regione del controllo sono presenti anticorpi di coniglio.

MATERIALE A CORREDO

- Card
- Contagocce
- Manuale d'istruzione

MATERIALE NECESSARIO NON A CORREDO

- Contenitori monouso per campioni di urine
- 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 urine 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.

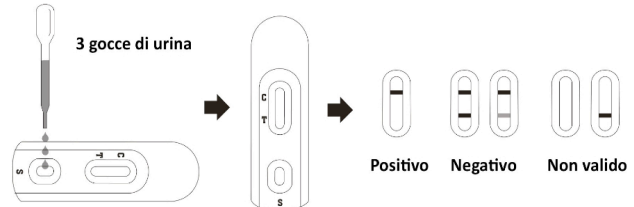
PROCEDURA ANALITICA

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 THC inferiore a 50 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 THC nel campione superiore a 50 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 THC 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 THC 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 11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH ma non fornisce informazioni sulla relativa concentrazione, vie di somministrazione o livello di intossicazione
5. Un risultato negativo non indica necessariamente l'assenza di 11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH nel campione: infatti, è possibile ottenere risultati negativi per campioni contenenti l'analita a concentrazioni inferiori al cut-off (50 ng/ml)
6. Il test non è in grado di distinguere la droga d'abuso da farmaci che eventualmente la contengano.

Pertanto, anche 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 l'11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH è assente nel campione o al di sotto del limite di sensibilità del metodo (50ng/ml). Un risultato positivo indica che la concentrazione di 11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH è superiore a 50ng/ml. La sensibilità del metodo risulta, pertanto, di 50 ng/ml

PRESTAZIONI DEL METODO

Accuratezza

Uno studio di correlazione è stato condotto utilizzando la presente procedura analitica ed analogo prodotto (test rapido) commerciale; sono stati impiegati 100 campioni provenienti da soggetti sottoposti a test di screening.

Nella Tabella sottostante sono riportati i risultati:

Metodo	Test commerciale analogo		Risultati totali
	Positivi	Negativi	
Marijuana Drug Test (THC)	Positivi	0	33
	Negativi	67	67
	Risultati totali	67	100
% Correlazione		>99.9%	>99.9%

Uno studio di correlazione è stato condotto utilizzando la presente procedura analitica e GC/MS, impostando il cut-off a 50 ng/ml; sono stati impiegati 330 campioni provenienti da soggetti sottoposti a test di screening. Nella Tabella sottostante sono riportati i risultati:

Metodo	GC/MS		Risultati totali
	Positivi	Negativi	
Marijuana Drug Test (THC)	Positivi	6	143
	Negativi	184	187
	Risultati totali	190	330
% Correlazione		96.8%	97.3%

Sensibilità analitica

Ad un pool di urine privo di 11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH è stato aggiunto l'analita alle seguenti concentrazioni: 0 ng/ml, 25 ng/ml, 37.5 ng/ml, 50 ng/ml, 62.5 ng/ml e 150 ng/ml. I risultati ottenuti hanno definito un'accuratezza >99% per concentrazioni comprese tra $\pm 50\%$ il valore di cut-off. I dati sono riportati nella Tabella sottostante

11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH aggiunto (ng/mL)	Percentuale del Cut-off	n	Risultato visivo	
			Negativo	Positivo
0	0%	30	30	0
25	-50%	30	30	0
37.5	-25%	30	27	3
50	Cut-off	30	13	17
62.5	+25%	30	4	26
75	+50%	30	0	30
150	3X	30	0	30

Specificità analitica

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

Composto	Concentrazione (ng/mL)
Cannabinolo	20,000
11-nor- Δ^8 -THC-9 COOH	30
11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH	50
Δ^8 - THC	15,000
Δ^9 - THC	15,000

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 THC, per valutare la precisione intrasaggio, intersaggio e intraoperatore. A ciascun Laboratorio è stato assegnato identico pannello di campioni codificati (assenza di 11-nor- Δ^8 -THC-9 COOH, 11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH a concentrazione $\pm 25\%$ al cut-off, 11-nor- Δ^8 -THC-9 COOH a concentrazione $\pm 50\%$ al cut-off di 50 ng/ml); i risultati sono riportati nella tabella sottostante:

11-nor- Δ^8 -THC-9 COOH (ng/mL)	n per Ospedale	Ospedale A		Ospedale B		Ospedale C	
		-	+	-	+	-	+
0	10	10	0	10	0	10	0
25	10	10	0	10	0	10	0
37.5	10	9	1	8	2	9	1
62.5	10	2	8	1	9	2	8
5	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 25 e 75 ng/ml di 11-nor- Δ^8 -THC-9 COOH. 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 25 e 75 ng/ml di 11-nor- Δ^8 -THC-9 COOH. 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 11-nor- Δ^8 -THC-9 COOH. I composti elencati di seguito non hanno mostrato alcuna interferenza crociata, quando testati con il presente metodo alla concentrazione di 100 $\mu\text{g/ml}$:

4-Acetilamofenolo	Deossicorticosterone	(+) 3,4-Metilenediossi-	Prednisolone
Acetofenetidina	Dextrometorfan	amfetamine	Prednisone
N-Acetilprocainamide	Diazepam	(+) 3,4-Metilenediossi-	Procaina
Acido acetilsalicilico	Diclofenac	metamfetamina	Prometazina
Aminopirina	Diffunisal	Metifenidato	Prometazina
Amiripitilina	Digossina	Metiprilon	D,L-Propranololo
Amobarbital	Difenidramina	Morfina-3-	D-Propossifene
Amoxicillina	Doxilamina	b-D-glucuronide	D-Pseudoefedrina
Ampicillina	Ecgonina idrocloruro	Acido nalidixico	Chinidina
Acido L-ascorbico	Ecgonina metilestere	Nalorfina	Chinino
D,L-Amfetamina	(-)- ψ -Efedrina	Naloxone	Ranitidina
L-Amfetamina	Eritromicina	Naltrexone	Acido salicilico
Apomorfina	b-Estradiolo	Naprossene	Secobarbital
Aspartame	Estrone-3-solfato	Niacinamide	Serotonin (5-Idrossitiramina)
Atropina	Etih-p-aminobenzoato	Nifedipina	Sulfametazina
Acido benzilico	Fenoprofene	Notcodeina	Sulfindac
Acido benzoico	Furosemide	Noretindrone	Temazepam
Benzolecgonina	Acido gentisico	D-Norpropossifene	Tetraciclina
Benzfetamina	Emoglobina	Noscipina	Tetraidrocortisone,
Bilirubina	Iralazina	D,L-Octopamina	3-Acetoato
(\pm)-Bromfeniramina	Idroclorotiazide	Acido ossalico	Tetraidrocortisone
Caffeina	Idrocodone	Oxazepam	3 (b-D-glucuronide)
Cannabidiolo	Idrocortisone	Acido ossolinico	Tetraidrozolina
Cloralidrato	Acido O-idrossipirurico	Ossicodone	Tebaine
Cloramfenicolo	3-Idrossitiramina	Ossimetazolina	Tiamina
Clordiazepossido	Ibuprofen	p-idrossi-	Tioridazina
Clorotiazide	Imipramina	metamfetamina	D, L-Tiroxina
(\pm) Clorfeniramina	Iproniazide	Papaverina	Tolbutamina
Clorpromazina	(\pm) - Isoproterenolo	Penicillina-G	Triamterene
Clorochina	Isosuprina	Pentazocina	Trifluoperazina
Colesterolo	Ketamina	Pentobarbital	Trimethoprim
Ciomipramina	Ketoprofene	Perfenazina	Triprammina
Clonidina	Labelalolo	Fenciclidina	Triptamine
Cocaina idrocloruro	Levorfanolo	Fenelzina	D, L-Triptofano
Codeina	Loperamide	Fenobarbital	Tiramina
Cortisone	Maprotilina	Fentermina	D, L-Tirosina
(-) Cotinina	Meprobamato	L-Fenilefrina	Acido urico
Creatinina	Metadone	b-Fenilettilamina	Verapamil
	Metossifenamina	Fenilpropanolamina	Zomepirac

BIBLIOGRAFIA

- Hawks RL, CN Chiang. Urine Testing for Drugs of Abuse. National Institute for Drug Abuse (NIDA), Research Monograph 73, 1986
- Baselt RC. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 2nd Ed. Biomedical Publ., Davis, CA. 1982; 488

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:

C2183 MARIJUANA DRUG TEST (THC)

20 Test



Bio Plastic Snc - 00100 Roma

Numero: RP5001002
Data effettiva: 2013-05-15