



CONFRONTO TRA METODICA CEDIA E LC-MS PER IL DOSAGGIO DELLE SOSTANZE D'ABUSO

D'Aurora A.¹, Del Fine P.¹, Indino F.², Paladini M.², Palumbieri V.³

1. U.O.C. Patologia Clinica di Chieti, ASL 02 ABRUZZO – 2. U.O. Patologia Clinica e Microbiologia del P.O. "Vito Fazzi", ASL Lecce – 3. Patologia Clinica Ospedale San Timoteo Termoli, ASREM

INTRODUZIONE

L'articolo 187 del Codice della Strada "Guida in stato di alterazione psico-fisica per uso di sostanze stupefacenti", ha l'obiettivo di garantire l'idoneità alla guida, affinché si possa condurre un veicolo con sicurezza. Da questo si comprende l'importanza della determinazione di sostanze stupefacenti o psicotrope nella matrice biologica di colui che viene sottoposto a controllo da parte delle forze dell'ordine oppure che provoca un incidente mortale o lesioni gravi, che è regolata dall'articolo stesso. Il laboratorio ricopre quindi un ruolo chiave in questa fase, per cui è fondamentale prestare attenzione alla matrice biologica da utilizzare, alla tempistica di campionamento, alla metodica analitica utilizzata e alla scelta dei valori soglia. In particolare per quanto riguarda la metodica analitica utilizzata, per lo screening vengono utilizzate metodologie immunochimiche, successivamente le analisi di conferma, le quali hanno validità medico-legale, sono eseguite mediante metodi di cromatografia accoppiati a rivelatori di massa. Uno screening ha lo scopo di identificare tutti i soggetti positivi che poi dovranno essere sottoposti a test di conferma. Il test di screening ha infatti una alta sensibilità, scarsa specificità, per cui è soggetto anche a interferenze dovute ad altre sostanze, ma è eseguibile in urgenza e ha costi bassi; il test di conferma, invece, è altamente sensibile, specifico e deve essere eseguito da personale specializzato. Per valutare l'assunzione di sostanze stupefacenti nel momento in cui si è eseguito il prelievo viene utilizzato il sangue come matrice.

Questo lavoro si pone dunque l'obiettivo di confrontare la metodica CLIA con la LC-MS per l'analisi di sostanze stupefacenti, al fine di garantire l'adeguata esecuzione del dosaggio stesso.

OBIETTIVO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è quello di confrontare la metodica utilizzata come screening (CEDIA) con quella di conferma (LC-MS), in quanto il settore di farmacotossicologia ospedaliera deve poter eseguire determinazioni di sostanze d'abuso su diverse matrici, al fine di produrre dati che possano essere usati in ambito diagnostico, medico-legale e forense.

MATERIALI E METODI

Sono stati presi in considerazione 7 pazienti. I campioni per l'esecuzione dell'analisi di screening sono stati raccolti in provette con K3EDTA e il plasma ottenuto dopo la centrifugazione è stato sottoposto a metodica CEDIA in singolo; per l'esecuzione dell'analisi di conferma, invece, è stato utilizzato sangue intero che è stato sottoposto a LC-MS e le misurazioni sono state eseguite in doppio. Per l'analisi dei dati ottenuti in doppio è stata considerata la loro media. In particolare è stata presa in considerazione la cocaina in 7 pazienti. L'Illab Taurus è lo strumento usato per l'analisi con tecnologia CEDIA. Recipe LC-MS/MS è stato usato per l'analisi di conferma. I dati sono stati rappresentati con il Bland-Altman Plot e il Box and Whisker Plot e l'analisi è stata eseguita calcolando parametri come Differenza, Media, Bias, Deviazione Standard, Lower LOA (Limit of Agreement), Upper LOA (Limit of Agreement), Mediana e Quartili, necessari alla rappresentazione grafica.

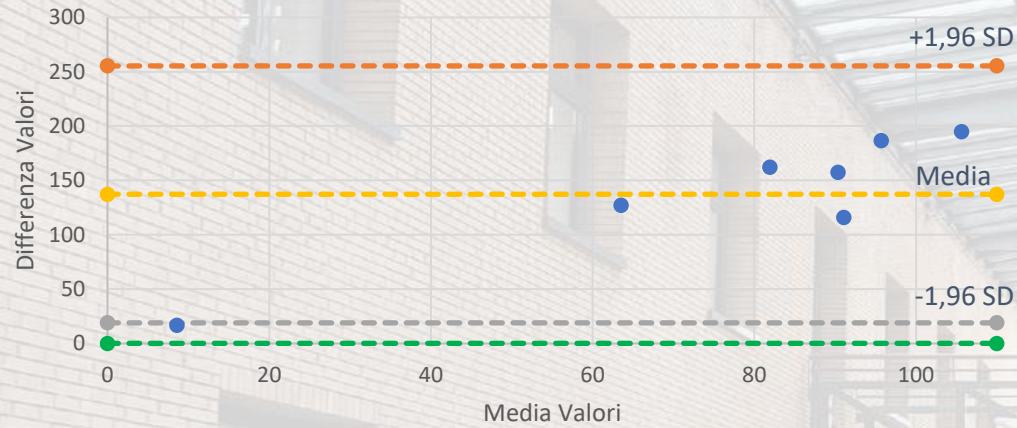


Grafico 1. Bland-Altman Plot per confronto tra due metodiche per il dosaggio della Cocaina

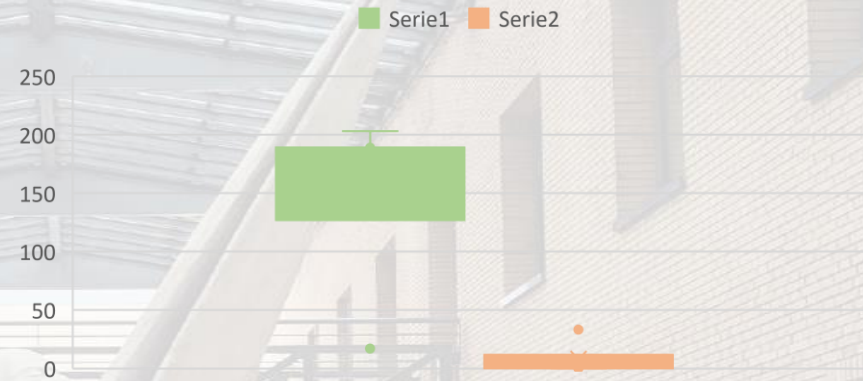


Grafico 2. Box and Whisker Plot per confronto tra due metodiche per il dosaggio della Cocaina

SCREENING	LC-MS 1	LC-MS 2	LC-MS	DIFFERENZA	MEDIA
169	11,65	11,74	11,695	157,305	90,3475
127	0	0	0	127	63,5
189	2,4		2,4	186,6	95,7
163	0,88		0,88	162,12	81,94
149	33,17		33,17	115,83	91,085
17	0,09	0,22	0,155	16,845	8,5775
203	8,09	8,39	8,24	194,76	105,62

Tabelle riportanti i dati ottenuti dalla misurazione e tutti i dati necessari all'interpretazione grafica

BIAS	137,208571
STANDARD DEVIATION	60,3113774
LOWER LOA	18,9982718
UPPER LOA	255,418871

Valori	SCREENING	LC-MS
Valore Minimo	17	0
Primo Quartile	138	0,5175
Mediana	163	2,4
Terzo Quartile	179	9,9675
Valore Massimo	203	33,17



RISULTATI

Dal Grafico 1, un Bland-Altman Plot, si può notare che delle 7 misurazione fatte, con entrambe le metodiche analitiche per il dosaggio della cocaina (CEDIA e LC-MS), 0 di esse ricadono al di fuori degli estremi dell'intervallo di confidenza calcolato al 95% (Media delle Differenze $\pm 1,96$ *Standard Deviation). Per valutare che i due metodi siano interscambiabili bisognerebbe analizzare i risultati ottenuti sulla base dei limiti di agreement (accordo) nel contesto clinico. L'ampiezza massima dell'intervallo di confidenza che permette di determinare l'interscambiabilità delle tecniche, va quindi stabilita secondo fattori clinici e fattori teorici. Se si determina, dunque, che l'ampiezza dell'intervallo di confidenza (+18,998; +255,419) non è rilevante dal punto di vista clinico i due metodi possono essere utilizzati interscambiabilmente. Altre considerazioni che possono essere fatte dal grafico è l'andamento dei punti: si può notare, infatti, che i punti non sono distribuiti attorno allo 0, dimostrando che i metodi non sono equivalenti.

Il Grafico 2, invece, è un Box and Whisker Plot, il quale permette di visualizzare la distribuzione dei dati attraverso i loro quartili. I valori che possono essere osservati sono massimo, minimo, mediana, primo quartile e terzo quartile. Da questo grafico si possono innanzitutto notare le "boxes", le mediane non si sovrappongono tra le due scatole. Successivamente si possono osservare i "whiskers"; la distribuzione dei dati del dosaggio della ciclosporina con dosaggio CEDIA (Serie 1) è più ampia rispetto a quella di LC-MS (Serie 2): ciò implica una maggiore variabilità dei dati ottenuti con metodica CEDIA rispetto alla LC-MS.

Dalla valutazione di questi grafici si può evincere quindi che c'è una differenza tra i due dosaggi della cocaina eseguiti con due metodiche analitiche diverse.

CONCLUSIONI

Dalla comparazione delle due metodiche analitiche per il dosaggio della Cocaina sono state riscontrate delle differenze. Questo potrebbe confermare lo scopo per cui queste due metodiche sono utilizzate. La CEDIA, infatti, ha lo scopo di trovare tutti i soggetti positivi ad una determinata sostanza, per questo ha anche una variabilità di dati maggiore rispetto alla LC-MS che è invece una metodica di conferma. La metodica LC-MS, inoltre, come descritto nell'introduzione, è un metodo più sensibile e specifico, dato che può valutare tutte le sostanze ed eventuali metaboliti contenuti in un campione, d'altro canto ha dei costi maggiori, di conseguenza viene utilizzato per confermare tutti coloro che sono risultati positivi ai test di screening. Per eseguire ulteriori analisi potrebbero essere presi in considerazione più pazienti al fine di condurre un migliore confronto.