

SCREENING RAPIDO DI 1° LIVELLO PER SOSTANZE D'ABUSO NORMATE
nelle matrici urina/cheratina/sangue intero in LC/MS

Cod. SC1000





Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD).

La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.



EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com

N° 002		11/2024
--------	--	---------

INTRODUZIONE

La determinazione delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici (soprattutto in urina) viene generalmente effettuata in prima istanza usando tecniche immunometriche che si avvalgono della reazione antigene-Anticorpo e successiva marcatura con vari reagenti. Queste metodologie sono considerate di screening.

Il presente metodo consente di determinare in maniera semiquantitativa la Morfina, la Codeina, la 6-Monoacetilmorfina, il 3,4-MDA, il 3,4-MDE, il 3,4-MDMA, l'MBDB, l'Amfetamina, la Metamfetamina, la Benzoilecgonina, la Cocaina, il Metadone, l'EDDP, la Norbuprenorfina, la Buprenorfina, la Cocaetilene, l'Ecgonina Metil Estere, il delta-9-THC, il delta-9-THC COOH, l'11-OH-THC, la Diidrocodeina, la Ketamina, l'Ossicodone, la Morfina-6-beta-glucuronide, la Morfina-3-beta-glucuronide, la Norbuprenorfina glucuronide, la Codeina-6-beta-glucuronide, il THC-COOH glucuronide, la Buprenorfina glucuronide con lettura in LC-MS/MS.

Questo metodo ha lo scopo di presentarsi come alternativa ai classici metodi di screening in immunoenzimatica, permettendo di effettuare un'analisi semiquantitativa sul pannello di sostanze di abuso normale sulle matrici urinaria, cheratinica e sangue intero.

CONTENUTO DELLA CONFEZIONE (200 TEST)

Reagente A – Soluzione Diluente	1 x 50 ml
Reagente B – Soluzione Stabilizzante per urine	1 x 100 ml
Reagente C – Standard Interni deuterati per urine	1 x 4 ml
Reagente D – Soluzione Stabilizzante per cheratina	1 x 100 ml
Reagente E – Standard Interni deuterati per cheratina	1 x 10 ml
Reagente F – Soluzione di Lavaggio dei capelli	1 x 400 ml
Reagente G – Soluzione Stabilizzante per sangue intero	1 x 20 ml
Reagente H – Standard Interni deuterati per sangue intero	1 x 60 ml
Reagente M1 – Fase Mobile M1	2 x 500 ml
Reagente M2 – Fase Mobile M2	4 x 500 ml

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2-8 °C, eccetto il Reagente C, il Reagente E ed il Reagente H che vanno conservati a -20 °C.

Per quanto riguarda la modalità di conservazione dello Standard di Calibrazione Liofilo, essa è descritta nella scheda tecnica dedicata.

Valori di cut-off di screening e di conferma nell'urina.

Classe di sostanze o sostanza (sostanza target per lo screening)	Cut-off screening (ng/ml)	Cut-off conferma (ng/ml)
Oppiacei (morfina libera) morfina totale ^a codeina totale ^a 6-acetilmorfina	300	100 100 10
Cocaina metabolita (benzoilecgonina) cocaina benzoilecgonina	300	100 100
Amfetamina e congeneri amfetamina metamfetamina	500	200 200
3,4-Metilendiossimetamfetamina e congeneri MDMA MDA MDEA MBDB	500	200 200 200 200
Metadone (metadone) metadone EDDP	300	100 100
Cannabinoidi (THC-COOH) THC-COOH	50	15
Buprenorfina buprenorfina totale ^a norbuprenorfina totale ^a	5	5 5

a il valore è riferito al campione sottoposto a idrolisi (la verifica dell'efficienza della reazione di idrolisi su morfina-3-glucuronide in fase di validazione del metodo è obbligatoria).

Rif. LINEE GUIDA PER LE STRUTTURE DOTATE DI LABORATORI PER GLI ACCERTAMENTI DI SOSTANZE D'ABUSO CON FINALITA'

TOSSICOLOGICO-FORENSI E MEDICO-LEGALI SU CAMPIONI BIOLOGICI PRELEVATI DA VIVENTE

Revisione n. 4 del 6 dicembre 2012 a cura della Commissione Qualità dell'Associazione Scientifica "Gruppo Tossicologi Forensi Italiani" (GTFI)

Tabella 1. Concentrazioni soglia (cut-off) raccomandate dalla Society of Hair Testing (SOHT) e stabilite dal Provvedimento del 18/9/2008 per le principali sostanze d'abuso nelle analisi di screening e conferma sui capelli.

Cut-off di screening secondo le raccomandazioni SOHT			Cut-off di conferma secondo le raccomandazioni SOHT	Cut-off di conferma secondo il provvedimento 18/09/2008 sui laboratori con mansioni a rischio
Classe di sostanza	Cut-off (ng/mg)	Analita	Cut-off (ng/mg)	Cut-off (ng/mg)
Amfetamine	0,2	Amfetamina	0,2	0,2
		Metamfetamina	0,2	0,2
		MDA	0,2	0,2
		MDMA	0,2	0,2
		MDEA	-	0,2
Cannabinoidi	0,1	THC	0,05	0,1
		THC-COOH	0,0002	-
Cocaina	0,5	Cocaina	0,5	0,2
		BEG, EME, CE, NC*	0,05	0,05
Oppiacei	0,2	Morfina	0,2	0,2
		Codeina	0,2	0,2
		6-MAM [§]	0,2	0,2
Metadone	0,2	Metadone	0,2	0,2
		EDDP	0,05	-
Buprenorfina	0,01	Buprenorfina	0,01	0,05
		Norbuprenorfina	0,01	-

* BEG: benzoilecgonina, EME: ecgoninametilestere, CE: cocaetilene, NC: norcocaina
[§] 6-MAM – 6-monoacetilmorfina

LINEE GUIDA PER LA DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE D'ABUSO NELLA MATRICE PILIFERA
A cura di Simona Pichini e Roberta Pacifici

Per il sangue, non ci sono linee guida che indicano certi livelli di cut-off per lo screening di primo livello

Ogni laboratorio dovrebbe definire i propri cut off di screening in funzione della sensibilità e della specificità diagnostiche desiderate.

Il presente metodo è stato sviluppato considerando un valore di cut off per lo screening di 10 ng/mL per i cannabinoidi, 20 ng/mL per gli oppiacei, il metadone e la classe della cocaina e di 40 ng/mL per la classe delle anfetamine.

DOTAZIONE STRUMENTALE MINIMA RICHIESTA

LC-MS/MS Triplo Quadrupolo

Interfaccia ESI

DOTAZIONE OPZIONALE

Autocampionatore
Computer gestionale.

MODALITÀ DI RACCOLTA DELLE *URINE E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE URINARIO*

Prelevare 10 ml urina

Stabile per circa 3 mesi a –20 °C

Centrifugare le urine prima di processarle

MODALITÀ DI RACCOLTA DEL *SANGUE INTERO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE EMATICO*

Provetta con anticoagulante EDTA

Stabile per circa 4 settimane a 2 – 8 °C o
4 mesi a –20°C.

MODALITÀ DI RACCOLTA DEI CAPELLI E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE CHERATINICO

Lunghezza raccomandata: 5 cm, partendo dal cuoio capelluto. Viene recisa una ciocca, non strappata (il bulbo non ha nessuno scopo al fine dei presenti accertamenti) nella regione del vertice posteriore del capo, di almeno 200 mg che viene suddivisa in 2 aliquote di simile peso (A e B) di ognuna delle quali viene fissata l'estremità prossimale. Tali aliquote vengono inserite in contenitori separati non trasparenti recanti tappi a chiusura ermetica e sigillati con nastro inamovibile e conservati a temperatura ambiente.

Il taglio del capello deve essere eseguito con forbici pulite con una piccola quantità di alcol e ben asciutte.

MODALITÀ DI RACCOLTA DEI PELI E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE PILIFERO

È necessario tagliare 200 mg di peli dalla regione pubica; i peli così raccolti vengono suddivisi in due aliquote (A e B).

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
SC1006U	Calibratore urinario per Screening Sostanze d'Abuso normale	4 x 1 ml
SC1009U	Controllo urinario per Screening Sostanze d'Abuso normale – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 1 ml
SC1006H	Calibratore in matrice Cheratinica per Screening Sostanze d'Abuso normale	1 x 1000 mg/ 1 x 3 x 0,5 ml
SC1009H	Controllo in matrice Cheratinica per Screening Sostanze d'Abuso normale – Livelli 1 e 2	1 x 1500 mg/ 1 x 3 x 0,4 ml/ 1 x 25 ml
SC1006B	Calibratore su sangue intero per Screening Sostanze d'Abuso normale	4 x 1 ml
SC1009B	Controllo su sangue intero per Screening Sostanze d'Abuso normale – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 1 ml
SK1000	Starter kit per Sostanze d'Abuso normale	35 x 1 ml
TF25402052130	Colonna Analitica Hypersil GOLD PFP (50 x 2,1mm x 1,9um)	1 Pz
Z1636/26	Provette Pirex da 10 ml con tappo SWL (per idrolisi, fino a 300 °C-lavabili e riutilizzabili)	1 x 40 Pz
L-30-210	Eppendorf da 1,5 ml con tappo	1 x 1000 Pz
S51843550	Vials di vetro chiaro a volume ridotto (forma a calicetto)	1 x 100 Pz
S51820717	Tappi per Vials di vetro chiaro a volume ridotto (forma a calicetto)	1 x 100 Pz

PROCEDURA ANALITICA PER MATRICI URINARIE

Aggiungere in sequenza:

- 450 µl di **Reagente B – Soluzione Stabilizzante per urina**
- 50 µl di Campione urinario/Calibratore/Controlli
- 20 µl di **Reagente C – Soluzione Standard interni deuterati per urina**

INIEZIONE

- Iniettare 5 µl della soluzione nel sistema LC/MS

PREPARAZIONE dei Campioni incogniti

FASE 1

Lavare i capelli/peli integri dentro una provetta di vetro da 10 ml con 2 ml di **Reagente F – Soluzione Lavaggio del capello**

Chiudere ermeticamente la provetta con il tappo

Vortex per 1 minuto

Centrifugare a 3.500 rpm per 5 minuti

Aprire la provetta di vetro

FASE 2

Portare a secco il solvente con l'ausilio di un leggero flusso di elio o di azoto ponendo attenzione a far rimanere il capello/pelo sul fondo della provetta. In alternativa prelevare, con una pinza pulita con Acetone (non fornito nel kit), il capello/pelo dalla provetta ed appoggiarlo su carta assorbente finché non è completamente asciutto. In questo ultimo caso la carta assorbente va cambiata per ogni campione.

Ripetere le Fasi 1 e 2 per due volte consecutive

FASE 3

Tagliare i capelli/peli, lavati ed asciugati, in segmenti di 1-2 cm con forbici pulite con Acetone (non fornito nel kit)

FASE 4

Pesare un'aliquota di campione, compresa tra 20 e 50 mg a seconda della disponibilità del campione, in una provetta di vetro in pyrex con tappo a vite pulita e precedentemente denominata.

PROCEDURA ANALITICA PER MATRICI CHERATINICHE

FASE 1

Pesare 50 mg di Campione in matrice cheratinica/Calibratore/Controlli direttamente in provette idonee per idrolisi

FASE 2

Aggiungere 500 µl di **Reagente D – Soluzione Stabilizzante per cheratina** e 50 µl di **Reagente E – Soluzione Standard Interni deuterati per cheratina**

FASE 3

Incubare 1 ora a 100°C

INIEZIONE

- Iniettare 2 µl della soluzione in HPLC.

PROCEDURA ANALITICA PER MATRICE SANGUE INTERO

FASE 1

Aggiungere in sequenza:

- 100 µl di Campione di Sangue intero/Calibratore/Controlli
- 300 µl di **Reagente H – Soluzione Standard interni per Sangue intero**

FASE 2

Centrifugare a 14.000 rpm per 10 minuti

FASE 3

Prelevare 100 µl di surnatante ed aggiungere 100 µl di **Reagente G – Soluzione Stabilizzante per Sangue intero**

INIEZIONE

- Iniettare 5 µl della soluzione in HPLC

SCREENING DI PRIMO LIVELLO in LC/MS - Avvertenze

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova Hypersil Gold PFP (50 x 2,1 mm, 1,9 µm), termostata a 40°C. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Metanolo (20 : 80 v/v) al flusso di 300 µl / minuto. Condizionare ulteriormente fluendo una soluzione di H₂O : Fase Mobile M2 (95 : 5 v/v) al flusso di 400 µl per 15 minuti. **Non riciclare i liquidi di lavaggio. Due iniezioni di 50% Acqua di grado HPLC / 50% Acetonitrile prima di procedere alle serie analitiche.**

NON è possibile fare analisi a ricircolo di fase.

Se la T Amb del Laboratorio è > 20 °C si consiglia di conservare a 2-8 °C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA DELLA COLONNA

Flussare una soluzione di H₂O : Metanolo (20 : 80 v/v) per 30 minuti scaricandola. La colonna va stoccata in questa soluzione.

LAVAGGIO DELL'AGO DI INIEZIONE

Lavare l'ago di iniezione con Metanolo.

SETTAGGIO DELGRADIENTE

Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	FLUSSO (µl/min)
0.2	95	5	400
8.0	25	75	400
8.1	0	100	400
10.0	0	100	400
10.1	95	5	400
15.0	95	5	400



eureka kit



EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com