

ARK™ HS Benzodiazepine II Assay

Leggere attentamente questo foglietto illustrativo di ARK Diagnostics, Inc. prima di effettuare il dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay ed attenersi scrupolosamente alle istruzioni ivi riportate. Il dosaggio rappresenta una procedura analitica di screening semplice e rapida per la rilevazione di benzodiazepine nell'urina. L'affidabilità dei risultati analitici è garantita soltanto se le istruzioni del foglietto illustrativo vengono seguite attentamente.

Servizio Clienti


ARK Diagnostics, Inc.

48089 Fremont Blvd
 Fremont, CA 94538 USA
 Tel.: 1-877-869-2320
 Fax: 1-510-270-6298
 customersupport@ark-tdm.com
 www.ark-tdm.com



Emergo Europe
 Prinsessegracht 20
 2514 AP The Hague
 The Netherlands

Legenda dei simboli utilizzati

	Codice del lotto	 YYYY-MM-DD	Utilizzare entro/Data di scadenza
	Numero di catalogo		Fabbricante
	Mandatario		Marchio CE
	Consultare le istruzioni per l'uso	 	Reagente 1/Reagente 2
	Limiti di temperatura		Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
Rx Only	Uso consentito esclusivamente su prescrizione		

© 2021, ARK Diagnostics, Inc.

 Reagent Kit  5073-0001-00

 Reagent Kit  5073-0001-01

 Reagent Kit  5073-0001-02

1 Denominazione

ARK™ HS Benzodiazepine II Assay

2 Finalità d'uso

ARK HS Benzodiazepine II Assay è un immunodosaggio previsto per la determinazione qualitativa e/o semiquantitativa di benzodiazepine in campioni di urina umana a concentrazioni di cutoff di 100 ng/mL e 200 ng/mL. Il dosaggio è previsto per l'uso nei laboratori con analizzatori di chimica clinica automatizzati. Il presente dispositivo diagnostico *in vitro* può essere utilizzato esclusivamente su prescrizione.

La metodica d'analisi semiquantitativa è impiegata per (1) consentire ai laboratori di determinare una diluizione appropriata dei campioni per la conferma dei risultati con un metodo di conferma, quale ad esempio la gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) o la cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) ovvero (2) consentire ai laboratori di determinare le procedure per il controllo di qualità.

Il dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay fornisce soltanto un risultato analitico preliminare. Utilizzare un metodo chimico alternativo più specifico a conferma del risultato analitico positivo. Il metodo di conferma preferito è la gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) o la cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS). L'interpretazione di qualsiasi risultato analitico deve essere oggetto di considerazioni cliniche e del giudizio professionale medico, in particolare se i test preliminari hanno fornito risultati positivi.

3 Riassunto e spiegazione del test

Le benzodiazepine appartengono a un'ampia classe di farmaci depressivi del sistema nervoso centrale noti come sedativo-ipnotici.¹ Sono prescritte come ansiolitici, sonniferi, anticonvulsivanti, miorilassanti e sono diffusamente impiegate anche come preanestetico e per integrare, indurre e mantenere l'anestesia.^{1,2,3}

Sebbene siano prescritte con frequenza, le benzodiazepine sono anche oggetto di abuso.²⁻⁴ L'uso cronico di benzodiazepine può causare dipendenza fisica, con sintomi di astinenza quali insonnia, agitazione, irritabilità, tensione muscolare e, nei casi più gravi, allucinazioni, psicosi e crisi convulsive.^{1,2}

Il dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay è concepito per rilevare un'ampia gamma di composti benzodiazepinici e di metaboliti, senza bisogno di pretrattamento dei campioni con glucuronidasi.

4 Principi del metodo

ARK HS Benzodiazepine II Assay è un immunodosaggio enzimatico omogeneo utilizzato per l'analisi di benzodiazepine nell'urina umana. Il dosaggio è basato sulla competizione tra le benzodiazepine presenti nel campione e le benzodiazepine marcate con glucosio-6-fosfato deidrogenasi ricombinante (rG6PDH) per i siti di legame anticorpale. Quando quest'ultimo si lega all'anticorpo, l'attività enzimatica diminuisce. In presenza di benzodiazepine nel campione, l'attività enzimatica aumenta ed è direttamente correlata alla concentrazione di benzodiazepine. L'enzima attivo converte la nicotinamide adenina dinucleotide (NAD) in NADH in presenza di glucosio-6-fosfato (G6P), con conseguente variazione dell'assorbanza che viene misurata con metodo spettrofotometrico. La G6PDH endogena non interferisce poiché il coenzima NAD agisce unicamente con l'enzima batterico usato nel dosaggio.

5 Reagenti

REF	Descrizione del prodotto	Quantità/Volume
5073-0001-00	ARK HS Benzodiazepine II Assay Reagente R1 – Anticorpo/Substrato Anticorpi monoclonali di coniglio anti-benzodiazepine, glucosio-6-fosfato, nicotinamide adenina dinucleotide, sieroalbumina bovina, sodio azoturo e stabilizzanti	1 x 28 mL
	Reagente R2 – Enzima Derivato di benzodiazepine marcato con glucosio-6-fosfato deidrogenasi ricombinante (rG6PDH), sieroalbumina bovina, tampone, sodio azoturo e stabilizzanti	1 x 14 mL

REF	Descrizione del prodotto	Quantità/Volume
5073-0001-01	ARK HS Benzodiazepine II Assay Reagente R1 – Anticorpo/Substrato Anticorpi monoclonali di coniglio anti-benzodiazepine, glucosio-6-fosfato, nicotinamide adenina dinucleotide, sieroalbumina bovina, sodio azoturo e stabilizzanti	1 x 115 mL
	Reagente R2 – Enzima Derivato di benzodiazepine marcato con glucosio-6-fosfato deidrogenasi ricombinante (rG6PDH), sieroalbumina bovina, tampone, sodio azoturo e stabilizzanti	1 x 58 mL

REF	Descrizione del prodotto	Quantità/Volume
5073-0001-02	ARK HS Benzodiazepine II Assay Reagente R1 – Anticorpo/Substrato Anticorpi monoclonali di coniglio anti-benzodiazepine, glucosio-6-fosfato, nicotinamide adenina dinucleotide, sieroalbumina bovina, sodio azoturo e stabilizzanti	1 x 500 mL
	Reagente R2 – Enzima Derivato di benzodiazepine marcato con glucosio-6-fosfato deidrogenasi ricombinante (rG6PDH), sieroalbumina bovina, tampone, sodio azoturo e stabilizzanti	1 x 250 mL

Manipolazione e conservazione dei reagenti

I reagenti ARK HS Benzodiazepine II Assay vengono forniti in stato liquido, pronti per l'uso e possono essere utilizzati immediatamente dopo essere stati tolti dal frigorifero. Quando non vengono utilizzati, i reagenti devono essere conservati a 2-8°C, in posizione verticale e chiusi ermeticamente con il tappo. Se conservati secondo le istruzioni, i reagenti si mantengono stabili fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Non congelare i reagenti. Evitare l'esposizione prolungata a temperature superiori a 32°C. **Se i reagenti non vengono conservati correttamente, le prestazioni del dosaggio possono risultare compromesse.**

I prodotti ARK HS Benzodiazepine II contengono $\leq 0,09\%$ di sodio azoturo. A titolo precauzionale, le tubazioni e la strumentazione interessate devono essere risciacquate adeguatamente con acqua, per ridurre il possibile accumulo di azidi metalliche esplosive.

6 Avvertenze e precauzioni

- Per uso diagnostico *in vitro*. Uso consentito esclusivamente su prescrizione. *Attenzione: conformemente alla normativa federale statunitense, la vendita del presente dispositivo è riservata esclusivamente ai medici o su prescrizione medica.*
- I reagenti **R1** e **R2** sono forniti come kit combinato e non devono essere utilizzati in modo intercambiabile con i reagenti contrassegnati da numeri di lotto differenti.
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.
- I reagenti contengono $\leq 0,09\%$ di sodio azoturo.

7 Prelievo e preparazione dei campioni per l'analisi

- Va utilizzato un campione di urina umana. Trattare come materiale potenzialmente infettivo.
- Raccogliere l'urina utilizzando coppette e procedure di campionamento standard. Prestare attenzione a preservare l'integrità chimica e fisica del campione di urina dal momento della raccolta fino all'esecuzione del dosaggio, ivi compreso il trasporto. Si consiglia di utilizzare campioni di urina freschi.
- Tappare il campione di urina subito dopo la raccolta, conservarlo in frigorifero a 2-8°C ed eseguire il dosaggio entro 7 giorni dalla raccolta. Se il dosaggio non viene eseguito entro 7 giorni, conservare il campione di urina congelato a -20°C.^{5,6}
- Per assicurare l'integrità del campione, non provocare la formazione di schiuma ed evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.
- I campioni congelati vanno scongelati e miscelati accuratamente prima dell'analisi.
- Centrifugare i campioni molto torbidi o contenenti sostanze particolate visibili prima dell'analisi.

- La presenza di bolle d'aria o schiuma nei campioni può determinare un volume insufficiente di campione e risultati falsamente bassi.
- Raccogliere un altro campione per il test se si sospetta un'adulterazione del campione. L'adulterazione dei campioni di urina può influire sui risultati del test.

8 Procedura

Materiali forniti

ARK HS Benzodiazepine II Assay – **REF** 5073-0001-00, 5073-0001-01 o 5073-0001-02

Materiali necessari – forniti a parte

ARK HS Benzodiazepine II Calibrator (Set) – **REF** 5073-0002-00

ARK HS Benzodiazepine II Calibrator A (Negative) – **REF** 5073-0002-01

ARK HS Benzodiazepine II Calibrator B (100 ng/mL Cutoff) – **REF** 5073-0002-02

ARK HS Benzodiazepine II Calibrator C (200 ng/mL Cutoff) – **REF** 5073-0002-03

ARK HS Benzodiazepine II Control (75 / 125 ng/mL) – **REF** 5073-0003-00

ARK HS Benzodiazepine II Control (150 / 250 ng/mL) – **REF** 5073-0003-01

Strumenti

È possibile che i reagenti **R1** e **R2** debbano essere trasferiti in un contenitore del reagente specifico per l'analizzatore, prima dell'uso. Evitare la contaminazione crociata tra **R1** e **R2**. Per la manutenzione giornaliera fare riferimento al manuale d'impiego specifico dello strumento. Per la programmazione del dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay consultare la scheda tecnica specifica dell'analizzatore o contattare il Servizio clienti.

Sequenza analitica

Per l'esecuzione o la calibrazione del dosaggio fare riferimento al manuale d'impiego specifico dello strumento.

Risultati qualitativi

Utilizzare il calibratore B da 100 ng/mL o il calibratore C da 200 ng/mL come calibratore di cutoff per differenziare i campioni negativi da quelli positivi. Analizzare i controlli ARK HS Benzodiazepine II basso (75 ng/mL) e alto (125 ng/mL) con il calibratore B di cutoff o analizzare i controlli ARK HS Benzodiazepine II basso (150 ng/mL) e alto (250 ng/mL) con il calibratore C di cutoff rispettivamente come negativi e positivi. Riportare i risultati analitici inferiori al valore del calibratore di cutoff applicabile come negativi. Riportare i risultati analitici pari o superiori al valore del calibratore di cutoff applicabile come positivi.

Risultati semiquantitativi

Eseguire una procedura di calibrazione a 5 punti; analizzare i calibratori in duplicato. Verificare la curva di calibrazione con i controlli di qualità ARK HS Benzodiazepine II basso e alto per il cutoff, conformemente al piano per

l'assicurazione della qualità stabilito dal proprio laboratorio. I campioni con risultati superiori al livello massimo del calibratore ARK HS Benzodiazepine II Calibrator (3000 ng/mL) possono essere diluiti con ARK HS Benzodiazepine II Calibrator A (urina negativa) e rianalizzati.

Quando ripetere la calibrazione

- Ogni qualvolta venga utilizzato un nuovo numero di lotto dei reagenti
- Se indicato dai risultati del controllo di qualità
- Se richiesto dai protocolli di laboratorio standard
- Una curva di calibrazione memorizzata è valida per almeno 15 giorni sulla base dei dati a sostegno.

Controllo di qualità (CQ) e calibrazione

Spetta ai laboratori stabilire le procedure CQ per il dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay. Tutti i controlli di qualità e i test devono essere eseguiti in conformità alle disposizioni locali e/o nazionali o ai requisiti per l'accreditamento.

Spetta a ciascun laboratorio stabilire i propri range per ogni nuovo lotto di controlli. I risultati dei controlli devono rientrare nei range stabiliti come determinato dalle procedure e linee guida di laboratorio. Il controllo ARK HS Benzodiazepine II Control è previsto per il controllo di qualità del dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay.

Nella modalità qualitativa il controllo basso deve essere negativo e il controllo alto deve essere positivo rispetto al calibratore di cutoff applicabile (100 ng/mL o 200 ng/mL).

9 Risultati e valori previsti

Per la conferma di un risultato positivo è necessario utilizzare un metodo di conferma più specifico, come LC-MS/MS o GC-MS.

Analisi qualitativa - Risultati negativi

Un campione con un risultato inferiore al valore del calibratore ARK HS Benzodiazepine II Calibrator B o ARK HS Benzodiazepine II Calibrator C di cutoff viene interpretato come negativo: il campione non contiene benzodiazepine o le concentrazioni di benzodiazepine presenti nel campione sono inferiori al livello cutoff applicabile per questo dosaggio.

Analisi qualitativa - Risultati positivi

Un campione con un risultato pari o superiore al valore del calibratore ARK HS Benzodiazepine II Calibrator B o ARK HS Benzodiazepine II Calibrator C di cutoff viene interpretato come positivo ad indicare la presenza di benzodiazepine.

Analisi semiquantitativa

Non è possibile determinare la concentrazione effettiva di benzodiazepine con questo dosaggio. I risultati semiquantitativi per i campioni positivi consentono al laboratorio di determinare una diluizione appropriata dei campioni per il metodo di conferma. I risultati semiquantitativi consentono altresì al laboratorio di stabilire

le procedure di controllo di qualità e di valutare la riproducibilità. I campioni con risultati superiori al livello massimo del calibratore ARK HS Benzodiazepine II Calibrator (3000 ng/mL) possono essere diluiti con ARK HS Benzodiazepine II Calibrator A (urina negativa) e rianalizzati.

I risultati di questo test devono essere sempre interpretati unitamente all'anamnesi del paziente, al quadro clinico e ad altri risultati, specialmente se il risultato preliminare è positivo.

10 Limiti

- Il dosaggio è destinato unicamente all'impiego con urina umana.
- I reagenti, i calibratori e i controlli del dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay sono stati concepiti per l'impiego combinato. Non è possibile assicurare prestazioni analoghe in caso di utilizzo di prodotti sostitutivi.
- Un risultato positivo al dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay indica soltanto la presenza di benzodiazepine e non è necessariamente correlato con l'entità degli effetti fisiologici e psicologici.
- L'interpretazione dei risultati deve tenere conto del fatto che le concentrazioni urinarie possono variare notevolmente in rapporto all'assunzione di liquidi e ad altre variabili biologiche.
- È possibile che sostanze diverse da quelle analizzate con lo studio di specificità diano luogo ad interferenze con il test e forniscano risultati falsi.

11 Caratteristiche specifiche di prestazione

Le seguenti caratteristiche di prestazione sono state raccolte con l'analizzatore automatizzato di chimica clinica Beckman Coulter AU680[®] utilizzando il dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay.

Precisione

Campioni di urina umana negativi, privi di farmaco, sono stati addizionati con etizolam (da 0,0 a 200,0 ng/mL per il cutoff di 100 ng/mL e da 0,0 a 400,0 ng/mL per il cutoff di 200 ng/mL). Ciascun livello è stato analizzato in quadruplicato due volte al giorno per 20 giorni (n = 160) e valutato qualitativamente e semiquantitativamente. I risultati sono riassunti nelle tabelle sottostanti.

Precisione qualitativa – cutoff di 100 ng/mL

Urina umana (ng/mL)	Cutoff % relativo	N. di risultati	Risultati precisione qualitativa
0,0	-100	160	160 negativi
25,0	-75	160	160 negativi
50,0	-50	160	160 negativi
75,0	-25	160	160 negativi
100,0	Cutoff	160	104 negativi; 56 positivi
125,0	+25	160	160 positivi
150,0	+50	160	160 positivi
175,0	+75	160	160 positivi
200,0	+100	160	160 positivi

Precisione semiquantitativa – cutoff di 100 ng/mL

Urina umana (ng/mL)	Cutoff % relativo	N. di risultati	Media (ng/mL)	Risultati precisione semiquantitativa
0,0	-100	160	1,1	160 negativi
25,0	-75	160	23,2	160 negativi
50,0	-50	160	50,5	160 negativi
75,0	-25	160	74,0	160 negativi
100,0	Cutoff	160	98,6	93 negativi; 67 positivi
125,0	+25	160	123,3	160 positivi
150,0	+50	160	145,2	160 positivi
175,0	+75	160	170,5	160 positivi
200,0	+100	160	187,6	160 positivi

Precisione qualitativa – cutoff di 200 ng/mL

Urina umana (ng/mL)	Cutoff % relativo	N. di risultati	Risultati precisione qualitativa
0,0	-100	160	160 negativi
50,0	-75	160	160 negativi
100,0	-50	160	160 negativi
150,0	-25	160	160 negativi
200,0	Cutoff	160	142 negativi; 18 positivi
250,0	+25	160	160 positivi
300,0	+50	160	160 positivi
350,0	+75	160	160 positivi
400,0	+100	160	160 positivi

Precisione semiquantitativa – cutoff di 200 ng/mL

Urina umana (ng/mL)	Cutoff % relativo	N. di risultati	Media (ng/mL)	Risultati precisione semiquantitativa
0,0	-100	160	1,1	160 negativi
50,0	-75	160	50,5	160 negativi
100,0	-50	160	98,6	160 negativi
150,0	-25	160	145,2	160 negativi
200,0	Cutoff	160	187,6	147 negativi; 13 positivi
250,0	+25	160	240,3	160 positivi
300,0	+50	160	293,2	160 positivi
350,0	+75	160	342,8	160 positivi
400,0	+100	160	391,1	160 positivi

Recupero analitico

Il recupero nell'intervallo del dosaggio è stato valutato utilizzando la modalità semiquantitativa. Campioni di urina umana negativi, privi di farmaco, sono stati addizionati con etizolam (3750,0 ng/mL) e sono state eseguite delle diluizioni proporzionali con urina umana priva di farmaco. Le concentrazioni di etizolam sono risultate comprese tra 25,0 e 3000,0 ng/mL. Ad ogni livello, il recupero percentuale è stato calcolato sulla base della concentrazione media (N=6) rispetto alla concentrazione prevista. I risultati sono riassunti nella tabella sottostante.

Concentrazione teorica (ng/mL)	Concentrazione media (ng/mL)	Recupero (%)
25,0	23,8	95,1
50,0	54,8	109,5
100,0	99,6	99,6
250,0	242,2	96,9
500,0	481,4	96,3
1000,0	951,9	95,2
1500,0	1422,4	94,8
2000,0	1929,9	96,5
2500,0	2333,7	93,3
3000,0	3107,7	103,6

Specificità analitica

Tutti i composti analizzati sono stati aggiunti a urina umana negativa, priva di farmaco e analizzati con il dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay sia nella modalità qualitativa che in quella semiquantitativa.

La reattività crociata dei seguenti composti strutturalmente correlati è stata valutata aggiungendo questi composti a urina umana negativa priva di farmaco per determinare la concentrazione minima che presenterebbe un risultato positivo approssimativamente equivalente ai valori di cutoff di 100 ng/mL o 200 ng/mL di etizolam. Queste concentrazioni sono state utilizzate per determinare la percentuale di reattività crociata secondo la formula:

Reattività crociata (%) = (concentrazione di cutoff / concentrazione minima della sostanza a reattività crociata che presenta un risultato positivo) x 100

Per i composti che non hanno fornito un risultato positivo, è stata utilizzata la concentrazione più elevata analizzata per calcolare la reattività crociata percentuale.

Composti strutturalmente correlati

Composti	Concentrazione approssimativamente equivalente al cutoff di 100 (ng/mL)	Reattività crociata al cutoff di 100 (%)	Concentrazione approssimativamente equivalente al cutoff di 200 (ng/mL)	Reattività crociata al cutoff di 200 (%)
α-OH-alprazolam	55	181,8	100	200,0
α-OH-midazolam	11	909,1	16	1250,0
α-OH-triazolam	20	500,0	35	571,4
2-OH-etilflurazepam	70	142,9	125	160,0
3-OH-flubromazepam	19	526,3	27	740,7
3-OH-fenazepam	15	666,7	22	909,1
4-OH-alprazolam	110	90,9	190	105,3
7-aminoclonazepam	40	250,0	75	266,7
7-aminoflunitrazepam	150	66,7	270	74,1
7-aminonimetazepam	600	16,7	1200	16,7
7-aminonitrazepam	400	25,0	800	25,0
Alprazolam	80	125,0	130	153,8
Bromazepam	140	71,4	270	74,1
Clordiazepossido	55	181,8	100	200,0
Clobazam	180	55,6	400	50,0
Clonazepam	100	100,0	180	111,1
Delorazepam	10	1000,0	15	1333,3
Demoxepam	100	100,0	180	111,1
Desalchilflurazepam	15	666,7	25	800,0

Composti	Concentrazione approssimativamente equivalente al cutoff di 100 (ng/mL)	Reattività crociata al cutoff di 100 (%)	Concentrazione approssimativamente equivalente al cutoff di 200 (ng/mL)	Reattività crociata al cutoff di 200 (%)
Clonazepam	350	28,6	800	25,0
Clorazepato	45	222,2	70	285,7
Descloroetizolam	450	22,2	900	22,2
Diazepam	65	153,8	100	200,0
Diclazepam	15	666,7	25	800,0
Estazolam	60	166,7	85	235,3
Flualprazolam	28	357,1	45	444,4
Flubromazepam	25	400,0	38	526,3
Flubromazolam	40	250,0	68	294,1
Flunitrazepam	450	22,2	850	23,5
Flurazepam	350	28,6	650	30,8
Alazepam	2.500	4,0	5.000	4,0
Ketazolam	2.200	4,5	4.000	5,0
Loprazolam	130	76,9	260	76,9
Lorazepam	12	833,3	16,5	1212,1
Lorazepam glucuronide	13	769,2	20	1000,0
Lormetazepam	17	588,2	23	869,6
Meclonazepam	36	277,8	57	350,9
Medazepam	250	40,0	500	40,0
Midazolam	16	625,0	25	800,0
N-desmetilclobazam	160	62,5	320	62,5
N-desmetilflunitrazepam	150	66,7	300	66,7
Nimetazepam	1.350	7,4	3.000	6,7
Nitrazepam	500	20,0	950	21,1
Norclorodiazepossido	75	133,3	120	166,7
Nordiazepam	43	232,6	57	350,9
Oxazepam	38	263,2	55	363,6
Oxazepam glucuronide	20	500,0	30	666,7
Fenazepam	15	666,7	20	1000,0
Prazepam	1.700	5,9	3.400	5,9
Pirazolam	350	28,6	700	28,6
Temazepam	85	117,6	130	153,8
Temazepam glucuronide	35	285,7	70	285,7
Tetrazepam	600	16,7	1.200	16,7
Triazolam	27	370,4	45	444,4

Interferenza

Composti strutturalmente non correlati

Concentrazioni elevate dei seguenti composti strutturalmente non correlati sono state aggiunte all'urina priva di farmaco e sono state analizzate nella modalità di analisi semiquantitativa. Le concentrazioni corrispondenti a 100 ng/mL e 200 ng/mL di etizolam sono state identificate e sono riportate nella seguente tabella. I composti che non hanno fornito un risultato positivo sono indicati come maggiori (>) della concentrazione più elevata analizzata. Quando aggiunti all'urina contenente etizolam alla concentrazione del controllo alto (125 ng/mL per il valore di cutoff di 100 ng/mL o 250 ng/mL per il valore di cutoff di 200 ng/ml), nessuno dei composti ha fornito un risultato negativo.

Composto	Concentrazione del composto approssimativamente equivalente al cutoff di 100 ng/mL (ng/mL)	Concentrazione del composto approssimativamente equivalente al cutoff di 200 ng/mL (ng/mL)
4-Idrossidiclofenac	>100.000	>100.000
6-Acetilcodeina	>100.000	>100.000
6-Acetil morfina	>100.000	>100.000
Acetaminofene	>100.000	>100.000
Acido acetilsalicilico	>500.000	>500.000
Amitriptilina	>100.000	>100.000
Amlodipina	>100.000	>100.000
Amobarbital	>100.000	>100.000
S-(+) amfetamina	>100.000	>100.000
Aripiprazolo	>100.000	>100.000
Benzoilecgonina	>100.000	>100.000
Bisoprololo	>100.000	>100.000
4-bromo-2,5-dimetossifenetilamina	>100.000	>100.000
Buprenorfina	>100.000	>100.000
Bupropione	>100.000	>100.000
Buspirone	>100.000	>100.000
Butabarbital	>100.000	>100.000
Caffeina	>500.000	>500.000
Cannabidiolo	>100.000	>100.000
Cannabinolo	>100.000	>100.000
Carbamazepina	>100.000	>100.000
Carisoprodol	>100.000	>100.000
Clorpromazina	>100.000	>100.000

Composto	Concentrazione del composto approssimativamente equivalente al cutoff di 100 ng/mL (ng/mL)	Concentrazione del composto approssimativamente equivalente al cutoff di 200 ng/mL (ng/mL)
Clorprotixene	>100.000	>100.000
Cis-Tramadolo	>100.000	>100.000
Clomipramina	>100.000	>100.000
Citalopram	>100.000	>100.000
Cocaina	>100.000	>100.000
Codeina	>100.000	>100.000
Cotinina	>100.000	>100.000
Ciclobenzaprina	>100.000	>100.000
Delta-9-THC	>100.000	>100.000
Desipramina	>100.000	>100.000
Destrometorfano	>100.000	>100.000
Diclofenac	10.000	20.000
Diidrocodeina	>100.000	>100.000
Difenidramina	>100.000	>100.000
Doxepina	>100.000	>100.000
Ecgonina	>100.000	>100.000
Ecgonina metil estere	>100.000	>100.000
EDDP	>100.000	>100.000
1R, 2S(-)-Efedrina	>100.000	>100.000
1S, 2R(+)-Efedrina	>100.000	>100.000
Escitalopram	>100.000	>100.000
Etil-β-D-glucuronide	>100.000	>100.000
Etilmorfina	>100.000	>100.000
Fenfluramina	>100.000	>100.000
Fentanil	>100.000	>100.000
Fluoxetina	>100.000	>100.000
Fluvoxamina	>100.000	>100.000
Gabapentin	>100.000	>100.000
Eroina	>100.000	>100.000
Esobarbital	>100.000	>100.000
Idrocodone	>100.000	>100.000
Idromorfone	>100.000	>100.000
11-idrossi-delta-9-THC	>100.000	>100.000
Ibuprofene	>100.000	>100.000
Imipramina	>100.000	>100.000
Indometacina	>100.000	>100.000
Ketamina	>100.000	>100.000
Lamotrigina	>100.000	>100.000

Composto	Concentrazione del composto approssimativamente equivalente al cutoff di 100 ng/mL (ng/mL)	Concentrazione del composto approssimativamente equivalente al cutoff di 200 ng/mL (ng/mL)
Levorfanolo tartrato	>100.000	>100.000
Lidocaina	>100.000	>100.000
Loperamide	>100.000	>100.000
LSD	>100.000	>100.000
Maprotilina	>100.000	>100.000
MDA	>100.000	>100.000
MDEA	>100.000	>100.000
MDMA	>100.000	>100.000
Meperidina	>100.000	>100.000
Meprobamato	>100.000	>100.000
Metamizolo	>100.000	>100.000
Metformina	>100.000	>100.000
Metadone	>100.000	>100.000
S(+)-metamfetamina	>100.000	>100.000
Metaqualone	>100.000	>100.000
Metilfenidato	>100.000	>100.000
Metoclopramide	>100.000	>100.000
Metoprololo	>100.000	>100.000
Mirtazapina	>100.000	>100.000
Morfina	>100.000	>100.000
Morfina-3-beta-glucuronide	>100.000	>100.000
Morfina-6-beta-glucuronide	>100.000	>100.000
Nalorfina	>100.000	>100.000
Naloxone	>100.000	>100.000
Naltrexone	>100.000	>100.000
Naproxene	>100.000	>100.000
Nefopam	>100.000	>100.000
N-desmetiltapentadolo	>100.000	>100.000
Norbuprenorfina	>100.000	>100.000
Norcodeina	>100.000	>100.000
Normorfina	>100.000	>100.000
Norpropossifene	>100.000	>100.000
Norpseudoefedrina	>100.000	>100.000
Nortriptilina	>100.000	>100.000
Olanzapina	>100.000	>100.000
Omeprazolo	>100.000	>100.000
Opipramolo	>100.000	>100.000
Oxaprozina	13.000	25.000

Composto	Concentrazione del composto approssimativamente equivalente al cutoff di 100 ng/mL (ng/mL)	Concentrazione del composto approssimativamente equivalente al cutoff di 200 ng/mL (ng/mL)
Ossicodone	>100.000	>100.000
Ossimorfone	>100.000	>100.000
Paraxantina	>100.000	>100.000
Paroxetina	>100.000	>100.000
PCP	>100.000	>100.000
Pentazocina	>100.000	>100.000
Pentobarbital	>100.000	>100.000
Fenobarbital	>100.000	>100.000
Fentermina	>100.000	>100.000
Fenilefrina	>100.000	>100.000
Fenilpropanolamina	>100.000	>100.000
Fenitoina	>100.000	>100.000
PMA	>100.000	>100.000
Prometazina	>100.000	>100.000
Propossifene	>100.000	>100.000
Propranololo	>100.000	>100.000
Protipendil	>100.000	>100.000
Protriptilina	>100.000	>100.000
R,R(-)-pseudoefedrina	>100.000	>100.000
S,S(+)-pseudoefedrina	>100.000	>100.000
Quetiapina	>100.000	>100.000
Ramipril	>100.000	>100.000
Ranitidina	>100.000	>100.000
Acido ritalinico	>100.000	>100.000
Acido salicilico	>100.000	>100.000
Secobarbitale	>100.000	>100.000
Sertralina	>100.000	>100.000
Sufentanil citrato	>100.000	>100.000
11-nor-9-carbossi THC	>100.000	>100.000
Teofillina	>100.000	>100.000
Tioridazina	>100.000	>100.000
Tianeptina	>100.000	>100.000
Trifluorometilfenilpiperazina	>100.000	>100.000
Trazodone	>100.000	>100.000
Trimipramina	>100.000	>100.000
Acido valproico	>100.000	>100.000
Venlafaxina	>100.000	>100.000
Vortioxetina	>100.000	>100.000

Composto	Concentrazione del composto approssimativamente equivalente al cutoff di 100 ng/mL (ng/mL)	Concentrazione del composto approssimativamente equivalente al cutoff di 200 ng/mL (ng/mL)
Zaleplon	>100.000	>100.000
Zolpidem tartrato	>100.000	>100.000
Zopiclone	>100.000	>100.000

Sostanze endogene

Concentrazioni elevate delle seguenti sostanze endogene sono state aggiunte all'urina addizionata con etizolam a $\pm 25\%$ delle concentrazioni di cutoff (75 ng/mL e 125 ng/mL per il cutoff di 100 ng/mL, 150 ng/mL e 250 ng/mL per il cutoff di 200 ng/mL). L'interferenza è stata osservata solo per l'acido borico analizzato con il dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay sia nella modalità qualitativa che in quella semiquantitativa.

Sostanza	Concentrazione analizzata	Livello di etizolam addizionato	
		-25% cutoff	+25% cutoff
Acetone	1000 mg/dL	Negativo	Positivo
Acido ascorbico	1500 mg/dL	Negativo	Positivo
Bilirubina	2 mg/dL	Negativo	Positivo
Acido borico	1% p/v	Negativo	Negativo
Creatinina	500 mg/dL	Negativo	Positivo
Etanolo	1000 mg/dL	Negativo	Positivo
Galattosio	10 mg/dL	Negativo	Positivo
Gammaglobuline	500 mg/dL	Negativo	Positivo
Glucosio	2000 mg/dL	Negativo	Positivo
Emoglobina	115 mg/dL	Negativo	Positivo
Albumina umana	500 mg/dL	Negativo	Positivo
Acido ossalico	100 mg/dL	Negativo	Positivo
Riboflavina	7,5 mg/dL	Negativo	Positivo
Sodio azoturo	1% p/v	Negativo	Positivo
Cloruro di sodio	6000 mg/dL	Negativo	Positivo
Fluoruro di sodio	1% p/v	Negativo	Positivo
Urea	6000 mg/dL	Negativo	Positivo

Gravità specifica e pH

Campioni di urina con valori di gravità specifica compresi tra 1,002 e 1,030 e valori pH da 3,0 a 11,0 sono stati analizzati in presenza dei due livelli di etizolam a $\pm 25\%$ delle concentrazioni di cutoff (75 ng/mL e 125 ng/mL per il cutoff di 100 ng/mL, 150 ng/mL e 250 ng/mL per il cutoff di 200 ng/mL). Non è stata osservata alcuna interferenza all'analisi con il dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay sia nella modalità qualitativa che in quella semiquantitativa.

Confronto dei metodi

Un totale di centosessantatré (163) campioni clinici di urina umana non modificati, non pretrattati con glucuronidasi, non identificabili singolarmente sono stati analizzati per individuare le benzodiazepine ai due livelli di cutoff con il dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay nella modalità semiquantitativa e i risultati sono stati confrontati con LC-MS/MS. Il metodo di conferma LC-MS/MS è stato eseguito da un laboratorio di riferimento autorizzato. In sintesi, il metodo prevede il trattamento dei campioni con glucuronidasi, l'aggiunta di standard interni e l'iniezione in una colonna per LC-MS/MS. I picchi di rilevazione e i relativi limiti di quantificazione (LoQ) in ng/mL sono i seguenti: 7-aminoclonazepam (5); alprazolam (1); idrossialprazolam (1); lorazepam (10); diazepam (5); nordiazepam (5); oxazepam (5); temazepam (1); midazolam (1); idrossimidazolam (1). I risultati sono riassunti nelle tabelle sottostanti, in cui il risultato LC-MS/MS rappresenta la somma tra tutti i picchi di benzodiazepine rilevati.

Per tutti i campioni risultati positivi con il dosaggio ARK nel presente studio, il metodo di conferma LC-MS/MS ha rilevato concentrazioni di benzodiazepine pari ad almeno 20 ng/mL.

Confronto dei metodi – cutoff di 100 ng/mL

Risultato dosaggio ARK	Risultato LC-MS/MS (ng/mL)			
	Inferiore al 50% del cutoff (< 50 ng/mL)	Tra il 50% inferiore al cutoff e il cutoff (50 – 99,9 ng/mL)	Tra il cutoff e il 50% superiore al cutoff (100 – 149,9 ng/mL)	Pari o maggiore del 50% superiore al cutoff (≥ 150 ng/mL)
Negativo (< 100 ng/mL)	71	3	2	1*
Positivo (≥ 100 ng/mL)	8**	9	9	60

ID campione	Dosaggio ARK (ng/mL)	LC-MS/MS (ng/mL)	Benzodiazepine rilevate con LC-MS/MS
62*	96,3	216,9	Alprazolam; idrossialprazolam
8**	118,2	39,1	7-aminoclonazepam
30**	661,8	26,4	Lorazepam
41**	183,8	23,9	Nordiazepam, oxazepam, temazepam
42**	466,3	27,1	Nordiazepam, oxazepam, temazepam
43**	520,1	23,5	Nordiazepam, oxazepam, temazepam
90**	>3.000	46,0	Lorazepam
91**	192,3	28,4	Lorazepam
93**	340,6	29,6	Lorazepam

**La forte reattività a 7-aminoclonazepam, diazepam, lorazepam-glucuronide, oxazepam-glucuronide e temazepam-glucuronide ha contribuito all'ottenimento di risultati positivi con il dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay.

Confronto dei metodi – cutoff di 200 ng/mL

Risultato dosaggio ARK	Risultato LC-MS/MS (ng/mL)			
	Inferiore al 50% del cutoff (<100 ng/mL)	Tra il 50% inferiore al cutoff e il cutoff (100 – 199,9 ng/mL)	Tra il cutoff e il 50% superiore al cutoff (200 – 299,9 ng/mL)	Pari o maggiore del 50% superiore al cutoff (≥ 300 ng/mL)
Negativo (< 200 ng/mL)	78	6	2	2 [†]
Positivo (≥ 200 ng/mL)	13 ^{††}	11	11	40

ID campione	Dosaggio ARK (ng/mL)	LC-MS/MS (ng/mL)	Benzodiazepine rilevate con LC-MS/MS
55 [†]	180,9	386,1	Alprazolam; idrossialprazolam
61 [†]	176,6	543,4	Alprazolam; idrossialprazolam
30 ^{††}	661,8	26,5	Lorazepam
35 ^{††}	1.620,1	90,3	Lorazepam
42 ^{††}	466,3	27,1	Diazepam, nordiazepam, oxazepam, temazepam
43 ^{††}	520,1	23,5	Nordiazepam, oxazepam, temazepam
47 ^{††}	1.291,9	66,3	Nordiazepam, oxazepam, temazepam
48 ^{††}	838,8	66,5	Nordiazepam, oxazepam, temazepam
72 ^{††}	1.117,9	75,4	Nordiazepam, oxazepam, temazepam
82 ^{††}	811,7	73,0	Nordiazepam, oxazepam, temazepam
90 ^{††}	>3.000	46,0	Lorazepam
93 ^{††}	340,6	29,6	Lorazepam
94 ^{††}	1.124,9	60,6	Lorazepam
96 ^{††}	697,6	57,5	Lorazepam
97 ^{††}	815,2	68,0	Lorazepam

††La forte reattività a diazepam, lorazepam-glucuronide, oxazepam-glucuronide e temazepam-glucuronide ha contribuito all'ottenimento di risultati positivi con il dosaggio ARK HS Benzodiazepine II Assay.

12 Bibliografia

1. Katzung BG, ed. Basic and clinical pharmacology. 5th ed. Norwalk, Conn: Appleton & Lange, 1992.
2. Julien RM. A primer of drug action. 6th ed. New York, NY: W.H. Freeman & Co; 1992.
3. Goodman and Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics. 8th ed. New York, NY: Pergamon Press, 1990.
4. Adams EH. Prevalence of prescription drug abuse: Data from the National Institute on Drug Abuse. NY State J Med 199; 91 (suppl 11): 32s-36s.
5. Department of Health and Human Services (DHHS), Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs. Federal Register / Vol. 69, No. 71 / Tuesday, April 13, 2004 (Effective Date: November 1, 2004) / Notices.

Gonzales, E. et al. 2013. Stability of pain-related medications, metabolites, and illicit substances in urine. *Clinica Chimica Acta* **416**:80-85.

13 Marchi commerciali

ARKTM è un marchio commerciale di ARK Diagnostics, Inc.

Altri marchi o nomi di prodotti sono marchi commerciali dei rispettivi proprietari.



ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 USA

Revisione Novembre 2021
1600-1026-00 Rev 03