

Comunicación Breve

CONCORDANCIA DE DOS MÉTODOS INMUNOLÓGICOS PARA LA DETERMINACION DE METABOLITOS DE BENZODIACEPINAS EN ORINA.

CONCORDANCE OF TWO IMMUNOLOGICAL
METHODS TO DETERMINE URINARY BEN-
ZODIAZEPINE METABOLITES .

*CONCORDÂNCIA DE DOIS MÉTODOS IMU-
NOLÓGICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE
METABÓLITOS DE BENZODIACEPINAS EM
URINA.*

Resumen:

Debido a la gran cantidad de pruebas comerciales disponibles para la determinación de metabolitos de benzodiazepinas en orina en el mercado, es que decidimos evaluar la concordancia de 2 test inmunológicos, disponibles en el laboratorio de Toxicología de nuestro hospital. Las muestras de orinas recibidas en nuestro laboratorio fueron analizadas en paralelo por ambos métodos. Se aplicarán las pruebas estadísticas de Kappa y Chi cuadrado para su evaluación. La utilidad de estos test ante la sospecha diagnóstica de consumo de benzodiazepinas en determinadas patologías amerita la disponibilidad de estos test inmunológicos que pueden proveer en corto tiempo, un resultado que permita al profesional médico una oportu-

Marks Lucrecia.¹,
González Ines Isabel.¹,
Suárez Héctor
Andrés.¹,
Rivolta Susana.^{1,3}

¹Laboratorio del Hospital
de Niños de la Santísima
Trinidad.

²Escuela de Salud
Pública, Facultad de
Ciencias Médicas,
Universidad Nacional de
Córdoba

Trabajo recibido: 16 de
noviembre 2018.

Aprobado: 06 de junio
2019.

tuna toma de decisiones frente a la problemática con la cual arriba el paciente. En este trabajo pudimos comprobar que ambos métodos presentan muy buena concordancia (test Kappa=0,88), por lo cual son ambas pruebas indistintamente aplicables para la casuística que presenta el Laboratorio de Toxicología.

Palabras clave: metabolitos benzodiazepinas – concordancia – test inmunológicos

Abstract

Due to the great number of commercial tests available in the market to determine urinary benzodiazepine metabolites, we decided to assess the concordance between two immunological tests available in the Toxicology lab in our hospital. Urine samples received in our lab were analyzed by both methods at the same time. Statistics tests of Kappa and Chi-Square are used for evaluation. The usefulness of these tests in cases of the diagnostic suspicion of benzodiazepine consumption in certain pathologies deserves the availability of these immunological tests since they can provide results in a short time which will let the medical professional make timely decisions regarding the problem presented by the patient. In this work we have been able to verify that both methods show good concordance (Kappa Test = 0.88) so, both can be indistinctly used for the cases presented by the Toxicology lab.

Key words: benzodiazepine metabolites - concordance - immunological tests

Resumo:

Devido ao grande número de testes comerciais disponíveis no mercado para a determinação de metabólitos de benzodiazepina na urina, decidimos avaliar a concordância de dois testes imunológicos, disponíveis no laboratório de Toxicologia de nosso hospital. As amostras de urina recebidas em nosso laboratório foram analisadas em paralelo pelos dois métodos. Os testes estatísticos Kappa e Xi quadrado serão aplicados na sua avaliação. A utilidade desses testes diante da suspeita diagnóstica do consumo de benzodiazepínicos em determinadas patologias merece a disponibilidade desses testes imunológicos que podem fornecer em pouco tempo, resultados que permitem ao profissional médico uma tomada de decisão oportuna em relação ao problema apresentado pelo paciente. Neste trabalho, pudemos verificar que ambos os métodos têm uma concordância muito boa (teste Kappa = 0,88), motivo pelo qual ambos são testes indistintamente aplicáveis ao estudo de casos apresentados pelo Laboratório de Toxicologia.

Palavras-chave: metabólitos benzodiazepínicos - concordância - testes imunológicos

Introducción

Las benzodiazepinas (BZD) son un grupo de fármacos que actúan selectivamente sobre los receptores de ácido gama aminobutírico A (GABA) mediando la actividad inhibitoria en el sistema nervioso central (SNC). Sus principales efectos son: reducción de la ansiedad y agresividad, inducción del sueño, disminución del tono muscular y la producción de amnesia anterógrada, por lo que también se utilizan como preanestésicos. Se caracterizan por compartir una estructura química típica, la cual consta de un anillo benzodiazepina de siete elementos unidos a un benceno, con cuatro posibles sustituciones (1). En general, las BZD provocan efectos clínicos cualitativamente similares, pero existen importantes diferencias cuantitativas en su espectro farmacodinámico y sus propiedades farmacocinéticas, las cuales han permitido diferentes perfiles de aplicaciones terapéuticas (2)

En la administración oral presentan buena absorción, alcanzando su concentración plasmática máxima en una hora aproximadamente, se unen a proteínas plasmáticas y son altamente liposolubles (3). El metabolismo de las BZD se realiza en tres fases mayores: la fase inicial y más rápida comprende la modificación, eliminación, o ambos fenómenos del radical; la segunda fase involucra la hidroxilación con la consiguiente formación de un derivado activo y; por último, la tercera fase consiste en la conjugación de los compuestos hidroxilados principalmente con ácido glucurónico (4). Muchas has BZD comparten los mismos metabolitos principales, algunos de los cuales también son fármacos en sí mismos, ellos son: nordiazepam, oxazepam (principal metabolito de la mayoría de las 1,4-benzodiazepinas), temazepam y, algunos glucurónidos conjugados. En el perfil urinario entre el 30 al 80% de la dosis de BZD se encuentra como metabolito tanto libre como conjugado, esto los convierte en dianas muy utilizadas para su detección en matrices biológicas. La duración de la acción de las BZD es variable; pueden clasificarse en compuestos de acción ultracorta, corta, intermedia o prolongada, lo cual define su aplicación terapéutica (4, 5, 6).

En la mayoría de los países, las BZD son unas de las drogas psicotrópicas de mayor prescripción médica y, como consecuencia, las más frecuente implicadas en casos de intoxicación aguda, ya sea intencional o accidental (7, 8). En sobredosis, las BZD causan sueño prolongado sin depresión grave de la respiración o la función cardiovascular. Sin embargo, a pesar del hecho de que las BZD tengan un índice terapéutico alto y sean consideradas relativamente seguras, su uso puede ser peligroso cuando son coadministradas con alcohol u otros depresores del SNC, ya que pueden causar depresión respiratoria grave, incluso potencialmente mortal (9, 10). Las BZD generan tolerancia y dependencia, los cuales son uno de los principales inconvenientes dados por el uso prolongado.

Existen numerosos métodos analíticos para la determinación de BZD en matrices biológicas. Entre ellos se encuentran la cromatografía líquida (LC) con diversos detectores, ultravioleta (UV), arreglo de diodos (DAD), espectrometría de masas (MS) y, menos frecuentemente, la cromatografía gaseosa (GC) con detectores de nitrógeno-fósforo, captura de electrones, y espectrometría de masas, los cuales se utilizan como métodos confirmatorios y de referencia. A pesar del innegable dominio de los métodos cromatográficos, se ha observado un aumento en el uso de inmunoensayos y métodos colorimétricos como screening para la detección y determinación de BZD en matrices biológicas (9).

Los inmunoensayos proveen un resultado cualitativo rápido para la detección de BZD con alta sensibilidad y especificidad, que permiten detectar tanto el abuso como el consumo de pequeñas dosis de BZD. Sin embargo, la identificación analítica por los métodos inmunológicos resulta difícil debido a la inmunoreactividad variable de los anticuerpos utilizados frente a las diferencias estructurales halladas entre las distintas clases de BZD (11, 12). En este sentido, la mayor parte de los inmunoensayos utilizados para el screening inicial están diseñados para detectar BZD no conjugadas, y muestran una muy baja reactividad cruzada con los metabolitos conjugados, por lo que, para el screening de estos es necesario un paso previo de hidrólisis. La hidrólisis enzimática aumenta la cantidad de la BZD disponible para su detección (13). La principal ventaja que otorgan los inmunoensayos es que permiten obtener resultados rápidos, pueden ser automatizados y, poseen un menor costo que los métodos cromatográficos.

Existen diversas matrices biológicas en las que se pueden detectar las BZD, algunas de ellas son suero o plasma, orina y saliva. La matriz biológica de elección frecuentemente es la orina, ya que su recolección no es invasiva y, en ella, las drogas se encuentran en mayores concentraciones y por períodos de tiempo más prolongados en comparación con el plasma. Muchos estudios han demostrado la efectividad del screening de drogas en orina; sin embargo, es importante tener en cuenta que estas muestras ser adulteradas o bien, puede resultar difícil obtener un volumen adecuado, especialmente cuando se trata

de poblaciones pediátricas (14).

Las intoxicaciones por medicamentos en la población pediátrica es un problema importante a nivel mundial (15). Los fármacos son responsables en más del 50% de las intoxicaciones pediátricas, en su inmensa mayoría por ingesta accidental en niños o voluntaria en adolescentes; donde, las BZD ocupan el segundo lugar entre los agentes más frecuentes después de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (16). Son muy pocas las situaciones en las que es necesario el uso de las BZD en pediatría; lo que puede ser reflejo de una exposición involuntaria, innecesaria y/o irracional. Esto subraya el problema de la falta de percepción de riesgo por parte de la población, que accede fácilmente tanto dentro como fuera del hogar a estos psicofármacos (17).

Los suicidios adolescentes se han convertido en un importante problema de salud pública en varios países, convirtiéndose en una de las primeras causas de muerte en este grupo etario (18). Los auto-envenenamientos ocupan más del 90% de los intentos suicidios que concurren a los hospitales; las sustancias involucradas incluyen AINEs y sustancias psicotrópicas (19). Dentro de los suicidios por intoxicaciones con drogas, la proporción de mujeres es mayor que la de hombres y, como es de esperarse, el poli consumo es muy común en los casos de muerte. Las BZD se encuentran dentro de las diez drogas más utilizadas en intentos de suicidio y, a su vez, junto con el alcohol, son unas de las más utilizadas en los casos de poli consumo (20, 21).

Como se mencionó anteriormente, los síntomas más comunes de la intoxicación por BZD incluyen sedación, ataxia, somnolencia, disartria, nistagmus y pupilas mióticas o intermedias; ocasionalmente pueden observarse algunos efectos paradójicos como agresión, excitación, psicosis o deterioro neurológico, principalmente en niños; en ellos también es común la producción de náuseas y vómitos (22). Estos síntomas son inespecíficos, y requieren de un diagnóstico diferencial con otras patologías si se desconoce la causa que los provoca. En este sentido, el diagnóstico diferencial de ataxia aguda incluye tanto procesos benignos como graves; su causa más común son las ataxias post-infecciosas y las secundarias a la ingestión de tóxicos, seguidas de otras etiologías de menor incidencia pero que también requieren un diagnóstico diferencial. Las ataxias agudas secundarias a intoxicaciones presentan un predominio masculino, a menor edad y con tiempos de evolución breves; las causas más frecuentes de las mismas son las BZD. Mediante una minuciosa anamnesis, su diagnóstico es relativamente sencillo; sin embargo, para los casos en el que la ingesta es desconocida, se requiere una actuación más exhaustiva (23). Por este motivo, es de amplia utilidad disponer de un método para la detección rápida de estos analitos ante la solicitud por parte del personal médico, con el objetivo de orientar la sospecha diagnóstica. Su detección temprana es importante para diagnosticar intoxicaciones agudas para su tratamiento o bien, realizar diagnósticos diferenciales con otras patologías que pueden generar síntomas similares. Así, un resultado erróneo puede llevar a dificultades en el manejo de los pacientes, provocando mayores gastos a nivel de salud pública.

El laboratorio de Toxicología del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad cuenta con dos métodos inmunológicos para la detección de metabolitos de BZD en orina. Se ha observado que, en ocasiones, una misma muestra arroja resultados diferentes entre ambas metodologías. Es por esto que se quiere estudiar si la concordancia entre los métodos inmunológicos es estadísticamente significativa y, por lo tanto, si los resultados entre ellos son estadísticamente comparables e intercambiables.

Objetivos

- Reconocer la concordancia de dos métodos inmunológicos utilizados como screening para la detección de BZD en muestras de orina.

Materiales y Métodos

El siguiente trabajo es un estudio retrospectivo, longitudinal, descriptivo en el cual se estudiaron un total de 631 muestras de orina recibidas en el Laboratorio de Toxicología del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad con solicitud de análisis para BZD correspondientes al período enero 2016 a diciembre 2017. Se procesaron las muestras en paralelo por un método basado en la interacción cinética de micropartículas en suspensión (KIMS) en el autonalizador Cobas c311 (Roche) y, una inmunocromatografía de flujo lateral (ICFL) [Quick Test TM Drug Screening Panel (Urine Cassette)]. El primero, es una prueba diagnóstica in vitro que permite la detección semicuantitativa de BZD en orina determinadas a través de las alteraciones en la transmisión de la luz. En una muestra libre de droga, los anticuerpos (Ac) libres se unen a los conjugados de droga-micropartículas, induciendo la formación de agregados de partículas. Dado que la reacción de agregación se produce en una muestra sin droga, la absorbancia aumenta. Si la muestra de orina contiene la droga a determinar, esta compete con el derivado de la droga unido a micropartículas por los Ac libres. Los Ac unidos a la droga de la muestra dejan de estar disponibles para inducir la agregación de partículas, inhibiéndose, por consiguiente, la formación de retículos de partículas. De esta manera, se reduce el aumento de la absorbancia proporcionalmente a la concentración de droga en la muestra (24). Los Ac de esta prueba están dirigidos contra nordiazepam con un valor de corte de 200 ng/ml. El Quick Test INMC está basado en el principio de unión competitiva para la detección cualitativa de BZD en orina, con Ac dirigidos contra oxazepam con un valor de corte de 300 ng/ml. Durante la prueba, la muestra de orina migra hacia arriba por acción capilar. La droga, si se encuentra presente en la muestra de orina en concentración inferior al límite de detección, no saturará los puntos de unión de las partículas recubiertas por el Ac en el panel de la prueba. Las partículas recubiertas de Ac serán capturadas por el conjugado inmovilizado de la droga específica y una línea visible de color aparecerá en la zona de la prueba. Esta línea de color no se formará si el nivel de la droga está por encima del límite de detección ya que saturará todos los puntos de unión a los Ac.

Para evaluar la concordancia entre ambos métodos se utilizó el test Kappa de Cohen, realizando el procesamiento de los datos con el software Infostat 2016I – versión estudiantil.

Resultados

Análisis de resultados:

Para KIMS los resultados obtenidos fueron un 72,6% (n= 458) con resultado negativo, y un 27,4% (n= 173) con resultado positivo; para el caso del análisis por ICFL los resultados observados fueron un 75,3% (n= 475) de las muestras con resultado negativo, y un 24,7% (n= 156) con resultado positivo; siendo un 4,6% (n=29) el total de muestras discordantes (Tabla 1).

Tabla N° 1: Resultados positivos (POS) y negativos (NEG) para las muestras procesadas por KIMS e ICFL expresadas en número total de muestras (n) y porcentaje (%).

	KIMS		ICFL	
	POS	NEG	POS	NEG
n	173	458	156	475
%	27,4	72,6	24,7	75,3

Del total de 631 muestras incluidas en el análisis de concordancia un 95,4% de las mismas

obtuvieron resultados concordantes entre ambas metodologías, un 23,8% (n= 150) de las mismas obtuvieron resultados positivos, y un 71,6% (n= 452) resultados negativos; del 4,6% restante de las muestras, las que obtuvieron resultado negativo por ICFL y positivo por KIMS fueron el 3,6% (n=23), y aquellas con resultado positivo por ICFL y negativo por KIMS representaron el 1% (n= 6) (Tabla 2). Para evaluar la concordancia entre ambos métodos se aplicó en test Kappa, cuyo coeficiente fue igual a 0,88, lo que indica que la misma es muy buena.

Tabla N° 2: Porcentaje de muestras analizadas por ambos métodos. Resultado positivo para KIMS (KIMS+), resultado negativo para KIMS (KIMS-), resultado positivo para ICFL (ICFL+), y resultado negativo para IFCL (IFCL-); n= 661.

	KIMS +	KIMS -
ICFL +	23,8	1,0
ICFL -	3,6	71,6

Discusión

Los resultados obtenidos en el análisis de concordancia permiten inferir que los métodos presentan una muy buena a excelente concordancia (kappa 0,88). La baja proporción de discordancia observada puede deberse a la diferencia en la molécula blanco detectado y su valor de corte, ICFL está dirigido contra oxazepam con un cut-off de 300 ng/mL, y KIMS contra nordiazepam con un cut-off de 200 ng/mL. Si bien ambos son metabolitos de la vía común de metabolización de las BZD, dependiendo del tipo de BZD que se trate, se puede presentar uno u otro mayoritariamente y, a su vez, otros factores como el tiempo de toma de muestra, el cual puede favorecer esta diferencia, siendo que al momento de muestreo puede encontrarse uno de los metabolitos detectados y el otro estar ausente o en muy baja concentración. Es importante recordar que ambos métodos son utilizados para la detección de BZD con el objetivo de orientar la conducta médica, ya sea para confirmar una sospecha de intoxicación o, realizar el diagnóstico diferencial con otra patología, por lo que la prueba debe tener buena sensibilidad para poder detectar el mayor número de resultados positivos, con la mayor especificidad posible para evitar resultados falsos positivos. Muchas veces el informe otorgado por el laboratorio no incluye la información referente a la prueba utilizada, por lo que el médico desconoce cuál es el metabolito detectado en orina y en qué concentración, lo que puede llevar a dificultades en la toma de decisiones respecto a la conducta terapéutica a seguir con el paciente, en la solicitud de exámenes complementarios para el diagnóstico diferencial con otras patologías, etc. llevando a mayores gastos a nivel de salud pública. Nuestros resultados muestran que, para las muestras solicitadas por eventos asociados a la sospecha de intoxicación por BZD, el 39,7% (n= 29) correspondieron a un resultado positivo para BZD en orina, esto es muy importante ya que evita la solicitud de estudios complementarios con el objeto de realizar diagnóstico diferencial con otras patologías.

Es necesario recordar que estos métodos requieren la confirmación de un resultado positivo por un método de referencia debido a la posibilidad de resultados falsos positivos. Sin embargo, la utilidad de estos test radica en la rapidez con la cual es posible obtener un resultado, lo que permite tomar decisiones médicas rápidas sobre la conducta a seguir con el paciente.

Conclusión

Este estudio nos permite inferir que en relación con el número de muestras ensayadas y a la población estudiada en nuestro medio, ante la solicitud de un estudio de screening de metabolitos de benzodiazepinas en orina, los resultados obtenidos serán en su mayoría concordantes con ambas metodologías evaluadas. Por ser métodos de screening es muy importante saber que ante resultados positivos por ambos métodos requerirán la confirmación por métodos de referencia (GC-MS). Sin embargo, el presente estudio no nos permite concluir a que obedece la disparidad de los resultados discordantes; para ello requerirá a futuro otro estudio en el cual evaluaremos a través de una comparación de ambos métodos con muestras patrones de benzodiazepinas valoradas en muestras de orina estudiadas contra método de referencia.

Bibliografía

1. Rang, H. P., y otros. Rang and Dale - Farmacología. Elsevier, 2016. pág. 539.
2. Brunton, L., Chabner, B. y Knollman, B. Goodman and Gilman - Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw Hill, 2011. pág. 458.
3. Rang, H. P., y otros. Rang and Dale - Farmacología. Elsevier, 2016. pág. 541.
4. Brunton, L., Chabner, B. y Knollman, B. Goodman and Gilman - Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw Hill, 2011. pág. 463.
5. Persona, K., y otros. Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2015; Vol. 113: pág. 245.
6. DeRienz, R., y otro. Evaluation of four immunoassay screening kits for the detection of benzodiazepines in urine. *J Anal Toxicol.* 2008, Vol. 32: pág. 433.
7. Rang, H. P., y otros. Rang and Dale - Farmacología. Elsevier, 2016. pág. 542.
8. Sacre, L., y otros. Toxicodynamics in nordiazepam and oxazepam overdoses. *Ann Pharm Fr.* 2017, Vol. 75: pág. 163-171.
9. Persona, K., y otros. Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2015, Vol. 113, pág. 244.
10. Rang, H. P., y otros. Rang and Dale - Farmacología. Elsevier, 2016. pág. 542.
11. Persona, K., y otros. Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2015, Vol. 113, pág. 252.
12. Klette, K. L., y otros. Urine Benzodiazepine Screening using Roche Online| KIMS Immunoassay Spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2005, Vol. 29: pág. 193-200.
13. DeRienz, R. T., y otros. Evaluation of Four Immunoassay Screening Kits for the Detection of Benzodiazepines in Urine. *J Anal Toxicol.* 2008, Vol 32: pág. 433.
14. Petrides, A. K., y otros. Monitoring opioid and benzodiazepine use and abuse: ¿Is oral fluid or urine the preferred specimen type? *Clin Chim Acta.* 2018, Vol. 481: pág. 75-82.
15. Karadeniz, H., y otros. Fatal poisoning of childhood in the Eastern Black Sea region of Turkey (2009-2013). *J Forensic Leg Med.* 2015, Vol. 34: pág. 109-112.
16. Mintegui, S. Manual de intoxicaciones en pediatría. Madrid. Ergon, 2003. págs. 145-149.
17. Domínguez Trobo, V., y otros. Perfil epidemiológico de las intoxicaciones por benzodiazepinas recibidas en el CIAT. *Rev Med Urug.* 2015, Vol. 31: pág. 35.
18. Clerici, C. A., y otros. Two decades of adolescent suicides assessed at Milan University's medicolegal unit: Epidemiology, forensic pathology and psychopathology. *J Forensic Leg Med.* 2016, Vol. 37: pág. 15-21.

19. Hawton, K. y James, A. ABC of adolescence Suicide and deliberate self harm in young people. *BMJ*. 2005, Vol. 330: pág. 891-894.
20. Jones, A. W., Holmgren, A. y Ahlner, J. Toxicology findings in suicides: Concentrations of ethanol and other drugs in femoral blood in victims of hanging and poisoning in relation to age and gender of the deceased. *J Forensic Leg Med*. 2013, Vol. 20: págs. 824-847.
21. Orsini, J., y otros. Clinical and epidemiological characteristics of patients with acute drug intoxication admitted to ICU. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2017, Vol. 7: pág. 202-207.
22. Domínguez Trobo, V., y otros. Perfil epidemiológico de las intoxicaciones por benzodiazepinas recibidas en el CIAT. *Rev Med Urug*. 2015, Vol. 31: pág. 33.
23. Martínez-González, M. J., y otros. Ataxia de aparición aguda en la infancia: etiología, tratamiento y seguimiento. *Rev Neurol*. 2006, Vol. 42: pág. 321-324.
24. Feldman, M., Kuntz, D. y Botelho, K. Evaluation of Roche Diagnostics ONLINE DAT II, a New Generation of Assays for the Detection of Drugs of Abuse. *J Anal Toxicol*. 2004, Vol. 28: págs. 593-598.