

CAT
Critically Appraised Topic

Screening voor, en confirmatie van, cannabis gebruik

Author: Bram Ngo
Supervisor: Leen Mortier
Date: 07-05-2013

CLINICAL BOTTOM LINE

Voor het aantonen van cannabisgebruik bestaan er screeningstesten gebaseerd op het principe van een competitieve immuno-assay. Deze analyses kunnen echter geen kwantitatieve resultaten produceren en zijn daarom niet geschikt om recent (her)gebruik van cannabis op te sporen, aangezien hiervoor een stijging of daling van de concentratie van de cannabis metaboliet moet worden aangetoond. Een ander nadeel van de screeningstesten is het gebrek aan specificiteit. Vandaar dat het Rijksinstituut voor Ziekte en Invaliditeit (RIZIV) vereist dat elk positief resultaat wordt geconfirmeerd door een tweede, meer specifieke, methode gebaseerd op een ander analytisch principe. Om deze redenen werd besloten een gaschromatografisch-massaspectrometrische (GC-MS) methode te ontwikkelen voor de kwantitatieve bepaling van het cannabis metaboliet 11-nor- Δ^9 -carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in urine, in het laboratorium van het Jessa Ziekenhuis. Hierbij werd zowel rekening gehouden met de eisen van de aanvragende artsen alsook met internationale richtlijnen ('European Workplace Drug Testing Society', EWDTs; CLSI protocol C43A). Na een uitgebreide validatie kon worden besloten dat de ontwikkelde GC-MS methode voor de bepaling van THC-COOH voldoet aan alle vooropgestelde criteria voor gebruik in routine.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Het aantonen van cannabisgebruik binnen het Jessa Ziekenhuis te Hasselt gebeurt zowel in het kader van de acute patiënt, die zich met bepaalde klachten op de dienst Spoedgevallen meldt, als in kader van controle van abstinentie bij patiënten op de Psychiatrische Afdeling Algemeen Ziekenhuis (PAAZ). Bij de acute patiënt wil men snel een algemeen beeld schetsen. Bij de psychiatrische patiënt is men vooral geïnteresseerd in een resultaat dat recent (her)gebruik kan aantonen of uitsluiten, wat impliceert dat een stijging of daling van de concentratie van de cannabis metaboliet moet worden aangetoond. Tot op heden is er geen analysemethode beschikbaar die beantwoordt aan beide noden. Enerzijds bestaan er screeningstesten gebaseerd op het principe van een competitieve immuno-assay. Het resultaat van dergelijke analyses is snel beschikbaar, wat ze adequaat maakt voor de diagnostiek bij de acute patiënt. Deze analyses kunnen echter geen kwantitatieve resultaten produceren en zijn daarom niet geschikt om recent hergebruik van cannabis aan te tonen. Een ander nadeel van de screeningstesten is het gebrek aan specificiteit. Zo kunnen vals positieve resultaten bekomen worden door interfererende moleculen (o.a. het veel gebruikte omeprazole). Vandaar dat het RIZIV vereist dat elk positief resultaat wordt geconfirmeerd door een tweede, meer specifieke, methode gebaseerd op een ander analytisch principe.

Omwille van hun hoge specificiteit, ook bij lage concentraties, zijn chromatografisch-massaspectrometrische technieken zeer geschikt voor zowel de confirmatie van positieve screeningstesten als voor kwantificatie. Een nadeel van deze technieken is dat, o.a. omwille van de complexe staalvoorbereiding, ze arbeidsintensief zijn en dus een lange turnaround time (TAT) hebben, en gespecialiseerd personeel vereisen. Alles samen heeft dit als gevolg dat chromatografische/massaspectrometrische -analyses van cannabis metabolieten doorgaans enkel in gespecialiseerde laboratoria worden uitgevoerd.

De huidige praktijk in het Jessa Ziekenhuis berust op het uitvoeren van een immunologische screeningstest. Positieve resultaten worden naar een extern laboratorium gestuurd ter confirmatie. Het resultaat van deze confirmatietest is semikwantitatief en laat meestal te lang op zich wachten om nog van nut te kunnen zijn voor de aanvragende arts. Daarom werd in het laboratorium van het Jessa Ziekenhuis de mogelijkheid onderzocht om zelf een kwantitatieve confirmatietest uit te voeren. Dit werd mogelijk door de recente aankoop van een gaschromatograaf gekoppeld aan een massaspectrometer.

In deze CAT ligt de focus op de ontwikkeling en validatie van de GC-MS-bepaling van het THC metaboliet 11-nor- Δ^9 -carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH).

QUESTION(S)

- 1) Over welke methoden beschikken we om cannabisgebruik aan te tonen?
- 2) Aan welke eisen moeten testen voor het aantonen van cannabisgebruik voldoen?
- 3) Kunnen we in het laboratorium van het Jessa Ziekenhuis aan deze vooropgestelde eisen voldoen?

APPRAISAL

Over welke methoden beschikken we om cannabisgebruik aan te tonen?

Hoewel cannabisgebruik via verschillende staalmatrices (urine, bloed, haar) kan worden opgespoord, beperkt deze CAT zich tot het analyseren van cannabis in urine. Om farmacokinetische redenen en gezien de niet-invasieve staalname is urine de meest gebruikte staalmatrix voor het aantonen van cannabisgebruik in de medische routine. In het laboratorium van het Jessa Ziekenhuis beschikt men over een immunoassay alsook over een GC-MS toestel waarmee cannabis metabolieten kunnen worden opgespoord. Alvorens beide methoden te bespreken, wordt een beknopt overzicht gegeven van de farmacokinetica van THC.

Metabolisme en farmacokinetica van THC

De cannabisplant bevat meer dan 421 chemische bestanddelen, waaronder 61 cannabinoïden. De meest psychoactieve molecule van cannabis is Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC). Figuur 1 toont het voornaamste metabolisch pad van THC.

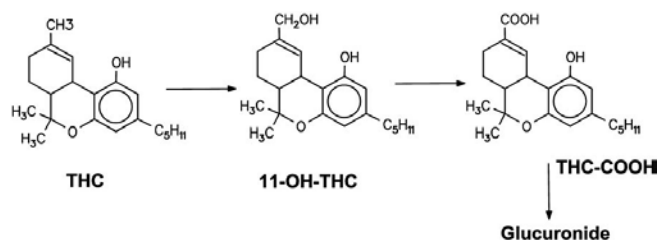


Fig. 1 Voornaamste metabolisch pad van Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC)

De farmacokinetica van cannabinoïden is goed gekend^{1,2}. Na gebruik van cannabis wordt het lipofiele THC opgenomen in het vetweefsel, de lever, de longen en de milt. Van hieruit wordt het molecule langzaam terug vrijgezet in het bloed, wat de relatief lange halfwaardetijd van THC verklaart, enkele dagen tot zelfs weken bij chronisch gebruik. Na vrijzetting ontstaat in de lever onder meer 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC), door hydroxylatie, gevolgd door een oxidatie tot het inactieve metaboliet THC-COOH. Dat laatste wordt in belangrijke mate geconjugeerd met glucuronzuur en wordt als glucuronide in de urine geëxcreteerd.

Immuno-assay

De screeningstest gebruikt in het laboratorium van het Jessa Ziekenhuis, Triage™ TOX Drug Screen (Alere), is een competitieve fluorescentie immunoassay met kwalitatieve bepaling van het metaboliet THC-COOH (zowel het vrije molecuule als het glucuronide).

Het urinestaal wordt rechtstreeks aangeboden op een wegwerp 'test device' dat op een afleestoestel wordt geplaatst. De analyse is snel en eenvoudig in gebruik : resultaten worden binnen de 15 min gegenereerd en vereisen geen bijkomende interpretatie. De cut-off waarde voor aanwezigheid van THC-COOH bedraagt 50 ng/mL (conform internationale richtlijnen, zie verder). Zoals hoger vermeld, is één van de problemen bij deze assay het gebrek aan specificiteit. Pantoprazole, simvastatine en carbamazepine zijn de meest voorkomende moleculen die een vals positieve reactie kunnen uitlokken. Hoewel één van de enige gepubliceerde studies betreffende de performantie van de Triage screeningstest een specificiteit van 100% vermeldt, blijkt dat niet te kloppen met de praktijk³. Over het aantal vals negatieven hebben we weinig of geen gegevens, aangezien een negatief resultaat in principe niet wordt opgevolgd door een confirmatie-analyse. Om een juister beeld van de sensitiviteit en specificiteit van de screeningstest in onze patiëntenpopulatie te verkrijgen, is een kwantitatieve confirmatiemethode nodig. Een laatste nadeel van de Triage test vormt de afwezigheid van een kwantitatief resultaat.

GC-MS

De kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van een grote variëteit klinisch relevante analyten kan uitgevoerd worden dmv GC-MS. Het laboratorium van het Jessa ziekenhuis beschikt over een Trace GC Ultra (gaschromatograaf, Thermo Scientific) en ITQ 900 (iontrap massaspectrometer, Thermo Scientific), De Trace GC Ultra staat in voor de scheiding van de componenten en de ITQ massaspectrometer voor de detectie ervan. Stalen, opgezuiverd en gederiviseerd om de vluchtigheid en stabiliteit te verhogen, worden met behulp van een autosampler (Triplus autosampler, Thermo Scientific) in de gaschromatograaf gebracht. Nadat het in de gasfase is gebracht in de injector van de GC, vindt in de GC-kolom een scheiding van het geïnjecteerde extract plaats. Vervolgens treedt in de ionenbron van de massaspectrometer, onder hoog vacuüm, ionisatie op door beschieting met hoog-energetische electronen. Door het gebruik van wisselende elektrische en magnetische velden is de iontrap in staat om de ionen te scheiden op basis van hun verhouding van massa over lading (m/z). Bij een zogenaamde MSⁿ-analyse isoleert de iontrap één precursor-ion op basis van een specifieke m/z. Dit precursor-ion kan dan door collision energie verder worden gefragmenteerd in één of meerdere productionen. Deze kunnen dan ofwel gedetecteerd worden (via een electron multiplier) ofwel kan opnieuw één van de productionen worden geïsoleerd en gefragmenteerd in één of meerdere productionen (zogenaamde 'kleindochterionen'). In theorie kan men dit proces n maal herhalen, vandaar de naam MSⁿ. De Xcalibur software staat in voor de aansturing van de verschillende instrumenten (GC, MS en autosampler) en wordt gebruikt voor de verwerking van de gegenereerde data.

Met deze techniek kan THC-COOH op een zeer specifieke manier worden bepaald. Daarenboven is het ook mogelijk, door middel van een kalibratiecurve en een inwendige standaard, een betrouwbaar kwantitatief resultaat te verkrijgen. Echter, door de complexe en arbeidsintensieve staalvoorbereiding is deze methode niet goed bruikbaar in een acute setting.

Aan welke eisen moeten laboratoriumtesten voor het aantonen van cannabisgebruik voldoen?

Eisen van de aanvragers

Bij het implementeren van een nieuwe laboratoriumtest moeten de aanvragende artsen steeds een sleutelrol spelen. Wat zijn hun verwachtingen en wat zijn de minimumeisen

waaraan de analyse moet voldoen? Indien hier niet kan aan worden voldaan, moet het nut van de test ernstig in vraag worden gesteld.

In het Jessa Ziekenhuis zijn deze sleutelrolspelers, enerzijds, de artsen werkzaam op de afdeling Spoedgevallen en, anderzijds, deze werkzaam op de PAAZ. Uit overleg kon er geconcludeerd worden dat de spoedartsen voornamelijk geïnteresseerd zijn in een test met hoge specificiteit waarvan het resultaat snel beschikbaar is. Er wordt een maximale TAT van één uur verwacht. Voor de artsen die de test aanvragen bij psychiatrische patiënten is het vooral belangrijk om met hoge specificiteit (her)gebruik tijdens opname/therapie te kunnen aantonen en is het dus belangrijk over kwantitatieve resultaten te beschikken.

Eisen volgens internationale richtlijnen

Hoewel specifiek voorgeschreven voor het opsporen van druggebruik op de werkvloer, bieden de guidelines van de 'European Workplace Drug Testing Society' (EWDTS) een zeer nuttige leidraad voor het opsporen van drugsmisbruik in een klinische setting⁴. Deze richtlijnen beslaan analytische maar ook pre- en post-analytische aspecten bij het detecteren van druggebruik via urine. Hieronder volgen enkele van de meest relevante elementen die ook voor gebruik in de klinische praktijk belangrijk kunnen zijn.

- Noteer recent medicatiegebruik door de patiënt (i.k.v. specificiteit).
- Wanneer de screeningstest negatief is, dient niet verder te worden getest.
- Positieve screeningsresultaten moeten geconfirmeerd worden met behulp van een chromatografische techniek gekoppeld aan massaspectrometrie (Liquid Chromatography/GC-MS/MS).
- Confirmatietesten moeten kwantitatief zijn.
- Maak gebruik van een kwaliteitsprogramma om de performantie van de test te borgen.
- De retentietijd van het onderzochte metaboliet dient binnen een venster van 3 seconden van deze van de gebruikte inwendige standaard te liggen.
- Er mogen geen ionen met een m/z ratio < 50 gebruikt worden.
- Maximale cut-off waarde voor de cannabis screeningstest bedraagt 50 ng/mL.
- Maximale cut-off waarde voor de cannabis confirmatietest bedraagt 15 ng/mL.

Voor het confirmeren van drugs met een chromatografisch/massaspectrometrische methode bestaan ook andere specifieke richtlijnen. In het CLSI protocol C43A, 'Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) Confirmation of Drugs; Approved Guideline', worden minimum criteria beschreven voor de validatie van een GC/MS-methode. Ook worden richtlijnen gegeven voor de ontwikkeling van de methode zelf. Enkele voorbeelden:

- Gebruik een geschikt aantal negatieve stalen om de specificiteit van de methode na te gaan.
- Verifieer de juistheid op tenminste 3 verschillende concentratieniveaus.
- Onderzoek mogelijke carryover, en neem desgevallend maatregelen om carryover terug te dringen en op te volgen.
- Ga de lineariteit na met tenminste 5 concentratieniveaus.
- De performantie van het chromatografisch systeem moet minstens éénmaal per dag nagegaan worden met behulp van een 'verificatie mengsel'. Hierbij moeten de retentietijden, symmetrie, resolutie en signaal-ruis ratio worden beoordeeld.
- Om de werking van de massaspectrometer te beoordelen moet het laboratorium gebruik maken van een referentiemolecule waarbij de relatieve abundanties van verschillende dochterionen worden gemeten. Deze moeten binnen vooropgestelde criteria liggen.

- De concentratie van de standaarden, berekend op basis van de regressielijn, mag maximaal 20% afwijken van de nominale concentratie.
- Een kalibratiecurve mag hergebruikt worden indien men voor tenminste twee standaarden een berekende concentratie bekomt die minder dan 20% van de nominale waarde afwijkt.
- Een inwendige standaard moet toegevoegd worden aan het staal vóór het begin van de extractieprocedure.
- Gebruik in elke run een blanco.
- De retentietijd van de piek van een positief staal moet liggen binnen de 0,2 min of 1%, afhankelijk van welke de grootste afwijking vertoont, van de retentietijd van de inwendige standaard.
- Wanneer MS/MS gebruikt wordt, mag de resolutie bij de detectie van het precursor-ion maximaal één amu bedragen.

Kunnen we in het laboratorium van het Jessa ziekenhuis aan deze vooropgestelde eisen voldoen?

Eisen van de aanvragers

De eerste groep van aanvragers, namelijk de artsen werkzaam op de dienst Spoedgevallen verwachten een test met een snelle TAT. Hiervoor komt enkel de Triage screeningstest in aanmerking. Hoewel niet zo specifiek als een GC-MS methode is de specificiteit van deze assay aanvaardbaar voor routine gebruik, althans dat is de conclusie op basis van de literatuur en de jarenlange eigen ervaring. De artsen worden daarenboven bij elk positief resultaat op de hoogte gebracht, via een opmerking op het rapport, van de meest courant gebruikte moleculen die kunnen interfereren. Elk staal met een positief resultaat wordt onderworpen aan een confirmatietest. Zo kan men alsnog, weliswaar retrospectief, vals positieve resultaten elimineren.

Voor de tweede groep van aanvragers is het belangrijk om te kunnen oordelen of de patiënt al dan niet recentelijk cannabis heeft gebruikt, eventueel zelfs op de verpleegafdeling, wat een kwantitatief resultaat vereist. Daarnaast is het ook voor deze artsen belangrijk dat de test voldoende specifiek is. Noch onze screeningstest, noch de extern uitgevoerde confirmatietest levert ons een kwantitatief resultaat in een voldoende korte tijdsspanne. Zodoende werd niet voldaan aan de verwachtingen van de artsen werkzaam op de PAAZ. Gezien de aanwezigheid van een GC-MS in het laboratorium van het Jessa Ziekenhuis bestaat de mogelijkheid om aan deze eis te voldoen. De ontwikkeling en validatie van deze methode worden hieronder beschreven.

Eisen volgens internationale richtlijnen

Bij de screeningstest wordt in het laboratorium van het Jessa Ziekenhuis gewerkt met een cut-off waarde van 50 ng/mL.

Tijdens de ontwikkeling van een eigen GC-MS methode werd uiteraard rekening gehouden met de relevante richtlijnen. In een uitgebreide validatie werden ook alle minimum criteria getoetst betreffende de performantie van deze methode.

Ontwikkeling van een methode voor bepaling van THC-COOH met behulp van GC-MS

Er zijn meerdere methodes gepubliceerd voor de bepaling van THC-COOH met GC-MS^{5,6,7}. Hieronder volgt een beschrijving van de methode zoals ze in het laboratorium van het Jessa Ziekenhuis wordt toegepast. Bij de opmerkingen worden een aantal van de keuzes toegelicht.

Zuivere (99.99%) THC-COOH werd aangekocht bij Restek (Bellefonte, Pennsylvania, V.S.). Zuivere (99.6%) 9-voudig gedeutereerde THC-COOH-d9 (inwendige standaard, IS) werd aangekocht bij Cerilliant (Roundrock, Texas, V.S.). SPE cartridges werden aangekocht bij

Waters (Milford, Massachusetts, V.S.). Alle solventen behalve azijnzuur (VWR; Radnor, Pennsylvania, V.S.) werden aangekocht bij Biosolve (Valkenswaard, Nederland). Overige reagentia werden aangekocht bij Sigma-Aldrich (Bornem, België) en VWR (Haasrode, België).

Staalvoorbereiding

De staalvoorbereiding die hieronder wordt beschreven, is gebaseerd op een application note van Waters⁸ waaraan enkele wijzigingen werden aangebracht.

Aan 1 mL gecentrifugeerde urine (5 min, 2500 g) wordt 60 µL IS (250 ng/mL in methanol) toegevoegd. Het staal wordt vervolgens alkalisch gemaakt met 25 µL 10N NaOH en gehydrolyseerd gedurende 15 min aan 70°C. Na afkoeling wordt 25 µL van een 50% waterige oplossing azijnzuur en 100 µL van een 0,2 M pH 7 fosfaatbuffer toegevoegd om een neutrale pH te verkrijgen. Ten slotte voegt men 500 µL acetonitrile toe alvorens het staal te laden op de 'solid phase extraction' (SPE) cartridges (Oasis MAX 96-well Plate, 60 mg Sorbent per Well, 30 µm Particle Size, Waters; reversed phase and ion exchange).

Na het laden van het staal volgen 2 wasstappen (0,5 mL 50:50 water/methanol en 1mL hexaan). Hierna wordt de SPE cartridge gedurende 10 min onder volledig vacuüm gedroogd. Er wordt geëluëerd met 1,5 mL 49:49:1 hexaan/ethylacetaat/azijnzuur. Het eluaat wordt volledig droog gedampt onder stikstof en gederivatiseerd met 50 µL bis-trimethylsilyltrifluoroacetamide/1% trimethylchlorosilaan (BSTFA/TMCS) en 100 µL ethylacetaat gedurende 15 min aan 70°C.

GC-MS methode

Van het gederivatiseerd product wordt 2 µL geïnjecteerd (splitless injectie). Er wordt gebruik gemaakt van een kolom van het type Crossbond[®] van Restek (30m x 0,25 mm i.d., filmdikte van 0,25 µm 5% diphenyl/95% dimethylpolysiloxaan), met volgend temperatuursprogramma: initieel isotherme periode van 1 min aan 110°C gevolgd door een stijging naar een t° van 300°C aan een snelheid van 30°C/min. Tenslotte wordt deze temperatuur nog gedurende 7 min aangehouden.

Het dragergas is helium, aan een constante flow van 0.3 mL/min. De temperatuur van de injectiepoort bedraagt 240°C, die van de transferline 300°C.

Er wordt een MS² -methode gebruikt met als precursor-ionen m/z 473,2 (THC-COOH) en m/z 479,2 (d9-THC-COOH). Voor kwantificatie wordt gebruik gemaakt van één enkel production met m/z 355,2 (THC-COOH) en 361,3 (d9-THC-COOH).

Opmerkingen

- De eindconcentratie van de IS (vóór extractie) bedraagt ongeveer 14 ng/mL, dus zeer dicht bij de 15 ng/ml cut-off waarde die door de guidelines wordt voorgeschreven (zie hoger).
- De alkalische hydrolyse ter vrijzetting van het THC-COOH is uitgebreid beschreven in de literatuur. Een studie van T. Abraham et al. geeft een mooie vergelijking van de verschillende mogelijkheden⁷. Hieruit blijkt een betere recovery van THC-COOH bij alkalische hydrolyse t.o.v. enzymatische hydrolyse. Hoewel combinatie van beide methode de recovery nog kan verhogen, weegt de meerwaarde hiervan niet op tegen de verlenging van de staalvoorbereiding door een enzymatische hydrolyse (16h, 37°C in schuddend waterbad).
- De concentratie van de buffer werd verdubbeld (0.2 M ipv 0.1 M) omdat na toevoeging van de meer verdunde buffer niet de beoogde pH werd bereikt.
- Voor het optimaliseren van de MS-parameters werd gewerkt met een standaardoplossing in methanol van zowel THC-COOH als THC-COOH-d9. Voor de keuze van het meest geschikte precursor-ion werden een aantal full scan experimenten uitgevoerd (figuur 2-3). Mogelijke precursor-ionen waren m/z 473 en 371 voor THC-COOH en m/z 479 en 380 voor THC-COOH-d9.

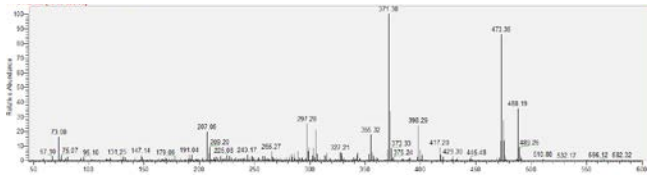


Fig. 2 Full-scan spectrum van THC-COOH

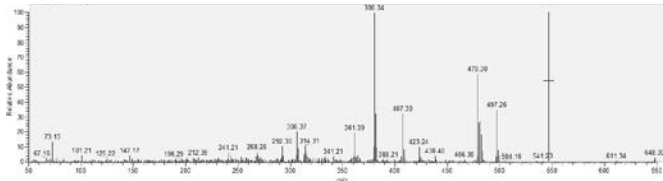


Fig. 3 Full-scan spectrum van THC-COOH-d9

- Om het meest geschikte precursor-ion te selecteren, werd behalve met de intensiteit ook rekening gehouden met de fragmentatie. Voor elk mogelijk precursor-ion, zowel bij THC-COOH als THC-COOH-d9, werd de fragmentatie bekeken bij verschillende collision energieën (CID, collision induced dissociation) (fig 4).

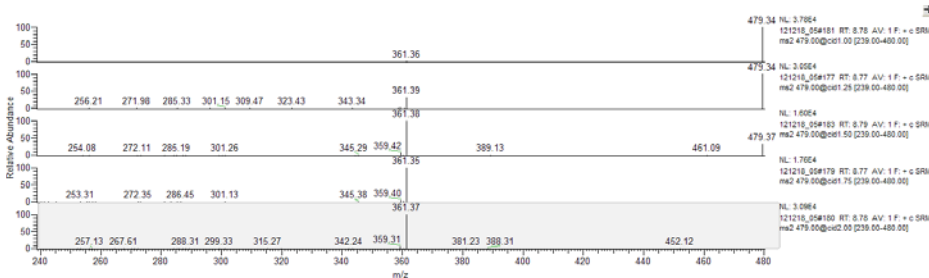


Fig. 4 Fragmentatiespectra bij verschillende CID's voor precursor ion 479.

Deze MS²-experimenten wezen uit dat de de ionen met m/z 473 en 479 de meest geschikte precursor-ionen zijn. De respectievelijk productionen zijn de ionen met m/z 355 en 361 (fig 5-6)

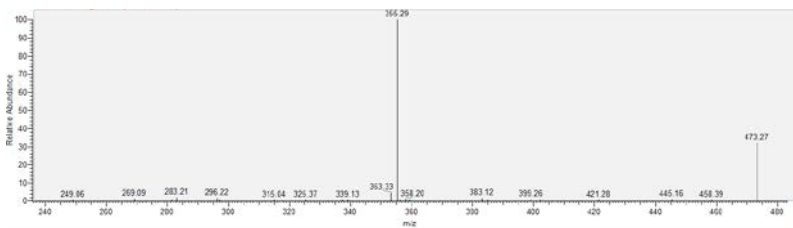


Fig. 5 MS² spectrum voor precursor ion 473 bij 1.5 CID

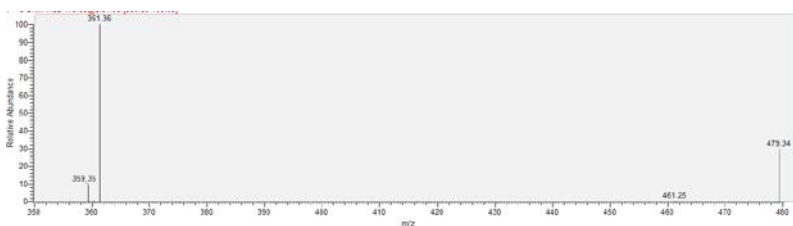


Fig. 6 MS² spectrum voor precursor ion 479 bij 1.5 CID

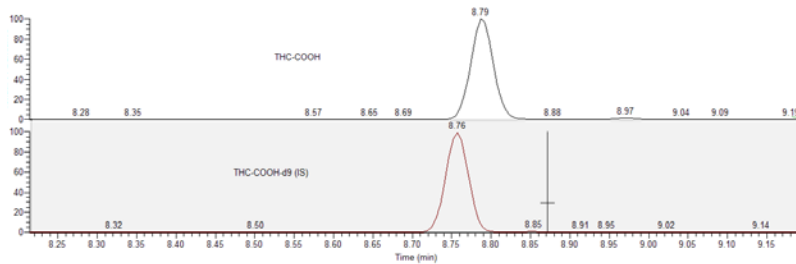


Fig. 7 Chromatogram van een positief patiëntstaal met retentietijden 8.76min en 8.79min voor de IS en THC-COOH respectievelijk

- Figuur 7 toont het chromatogram van een positief patiëntstaal. De piek van de IS valt binnen een venster van 1,8 sec van de piek van THC-COOH. Dit voldoet ruimschoots aan de eisen van de guidelines (< 3sec). Verder is de retentietijd voor de standaard identiek aan deze van de positieve stalen.
- Voor de opvolging van de performantie van de GC-MS wordt gebruik gemaakt van een polychloorbifenyyl-mix (PCB-mix). PCB's zijn organische stoffen waarbij 1 tot 10 Cl-atomen verbonden zijn aan een bifenyyl. Kenmerkend voor PCB's zijn hun hoge chemische en thermische stabiliteit. Gezien de aanwezigheid van meerder Cl-atomen vertonen ze zogenaamde Cl-clusters in hun massaspectrum. Daarenboven is er geen derivatisatie nodig voor detectie met GC-MS. Hierdoor is het mogelijk de performantie van de GC-MS te beoordelen los van de performantie van bv. de derivatisatie. De PCB-mix wordt geïnjecteerd en geanalyseerd met een speciaal ontwikkelde methode die full-scan metingen combineert met MS²-metingen. Tabel 2 geeft een overzicht van de verschillende functies die worden gecontroleerd.

gaschromatograaf Trace GC Ultra	ion trap massaspectrometer ITQ 900
Activiteit van de liner	Massa kalibratie
Stabiliteit van de retentietijden	Isolatie van precursorionen
Symmetrie van de pieken	Collisie-geïnduceerde dissociatie
Achtergrond van het systeem op hoge t°	Kwaliteit van het totale spectrum

Tabel 2 Functies van GC-MS waarvan performantie wordt opgevolgd met de PCB-mix

Validatie van onze GC-MS methode voor detectie van THC-COOH

Voor de validatie van de methode werden onderstaande performantiekarakteristieken nagekeken. De acceptatiecriteria met referentie (indien beschikbaar) zijn telkens toegevoegd.

- Repeteerbaarheid (CV% < CV% reproduceerbaarheid)
- Reproduceerbaarheid (CV% < 20, CLSI)
- Juistheid (+/- 20%, CLSI)
- Lineariteit ($R^2 \geq 0,998$)
- Limit of quantitation (LOQ, CV% < 20, CLSI)
- Specificiteit

In tabellen 3, 4 en 5 kan men de resultaten voor de repeteerbaarheid, reproduceerbaarheid, juistheid en lineariteit terugvinden.

	L1 (ng/mL)	L2 (ng/mL)	L3 (ng/mL)
Mean (10 metingen)	9,3	45,3	125,4
Repeteerbaarheid CV%	9,4	6,9	6,0
Reproduceerbaarheid CV%	10,6	8,8	6,7

Tabel 3 Resultaten voor repeteerbaarheid en reproduceerbaarheid

Target	19,0 (ng/mL)	145,0 (ng/mL)
Mean (4 metingen)	17,1	138,0
Juistheid % diff	-10,0	-4,8

Tabel 4 Resultaten voor juistheid

vgl ijkcurve	R ²
$Y = -0.375372 + 0.0606174 * X$	0,9947
$Y = 0.0249069 + 0.0529337 * X$	0,9994
$Y = -0.167644 + 0.0544762 * X$	0,9982
$Y = -0.414709 + 0.0622594 * X$	0,9984
$Y = 0.421366 + 0.0516821 * X$	0,9972
$Y = 0.565892 + 0.0456653 * X$	0,9992
$Y = -0.0843179 + 0.0570864 * X$	0,9997
$Y = 0.0121437 + 0.060947 * X$	0,9987
$Y = -0.187184 + 0.0594525 * X$	0,9991
$Y = -0.257416 + 0.0658912 * X$	0,9996

Tabel 5 Vergelijking van 10 ijklijnen

Aangezien er bij een concentratie van 9,3 ng/mL een CV% < 20% bekomen werd (zie tabel 3) en deze concentratie kleiner is dan de cut-off concentratie (15 ng/mL) geldt dat de gebruikte cut-off concentratie \geq de LOQ.

Voor het nagaan van de specificiteit werden 20 patiëntstalen geanalyseerd. De selectie van deze stalen gebeurde op basis van detectie van andere drugs in de urine (opiaten, tricyclische antidepressiva, cocaïne, methadon, amfetamine en/of benzodiazepines) of hospitalisatie op de dienst intensieve zorgen. Een lijst van gebruikte medicatie van deze laatste groep patiënten kan men terugvinden in bijlage 1. In geen enkel van deze 20 stalen werd een THC-COOH-gehalte groter dan 15 ng/mL aangetroffen.

Besluit

Er werd met succes een methode ontwikkeld voor de confirmatie van een positieve screeningstest voor cannabis in urine. Hierbij werd de nadruk gelegd op het voldoen aan zowel de eisen van de aanvragende artsen alsook die van diverse internationale richtlijnen. Tot slot hebben we de methode ook uitvoerig gevalideerd door ze te toetsen aan verschillende aanvaardingscriteria. De resultaten die werden bekomen doen ons besluiten dat we deze methode kunnen implementeren in het laboratorium van het Jessa Ziekenhuis.

To DO/ACTIONS

- 1) Deelname aan een eQC programma (LGC-standards, Drugs of abuse in urine proficiency testing scheme)
- 2) Evaluatie van gebruik van kwantitatief resultaat voor detectie van recent (her)gebruik

ATTACHMENTS

Patiënt 1		Patiënt 2		Patiënt 3		Patiënt 4		Patiënt 5	
Merksnaam	Werkzaam bestanddeel	Merksnaam	Werkzaam bestanddeel	Merksnaam	Werkzaam bestanddeel	Merksnaam	Werkzaam bestanddeel	Merksnaam	Werkzaam bestanddeel
Dobutrex	Dobutamine	Augmentin	Amoxicilline + clavulaanzuur	Paracetamol	Paracetamol	Paracetamol	Paracetamol	Contramal	tramadol
Dipidolor	Pirritamide	Pantomed	Pantoprazole	Pantomed	Pantoprazole	Tramadol	Tramadol	Eusaprim	sulfamethoxazole + trimethoprim
Adrazid	Insuline	Dafalgan	Paracetamol	Aacideam	Desamethasone	Alcapride	Alzorde	Azithromycine	Azithromycine
Nicotiel	Nicotine	Opiclor	Pirritamide	Cholemed	Simvastatine			Drifuzan	Fluconazole
Pantomed	Pantoprazole	Emconor	Bisoprolol + fumarate	Amior	Amlodipine			Zovirax	Aciclovir
solu-cortef	Hydrocortisone	Corono	Molsidomine	Depakine	Valproïnezuur			Pantomed	Pantoprazole
Primperan	Metoclopramide	Lasix	Furosemide	Duwent	fenoterol + bromide + pratriptium			Magnesium/faat	
Lasix	Furosemide	Crestor	Rosuvastatine	Serebide	salmeterol + fluticasone			Burinec	Bumetanide
Dalacin	Clindamycine	Asafow	Acetylsalicylzuur					Lysomucil	Acetylcysteine
Plogyl	Metronidazole	Fraxiparine	Nadroparine					Acideam	Dexamethasone
Roxiphan	Cephalosporines	Serebide	salmeterol + fluticasone					Vitamine B	
Perfusalgan	Paracetamol	Duwent	fenoterol + bromide + pratriptium					Nystatine	
Lamictal	Lamotrigine							Duphalac	lactulose
Chioamed	Simvastatine							unodefocylzuur	
Noznan	Levonorgestrel							Emconor	Bisoprolol + fumarate
Spiralax	Escitalopram							Duwent	fenoterol + bromide + pratriptium
Xanax	Alprazolam							Folvit	foliumzuur
Lormetazepam	Lormetazepam							Reyfaz	Atazanavir
Fraxiparine	Nadroparine							Novir	Ritonavir
									emtricitabine + tenofovir + disoproxil
									Miconazole
								Fraxiparine	Nadroparine
Patiënt 6		Patiënt 7		Patiënt 8		Patiënt 9		Patiënt 10	
Merksnaam	Werkzaam bestanddeel	Merksnaam	Werkzaam bestanddeel	Merksnaam	Werkzaam bestanddeel	Merksnaam	Werkzaam bestanddeel	Merksnaam	Werkzaam bestanddeel
Pantomed	Pantoprazole	Pantomed	Pantoprazole	avelox	Moxifloxacin	Duwent	fenoterol + bromide + pratriptium	Diprivan	Propofol
Nobiten	nebulivol	Lysomucil	Acetylcysteine	pantomed	Pantoprazole	Augmentin	Amoxicilline + clavulaanzuur	Sulfenta	Sulfentanil
Tamboor	flecainide	Cordanone	amiodaron	asafow	Acetylsalicylzuur	Depakine	Valproïnezuur	Elmiron	Rocuronium + Bromide
Lasix	Furosemide	Crestor	Rosuvastatine	burinec	bumetanide	Amior	Amlodipine	Augmentin	Amoxicilline + clavulaanzuur
Marcoumar	fenprocoumon	Asafow	Acetylsalicylzuur	corono	molsidomine	Asafow	Acetylsalicylzuur		
Dafalgan	paracetamol	Fraxiparine	Nadroparine	nobiten	nebulivol	Chioamed	Simvastatine		
Fraxiparine	Nadroparine			zylic	allopurinol	Cedocard	isosorbide		
				fraxiparine	Nadroparine	Lycia	Pregabaline		
				glucophage	metformine	Protoka	Levodopa + benserazide		
				dafalgan	paracetamol	Glucophage	metformine		
				marcoumar	fenprocoumon	Talace	Rianseril		
						Humuline	Insuline		
						Lioresal	Baclofen		
						Lysomucil	Acetylcysteine		
						Spiralax	escitalopram		

Bijlage 1 Medicatiegebruik van patiënten voor specificiteitsstudie

- 1 Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. Grotenhermen F. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42:327–360.
- 2 Pertwee R, ed. Pharmacokinetics and metabolism of the plant cannabinoids Delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *Cannabinoids.* New York: Springer-Verlag. 2005:657–690.
- 3 Milly E. Attema-de Jonge, PHARM D, PH D, Suzanne Y. G. Peeters, MD,† and Eric J. F. Franssen, PHARM D, PH D Performance of three point of care urinalysis test devices for drugs of abuse and therapeutic drugs applied in the emergency department. *The Journal of Emergency Medicine.* 2012;42:682–691,
- 4 European Laboratory Guidelines for Legally Defensible Workplace Drug Testing Version 1.0. *EWDTS* 2002.
- 5 Marcello Chiarottia, Luisa Costamagnab. Analysis of 11-nor-9-carboxy-D9-tetrahydrocannabinol in biological samples by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS-MS). *Forensic Science International* 2000;114 (2000) 1±6
- 6 Matthew H. Jamerson, Robert M. Welton, Cynthia L. Morris-Kukoski, and Kevin L. Klette. Rapid quantification of urinary 11-nor-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid using fast gas chromatography-mass spectrometry. *J Of Analytical Toxicology.* 2005;49:664–668
- 7 Tsadik T. Abraham¹, Ross H. Lowe¹, Stephane O. Pirnay^{1,2}, William D. Darwin¹, and Marilyn A. Huesti. Simultaneous GC-EI-MS Determination of Δ9-Tetrahydrocannabinol, 11-Hydroxy-Δ9-Tetrahydrocannabinol, and 11-nor-9-Carboxy-Δ9-Tetrahydrocannabinol in Human Urine Following Tandem Enzyme-Alkaline Hydrolysis. *J Anal Toxicology.* 2007;31:477–485.
- 8 Young M, Martin J. Optimized SPE for UPLC-MS/MS and GC-MS/MS Determination of THC and Metabolites in Urine and Blood. *Waters*