

Pipette 4-2012, Seite 08/09

Prof. Dr. Thomas Keller, Chemisch-Toxikologisches Labor, Gerichtsmedizin, Universität Salzburg

Korrespondenz:

thomas.keller@sbg.ac.at

Nachweis von Drogen- und Medikamentenwirkstoffklassen mittels Immunoassays

Trotz rasanter Entwicklungen in der apparativen Analytik belegen immunologische Methoden zur Untersuchung von Drogen- und Medikamentenwirkstoffklassen aus biologischen Matrices weltweit immer noch unumstritten einer der vordersten Plätze unter den Screeningverfahren.

Im Bereich der forensisch- und klinisch-toxikologischen Analytik existieren Drogen bzw. Medikamentenwirkstoffklassen, aber auch einzelne Substanzen, auf deren Vorhandensein oder Abwesenheit routinemässig im Rahmen von Übersichtsanalysen untersucht werden muss.

Von besonders forensisch-toxikologischer Relevanz sind hierbei folgende Drogen bzw. Medikamentenwirkstoffklassen:

Amphetamine/Methamphetamine, Barbiturate (nur noch selten von Bedeutung), Benzodiazepine, Buprenorphine, Cannabinoide, GHB ("Liquid Ecstasy"), Cocain bzw. Cocain-Metabolite, LSD, Methadon/EDDP, Opiate, Phencyclidin (von geringerer Bedeutung in Europa) sowie Substanzen aus der Klasse der tricyclischen Antidepressiva.

Anwendungsgebiete

Die Einsatzgebiete immunologischer Untersuchungen generell sind ganz besonders im Bereich der klinisch-toxikologischen Analytik wie auch in der forensisch-toxikologischen Analytik zu sehen.

Die klinisch-toxikologische Analytik erstreckt sich hier auf Untersuchungen beispielsweise im Bereich der Notfallanalytik.

Ein weiteres Anwendungsgebiet betrifft die Abhängigkeitsüberwachung. In diesem Bereich sind solche Untersuchungen hauptsächlich im Rahmen von Suchtkontrollen und Suchttherapien erforderlich.

Psychiatrische Kliniken aber auch Drogenkliniken sowie Krankenstationen von Justizvollzugsanstalten müssen beispielsweise bei Verdacht eines eventuell erfolgten Drogenkonsums Untersuchungen durchführen.

Auch die analytische Überwachung des Beigebrauchs im Rahmen der Methadon Therapie ist hier von großer Bedeutung.

Ganz besonders ist bei medizinisch-psychologischen Untersuchungen von Patienten, denen aufgrund eines Drogenmissbrauches die Fahrerlaubnis entzogen wurde, ein Nachweis der Drogenfreiheit für eine positive Beurteilung und Prognose von Bedeutung, was dann letztendlich zur Wiedererteilung der eigentlichen Fahrerlaubnis führen kann.

Im klinischen Sektor bestehen ebenfalls Anwendungsbereiche für den Einsatz von Immunoassays. Hier ist vor allen Dingen an den Nachweis von Medikamentenwirkstoffklassen bzw. Drogen im Zusammenhang mit der Sicherstellung der Abwesenheit von Fremdstoffen bei Transplantaten und Transplantationspatienten, der Feststellung des Hirntodes sowie die Überprüfung von Blutspendern, der Kontrolle während der Schwangerschaft und der Plazentapassage von Drogen bei Neugeborenen als Einsatzgebiet zu nennen.

Im Bereich der forensisch-toxikologischen Analytik ist ganz besonders auch an den verkehrsmedizinischen Sektor zu denken, wobei hier ganz besonders die Teilnahme am öffentlichen Straßenverkehr unter dem Einfluss von Fremdstoffen analytisch abzuklären und juristisch zu bewerten ist.

Immunologische Untersuchungen werden aber auch im Verlauf von forensisch-toxikologischen Untersuchungen beispielsweise nach Diebstahl, Raub und Körperverletzung aber auch bei Kapitalverbrechen wie Totschlag und Mord angewendet. In diesem Bereich erhaltene positive immunologische Analysenergebnisse müssen immer mit einem zweiten, von der apparativen Immunologie unabhängigen Analyseverfahren wie z.B.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), Hochdruckflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit (Tandem)-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) oder Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS), gegenbestätigt und in Form eines Gutachtens für Polizei und Justiz niedergelegt werden.

Weitere Einsatzgebiete für immunologische Untersuchungen sind aber auch immer mehr im Rahmen arbeitsmedizinischer Fragestellungen zu sehen. Diese betreffen beispielsweise die

Überwachung der Drogenfreiheit am Arbeitsplatz (Workplace Drug-Testing). Hierbei stehen vor allen Dingen Fragen der Arbeitssicherheit in Vor-dergrund.

Aber auch im Rahmen von Einstellungsuntersuchungen wird in vielen Ländern bereits ein umfassendes Drogen- und Medikamentenscreening (Pre-Employment Testing) durchgeführt. Einen weiteren Bereich betreffen beispielsweise versicherungsrechtliche Fragen. Hier muss beispielsweise vor Abschluss einer Lebensversicherung der Nachweis des Gebrauchs oder Missbrauchs von Medikamenten und Drogen erbracht werden.

Auch der Einsatz von Immunoassays für den Nachweis von Drogen im Bereich der Zollfandung aber auch beim Militär und im Sport darf nicht vergessen werden.

Grundlage der Immunoassays

Die Grundlage aller apparativ-immunologischer Immunoassays aber auch aller käuflich zu erwerbenden Schnelltestsysteme ist die Antikörper-Antigen-Reaktion. Antikörper auch als Gammaglobuline oder Immunglobuline bezeichnet sind die Antwort unseres Immunsystems auf das Eindringen körperfremder Substanzen in den Organismus. Die Antikörper werden gebildet, um diese körperfremden Substanzen zu binden und somit unwirksam zu machen. Die Bildung von Antikörpern wird jedoch nur dann ausgelöst, wenn das eingedrungene Molekül eine Mindestgröße besitzt. Nur bei hochmolekularen Substanzen wird der Organismus also mit der Bildung von Antikörpern beginnen. Die hochmolekularen Substanzen werden auch als Antigene bezeichnet. Antikörper sind aber auch außerhalb des lebenden Organismus in der Lage Antigene spezifisch zu binden. Dies macht man sich bei immunologischen Testsystemen zu Eigen. Solche Tests verwenden meist monoclonale Antikörper, die in Zellkulturen produziert werden. Bei der Erzeugung von Antikörpern gegen niedermolekulare Substanzen wie Drogen und Medikamentenwirkstoffe bedient man sich großer Trägermoleküle wie z.B. BSA (Bovine Serum Albumin). An diese Trägermoleküle werden diese niedermolekularen Substanzen gekoppelt, um im Versuchstier immunogen zu wirken. Sobald die Antikörper einmal gebildet sind reagieren sie auch auf die niedermolekulare Substanz allein.

Technik des Nachweises

Die Technik eines immunchemischen Nachweises kann sehr unterschiedlich sein. Meist werden sogenannte "kompetitive Immunoassays" verwendet, bei denen Antigene in der zu bestimmenden Probe mit markierten Antigenen aus dem Reagenz um eine beschränkte Menge an Antikörpern konkurrieren. Sind wenige Antigene in der zu bestimmenden Probe vorhanden, so werden, da die Antikörper-Antigen-Komplexbildung eine

Gleichgewichtsreaktion ist, viele markierte Antigene gebunden und nur eine geringe Zahl markierter Antigene bleibt frei in Lösung. Um Rückschlüsse auf die Konzentration einer Substanz in einer Probe zu ziehen, kann nun prinzipiell entweder die Menge an gebundenem oder die Menge an freiem markiertem Antigen bestimmt werden. Je nach verwendetem Markierungs- und Messverfahren ist hierzu ein Trennschritt erforderlich oder nicht. Wird eine Trennung der gebundenen von den freien Antigenen durchgeführt, so handelt es sich um einen "heterogenen Immunoassay".

Beim "homogenen Immunoassay" hingegen ist kein Trennschritt erforderlich. Die Praktikabilität dieser Methode ist somit im Vergleich zum heterogenen Immunassay beträchtlich höher und in den Laboren somit auch beliebter.

Heterogene Enzymimmunoassays sind beispielsweise der Radio-Immuno-Assay (RIA) sowie der "ELISA"-Enzymimmunoassay (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay).

Als Beispiele für homogene immunologische Verfahren sei der Enzymimmunoassay "EMIT" (Enzyme-Multiplied-Immunoassay-Technique) aber auch der Fluoreszenz-Polarization-Immuno-Assay (FPIA) und einer der meist verwendeten immunologischen Technologien überhaupt, der CEDIA-Test (Cloned-Enzyme-Donor-Immuno-Assay) genannt.

Einer in der forensischen Analytik verbreitetsten immunologischen Assays stellt die CEDIA-Technologie dar. Beim CEDIA-Test wurde die rekombinante DNA-Technologie zur Anwendung gebracht. Grundlage der CEDIA-Technologie ist das Enzym β -Galactosidase, das gentechnisch in zwei inaktive Fragmente gespalten wird. Nach Zugabe des ersten Fragments (Enzym-Donor, ED) zu einer Lösung mit einem zweiten Fragment (Enzym-Akzeptor, EA) rekombinieren diese spontan zu einem intakten Enzym, das im Test ein Substrat umsetzt, dessen Farbänderung spektralfotometrisch verfolgt werden kann.

In der Probe konkurriert das freie Antigen dann mit dem an ein inaktives Fragment (ED) gekoppelte Antigen um den Antikörper. Der Komplex, der aus einer ED-Antigen-Antikörper-Verbindung besteht, ist nicht mehr in der Lage, die Rekombination der inaktiven Fragmente durchzuführen. Die gebildete Menge an β -Galactosidase korreliert mit den in der Probe vorhandenen freien Antigenen (Drogen).

Ein ebenfalls vielfach angewandtes System stellt der Fluoreszenz-Polarisation-Immuno-Assay dar. Als Markierungsreagenz dient hierbei eine fluoreszierende Verbindung wie Fluorescein. Das Reagensgemisch aus Antikörpern, Antigenen aus der Probe und an Fluorescein gebundenen Antigenen wird mit polarisiertem Licht bestrahlt. Dieses Licht wird vom Fluorescein absorbiert und als Fluoreszenzlicht wieder abgegeben. Der Polarisationsgrad des Fluoreszenzlichtes ist umgekehrt proportional zur Rotationsgeschwindigkeit des fluoreszierenden Moleküls. Ist das Molekül klein, d.h. ist das

Fluorescein-markierte Antigen nicht an einen Antikörper gebunden, so rotiert das Molekül schnell, der Polarisationsgrad ist gering.

Ist das Fluorescein-markierte Antigen aber an einen Antikörper gebunden, so rotiert das wesentliche größere Molekül jetzt wegen seiner höheren Trägheit nun langsamer, was einen höheren Polarisationsgrad zur Folge hat. Da es sich bei diesem Verfahren um einen kompetitiven Assay handelt, konkurrieren Fluorescein-markierte Antigene mit nicht markierten Antigenen aus der Probe um die in beschränkter Anzahl vorhandenen Antikörper-Bindungsstellen, und die beobachtete Fluoreszenzpolarisation liegt zwischen dem Wert für vollständig gebundenes und vollständig freies Fluorescein-markiertes Antigen. Die Fluoreszenzpolarisation ist somit umgekehrt proportional der Konzentration des Antigens in der Probe.

Die genaue Beziehung zwischen Polarisationsgrad und Konzentration des Antigens in der Probe wird bestimmt, indem die Polarisationswerte von Kalibrierungsstandards gemessen werden. In der Regel wird ein Schwellenwert (Cut-off-Wert) in der Immunologie festgelegt, bei dessen Überschreitung die Probe als positiv angesehen wird. Je niedriger jedoch ein solcher Cut-off-Wert gewählt wird, desto leichter kann es durch Matrixeffekte zu „falsch-positiven“ Resultaten kommen, die dann mit spezifischeren Meßmethoden wie HPLC und GC/MS nicht zu bestätigen sind.

Der Einsatz von Einzel- und Multi-Tauchtestsystemen aber auch Einzel- und Multi-Kassettensystemen findet z.B. im niedergelassenen ärztlichen Bereich aber auch bei den Exekutivbehörden und Justizvollzugsanstalten weit verbreitete Anwendung. Die auf dem Markt befindlichen Systeme sind zum Screenen verschiedener Drogen- und/oder Medikamentenwirkstoffklassen erhältlich und basieren auf dem Prinzip der GLORIA-Technologie (Gold-Labeled-Optical-read-RapidImmuno-Assay). Diese Teststreifen bestehen aus einer schmalen Trägerfolie, auf die verschiedene Vlies-Zonen aufgebracht sind, die wiederum von einer Folie abgedeckt werden. Auf der Abdeckfolie befindet sich neben der Bezeichnung des zu bestimmenden Parameters eine Markierung, die anzeigt, wie tief der Teststreifen in die Flüssigkeit (z.B. in den Urin) eingetaucht werden soll. Auf der Trägerfolie befinden sich das Detektionsfeld sowie eine Farbmarkierung, anhand der die verschiedenen Teststreifen zu unterscheiden sind.

Während des Eintauchvorganges saugt sich das unterste Vlies mit der Flüssigkeit voll und dient als Reservoir für den nachfolgenden chromatographischen Prozess, der entlang des Teststreifens aufgrund der Kapillarkräfte stattfindet (lateral flow immunoassay). Das unmittelbar anschließende Vlies enthält Gold-markierte monoclonale Antikörper, die spezifisch für den zu bestimmenden Analyten sind. Der in der Probe eventuell vorhandene

Analyt reagiert mit den Gold-markierten monoclonalen Antikörpern und bildet mobile, rot-gefärbte Komplexe. Nicht gebundene Gold-mar-kierte monoclonale Antikörper wandern mit der Reaktionsmischung zum nächsten Vlies, wo sie von immobilisierten Analyt-Analoga abgefangen werden.

Die mobilen, rot-gefärbten Komplexe bestehen aus Analyt der Probe und Gold-mar-kierten monoclonalen Antikörpern, durchlaufen dieses Vlies und gelangen zur De-tektionszone, wo sie ein positives Signal ergeben. Die Farbintensität korreliert mit der Konzentration von Analyt (Droge/Medikament) in der Probe.

Roadside-Streifentestsysteme

Das Fahren unter Cannabiseinfluß stellt heutzutage in vielen Ländern eines der größten Probleme im Straßenverkehr dar. Fahrzeuglenker unter Cannabiseinfluß zu erkennen und aus dem Straßenverkehr zu entfernen ist nicht nur ein Problem, dem sich die Exekutive gegenüber sieht.

Einfach zu handhabende, immunologische "Roadside"-Streifentestsysteme zur De-tektion von Cannabinoiden im Urin stellen nach wie vor ein unverzichtbares Hilfsmittel dar, wenn ein von Exekutivseite vorhandenes Verdachtsmoment bei Fahrten unter Drogeneinfluß erhärtet werden soll.

Durch z.B. den Einsatz eines Drogenschnelltestsystems mit zwei Schwellenwerten, einmal mit einem Cut-Off von 50 ng Cannabinoidäquivalente/mL Urin sowie eines neuen, gezielt angehobenen Schwellenwertes (jetzt jedoch bezogen auf THCCOOH-Glucuronid und nicht wie üblich auf THCCOOH) kann das Erkennen eines aktuellen Konsumverhaltens deutlich verbessert werden, ohne jedoch einen länger zurückliegenden Cannabiskonsum zu übersehen.

Die Abteilung Forensische-Toxikologie des Instituts für Gerichtliche Medizin der Universität Salzburg führte eine über 3 Jahre dauernde Studie zur diagnostischen Effizienz eines Urinschnelltestsystems mit zwei verschiedenen Schwellenwerten zur verbesserten Erkennung aktuell unter Cannabiseinfluß stehender Fahrzeuglenker durch. Hierzu wurde das Doppelstreifenschnelltestsystem "Check24" für Cannabinoide der Firma Protzek GmbH (Füllinsdorf, Schweiz) zum Einsatz gebracht.

Im genannten Zeitraum wurden sämtliche, von der Exekutive aus den Bundesländern Salzburg und Oberösterreich sichergestellten Blutproben sowie die dazugehörigen je-weiligen Urinproben von vermeintlich unter Drogeneinfluß stehenden Fahrzeuglenkern, einer forensisch-toxikologischen Analyse auf Cannabinoide unterzogen. In die-sem Zeitraum wurden über 700 Blutproben einer forensisch-toxikologischen Untersuchung auf gängige

Drogen sowie auf zentralwirksame Medikamentenwirkstoffe unterzogen. Insgesamt wurden aus dem übermittelten Probenmaterial 297 Blutproben und Urinproben einer Analyse auf Cannabinoide unterzogen. Alle Urinproben wurden mit dem "Check24"-Schnelltestsystem sowie anschließend mittels apparativer Immunologie (Hitachi 912) auf forensisch-relevante Drogen und Medikamentenwirkstoffklassen untersucht. In 211 Urinproben wurden beim Check24-Test die beiden Schwellenwerte überschritten. Von den dazugehörigen Blutproben wurde in 184 Fällen (87%) THC, 11-OH-THC und THCCOOH mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) nachgewiesen. In diesen Fällen wurde dem Fahrzeuglenker aufgrund einer aktuellen Berausung durch Cannabis eine Fahruntüchtigkeit in Form eines Gutachtens attestiert.

Durch die Analyse der sichergestellten Urinproben mit dem "Check24"-Doppelstreifentestsystem konnte mit einer Wahrscheinlichkeit von 87 % eine aktuelle Berausung eines Fahrzeuglenkers infolge eines vorangegangenen Cannabiskonsums vorhergesagt werden. Dies gibt einem Exekutivbeamten und einem die klinische Untersuchung durchführenden Arzt in hohem Maße eine Sicherheit, die letztendlich zur Abnahme einer Blutprobe und zur Bestätigung des anfänglich geäußerten Anfangsverdachts seitens des Exekutivbeamten führt.

Das eingesetzte Testsystem hat sich im alltäglichen Einsatz in der Praxis sowohl methodisch wie auch analytisch bewährt. Mit Hilfe des zusätzlichen Teststreifens mit angehobenem Cut-Off-Wert konnte bei allen untersuchten § 5 StVO Fällen eine sehr hohe Vorraussagewahrscheinlichkeit erzielt werden, was das Fahren unter aktueller Berausung durch Cannabis betrifft.

Mit dem verwendeten Testsystem gelingt es in hohem Maße einen aktuellen Cannabiskonsum zu erkennen, wobei ein länger zurückliegender Konsum von Cannabis jedoch nicht übersehen wird.

Kreuzreaktivität

Mit wenigen Ausnahmen, beziehen sich die heute verfügbaren immunologischen Testsysteme auf Drogen- bzw. Medikamentenwirkstoffklassen. Die entsprechenden Antikörper erkennen somit auch strukturell ähnliche Verbindungen. Dies erklärt das Phänomen der Kreuzreaktivität. Über mögliche Kreuzreaktivitäten entsprechender Substanzen mit dem angewandten Test, hat sich der Anwender grundsätzlich über das Informationsmaterial des Herstellers bzw. der einschlägigen Fachliteratur kundig zu machen. Denn selbst bei einer niedrigen Kreuzreaktivität muß im Falle einer fulminanten

Überdosierung mit einem entsprechenden falsch-positiven immunologischen Meßergebnis gerechnet werden.

Überdies ist bei der Anwendung immunchemischer Testverfahren zu bedenken, daß auch beistimmte Wirksubstanzen, die sich strukturell von der zu untersuchenden Substanzklasse vielfach dramatisch unterscheiden, diese Drogenschreenings stark beeinflussen, d.h. zu falsch-positiven Befunden führen können. Hierzu wird schon teilweise in den entsprechenden Fachinformationen darauf hingewiesen.

So wird die Bestimmung der Opiate mittels CEDIA-Technologie beispielsweise von Promethazin beeinflußt, während bei den tricyclischen Antidepressiva die Wirksubstanzen Carbamazepin, Diphenhydramin, Quetiapin, Opipramol, Cetirizin und Hydroxyzin ein verfälschtes Ergebnis liefern können. Substanzen wie Fentanyl, Ambroxol, Sertralin und Pipamperon führen bei der Bestimmung von LSD im Urin zu einem falsch-positiven Meßergebnis. Falsch-positive Cannabinoid-Testergebnisse im Urin wurden auch beim CEDIA DAU THC Multilevel Assay beobachtet, nachdem man nicht-infizierten Probanden, das Medikament „Efavirenz“ verabreicht hatte. Ähnliche Beobachtungen werden auch bei der Verwendung anderer immunologischer Systeme und Meßtechniken gemacht.

Mit dem Wissen über Kreuzreaktivität und/oder der Beeinflussung einer oder mehrerer Wirksubstanzen einer Drogen- und/oder Medikamentenwirkstoffklasse, bei der immunologische Meßtechniken wie CEDIA, FPIA etc. zur Anwendung kommen, ist immer ein immunologisch positives Testresultat mit einem zweiten, von der Immunologie unabhängigen Analyseverfahren, zu bestätigen. Eine solche Vorgehensweise ist insbesondere in forensisch-relevanten Fällen oberstes Gebot und somit als unerläßlich zu betrachten.

Zusammenfassung

Trotz rasanter Entwicklungen in der apparativen Analytik belegen immunologische Methoden zur Untersuchung von Drogen- und Medikamentenwirkstoffklassen aus biologischen Matrices weltweit immer noch unumstritten einer der vordersten Plätze unter den Screeningverfahren.

Im Bereich der forensisch- und klinisch-toxikologischen Analytik existieren Drogen bzw. Medikamentenwirkstoffklassen, aber auch einzelne Substanzen auf deren Vorhandensein oder Abwesenheit routinemäßig täglich im Rahmen von Übersichtsanalysen geprüft werden soll.

Hierbei sollte sich jedoch die Laborfachkraft als Anwender einer automatisierten apparativen Immunologie über die Möglichkeiten und Grenzen einer solchen Meßtechnik ebenso im

Klaren sein wie der Nichtfachmann (Polizeibeamter, Arzt, etc.), der in seinem Wirkungsfeld Einzelstreifen- und/oder Kassenmultitests zur Anwendung bringt.

Literatur

- H. Schütz,
Screening von Drogen und Arzneimitteln mit Immunoassays,
3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsabteilung Abbott, 1999
- Th. Keller, A. Schneider, R. Dirnhofer, R. Jungo, W. Meyer,
Fluorescence Polarization Immunoassay for the detection of drugs of abuse in human
whole blood,
Medicine, Science and the Law, 40 (3) (2000) 258-262
- R. Wong, H. Tse, Lateral Flow Immunoassay, Human Press, 2009
- Th. Keller,
Cannabis im Straßenverkehr,
Österreichische Ärztezeitung, 15/16 (2011) 26-29