

Z Warsztatów Badawczych i Doświadczeń Klinicznych

Halina Matsumoto, Bogdan Szukalski, Krystyna Stencka, Elżbieta Woźny
Pracownia Psychofarmakologii I Kliniki Psychiatrii AM, Zakład Biochemii Instytutu
Psychiatrii i Neurologii

BADANIA PRZYDATNOŚCI TESTU ABUSCREEN-ONTRAK DO WYKRYWANIA OPIATÓW, AMFETAMIN, BARBITURANÓW I KANABINOLI W MOCZU NARKOMANÓW

Wstęp

Skrining próbek moczu na obecność narkotyków odbywa się zwykle przy pomocy metod immunologicznych; immunoenzymatycznych (EIA - Enzyme Immunoassay), immunofluorescencyjnych (FPIA - Fluorescence Polarisation Immunoassay) lub radioimmunologicznych (RIA - Radioimmunoassay). Metody te wymagają określonego typu wyposażenia (spektrofotometr, analizator spolaryzowanego światła fluorescencji, licznik gamma) i są zwykle stosowane w laboratoriach klinicznych i toksykologicznych. Nadają się one do prowadzenia dużych programów skринingowych przy użyciu niewielkich ilości materiału biologicznego.

Wymienione aparaty są jednak dość kosztowne, a ich użycie wymaga doświadczenia laboratoryjnego. Ponadto są sytuacje, w których konieczne jest wykonanie badania na obecność substancji uzależniających bez użycia jakiegokolwiek aparatury, np. przez policję na miejscu wypadku, w Oddziale Detoksykacyjnym u pacjenta przywiezionego z objawami ciężkiego zatrucia narkotykami itp.

Nowa metoda wykrywania narkotyków - Abusereen Ontrak, opracowana przez koncern Hoffmann-La Roche, wychodzi naprzeciw takim potrzebom. Jest to jakościowy, płytkowy test immunologiczny, oparty na hamowaniu aglutynacji lateksu, przeznaczony do wykrywania podstawowych grup substancji

uzależniających, bez konieczności użycia aparatury i innych urządzeń laboratoryjnych a także dodatkowych odczynników poza tymi, które znajdują się w zestawie testowym.

Metoda daje wynik dodatni gdy stężenie narkotyku lub jego metabolitów w moczu przekroczy tzw. „próg czułości” (ang. cutoff level, Minimal Allowable Threshold - MAT)*.

Badania mogą być wykonywane przez personel bez dużego doświadczenia w pracy laboratoryjnej i dostarczają wyników, które odczytuje się wizualnie. Dużą zaletą metody jest możliwość otrzymania wyniku w ciągu 3-5 minut. Ponieważ leczenie narkomanów opiatowych metadonem (stosowane m.in. przez Instytut Psychiatrii i Neurologii oraz Szpital Nowowiejski) wymaga sprawnie i szybko funkcjonującego systemu kontroli abstynencji, metoda Ontrak mogłaby być przydatna, jako podstawowy test skriningowy.

Nie wiadomo jednak czy szybki test ten sprawdza się również w naszych warunkach, tzn. czy daje prawidłowe wyniki przy badaniu moczu narkomanów stosujących preparaty o nieznanym, zmiennym składzie, otrzymane prymitywnymi domowymi metodami (makiwara, mleczko makowe, kompot itp.) [4, 5], często „wzbogacane” innymi substancjami psychoaktywnymi w celu zwiększenia ich efektu.

Materiał i metody

Materiałem użytym do badania był mocz 121 narkomanów leczonych w Szpitalu Nowowiejskim i w Instytucie Psychiatrii i Neurologii, pobierany pod kontrolą, by wykluczyć możliwość zafalszowań. Oznaczano w nim barbiturany (39 pacjentów), opiaty (32 pacjentów), amfetaminy (26 pacjentów) i kanabinoły (24 pacjentów) stosując test Abuscreen-Ontrak (Ontrak Test Kit Roche Diagnostic System) oraz metodę immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA).

Testy Abuscreen-Ontrak (Ontrak Test Kit Roche Diagnostic System) do wykrywania opiatów, barbituranów, amfetaminy i kanabinoli i otrzymano od producenta. Testy są sprzedawane w opakowaniach po 40 lub 100 zestawów. Zawierają one plastikowe płytki do przeprowadzenia reakcji, odczynniki, plastikowe łopatkę do mieszania i pipetki do dokładnego odmierzenia objętości moczu.

Obudowa płytki wykonana jest z czarnej masy plastycznej, natomiast część, w której zachodzi reakcja immunologiczna - z przezroczystego plastiku. Składa się

*Jest to ustalone przez producenta testu stężenie, które musi być przekroczone, aby wynik mógł być uznany za dodatni.

ona z zagłębienia do przeprowadzenia reakcji („studzienki”, Mixing well), kapilarnego tunelu, którym przepływają substraty i produkty reakcji (Track) oraz kwadratowego zagłębienia do odczytywania wyników badania (Viewing chamber) (Ryc.1).

Do każdego zestawu dołączone są 3 flaszeczki z odczynnikami oznaczonymi literami A, B, i C. Buteleczka A zawiera roztwór przeciwciała zdolnego do reakcji immunologicznej z badanym narkotykiem i jego głównymi metabolitami, butelecaska B - roztwór mieszaniny buforowej, butelecaska C - zawiesinę cząstek lateksu „opłaszczonych” cząsteczkami narkotyku (tj. ze związanymi na powierzchni lateksu cząsteczkami oznaczanej substancji).

W zestawie znajduje się również flaszeczka z moczem zawierającym oznaczaną substancję w stężeniu stanowiącym połowę „progu czułości” - jako tzw. ujemna kontrola (test wykonywany przy użyciu takiego moczu powinien dać wynik ujemny).

Zasada metody opiera się na hamowaniu aglutynacji lateksu. W obecności „czystego” moczu, lub przy stężeniu badanej substancji niższym od „progu czułości” - przeciwciała wiąże się z cząstkami lateksu „opłaszczonymi” cząsteczkami substancji oznaczanej powodując aglutynację lateksu, manifestującą się utworzeniem wyraźnie widocznej klaczkowatej struktury.

Jeśli mocz zawiera substancję oznaczaną lub jej metabolity, łączą się one z przeciwciałem, nie dopuszczają do połączenia przeciwciała z cząstkami lateksu a tym samym - do ich aglutynacji. Stężenia odczynników są tak dobrane, że hamowanie aglutynacji następuje wówczas, gdy stężenie narkotyku lub jego metabolitu w moczu przekroczy wartość „progu czułości”, ustalonego dla danej substancji.

Wykonanie badania polega na nałożeniu za pomocą pipety (firmowej lub innej) i 11/ μ L badanego moczu do zagłębienia, dodanie po 1 kropli odczynników kolejno z buteleczek A, B i C, starannym wymieszaniu składników plastikową łopatką, wprowadzeniu mieszaniny tą samą łopatką przez kapilarny tunel do kwadratowej „studzienki” i odczytaniu wyniku badania.

Negatywnym wynikiem jest aglutynacja cząstek lateksowych, czyli pocętkowane białe pole (kratownica utworzona z cząstek lateksowych), natomiast wynikiem dodatnim - brak objawów aglutynacji, czyli mleczny, jednolity wygląd mieszaniny reakcyjnej. Dostrzegalna mikroaglutynacja lateksu („klaczkki” częściowo zaglutynowanej zawiesiny lateksowej na mlecznym białym tle) może zachodzić, gdy stężenie narkotyku jest równe lub bliskie wartości „progu czułości” (mikroklaczkowanie na poziomie „progu czułości”). Każdy rodzaj aglutynacji, w tym wspomniane wyżej mikroklaczkowanie, odczytuje się jako wynik ujemny.

„Progi czułości” dla poszczególnych narkotyków są następujące:

Opiaty	300 ng/mL
Barbiturany	200 ng/mL
Amfetaminy	1000 ng/mL
Kokaina	300 ng/mL
Kanabinole	100 ng/mL
Fencyklidyna	25 ng/mL

Wartości te odpowiadają wymaganiom NIDA (National Institute of Drug Abuse, USA) w zakresie czułości metod oznaczania narkotyków w płynach biologicznych.

Wynik badania za pomocą testu Ontrak może być zachowany jako dowód. Jest to ważne w różnych sytuacjach, ale szczególnie w przypadkach związanych z łamaniem prawa. Należy wówczas wyjąć z bloku płytki jej centralną część i włożyć ją z powrotem odwrotną stroną (w takim położeniu jej zawartość nie może się wylać). Można również zrobić fotografię płytki po zakończeniu badania. Instrukcja zaleca wykonanie dla każdej serii badań kontroli ujemnej. Jednakże wykonanie wyłącznie kontroli ujemnej nie daje gwarancji, że dany zestaw będzie prawidłowo reagował na próbki dodatnie. Należałoby więc wykonywać zarówno kontrole dodatnie jak i ujemne. Producent nie stwarza jednak możliwości wykonania kontroli dodatniej (brak w firmowych zestawach moczu wzorcowego, zawierającego narkotyk w stężeniu przekraczającym próg czułości), gdyż jednoczesne wykonywanie obu zwiększyłoby koszt oznaczeń.

B. Wyniki

Wykonano badania moczu na obecność opiatów u 32 pacjentów, barbituranów - u 39 pacjentów, kanabinoli - u 24 pacjentów oraz amfetaminy - u 26 pacjentów.

Do weryfikacji przydatności testu Ontrak jako metody wykrywania opiatów zastosowano metodę immunofluorescencyjną (FPIA) przy użyciu aparatu Abbotta.

Na 32 badania opiatów wykonane metodą FPIA i testem Abuscreen Ontrak - w czterech przypadkach test Ontrak dał wynik dodatni, chociaż stężenie opiatów w moczu, oznaczane metodą FPIA, było niższe od progu czułości dla opiatów (Tabela 1, mocze Nr 9, 10, 26 i 31).

W badaniach barbituranów i kanabinoli otrzymano po jednym wyniku fałszywie dodatnim (tabela 2 i 3), natomiast dla amfetamin wyniki uzyskane obu metodami były zgodne (Tabela 4).

Tabela 1

Wyniki badania opiatów metodą immunofluorescencyjną Abbotta (FPIA),
immunoaglutynacyjnym testem Ontrak La Roche.

Lp.	pacjent	FPIA	Ontrak
1.	Z.Z.	1000	+
2.	A.G.	1000	+
3.	T.D.	1000	+
4.	H.K.	1000	+
5.	W.B.	1000	+
6.	B.Ch.	2000	+
7.	W.R.	3000	+
8.	M.F.	1000	+
9.	K.Z.	147	+
10.	W.D.	100,4	+
11.	Z.D.	38,8	-
12.	R.M.	1000	+
13.	W.J.	513	+
14.	T.K.	3000	+
15.	P.K.	5000	+
16.	J.J.	50,3	-
17.	E.P.	1000	+
18.	H.D.	120	-
19.	A.P.	1000	+
20.	A.C.	1000	+
21.	B.P.	3000	+
22.	J.P.	10,4	-
23.	J.K.-L.	1000	+
24.	J.K. ^{1'}	1000	+
25.	J.K. ^{2'}	1000	+
26.	P.P.	240	+
27.	B.M.	59,9	-
28.	D.L.	380	+
29.	O.G.	1000	+
30.	A.W.	340	+
31.	D.Z.	136,08	+
32.	B.C.	niski (low)	-

Tabela 2

Wyniki badania barbituranów w moczu 39 pacjentów metodą immuno-
fluorescencyjną Abbotta (FPIA) i immunoaglutynacyjnym testem Ontrak La Roche

Wynik Metoda	Dodatni		Ujemny	
	FPIA	Ontrak	FPIA	Ontrak
Liczba próbek moczu	6	7	33	32

Tabela 3

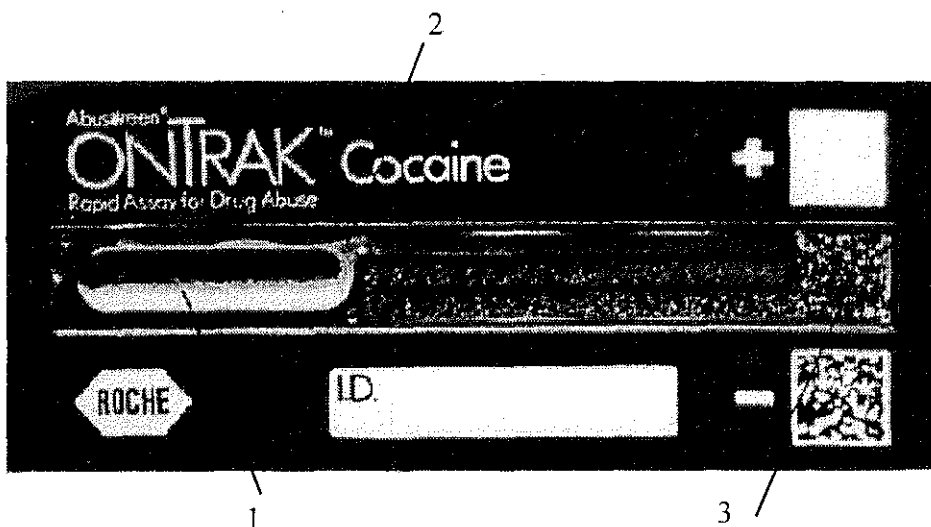
Wyniki badań kanabinoli w moczu 24 pacjentów metodą immunofluorescencyjną Abbotta (FPIA) i testem immunoaglutynacyjnym Ontrak La Roche

Wynik	Dodatni		Ujemny	
	FPIA	Ontrak	FPIA	Ontrak
Liczba próbek moczu	-	1	24	23

Tabela 4

Wyniki badania amfetaminy w moczu 26 pacjentów metodą immunofluorescencyjną Abbotta (FPIA) i testem immunoaglutynacyjnym Ontrak La Roche

Wynik	Dodatni		Ujemny	
	FPIA	Ontrak	FPIA	Ontrak
Liczba próbek moczu	4	4	22	22



Ryc. 1. Test Abuscreen-Ontrak

1. Miejsce reakcji (Mixing well)
2. Droga przepływu substratów (Track)
3. Miejsce odczytu wyniku reakcji (Viewing chamber)

Tak więc bez weryfikacji inną metodą (w naszym badaniu FPIA) 6 wyników (4,9%) uzyskanych za pomocą testu Ontrak byłyby fałszywie dodatnich, a więc krzywdziłoby pacjentów, którzy nie złamali abstynencji.

W pozostałych przypadkach nie stwierdzono rozbieżności wyników otrzymanych obu metodami, to znaczy mocze, w których metodą FPIA wykazano

stężenie narkotyku wyższe od „progu czułości” dla testu Ontrak - przy badaniu tym testem dawały wynik dodatni, a gdy stężenie było niższe od „progu czułości” - wynik ujemny.

Omówienie wyników

W pewnych sytuacjach klinicznych i sądowych potrzebny jest szybki, przenośny test pozwalający wykrywać w materiale biologicznym małe stężenia najczęściej stosowanych przez narkomanów substancji uzależniających. Pod koniec lat 80-tych próbowano wprowadzić taką metodę pod nazwą KDJ Quick Test (Keystone Diagnostic), który miał jednak szereg mankamentów i nie spełniał oczekiwań analityków [6,7,8].

Nie nadawał się na przykład do wykrywania kanabinoli, najczęściej używanych w USA substancji uzależniających oraz benzoiloekegoniny - głównego metabolitu kokainy. Ponadto przy badaniu innych narkotyków dawał dość znaczny procent wyników fałszywie ujemnych i fałszywie dodatnich. Oceniany przez nas Ontrak nie ma tych wad, chociaż wyniki fałszywie dodatnie mogą się zdarzać. W naszych badaniach było ich 6 na 121 oznaczeń, a więc 4,9%.

Prawdopodobnie najpoważniejszym mankamentem metody Ontrak i innych testów tego typu jest subiektywny charakter oceny wyników. Wyniki zdecydowanie dodatnie i ujemne są łatwe do oceny, ale próbki moczu zawierające dostateczną ilość narkotyku, aby osłabić aglutynację, ale za małą, by ją całkowicie zahamować - stwarzają czasem duże trudności interpretacyjne.

Subiektywny charakter oceny wizualnej sprawia, że taki rezultat jedna osoba może ocenić jako wynik dodatni, a inna - jako ujemny.

Wyniki metody Ontrak porównywano z wynikami uzyskanymi metodą FPIA. Zarówno Ontrak jak i FPIA dają reakcje krzyżowe z różnymi związkami opioidowymi jak kodeina, dihydromorfina, 3-glukoronian morfiny itp. Różne próby immunologiczne mogą dawać odmienne ilościowe i półilościowe wyniki dla tej samej próbki, zależne od profilu reakcji krzyżowych oraz proporcji ilościowych między substancją uzależniającą i jej metabolitami. Wyniki fałszywie ujemne (w porównaniu np. z FPIA) można przypisywać albo brakowi czułości testu jakościowego w porównaniu z metodami półilościowymi lub ilościowymi, albo rozkładem narkotyku w próbce podczas przechowywania. Przyczyną wyników fałszywie dodatnich przy badaniu opiatów w tej pracy mogła być obecność w moczu składników nieoczyszczonych preparatów ze

słomy makowej, które dają reakcję z odczynnikami testu Ontrak, a pozostają „niezauważone” przez metodę FPIA.

Do analizy za pomocą testu Ontrak używa się 1 l/μL moczu i producent oferuje pipetki odmierzające taką objętość. Można jednak stosować również inne pipety, chociaż pracownikom bez doświadczenia laboratoryjnego zalecilibyśmy używanie pipet firmowych.

Próby wykonane z różnymi objętościami moczu wskazują, że mocze o stężeniach przekraczających wartość progu czułości mogą dawać wyniki ujemne, jeżeli użyto zbyt małą objętość moczu, i odwrotnie - próbki o stężeniu niższym od progu czułości mogą dawać wyniki dodatnie, jeśli do badania użyto zbyt dużą objętość moczu. Tak więc objętość moczu użyta do badania jest istotna i wskazane jest ściśle stosowanie się w tym zakresie do zaleceń producenta.

Rekapitulując, test Ontrak daje wyniki na ogół zgodne z metodą immunofluorescencyjną Abbotta. Stanowi on szybką i dość pewną, chociaż niezbyt taną, metodę wykrywania narkotyków, która może być użyta również poza laboratorium przez osoby nie posiadające doświadczenia analitycznego. Nasze spostrzeżenia są zgodne z wcześniejszymi badaniami na ten temat [1, 2, 3] oceniającymi Ontrak jako szybką metodę skringową, która wymaga jednak potwierdzenia wyników dodatnich i wątpliwych inną metodą, aby uniknąć krzywdzących zarzutów pod adresem pacjentów, którzy nie złamali abstynencji.

Streszczenie

W moczu 121 narkomanów oznaczano barbituriany (39 pacjentów), opiaty (32 pacjentów), amfetaminy (26 pacjentów) i kanabinole (24 pacjentów) stosując metodę Abuscreen-Ontrak, opartą na hamowaniu aglutynacji lateksu oraz metodę immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA).

Na 32 badania opiatów - w 4 przypadkach test Ontrak dał wynik dodatni, chociaż stężenie opiatów w moczu, oznaczane metodą FPIA, było niższe od progu czułości (wynik fałszywie dodatni). Badanie na barbiturany i kanabinole dało po 1 wyniku fałszywie dodatnim, natomiast wyniki analizy amfetamin przeprowadzone obu metodami były zgodne.

Tak więc metoda Abuscreen-Ontrak daje wyniki na ogół zgodne z metodą FPIA. Stanowi ona szybą, choć niezbyt taną, metodę skringową, która wymaga jednak potwierdzenia wyników dodatnich i wątpliwych, aby uniknąć krzywdzących zarzutów pod adresem pacjentów, którzy nie złamali abstynencji.

H.Matsumoto, B.Szukalski, K.Stencka, E.Woźny

Studies On The Usefulness of The Abuscreen-Ontrak Test For Detecting Opiates, Amphetamines, Barbiturans And Cannabinol In Drug User Urine.

Summary

With use of Abuscreen-Ontrak method, based on latex agglutination impediment and FPIA method barbiturans (39 cases), amphetamine (26 cases) and cannabinol were identified in urine of 121 studied drug dependents.

In 32 tests over opiates - Ontract test was positive in 4 cases, however opiate concentration was lower than sensitivity threshold (false positive result). Tests of barbiturans and cannabinol resulted in 1 one false positive result respectively. Results of amphetamine tests with use of both methods were identical.

Abuscreen-Ontrak method brings results generally in concordance with FPIA method. It is fast, however not cheap screening method, which needs to be confirmed by other method in case of positive or ambiguous results, in order to avoid biased accusations addressed to patients, who do not break abstinence.

Key words: Abuscreen-Ontrack method, barbiturans, amphetamine, cannabinol

Piśmiennictwo

1. Akhabus B., Brenner C., Hernandez M.: (1991) Abuscreen Ontrak Assay for methamphetamine. A rapid latex immunoassay for detection of methamphetamine use. American Akademy of Forensic Sciences Annual Meeting Program, K 49, 183.

2. Akhabus B., Hernandez M., Kravec C.: (1991) Abuscreen Ontrak Assay for benzodiazepine: A rapid latex immunoassay for detection of benzodiazepine use. American Akademy of Forensic Sciences Annual Meeting Program, K 6, 176.

3. Baker D.P., Guintu D.C., Mendoza D.A.: (1991) Evaluation of Abuscreen Ontrak assays: Correlations between klinikally trained personel and non-clinical personel in the field. American Akademy of Forensic Sciences Annual Meeting Program K 31, 178.

4. Borkowski T., Kała M., Gut W., Janowska E., Lech M.: (1990) Diagnostyka chemiczno-analityczna narkomanii w Polsce. Część I. Poznanie składu przetworów maku stosowanych przez narkomanów w Polsce, *Z Zagadnień Kryminalistyki XXIII*, Wydawnictwo Prawnicze, Warszawa, s. 46-63.

5. Borkowski T., Kała M., Chacia T., Gut W., Janowska E., Lech M.: (1990) Diagnostyka chemiczno-analityczna narkomanii w Polsce. Część II. Określenie składu opiatów i zawartości morfiny w słomie makowej z różnych regionów kraju, *Z Zagadnień Kryminalistyki XXIII*, Wydawnictwo Prawnicze, Warszawa, s.64-69.

6. Cone D.P., Menchen S.L.: (1987) Lack of validity of the KDJ Quick Test Drug Screen for detection of benzoylecgonine in urine. *J. Anal Toxicol.* 11, 276.

7. Kaplan R.M., Fochtman F., Burnell P., White C., Haller M.B.: (1989) An analysis of clinical toxicology urine specimens using the KDI Quick Test, *Clin. Toxicol.* 27, 369.

8. Schwartz R.H., Bogema S., Thorne M.M.: (1989) Evaluation of the Keystone Diagnostic Quick Test, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 113, 363.