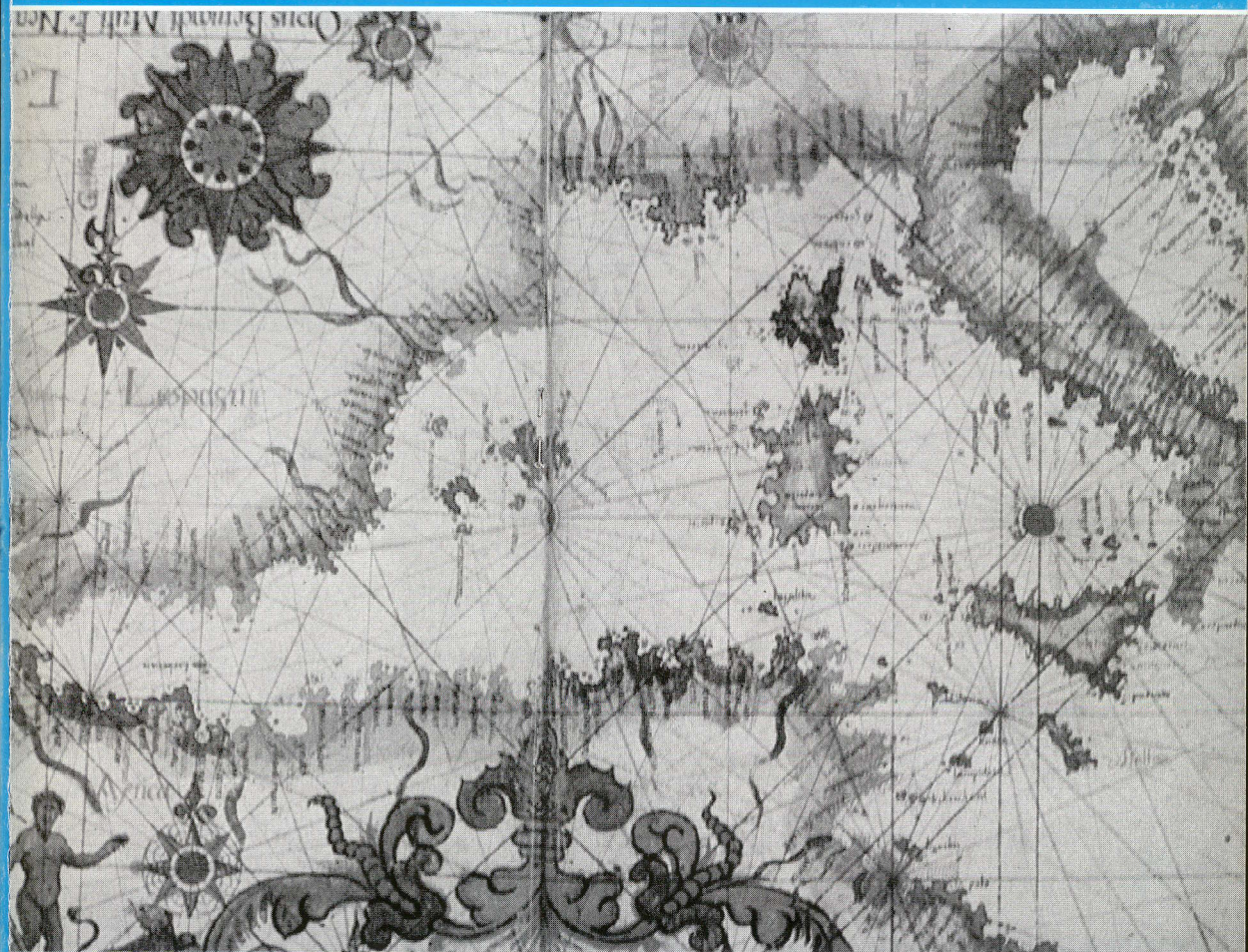


SOCIEDAD MEDITERRANEA DE MEDICINA LEGAL

**XI JORNADAS MEDITERRANEAS DE
MEDICINA LEGAL**

**XI JOURNÉES MEDITERRANÉENNES
DE MÉDECINE LÉGALE**



**21 AL 24 DE SEPTIEMBRE DE 1994
LA MANGA DEL MAR MENOR
MURCIA - ESPAÑA**

Edita: Sociedad Española de Medicina Legal y Forense

Depósito Legal: V - 3000 - 1998

I.S.B.N.: 84-8497-896-6

Impresión: Artes Gráficas Peñafort

Edición coordinada por Marina Gisbert Grifo

Universitat de València E. G.

La edición recoge sólo los trabajos que fueron facilitados por sus autores

APLICACION DE LOS INMUNOENSAYOS EMITst Y TRIAGE AL ANALISIS DE OPIACEOS Y COCAINA EN MUESTRAS DE PELO

HERNANDEZ, A. F.; PLA, A.; VILLANUEVA, E.

Departamento de Medicina Legal y Servicio de Toxicología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada

INTRODUCCION

El análisis de pelo para determinar la presencia de drogas fue utilizado por primera vez en 1954 por dermatólogos en un caso de dermatitis tóxica por barbitúricos [1]. Pero no va a ser hasta la década de los setenta cuando se considere el pelo como alternativa a la orina en el análisis de drogas de abuso. A partir de entonces el pelo ha recibido considerable atención ya que puede ser utilizado para la detección de consumidores habituales (es decir, crónicos) de drogas de abuso.

Hay 4 campos importantes en los que el análisis del pelo ha demostrado su utilidad [1]: toxicología forense, toxicología ambiental, patología clínica y nutrición. Teniendo en cuenta que el pelo no se afecta por la descomposición como los fluidos biológicos u otros tejidos blandos, ha sido utilizado por los patólogos forenses para determinar la causa de muerte en restos cadavéricos momificados o descompuestos. Así, el análisis del pelo de Napoleón reveló la presencia de arsénico y el de momias precolombinas de más de 4000 años de antigüedad la presencia de cocaína. Ultimamente esta metodología analítica se está aplicando en muestras de pelo de recién nacidos para evaluar el consumo de drogas de abuso por la madre durante el embarazo [2].

Tanto las diferentes drogas como sus principales metabolitos se incorporan al pelo desde el torrente sanguíneo y permanecen allí secuestrados de forma estable e indefinida [3,4], proporcionando un período de detección mucho mayor con respecto a otros fluidos biológicos.

El análisis de pelo puede constituir una prueba importante e incluso decisiva en los Tribunales de justicia, ya que puede aplicarse para la determinación del consumo de drogas meses después de iniciarlo [5,6], proporcionando una perspectiva histórica del consumo.

El análisis de drogas de abuso en pelo tiene varias ventajas probatorias respecto al de orina, entre las que destacan [7,8]: la inexistencia de riesgo de falsificación por abstinencia temporal o adulteración, la recogida de la muestra se puede realizar bajo estrecha vigilancia y sin invadir la privacidad del individuo, la posibilidad de tomar una segunda muestra de la misma persona para efectos de identificación y comparación o contraanálisis, la estabilidad tanto de la muestra de pelo como de los analitos presentes en la misma incluso bajo condiciones ambientales adversas, la posibilidad de almacenarla casi indefinidamente sin refrigeración, y, finalmente, el análisis proporciona información sobre el tiempo de consumo y su intensidad. Todas estas ventajas, junto a una amplia ventana de detección, hacen que el análisis de drogas de abuso en pelo sea más eficiente que el de orina para detectar a los consumidores de drogas. No obstante, este tipo de análisis no está exento de controversia y problemas, siendo el más importante el riesgo de falsos resultados positivos por contaminación exógena o exposición pasiva endógena.

Hasta la fecha, los procedimientos inmunológicos descritos para la determinación de drogas de abuso en pelo han sido, fundamentalmente, el RIA. En este trabajo presentamos un protocolo que permite la utilización de técnicas inmunológicas más asequibles, como el enzimoimmunoensayo. El procedimiento analítico seguido se ha dirigido específicamente a la detección de opiáceos y cocaína.

MATERIAL Y METODOS

Recogida de las muestras de pelo

Se han utilizado muestras de pelo procedentes de cinco consumidores habituales de drogas de abuso que acudían al Centro Provincial de Drogodependencias de Granada. Mediante evaluación clínica y controles analíticos en orina, los facultativos de dicho centro confirmaron que dos de ellos eran consumidores habituales de heroína y otros dos de cocaína. El quinto caso se trataba de un drogadicto que consumía simultáneamente heroína y cocaína.

Como muestras control se ha utilizado pelo de personal de nuestro laboratorio, en el que no existía consumo de ningún tipo de droga, teniendo en cuenta además que tampoco hubieran consumido medicamentos estructuralmente relacionados con las drogas objeto de estudio.

En todos los casos, las muestras se tomaron de la zona del cuero cabelludo correspondiente al vértex, por tener allí el pelo un crecimiento más uniforme.

Preparación de las muestras de pelo

Esta consistió básicamente en el lavado previo de las muestras de pelo para su descontaminación externa. Para ello, se siguió el procedimiento descrito por Welch et al [4], que básicamente consiste en sumergir el pelo tres veces en una solución de sodio dodecil sulfato al 0,05 %, otras tres veces en agua y otras tantas en etanol.

Posteriormente, las muestras se fragmentaron con ayuda de unas tijeras de rama fina en segmentos de unos 2 cm hasta obtener 120 mg. A continuación se sometieron a hidrólisis con 3 ml de ClH 0,1 N a 50°C/18 h, y finalmente se neutralizaron con 0,1 ml de NaOH 3 M y 1 ml de buffer fosfato salino pH 7,4. Este paso es importante para evitar que la solución de pelo digerido desnaturalice los anticuerpos del inmunoensayo.

Extracción de las drogas a partir del pelo digerido

A continuación, las muestras se extrajeron en fase sólida, utilizando columnas C-18 (Supelclean LC-18, de 1 ml de capacidad, SupelcoR), previamente acondicionadas según las instrucciones del fabricante. El eluido final se llevó a sequedad en baño maría a 50°C bajo corriente de nitrógeno y se redisolvió en 0,2 ml de agua destilada. Se obtiene así un extracto acuoso que puede analizarse mediante procedimientos inmunológicos estándar, como si fuera plasma u orina.

Análisis del extracto final por EMIT st y TRIAGE

En nuestro caso, alícuotas de este extracto (0,05 ml y 0,14 ml), respectivamente) se sometieron a un inmunoensayo enzimático tipo EMIT st (SyvaR) así como a un multiinmunoensayo ASCENDTM, que utiliza anticuerpos monoclonales inmovilizados (TRIAGE, MerckR) y permite el análisis simultáneo de 7 drogas de abuso sobre un mismo panel y en poco más de 10 min. Cada una de las muestras de este estudio se analizó por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los inmunoensayos practicados en este estudio fueron congruentes entre sí y con la historia previa de los drogadictos. Así, en los tres casos que eran consumidores habituales de heroína se obtuvo un resultado cualitativo positivo tanto con el sistema EMIT st como con el TRIAGE. Igualmente, en los otros tres consumidores de cocaína se obtuvieron resultados positivos con ambas técnicas. En el sistema EMIT st, la lectura del problema superó en todos los casos el 10 % de la del calibrador. Por su parte, el ensayo TRIAGE del pelo correspondiente al consumidor habitual de heroína y cocaína reveló la presencia de dos bandas correspondientes a la zona de opiáceos y cocaína.

Los ensayos resultaron ser lo suficientemente específicos y, además, no se observaron interferencias de matriz. En los 3 controles diferentes (analizados además por triplicado) se obtuvo un resultado negativo. En este caso, y para el ensayo EMIT st, el valor que arrojó la muestra fue siempre inferior al del calibrador una vez sustraído el 10 % de su lectura numérica.

Un problema importante para aplicar el análisis de drogas de abuso a muestras de pelo mediante inmunoensayos diseñados para orina, es la elección de un determinado nivel de cut-off. A primera vista parece claro que los valores de corte de las diferentes drogas no son los mismos para todos los fluidos biológicos, pues para establecerlos se tienen en cuenta aspectos relacionados con su toxicocinética además del efecto matriz del fluido biológico [9]. Los estudios realizados hasta el momento, consideran que, en general, el límite de corte para opiáceos y cocaína en muestras de pelo es de 500 ng/g [7]. Nosotros hemos utilizado inmunoensayos diseñados para trabajar con muestras de orina y cuyo cut-off era el recomendado por el NIDA, es decir de 300 ng/ml para opiáceos y cocaína, por lo que fue necesario calcular la cantidad mínima de pelo de la que deberíamos partir y el volumen final en que deberíamos redisolverlo con objeto de que se pudieran utilizar los inmunoensayos EMIT st y TRIAGE en condiciones adecuadas. Para que no hubiera ningún problema de interferencia de matriz se decidió redisolver el extracto final en agua (similar a la orina). Así, vimos que partiendo de 120 mg de pelo y, una vez hidrolizado y extraído, se podía redisolver en 200 µl de agua destilada, de manera que un resultado positivo en condiciones similares a las de orina equivaldría a la presencia de droga por encima del nivel de cut-off en pelo, es decir, por encima de 500 ng/g. Además, utilizamos inmunoensayos preparados para detectar metabolitos en orina, mientras que en las muestras de pelo se incorporan, fundamentalmente, la droga patrón o su primer metabolito pero, gracias a la reactividad cruzada de los inmunoensayos, este problema no ocasionó en la práctica ninguna interferencia. De esta manera, se obviaron también posibles problemas de especificidad por diferencias toxicocinéticas.

En definitiva, el procedimiento descrito aquí es sólo cualitativo, pero suficiente para el screening de opiáceos y cocaína en muestras de pelo en laboratorios con pocos medios instrumentales. No obstante, todo resultado positivo requiere una posterior confirmación analítica, preferentemente por GC/MS.

CONCLUSION

En resumen, los requerimientos analíticos para la determinación de drogas de abuso en muestras de pelo son sensibilidad, especificidad y ausencia de efectos matriz. Los inmunoensayos cubren todos estos aspectos y, además, son más baratos, rápidos y fáciles de hacer. No obstante, al aplicarlos a muestras de pelo presentan ciertas limitaciones y la interpretación de los resultados debe realizarse con la perspectiva adecuada.

BIBLIOGRAFIA

1. Harkey MR, Henderson GL (1989) Hair analysis for drugs of abuse. En: *Advances in analytical toxicology* (vol II). RC Baselt (ed), Year Book Medical Publishers Inc, Chicago, pp 289-329.
2. Kintz P, Mangin P (1993) Determination of gestational opiate, nicotine, benzodiazepine, cocaine and amphetamine exposure by hair analysis. *J Forensic Sci Soc* 3:139-142.
3. Henderson GL (1993) Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci Int* 63:19-29.
4. Welch MJ, Sniegowski LT, Allgood CC, Habram M (1993) Hair analysis for drugs of abuse: evaluation of analytical methods, environmental issues, and development of reference materials. *J Anal Toxicol* 17:389-397.
5. Bost RO (1993) Hair analysis-perspectives and limits of a proposed forensic method of proof: a review. *Forensic Sci Int* 63:31-42.
6. Moeller MR, Fey P, Sachs H (1993) Hair analysis as evidence in forensic cases. *Forensic Sci Int* 63:43-53.
7. Baumgartner WA, Hil VA (1993) Sample preparation techniques. *Forensic Sci Int* 63:121-135.
8. Martínez F, Poet TS, Pillai R, Erickson J, Esstrada AL, Watson RR (1993) Cocaine metabolite (benzoylecgonine) in hair and urine of drug users. *J Anal Toxicol* 17:138-42.
9. Cassani M, Spiehler V (1993) Analytical requirements, perspectives and limits of immunological methods for drugs in hair. *Forensic Sci int* 63:175-184.