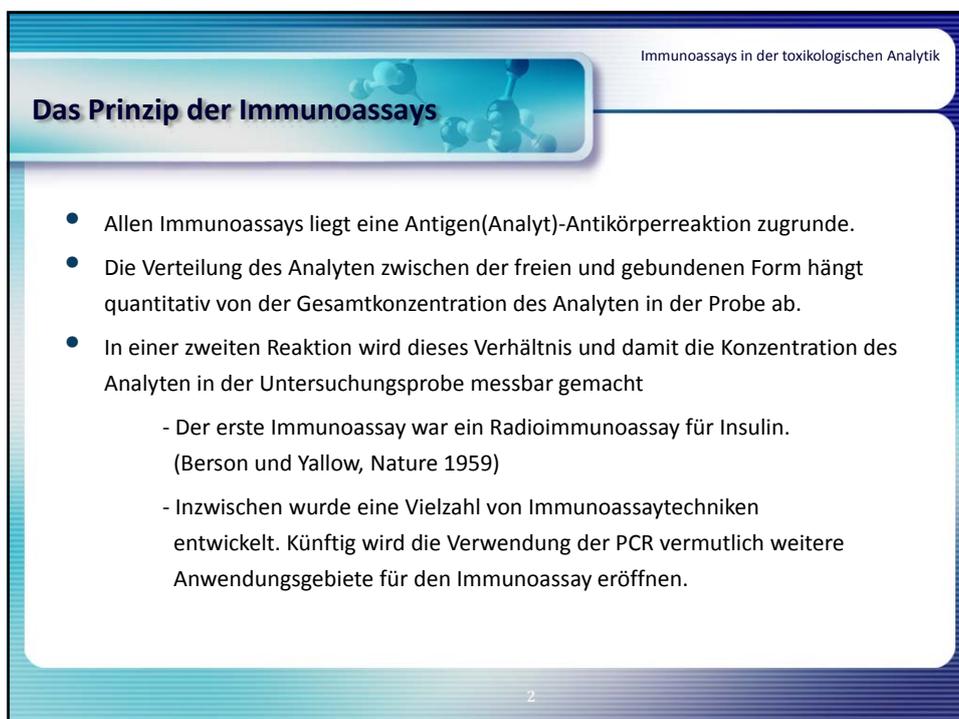


BBGes
Berlin

Institut für Toxikologie des BBGes
Kursus „Klinische Toxikologie“ zur Weiterbildung Fachtoxikologe/in (DGPT)
vom 28. September bis 2. Oktober 2009 in Berlin.

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Thomas Grobosch
und
Torsten Binscheck



Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Das Prinzip der Immunoassays

- Allen Immunoassays liegt eine Antigen(Alyt)-Antikörperreaktion zugrunde.
- Die Verteilung des Analyten zwischen der freien und gebundenen Form hängt quantitativ von der Gesamtkonzentration des Analyten in der Probe ab.
- In einer zweiten Reaktion wird dieses Verhältnis und damit die Konzentration des Analyten in der Untersuchungsprobe messbar gemacht
 - Der erste Immunoassay war ein Radioimmunoassay für Insulin.
(Berson und Yallow, Nature 1959)
 - Inzwischen wurde eine Vielzahl von Immunoassaytechniken entwickelt. Künftig wird die Verwendung der PCR vermutlich weitere Anwendungsgebiete für den Immunoassay eröffnen.

2

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

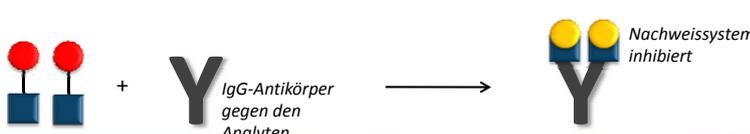
Das Testprinzip

Im Reaktionsansatz konkurriert der Analyt mit einem Konjugat aus Referenzsubstanz und einem Nachweissystem (z.B. Enzym) um die Bindungsstellen.

Analyt
 Nachweissystem (z.B. Enzym)
 Referenzsubstanz

} Konjugat

Die Bindung des Konjugates an den Antikörper hemmt das Nachweissystem.

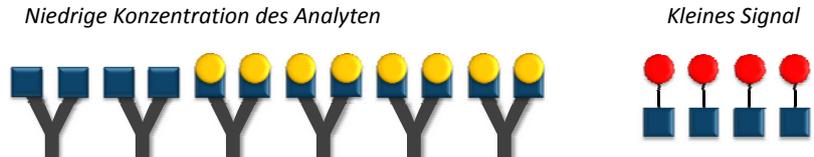


3

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

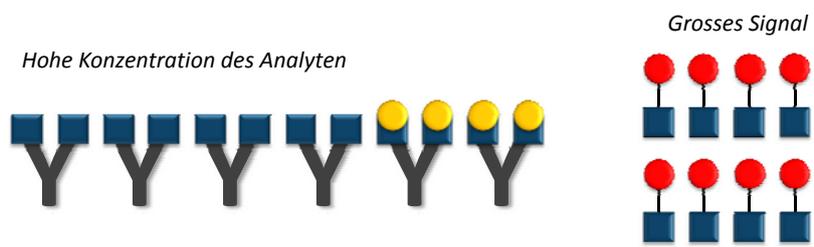
Das Testprinzip

Niedrige Konzentration des Analyten



Kleines Signal

Hohe Konzentration des Analyten



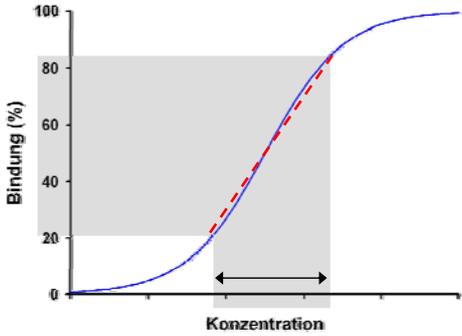
Grosses Signal

4

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Das Prinzip der Immunoassays

- Immunoassays sind Bindungsassays.
- Die Bindung ist sättigbar.
- Nur innerhalb eines testspezifischen Bereichs ist die Gesamtkonzentration des Analyten der antikörpergebundenen Fraktion direkt proportional.



5

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Ziel dieses Vortrages

In diesem Vortrag soll auf wesentliche Gesichtspunkte bei der Anwendung kommerziell verfügbarer Immunoassays in der klinischen Toxikologie eingegangen werden.

Ausführliche Informationen über die Theorie von Immunoassays:

1. *Immunoassay*
eds. E.P. Diamandis und T.K. Christopoulos
Academic Press Inc., San Diego 1996
2. *The Immunoassay Handbook*
2nd edition
ed. D. Wild
nature publishing group, London 2001

6

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

In unserem Fachbereich eingesetzte Immunoassays

Verwendungszweck	Substanz(gruppe)	Verwendungszweck	Substanz(gruppe)
Tox	Paracetamol	Drogenscreening	Amphetamine/Ecstasy
Tox	Salicylat	Drogenscreening	Barbiturate
Tox	TCA	Drogenscreening	Benzodiazepine
Tox	Thyroxin	Drogenscreening	Buprenorphin
Tox	Amanitin	Drogenscreening	Kokain
TDM/Tox	Carbamazepin	Drogenscreening	Cotinin
TDM/Tox	Digitoxin	Drogenscreening	EDDP
TDM/Tox	Digoxin	Drogenscreening	LSD
TDM/Tox	Chinidin	Drogenscreening	Monoacetylmorphin
TDM/Tox	Ethosuximid	Drogenscreening	Opiate
TDM/Tox	Phenobarbital	Drogenscreening	Cannabinoide
TDM/Tox	Phenytoin	TDM	Amikacin
TDM/Tox	Primidon	TDM	Gentamycin
TDM/Tox	Theophyllin	TDM	Netilmycin
TDM/Tox	Valproinsäure	TDM	Teicoplanin
		TDM	Tobramycin
		TDM	Vancomycin

7

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Qualität und Eignung immunologischer Tests

Wesentliche Qualitätskriterien (auch) für immunologische Tests sind:

- Sensitivität
- Spezifität / Kreuzreaktivität
- Stabilität

- Tests verschiedener Hersteller können sich in diesen Punkten erheblich unterscheiden.
- Linearer Arbeits- bzw. Messbereich wird vom Hersteller angegeben (z.B. Konzentrationsbereich zwischen niedrigstem und höchstem Kalibrator). Messungen außerhalb dieses Bereiches erfordern eine experimentelle Überprüfung.
- Immunoassays unterliegen auf Grund der enthaltenen Proteine der Alterung. Daher sind Qualitätskontrollen in jedem analytischen Lauf erforderlich.

8

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Wichtige Aspekte für den Einsatz von Immunoassays

Für die Anwendung von kommerziellen Immunoassays in der klinischen Toxikologie wichtige Aspekte:

- Art des Untersuchungsmaterials (Plasma, Urin, etc.)
- Gruppennachweis vs. Einzelnachweis
- Qualitativer vs. quantitativer Test
- „cut-off“ vs. untere Bestimmungsgrenze
- Störung des Test durch Manipulation des Untersuchungsmaterials
- Individuelle Besonderheiten der einzelnen Tests
- ELISA für den Nachweis von Amanitinen
- Arzneimittelkonzentrationsbestimmungen
- Messungen nach therapeutischer Gabe von Antikörperfragmenten (Fab-Therapie) bei Intoxikationen mit Herzglykosiden

9

Immunoassays in der toxikologischen Analytik
Dr. D. Lampe

Wichtige Aspekte für den Einsatz von Immunoassays

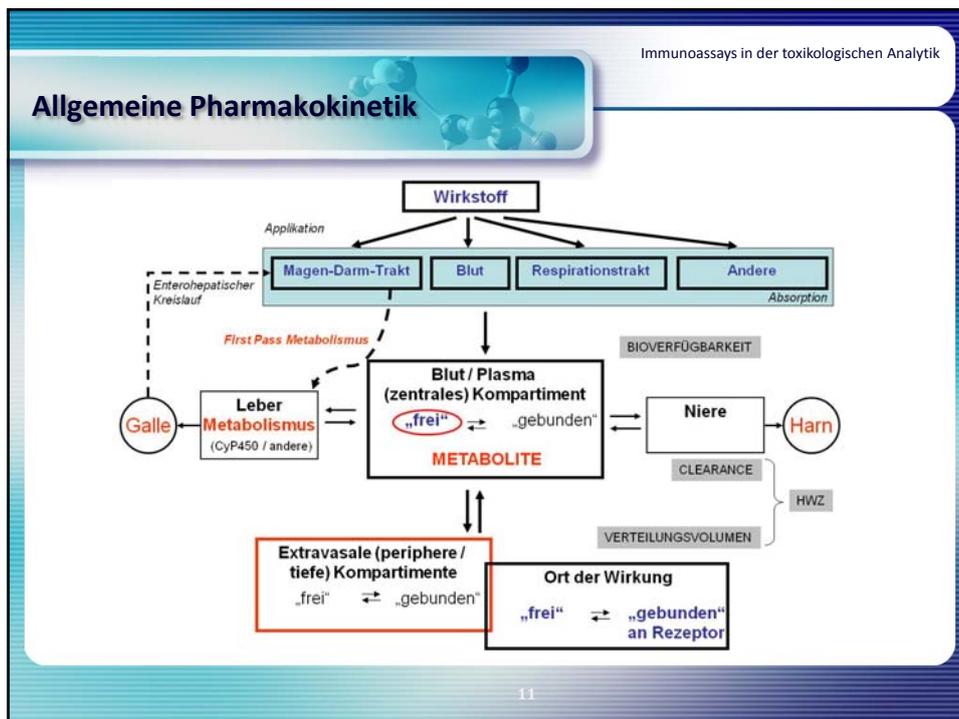
Verwendete Untersuchungsmaterialien sind

Plasma / Serum
Urin
(Speichel)
(Schweiß)
(Mekonium)

Wichtige Vorüberlegungen zum Einsatz von Immunoassays:

analytisch	Kommerzielle Tests sind für ein bestimmtes Untersuchungsmaterial ausgelegt und dürfen nicht unkritisch in einem anderen Material eingesetzt werden. Es ist allerdings nicht selten möglich; die Rahmenbedingungen müssen jedoch chromatographisch überprüft werden.
pharmakokinetisch	Die entscheidende Frage: Kann die nachzuweisende bzw. zu messende Substanz im Untersuchungsmaterial überhaupt in messbarer Konzentration anwesend sein?

10



Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Untersuchungen im Urin

- **Der Wassergehalt des Urins beeinflusst maßgeblich das Testergebnis!**
Bei jeder Untersuchung im Urin sollte deshalb die Kreatininkonzentration gemessen werden.
- Die „normale“ Kreatininkonzentration beträgt etwa 1 g pro Liter Urin.
Sie kann erheblich schwanken in Abhängigkeit vom Hydratationszustand des Patienten bzw. einer möglichen diuretischen Therapie.

12

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Gruppennachweise

- Kalibrierung des Tests auf **eine** Markersubstanz
- Berücksichtigung der Kreuzreaktivität mit strukturverwandten Substanzen
- Nur als qualitative Tests aussagekräftig
- Entscheidungsgrenze ist der „cut-off“
(Meßwert in „Äquivalenten“ der Markersubstanzkonzentration, oberhalb derer ein Testergebnis als positiv angesehen wird. Er wird vom Hersteller vorgegeben oder experimentell ermittelt.)

Vorsicht

- Verwenden Sie Gruppennachweise nie zur quantitativen Bestimmung einzelner Substanzen!
- Kreuzreaktivität einer Substanz mit einem Gruppennachweis bedeutet nicht die Zugehörigkeit zu einer „Wirkstoffgruppe“ oder „Indikationsgruppe“.

13

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Beispiel: Kreuzreaktionen beim TCA-Test (FPIA)

Zahlreiche Substanzen kreuzreagieren, obwohl sie **keine** „trizyklischen Antidepressiva“ sind:

Carbamazepin	Clomipramin
Amitriptylin	(Fluphenazin)
Nortriptylin	Noxipzillin
Diphenhydramin	(Chlorphenamin)
Amitriptylinoxid	Trifluorpromazin
Promethazin	Desipramin
Doxepin	Promazin
Chlorprothixen	Clopenthixol
Perazin	Mianserin
Trimipramin	
Levomepromazin	
Opipramol	
Maprotilin	

Reihenfolge entspricht der Untersuchungshäufigkeit in einem Testzeitraum.

14

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Beispiel: Benzodiazepine (Kinetische Daten)

Benzodiazepin	Ther. Konz. [ng/ml]	HWZ [h]	Benzodiazepin	Ther. Konz. [ng/ml]	HWZ [h]
Alprazolam	5-80	14	Loprazolam	5-150	6,3
Bromazepam	80-170	22	Lorazepam	25-250	15
Brotizolam	5-20	6	Lormetazepam	5-30	12
Chlordiazepoxid	700-2000	16	Medazepam	10-500	12
Clobazam	100-400	18	Metaclazepam	50-200	15
Clonazepam	30-60	23	Midazolam	40-250	1,5
Clotiazepam	100-700	4	Nitrazepam	30-120	28
Demoxepam	300-2800	37	Nordazepam	200-800	48
Diazepam	125-750	35	Oxazepam	200-2000	8
Estazolam	20-100	15	Temazepam	20-500	10
Flunitrazepam	1-15	20	Tetraazepam	300-1000	18
Flurazepam	5-50	2,5	Triazolam	2-20	3

15

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Nachweis von Benzodiazepinen

- Grosse Substanzgruppe mit vielen, teilweise identischen Metaboliten und sehr unterschiedlichen therapeutischen Konzentrationsbereichen.
- Eine Erhöhung der Sensitivität gelingt durch Deglucuronidierung der Metabolite in der Urinprobe vor der Analyse.
- Ein Alptraum ist die sichere chromatographische Identifizierung im Urin mit vertretbarem Aufwand.
Die Chromatographie sollte primär aus Blut, Plasma oder Serum erfolgen.

16

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Drogennachweise im Urin

- Kreuzreaktionen sind nie auszuschließen.
Der alleinige immunologische Drogennachweis hat keine Rechtsrelevanz!
- Substanznachweise im Urin sind immer qualitativ.
- Der „cut-off“-Wert muss beachtet bzw. festgelegt werden.
- Kreatininkonzentration messen und festlegen, unterhalb welcher Konzentration ein negatives Testergebnis nicht verwertbar ist.
- Bei Drogenkontrolluntersuchungen (Abstinenzkontrollen) müssen falsch negative Testergebnisse möglichst minimiert werden.

17

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Falsch negative Testergebnisse durch Manipulationen minimieren

- Urinabnahme unter Sichtkontrolle
- Messung der Kreatininkonzentration: Handelt es sich überhaupt um Urin?
- „Sample check“: Funktioniert der Test im vorliegenden Untersuchungsmaterial überhaupt?

Häufige Manipulationen

- Abgabe „urinfarbener“ Flüssigkeit
- Verdünnen des Urins mit „urinfarbener“ Flüssigkeit
- Diuretikagebrauch mit gleichzeitiger Einnahme von Substanzen, die den Urin gelb färben
- Zusatz von Substanzen, die die Antikörperbindung stören (Tenside, Kochsalz, Säure, Lauge, etc.)

18

Stoffwechsel von Opiaten und Opioiden

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Heroin (Diacetylmorphin) → Monoacetylmorphin → Morphine

Morphine → Weitere Metabolite

Codeine → Morphine → Weitere Metabolite

Dihydrocodeine → Weitere Metabolite

- Morphine und Strukturverwandte reagieren positiv im Opiatest.
- Die synthetischen **Opiode** werden durch den Urintest auf Opiate nicht erfasst: Methadon, Pethidin, Tramadol, Buprenorphin, Fentanyl, Loperamid, Piritramid, Pentazocin u.a.

19

Die Elimination von Heroin

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

	HWZ	im Urin
Heroin (Diacetylmorphin)	5 min	0 %
6-Monoacetylmorphin	15 min	1 %
Morphine	5 h	5 %
M-6-Glucuronid , M-3-Glucuronid	8 h	50 %

- Ein Heroinkonsum kann nur durch den Nachweis von 6-Monoacetylmorphin **bewiesen** werden (sehr kleines Zeitfenster).

20

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Das Mohnkuchenexperiment

Code	Kreatinin [g/l]	Morphinäquivalente [ng/ml]	Opiatnachweis im Urin Cut-off 300 ng/ml
Wehler	0,7	1433	+
Rohn	0,29	208	-
Lehmann	0,75	512	+
Riesenklops	1,86	1023	+
Sheep	0,88	673	+
Crocodylus	1,71	1356	+
Koala	1,38	1677	+
Nina	0,03	1966	+
Mende	1,37	1495	+
Dornröschen	0,66	872	+

- Der Verzehr mohnhaltiger Nahrungsmittel kann zu einem positiven Opiatnachweis führen.

21

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Ausscheidung von Cocain im Urin

```

graph TD
    COCAIN --> Norcocain
    COCAIN --> Benzoylcognin
    Norcocain --> N-Hydroxynorcocain
    Benzoylcognin --> Ecognin-Methylester
    Ecognin-Methylester --> Ecognin
    Ecognin --> Anhydroecognin
    Ecognin --> Cocaethylen
    
```

HWZ	im Urin
1h	1-9 %
6,5h	35-53 %
5,5h	32-49 %
	< 5 %

Pyrolyse : Anhydroecognin

+ Ethanol : **Cocaethylen**

22

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Cannabinoide

- Cannabinoide: ca. 60 strukturell verwandte Cannabis-Inhaltsstoffe
Hauptkomponenten: Tetrahydrocannabinol (THC)
Cannabidiol

THC

↓

11-Hydroxy-D-9-THC

↓

11-Nor-D-9-THC-Carbonsäure

↓

11-Nor-D-9-THC-Carbonsäure-Glucuronid

- Weitere Metabolite: 8-a-Hydroxy-THC
8-b-Hydroxy-THC
8-a-11-Hydroxy-THC u.a.

23

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Die Elimination von THC

	HWZ	im Urin
Tetrahydrocannabinol (THC)	3 Tage	0 %
↓		
11-Hydroxy- Δ -9-THC	4 Tage	0 %
↓		
11-Nor-Δ-9-THC-COOH	1 Woche	5 %
↓		
11-Nor-Δ-9-THC-COOH-Glucuronid	1 Woche	20 %

8-Hydroxy- Δ -9-THC

2'-Hydroxy- Δ -8-THC

- Häufig vom Einsender gewünscht: Eliminationskinetik
Probleme: a) Gruppennachweis von THC-Metaboliten
b) Fehlende Linearität im erforderlichen Konzentrationsbereich

24

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Ausscheidung von Methadon

	HWZ	im Urin
Methadon saurer Urin: 20h alkalischer Urin: 40h <div style="border: 1px solid gray; padding: 2px; display: inline-block;">Metabolismus durch CYP3A4</div> EDDP (2-Ethylidin-1,5-Dimethyl-3,3-Diphenylpyrrolidin)	30h	24 %
andere		15 %

saurer Urin z.B. durch : Ammoniumchlorid
 basischer Urin z.B. durch : Natriumbicarbonat

- Für Complaincetestung im Methadonsubstitutionsprogramm ist der Test auf EDDP zu bevorzugen.
(Keine Manipulationsmöglichkeit durch Zugabe von Methadon in die Urinprobe)

25

Immunoassays in der toxikologischen Analytik
Dr. D. Lampe

Amanitinnachweis im Urin

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay, solid phase immunoassay

- Zur Zeit ohne Alternative
- Immer Urin untersuchen
- „Cut-off“ beachten
- Kreatininkonzentration im Urin messen

Amanitine sind enthalten in:

- **Knollenblätterpilzen**
 Grüner K. : *Amanita phalloides*
 Weisser K.: *Amanita verna*
 Kegelhütiger K.: *Amanita virosa*
- **Gifhäubling, Nadelholz-Häubling:**
Galerina marginata bzw. *Galerina autumnalis*

26

Immunoassays in der toxikologischen Analytik
Dr. D. Lampe

Toxikokinetik von α -Amanitin

Resorption: „sehr schnell“

Bioverfügbarkeit: 100%

Verteilungsvolumen: 0,25 l/kg

Gesamtclearance: 1,8 ml/min/kg

Halbwertszeit: 1,6 Std.

Plasmaproteinbindung: 0%

Metabolisierung: 0%

Unverändert renal eliminiert: > 80%

Biliär ausgeschieden: > 10%

Enterohepatischer Kreislauf

27

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Arzneimittelnachweise: Substanzspezifische Nachweise in Plasma oder Serum

- Kalibrierung auf die zu messende Substanz; quantitative Tests
- Aber: Unerwünschte Kreuzreaktionen sind auch bei diesen Tests nie auszuschließen (z.B. Metabolite von Ciclosporin A kreuzreagieren mit dem Test für Ciclosporin A)
- Der Messbereich ist durch obere und untere Bestimmungsgrenzen festgelegt. Bei Intoxikationen müssen daher häufig Verdünnungen (mit „leerem“ Spenderplasma) vermessen werden.
- In der Regel werden Gesamtkonzentrationen erfasst (freier + plasmaproteingebundener Anteil).

Achtung bei Intoxikationen:
Bei Substanzen mit hoher Plasmaproteinbindung (> 90%) und hoher Konzentration (> 100 µg/ml) kann die Proteinbindung gesättigt sein.
Dieser Effekt ist relevant u.a. für Valproinsäure und Salicylat.

28

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Herzglykosidassays (Digitoxin, Digoxin)

Für die zeitkritische Messung von Herzglykosiden stehen in der Regel ausschließlich kommerzielle Immunoassays zur Verfügung.

Kreuzreaktionen nachgewiesen z.B. für

Digitoxinassys	Digoxinassay
Uzarawurzel (<i>Radix uzara</i>) Behandlung unspezifischer Durchfallerkrankungen Maiglöckchen (<i>Convallaria majalis</i>) Vergiftung durch Verwechslung mit Bärlauch	Oleander (<i>Nerium oleander</i>) Gelber Oleander (<i>Thevetia peruviana</i>) Adonisröschen (<i>Adonis vernalis</i>) Meerzwiebel (<i>Urginea maritima</i>)

„Falsch positive“ Herzglykosiduntersuchungen können in der Klinik zu Irritationen führen, aber auch Hinweis auf **Intoxikationen** sein.

29

Immunoassays in der toxikologischen Analytik
Dr. D. Lampe

Konzentrationsbestimmungen bei Digoxin- bzw. Digitoxinintoxikation unter Fab-Therapie

1. Analytik

Digitalisantikörper stören den Immunoassay, daher muss die Probenvorbereitung einen Enteiweißungsschritt enthalten.

a) **Digitoxin:** Plasmaproteinbindung 97%; Konzentration der freien Fraktion liegt unterhalb der Bestimmungsgrenze.
→ Bestimmung der Gesamtkonzentration (wenig aussagekräftig, da nur die freie Fraktion toxikologisch relevant ist.)

b) **Digoxin:** Plasmaproteinbindung 25%; Konzentration der freien Fraktion liegt im Meßbereich.
→ Ultrafiltration; freie Fraktion kann gemessen werden.

30

Immunoassays in der toxikologischen Analytik
Dr. D. Lampe

Konzentrationsbestimmungen bei Digoxin- bzw. Digitoxinintoxikation unter Fab-Therapie

2. Pharmakokinetik

Die Verabreichung von Fab führt durch die Bindung an den Antikörper zu einer Veränderung des Verteilungsvolumens von Digoxin und Digitoxin

	Digoxin	FAB	Digitoxin
Verteilungsvolumen (l/kg)	6	0,4	0,52
Theoretische Gesamtplasmakonzentration	A x 15		A x 1,3

A: Ausgangskonzentration vor FAB-Therapie

Der Konzentrationsanstieg unter Fab-Therapie ist toxikologisch irrelevant, da nur die freie Fraktion der Glykoside wirksam ist.

31

Immunoassays in der toxikologischen Analytik
Dr. D. Lampe

Zusammenfassung I

Immunoassays als Suchtest

- beruhen auf der Kreuzreaktion von strukturverwandten Substanzen.
- sind qualitative Tests. Entscheidungskonzentration ist der „cut-off“.
- Ein positiver Suchtest sagt nichts über die Zugehörigkeit der kreuzreagierenden Substanzen zu einer bestimmten Wirkstoffgruppe. (Beispiel: trizyklische Antidepressiva)
- Das Ausmaß der Kreuzreaktivität einzelner Substanzen und ihrer Metabolite innerhalb einer Substanzgruppe kann sehr unterschiedlich sein.
- Die einzelnen Vertreter einer Substanzgruppe können in sehr unterschiedlichen Dosierungen bzw. Konzentrationen wirksam sein. Hochpotente Substanzen (= niedrige Wirkkonzentrationen) können übersehen werden (Beispiel: Benzodiazepine)

32

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Zusammenfassung II

Immunoassays im Urin

- Immunoassays sind Konzentrationsbestimmungen, der Wassergehalt des Urins bestimmt u.a. das Testergebnis. Zur Beurteilung muss die Urinkreatininkonzentration gemessen werden.
- Bei Drogenkontrolluntersuchungen müssen Manipulationen durch den Probanden „erwartet“ und damit aktiv ausgeschlossen werden.

33

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Zusammenfassung III

Immunoassays als substanzspezifische, quantitative Analysenmethode in der klinischen Toxikologie.

- Bei hohen Konzentrationen Meßbereich des Assays beachten. (Sättigung der Antikörperbindung)
- Kreuzreaktionen sind auch bei substanzspezifischen Tests nicht auszuschließen. (Beispiel: Herzglykoside)
- Therapeutische Anwendung von „giftspezifischen“ Antikörpern kann zu Störungen des Immunoassays führen. (Beispiel: fragmentierte Digitalisantikörper)

34

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Take home message

Das Prinzip von Immunoassays, die Antigen-Antikörperreaktion erfordert beim Einsatz in der klinischen Toxikologie die Berücksichtigung spezieller Rahmenbedingungen und Voraussetzungen.

- Ohne experimentelle Überprüfung dürfen vom Hersteller vorgegebenes Untersuchungsmaterial und vorgegebener Messbereich nicht verändert werden.
- Kommerzielle Tests können sich abhängig vom Hersteller in Sensitivität, Spezifität und Stabilität wesentlich unterscheiden. Die Daten sind nicht übertragbar.

35

Immunoassays in der toxikologischen Analytik

Stellenwert der kommerziellen Immunoassays für die toxikologische Analytik

**Sehr gut geeignet zur
Abstinenz-, und Konsumkontrolle bei Substanzmissbrauch
(„Drogenscreening“)**

**Gut geeignet zum
Ausschluss von Intoxikationen mit definierten Stoffen
(z.B. Paracetamol, Salicylat, Herzglykosiden)**

**Bedingt geeignet zum
Nachweis von Intoxikationen bei Verdacht auf bestimmte Substanz(gruppe).
Beachte Meßbereich, Kreuzreaktivitäten!**

**Völlig ungeeignet zum
Ausschluss einer Intoxikation ohne Verdacht auf eine bestimmte Substanzgruppe
(„general unknown“)**