

Erste Erfahrungen mit CEDIA DAU zum Nachweis von Betäubungsmitteln im Blut

Annette Rickert und Thomas Daldrup

1. Einleitung

Die Blutprobe gewinnt immer mehr an Bedeutung als Untersuchungsmaterial zur Feststellung einer Drogeneinnahme bzw. Beeinflussung durch andere berauschende Mittel als Alkohol. Benötigt werden deshalb Vortest-Verfahren, mit denen die Anwesenheit bestimmter Drogen schnell und zuverlässig nachweisbar ist, so daß dann gezielte qualitative und quantitative Bestätigungsanalysen möglich sind. Bisher wurden nicht-radioaktive kommerzielle immunchemische Vorteste auf illegale Drogen nur für Urin angeboten, so daß, wollte man Blutproben hiermit messen, diese erst enteivweißt bzw. extrahiert werden mußten [1]. Iwersen et al. (1996) [2] konnten zeigen, daß der von der Fa. Boehringer Mannheim vertriebene CEDIA-DAU auch für die direkte Untersuchung von Blut- bzw. Serumproben geeignet ist.

CEDIA (cloned-enzym-donor-immuno-assay) ist ein homogener Enzym-Immunoassay der Fa. Boehringer Mannheim, bei dem die rekombinante DNA-Technik verwendet wird. Grundlage des CEDIA-Tests ist das Enzym β -Galaktosidase, das gentechnologisch in zwei inaktive Fragmente gespalten wird. Nach Zugabe des ersten Fragments (Enzymdonor) zu einer Lösung mit dem zweiten Fragment (Enzymakzeptor) rekombinieren diese spontan zu einem intakten Enzym, das im Test ein Substrat spaltet, dessen Farbänderung spektralphotometrisch gemessen wird. In der Probe konkurriert das freie Antigen mit dem an ein inaktives Fragment (Enzymdonor) gekoppeltes Antigen um den Antikörper. Der Komplex, der aus einer Enzymdonor-Antigen-Antikörper-Verbindung besteht, ist nicht mehr in der Lage, die Rekombination der inaktiven Fragmente durchzuführen. Die gebildete Menge an β -Galaktosidase korreliert mit den in der Probe vorhandenen freien Antigenen (Drogen).

Es wurde geprüft, inwieweit Serum- / Blutproben direkt eingesetzt werden können.

2. Material und Methode

Zur Durchführung von CEDIA-Messungen auf Cannabinoide, Cocain, Opiate, Amphetamine, Benzodiazepine und LSD wurde der Hitachi 911 eingesetzt.

2.1. Probenmaterial

Es wurden Seren / hämolytische Seren und Blutproben eingesetzt, die im Auftrag von Staatsanwaltschaft oder Polizei auf Drogen untersucht werden sollten. Zusätzlich wurden mit methanolischen Lösungen von Morphin, Benzoyl-ecgonin, LSD und THC-COOH gespikete Seren gemessen, von denen jeweils 5 ml Serum angesetzt wurden. Das Pipettierschema, die daraus entstandenen Endkonzentrationen und die gemessenen CEDIA-Werte sind der Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Pipettierschema und Meßdaten gespikter Seren

Assay	Zugabe zu 5 mL Blindserum	Endkonzentration, in ng/mL	gemessener CEDIA-Wert in ng/mL
Cocain	0	0	0
	25 µL (10 ng/µL)	50	37
	100 µL (10 ng/µL)	200	174
	200 µL (10 ng/µL)	400	371
Opiate	0	0	0
	25 µL (10 ng/µL)	50	36
	100 µL (10 ng/µL)	200	205
	200 µL (10 ng/µL)	400	382
d,l - Amphetamin	0	0	0
	25 µL (10 ng/µL)	50	0
	100 µL (10 ng/µL)	200	148
	200 µL (10 ng/µL)	400	268
LSD	0 µL	0	0
	12,5 µL (100 pg/µL)	0,25	0,23
	25 µL (100 pg/µL)	0,5	0,47
	50 µL (100 pg/µL)	1,0	0,93
THC-COOH	0	0	0
	10 µL (10 ng/µL)	20	31
	25 µL (10 ng/µL)	50	60
	50 µL (10 ng/µL)	100	86

2.2. Kalibratoren

Für die Cannabinoide und das LSD wurden - wie vom Hersteller Boehringer Mannheim vorgesehen - die Urinkalibratoren (Negativ-Cal, Cal 25, Cal 50, Cal 75, Cal 100 für die Cannabinoide und Negativ-, Cut-off-, Intermediate-, High-Kalibrator für das LSD) direkt eingesetzt. Für die Assays Cocain, Opiate, Amphetamine und Benzodiazepine wurden die Urinkalibratoren (Secondary-cut-off-, Intermediate-, High-Kalibrator) automatisch vor der Messung vom Gerät mit Wasser verdünnt (siehe Tab. 2). Die Endkonzentrationen der Kalibratoren sind in

Tab. 3 ersichtlich. Die dazugehörigen Kalibrationskurven sind in Abb. 1 dargestellt.

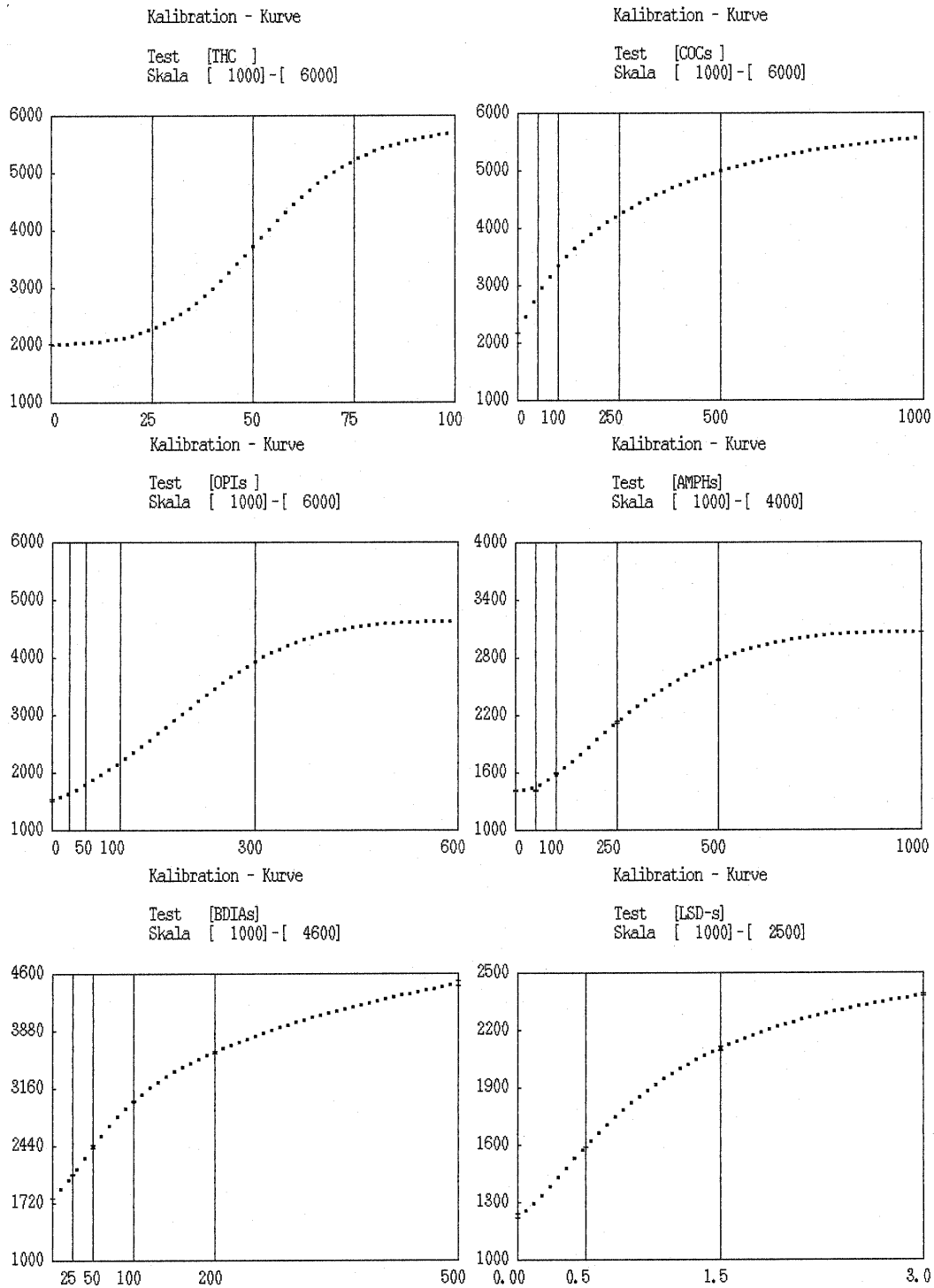


Abb. 1: Kalibrationskurven

Tab. 2: Verdünnungsschema der Kalibratoren; Abk.: N = Negativ-Calibrator, S = Secondary cut-off-Calibrator, I = Intermediate-Calibrator, H = High-Calibrator

Assay	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6	Proben- volumen
Cocain	N direkt	S 1:3	I 1:20	I 1:8	I 1:4	I 1:1	10 µL
Opiate	N direkt	S 1:12	S 1:6	S 1:3	S direkt	S Vol. × 2	6 µL
Amphetamine	N direkt	S 1:10	S 1:5	S 1:1	S direkt	S Vol. × 2	10 µL
Benzodiazepine	N direkt	S 1:8	S 1:4	S 1:1	S direkt	H 1:10	10 µL

Tab. 3: Endkonzentrationen der Kalibratoren; Angaben in ng/ml

Assay	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
Cannabis	0	25	50	75	100	-
Cocain	0	50	100	250	500	1000
Opiate	0	25	50	100	300	600
Amphet.	0	50	100	250	500	1000
Benzod.	0	25	50	100	200	500
LSD	0	0,5	1,5	3,0	-	-

2.3. Kontrollen

Es wurden von der Fa. Boehringer Mannheim kommerziell erhältliche Kontrollen für die Cannabinoide und das LSD direkt eingesetzt, für die Assays Cocain, Opiate, Amphetamine und Benzodiazepine wurden die Multikontrollen nach Verdünnung - wie in Tab. 4 beschrieben - eingesetzt.

Tab. 4: Vorbereitung der Urinkontrollen

Assay	Verdünnung Mul- tikontrolle mit H ₂ O	Sollwert Low	Toleranz- bereich ±20%	Sollwert High	Toleranz- bereich ±20%
THC 25	-	19	15-23	31	25-37
LSD	-	0,3	0,24-0,36	0,7	0,56-0,84
Cocain	1:3	75	60-90	125	100-150
Opiate	1:3	75	60-90	125	100-150
Amphetamine	1:10	75	60-90	125	100-150
Benzodiazepine	1:5	45	36-54	75	60-90

3. Ergebnisse und Diskussion

Es wurden 120 Proben gemessen, die zum größten Teil mittels FPIA (ADx, Fa. Abbott) nach der Methode von Daldrup und Mußhoff [1] voruntersucht und gegebenenfalls mit GC/MS bestätigt wurden.

Als meßtechnisch unproblematisch stellten sich Seren und leicht hämolytische Seren heraus, wohingegen stark hämolytische Seren und Blute ohne Probenvorbereitung nicht meßbar waren. Es wurden hierbei vom Gerät Fehlermeldungen jedoch nur für einzelne Drogen ausgegeben, wie den in Tab. 5 wiederge-

gebenen Beispielen zu entnehmen ist. Es zeigte sich jedoch in diesen Fällen, daß das Ergebnis auch für die anderen Drogen, für die das Gerät keine Fehlermeldungen ausgab, als zweifelhaft angesehen werden mußte. So wurde z. B. im Fall 5071 für Cocain und im Fall 5198 für Cannabinoide ein eindeutig falsch negatives Ergebnis ohne Fehlermeldung erhalten.

Tab. 5: Auswirkungen von Fehlermeldungen; Angaben in ng/ml; Fehlermeldungen: Limit 0: Die Extinktionsgrenze ist an allen Meßpunkten überschritten, Limit 2: Die Extinktionsgrenze ist ab dem dritten Meßpunkt überschritten, Lin. 8: Die Extinktionsänderung bei der Kinetik ist nicht linear

Ch-Nr	Methode	Cannabinoide	Cocain	Opiate	Amphetamine
5071 Blut	CEDIA	0, Limit 0	0	0, Limit 0	0
	GC/MS	THC: neg. 11-OH-THC: 1,4 THC-COOH: 29,4	Cocain: 24,4 BZE: 389	Mo: 42,9 Co: 2,7 Di: neg.	
5198 Stark hämol. Serum	CEDIA	0	0, Lin. 8	0, Limit 2	0
	GC/MS	THC: 6 11-OH-THC: 4 THC-COOH: 73			

Versuche, stark hämolytisches Serum oder Blut nach Präzipitation mit Methanol (Aceton konnte wegen der Kunststoff-Küvetten im Hitachi 911 nicht verwendet werden) als Probenmaterial einzusetzen, zeigten Linearitätsprobleme, u. a. aufgrund der hohen Blindwertextinktionen. Einen Ausnahme stellte das LSD dar, bei dem gute Ergebnisse erzielt werden konnten.

Die Direktmessungen der gespikten Seren erzielten relativ gute Wiederfindungen. Beim LSD und den Opiaten zeigten sich die geringsten Abweichungen von den eingesetzten Konzentrationen.

Bei den mit CEDIA, ADx und GC/MS untersuchten Proben konnten einige positive CEDIA-Messungen nicht mit weiteren chromatographischen Methoden überprüft werden, da kein Probenmaterial mehr vorhanden war. Es zeigten sich bei dem Vergleich von ADx und CEDIA z. T. deutliche Unterschiede (Tab. 6), die u. a. auf die unterschiedlichen Kreuzempfindlichkeiten der Assays zurückgeführt werden könnten. Von den mit GC/MS und CEDIA auf Cannabinoide überprüften Proben stellten sich 4 von 54 als falsch negativ heraus. Bei Cocain und den Opiaten wurde dagegen eine recht gute Übereinstimmung der verschiedenen Meßmethoden erzielt. Bei Cocain war 1 von 21 Proben und bei den Amphetaminen war 1 von 4 Proben falsch negativ. Bei den Opiaten war 1 von 34 Proben falsch positiv und bei den Benzodiazepinen konnten alle mit CEDIA positiv gemessenen Proben mit der HPLC bestätigt werden. 2 der 6 mit CEDIA positiv auf LSD gemessenen Proben konnten nicht mit GC/MS bestätigt werden. Hierbei wollen wir aufgrund der Instabilität von LSD bzw. dadurch, daß bei der Massenspektrometrie nur LSD ohne seine Metabolite erfaßt wurde, nicht ausschließen, daß methodische Probleme zu "falsch positiven" CEDIA-Werten geführt haben.

Tab. 6: Gegenüberstellung verschiedener Meßverfahren: CEDIA / ADx; CEDIA / GC/MS; CEDIA / HPLC

Cannabis

ADx		pos. CEDIA neg.
pos.	neg.	
39	1	
8	34	

GC/MS		pos. CEDIA neg.
pos.	neg.	
47	0	
4	3	

Cocain

ADx		pos. CEDIA neg.
pos.	neg.	
14	0	
1	57	

GC/MS		pos. CEDIA neg.
pos.	neg.	
20	0	
1	0	

Opiate

ADx		pos. CEDIA neg.
pos.	neg.	
30	0	
4	42	

GC/MS		pos. CEDIA neg.
pos.	neg.	
30	1	
0	3	

Amphetamine

ADx		pos. CEDIA neg.
pos.	neg.	
1	0	
2	67	

GC/MS		pos. CEDIA neg.
pos.	neg.	
3	0	
1	0	

Benzodiazepine

ADx		pos. CEDIA neg.
pos.	neg.	
15	3	
0	53	

HPLC		pos. CEDIA neg.
pos.	neg.	
15	0	
0	0	

LSD

pos.	neg.	pos. CEDIA neg.
4	2	
0	0	

GC/MS

Eine semiquantitative Auswertung der CEDIA-Ergebnisse scheint problematisch zu sein, da eine Korrelation zwischen den CEDIA- und den ADx-Werten einerseits und den GC/MS-Ergebnissen andererseits nicht zu erkennen ist.

Bei den Opiaten könnte dies an den Morphin glucuroniden liegen, die bei der GC/MS-Analyse nicht berücksichtigt wurden. Vergleiche mit GC/MS-Analysen haben gezeigt, daß die Meßempfindlichkeit von CEDIA bezüglich der Cannabinoide noch gesteigert werden müßte. Es hat sich bei Benutzung der Urinkalibrierung für Cannabinoide herausgestellt, daß eine Sättigung des Assays bei Werten ab 60 ng/mL erreicht wurde. Deshalb wurde auf eine Kalibration mit niedrigeren Konzentrationen (0, 5, 10, 25, 50 ng/mL) umgestellt, für die jedoch noch keine ausreichenden Erfahrungen vorliegen.

Grundsätzlich scheint nach den bisherigen Erfahrungen der neu auf den Markt gekommene CEDIA-Test ähnlich gut wie andere etablierte Systeme für die Untersuchung von Proben geeignet zu sein, wobei jedoch der Vorteil einer Direktmessung nur z. T. gegeben ist, da die Voraussetzung, mehr oder weniger hämolysefreies Serum zur Verfügung zu haben, in vielen Fällen nicht gegeben ist.

4. Literatur:

[1] Daldrup, Th. und Mußhoff, F.: Forensische Analytik: Drogen und Arzneimittel. In Günzler et al. (Hrsg), Analytiker Taschenbuch, Bd. 13, Springer, Berlin, Heidelberg, 1995

[2] Iwersen, St.: Persönliche Mitteilung

5. Anschrift der Autoren

BTA Annette Rickert und
Prof. Dr. Th. Daldrup
Institut für Rechtsmedizin
Heinrich-Heine-Universität
Moorenstr. 5, D-40225 Düsseldorf