

**CARRERA: LICENCIATURA EN CRIMINALÍSTICA**

**CÁTEDRA: QUÍMICA III**

**TRABAJO PRACTICO N° 3:**

**TEST INMUNOCROMATOGRÁFICOS EN ORINA: DETECCIÓN DE  
COCAÍNA Y METABOLITOS INDICADORES DEL CONSUMO DE  
MARIHUANA EN ORINA HUMANA**

**INMUNOCROMATOGRAFIA DE FLUJO LATERAL**

Los ensayos de inmunocromatografía, también llamados ensayos de flujo lateral, están diseñados para detectar la presencia o ausencia de determinado analito en una muestra. Estos ensayos son de detección visual y de fácil lectura, pueden considerarse, en muchos casos, como un test POC ideal. Los test POC (de la sigla Point-Of-Care) son aquellos que pueden realizarse lejos del laboratorio, en el lugar de atención.

Los test de flujo lateral más populares, disponibles en el mercado, son los test de embarazo y los test de detección de estupefacientes, pero existen muchos más como los utilizados para detectar distintos tipos de infecciones (VIH, *Chlamydia spp.*, entre otros) así como analitos presentes en el ambiente o en productos agrícolas.

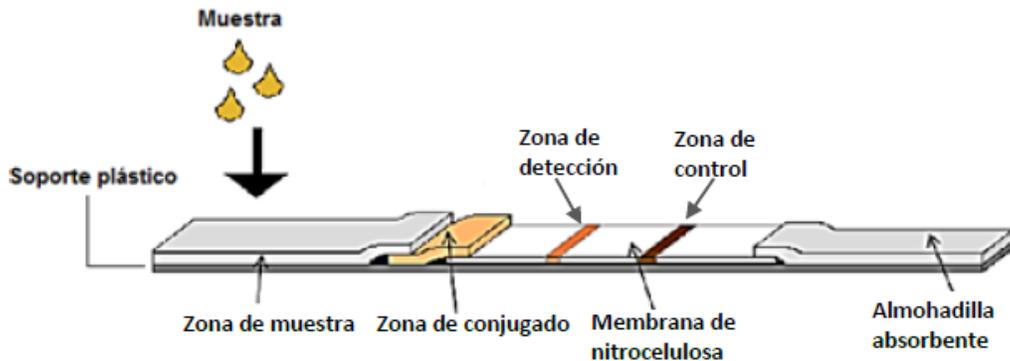
La inmunocromatografía se basa en la capacidad de una muestra de migrar por capilaridad a través de una tira de material poroso (por ejemplo, nitrocelulosa).

En las tiras reactivas se pueden distinguir 5 zonas:

- **Zona de siembra de la muestra:** es el lugar donde se coloca la muestra a analizar, pudiendo esta contener o no el analito de interés.
- **Zona del conjugado:** en esta zona se encuentra un compuesto conjugado a nanopartículas coloreadas, por ejemplo con metales pesados (oro o selenio coloidal, color rosa o azul respectivamente). Este compuesto se debe solubilizar al pasar la muestra, debe ser capaz de migrar junto con ella, y siempre debe ser capaz de unirse específicamente al analito de interés, si está presente en la muestra, formando un inmunocomplejo.
- **Zona de detección:** en esta zona se encuentra fijado a la membrana un compuesto capaz de reaccionar con el inmunocomplejo previamente formado. De esta manera la presencia o ausencia de color en esta banda permitirá conocer si el analito se encuentra presente en la muestra.
- **Zona de control:** en esta región se encuentra inmovilizado un anticuerpo capaz de reconocer al compuesto conjugado. De esta manera el exceso de conjugado es

capturado, formándose una banda coloreada tanto en presencia como ausencia del analito. La presencia de banda en esta zona válida la técnica, ya que verifica el estado de conservación del test y la correcta migración de la muestra durante su uso.

- **Almohadilla absorbente:** absorbe los restos de muestra para evitar derrames.



Modelo de test inmunocromatográfico de flujo lateral.

## **DETECCION DE DROGAS EN ORINA**

Los ensayos inmunológicos se realizan sin un aislamiento previo de la orina del analito de interés. Los sistemas desarrollados para detección de drogas, poseen un anticuerpo específico para una sustancia determinada o para un grupo de ellas. Son ensayos de competencia antígeno-anticuerpo, en los cuales se marca el anticuerpo (sistemas homogéneos) o se utiliza un sistema acoplado donde se visualiza la reacción mediante un color, visualizándose la presencia/ausencia de bandas determinadas o de lectura mediante algún sistema específico (sistemas heterogéneos). Para ello se dispone de dispositivos de diagnóstico inmunológicos “tipo cassette” o “one-step”.

Las drogas que pueden estar presentes en la muestra de orina compiten frente a los respectivos conjugados de las drogas por los puntos de unión al anticuerpo.

Tales ensayos están disponibles como ensayos aislados: benzodiazepinas genéricas, cocaína, THC o combinados: anfetaminas, metanfetamina, cocaína, morfina y PCP (fenciclidina). Ofrecen alta sensibilidad y relativa especificidad, pero siempre es necesario confirmar los resultados con otra metodología, cuyo principio sea diferente al utilizado, ya que pueden existir falsos positivos. La metodología de confirmación más recomendada es Cromatografía gaseosa (CG) acoplada a Detector Espectrómetro de Masas (MS).

### **Procedimientos de recolección y manipulación de muestra:**

La muestra de orina presenta una ventaja importante frente a otras muestras biológicas, dado que está disponible en cantidad suficiente, es de fácil recolección en diversos medios y las drogas y/o sus metabolitos tienden a estar presentes en concentraciones relativamente altas (Moffat y col, 1986).

Hay que tener en cuenta que este fluido biológico es fácilmente adulterable con sustancias químicas (lavandina, agentes limpiadores, jabón líquido) y fácilmente diluible para producir resultados falsamente negativos. Por tanto, la autenticidad de las muestras de orina puede ser un problema. Idealmente la muestra debe tomarse en presencia de un veedor, para evitar manipulaciones mal intencionadas. Sin embargo, la monitorización de la temperatura, el pH, el nivel de creatinina de un peso específico de una orina recogida recientemente ayuda a aliviar el problema de las muestras adulteradas (Wolff, Welch, & Strang, 1999).

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

**-ACTIVIDADES A REALIZAR: Test inmunocromatográfico para detección de Cocaína y metabolitos indicadores del consumo de Marihuana en orina humana.**

**-DISEÑO DEL KIT A UTILIZAR - SISTEMA REACCIONANTE:**

**Zona de muestra:** pocillo donde se siembra la muestra

**Zona del conjugado:** Anticuerpo marcado (Ac-conjugado) capaz de reconocer el hapteno de interés.

**Zona de detección (línea de test):** Hapteno de interés unido a proteína (Ag- proteína), la cual le permite mantenerse fijado a la membrana.

**Zona de control (línea de control):** Anticuerpo anti Anticuerpo marcado (Anticuerpo anti Ac-conjugado).

Durante la prueba, una muestra de orina se traslada por acción capilar.

Si una droga se encuentra presente en la muestra de orina por debajo de su umbral de concentración, no ocupará los puntos de unión al anticuerpo específico. A continuación, el Anticuerpo marcado (Ac-conjugado) reaccionará con el Ag-proteína fijado a la membrana y aparecerá una línea de color visible en la zona de la línea de prueba.

La presencia de droga por encima del umbral de concentración saturará todos los puntos de unión del anticuerpo marcado (Ac-conjugado). Por lo tanto, la línea de color no se formará en la zona de la línea de prueba.

Una muestra de orina positiva no generará una línea de color en la zona de la línea de prueba debido a la competición de sustancias, mientras que una muestra negativa generará una línea en la zona de línea de prueba debido a la ausencia de competición de sustancias.

En ambos casos, la muestra sigue fluyendo hasta la zona de control, donde el exceso de Ac-conjugado es capturado por un Ac anti Ac-conjugado, formándose una banda coloreada que valida el ensayo. Si la línea de control no aparece, el resultado de la prueba no es válido.

## **-MATERIALES DE LABORATORIO**

-Test Inmunocromatográficos con material provisto por el kit (pipetas cuentagotas y cassettes).

-Guantes y gafas.

-Cronómetro.

-Muestras de orina.

## **-PROCEDIMIENTO:**



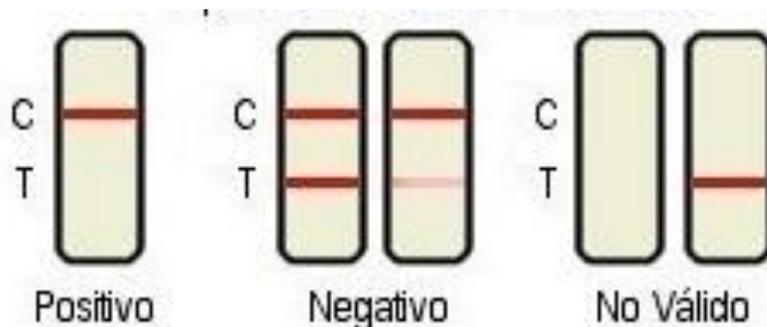
La muestra de orina debe estar a temperatura ambiente (15-30 ° C) antes de realizar la prueba.

**1-Extraer la placa del test en el momento que vaya a realizar la determinación.**

**2-Colocar la placa en una superficie limpia y lisa. Tomar la muestra con la pipeta provista por el Kit (cuentagotas) y colocar en posición vertical, para añadir tres gotas en el pocillo de muestra (S).**

**3-Esperar que la muestra difunda y aparezcan las bandas coloreadas. Los resultados deberán leerse a los 5 minutos de iniciado el test. No interpretar resultados pasados 10 minutos.**

## -INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:



**NEGATIVO:** Se observan **dos líneas**. Una línea coincide con la zona de control (C) y otra línea aparecerá en la zona de prueba (T). Un resultado negativo indica que la concentración de droga se encuentra por debajo del nivel de detección.

Nota: la intensidad del color de la línea de la zona T puede variar, pero cualquier coloración roja, por muy débil que sea, deberá considerarse como resultado negativo.

**POSITIVO:** Una **línea** roja aparece en la región de control (C). No aparecerá ninguna línea en la zona de prueba (T). Un resultado positivo indica que la concentración de droga excede los niveles de detección.

**NO VÁLIDO:** Cuando **no se observa ninguna línea** en la zona de control (C). Si esto ocurre, el test es inválido.

**ATENCIÓN:** Todas las muestras deben ser consideradas como potencialmente infecciosas y deben manipularse con guantes, desinfectando luego con agua lavandina todos los elementos que puedan haber entrado en contacto con la misma.

### Bibliografía:

- Ficha Técnica. Prueba de detección rápida en un paso para la detección cualitativa de varios fármacos y metabolitos en orina humana. ABON Biopharm (Hangzhou) Co.Ltd.
- Manuel Repetto, Toxicología Avanzada, Madrid España, Editorial Diaz de Santos, S.A., 1995.
- Gabriela Fiorenza Biancucci Diana González Adriana Pérez Adriana Ridolfi Analía Strobl, Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos para Laboratorios de Baja Complejidad, Ministerio de Salud de la Nación, Argentina, 2007.
- Inmunología Básica. Seminarios Métodos de Laboratorio. Universidad Nacional del Litoral. 2019