

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE RASTREIO PARA KETAMINA (KET) POR IMUNOENSAIOS ENZIMÁTICOS

Francisco Coelho^{1,2,3*}, Pedro Costa^{3,6*}, Paula Melo^{3,6*}, Maria José Quintas^{3,6*},
Sónia Tarelho^{3,6*}, André Castro^{3,6*}, Helena M. Teixeira^{3,4,5,6}

INTRODUÇÃO & OBJETIVO

Nas últimas décadas, têm sido frequentemente reportados casos em que drogas legais são utilizadas de forma ilícita/descontextualizada, sendo a ketamina (KET) um exemplo. A ketamina foi inicialmente desenvolvida como anestésico. No entanto, cedo passou a ser também classificada como “club drug”, tendo um caráter alucinogéneo e funcionando como anestésico dissociativo, dados os distúrbios psiquiátricos de tal ordem graves que causava e causa nos pacientes/consumidores.

Segundo a TIAFT, a gama terapêutica associada à KET varia aproximadamente entre 500 e 6000 ng/mL. Nesta gama, os seus efeitos não são, por norma, tóxicos ou letais. A TIAFT considera ainda que concentrações de KET superiores a 7000 ng/mL já são, para a maioria dos casos estudados, consideradas letais.

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação de um método de deteção da ketamina por imunoenaios enzimáticos (método de rastreio) em amostras de sangue total e de urina, *in vivo* e *post-mortem*, de forma a que possa ser posteriormente aplicável à rotina pericial do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P..

MATERIAL & MÉTODOS

Os imunoenaios enzimáticos (EIA) foram realizados num CODA® Automated EIA Analyzer da Bio-Rad. O kit utilizado foi o Ketamina Micro-Plate EIA – Forensic Application da OraSure Technologies, Inc..

Os EIA implicam a utilização de anticorpos imobilizados numa placa de poliestireno. O seu princípio de funcionamento assenta numa reação antígeno-anticorpo de caráter competitivo (Figura 1). Esta competição pela ligação ao anticorpo específico dá-se entre o conjugado enzimático (composto tóxico marcado) e o analito (composto tóxico livre). A relação entre a quantidade de analito na amostra e a intensidade da cor é inversamente proporcional: sinais elevados correspondem a baixas concentrações de analito na amostra.

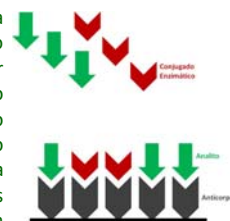


Figura 1 – Reação antígeno-anticorpo de caráter competitivo

Para os passos de validação, foram fortificadas amostras brancas de sangue total e de urina com diferentes concentrações de KET (210, 300, 510, 3000 ng/mL). Para a avaliação da ocorrência de reatividade cruzada, diferentes amostras foram fortificadas com fenciclidina (10, 100 ng/mL).

RESULTADOS

Para a validação do método foram realizados testes de reprodutibilidade, arrastamento, especificidade e seletividade, influência da diluição/concentração da amostra e robustez.

O **cut-off** (limiar de deteção) definido neste estudo foi de 210 ng/mL. A escolha de uma concentração subterapêutica permite alargar a janela de deteção do composto no organismo da alegada vítima de abuso sexual facilitado pela administração de KET, do alegado consumidor ilícito da droga ou mesmo da alegada vítima mortal devido a uma administração hospitalar incorreta do composto (por exemplo, em cirurgia).

Para testar o **arrastamento** (transição de analito de uma mistura reacional para outra) foi utilizada uma *strip* cujos poços alternavam repetidamente da seguinte forma: CQI alto, negativo, CQI baixo, negativo. Comprovou-se que não ocorre arrastamento.

A **especificidade** e a **seletividade** do método foram estudadas por meio de fortificações de amostras brancas com KET e com PCP (fenciclidina), um precursor e análogo estrutural da ketamina, de forma a testar, em paralelo, a ocorrência de reatividade cruzada (tabela 1).

Tabela 1. Testes de especificidade/seletividade

Amostra	Resultado	Absorvância
Controlo Negativo (média)	-	0.674
Cut-off (média)	+/-	0.271
KET510	+	0.179
PCP10	-	0.787
PCP100	-	0.614

Tabela 2. Diferentes razões de diluição da amostra

Amostra	Resultado	Absorvância
Controlo Negativo (média)	-	0.674
Cut-off (média)	+/-	0.271
KET510	+	0.179
KET3000	+	0.109
KET510 (200:300)	+	0.151
KET3000 (200:300)	+	0.104

Tabela 3. Teste com mistura de 10 sangues “reais”

Amostra	Resultado		Concordância
	Sangue branco	Mistura de sangues	
KET3000	+	+	Sim
AMBO02 (negativo)	-	-	Sim
KET510	+	+	Sim
PCP10	-	-	Sim
PCP100	-	-	Sim



Figura 2 – Equipamento CODA fechado (em cima) e aberto (em baixo)



DISCUSSÃO & CONCLUSÕES

O método revelou-se específico/seletivo para a ketamina. Não foi verificada reatividade cruzada com outros compostos (mesmo que estruturalmente semelhantes, como é o caso da PCP). Não se verificou arrastamento de analito ao longo dos poços e a robustez do método foi também assegurada através da introdução de diversas variáveis, as quais em nada alteraram a performance do teste avaliado.

Este tipo de método apresenta vantagens importantes: é eficaz, rápido, automatizado, rentável, devolve resultados fáceis de interpretar e que prontamente permitem direcionar ou não as amostras para a confirmação.

Os resultados obtidos na validação permitem concluir que o método se revelou adequado para a deteção de ketamina nas amostras testadas, com um *cut-off* de 210 ng/mL, quer para sangue, quer para urina, permitindo a sua aplicação na rotina laboratorial e pericial do Serviço de Toxicologia Forense.

Os autores gostariam de agradecer à Bio-Rad o apoio prestado para a realização deste trabalho.

¹Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

²Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

⁴Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

⁵Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

⁶CENCIFOR – Centro de Ciências Forenses

* andre.castro@inml.mj.pt

