

A: José Gallero, Oscar Bertoletti
DE: Eleonora Scoseria
TEMA: Conceptos de antidoping equino para divulgación
FECHA: 22/12/2008

Contenido de este informe

1. Conceptos básicos sobre antidoping equino	1
2. Screening	1
3. Confirmación por métodos químicos	2
4. Bibliografía	3
ANEXO I: Métodos de screening	4
ANEXO II: Métodos cromatográficos.....	5

1. Conceptos básicos sobre antidoping equino

Habitualmente el análisis legal o forense de drogas ya sea en humanos o animales, se realiza en dos etapas, empleando dos tipos de metodología diferentes.

La primera etapa consiste en un test de screening o "tamizado / cernido" que se aplica a la totalidad de las muestras recibidas por el laboratorio. El concepto es emplear un tamiz o "cernidor" para separar los posibles positivos de los negativos.

La segunda etapa consiste en aplicar un método de confirmación sobre las muestras que hayan dado reacción positiva en el test de screening (fueron "separadas" por el "cernidor").

Habitualmente los tests de screening son más rápidos pero menos sensibles (detectan a partir de mayores cantidades de sustancia) y menos específicos que los métodos confirmatorios.

2. Screening

En antidoping equino es habitual emplear como screening métodos de inmunoensayo, como el ELISA, que constituye un método rápido, sensible y con una especificidad elevada, lo cual limita la cantidad de falsos positivos.

El ELISA fue introducido en el testeo de carreras de caballos hacia fines de la década de 1980, luego de las investigaciones de un grupo de la Universidad de Kentucky, liderado por el Dr. Thomas Tobin quien estuvo recientemente de visita en nuestro país (Thomas Tobin).

Los kits empleados para screening suelen estar dirigidos a un grupo de sustancias por lo que una reacción positiva en un ELISA, puede indicar la presencia de más de una sustancia (ver Anexo I).

La sensibilidad del ELISA puede verse aumentada mediante el empleo de lectores adecuados que permiten independizar la lectura del criterio y apreciación visual del analista.

Un ELISA puede dar falsos positivos, porque los reactivos empleados pueden reaccionar ante sustancias diferentes a la sustancia buscada. Por ser métodos inmunológicos es inevitable que para algunos compuestos más que otros, exista una cierta reactividad cruzada. Es decir: los reactivos empleados reaccionan no solamente con la(s) sustancia(s) buscada(s) sino que pueden reaccionar con otras sustancias relacionadas o no.

Por esta razón, ante un ELISA negativo, se da la muestra por negativa, pero ante un ELISA positivo, la muestra se considera sospechosa y se hace una verificación primaria por un método químico de especificidad adecuada.

De no existir un kit para screening por ELISA, se suele trabajar directamente por métodos químicos, lo cual constituye una alternativa usualmente más larga, costosa y trabajosa, pero igualmente válida.

Es cada vez más frecuente el desarrollo de los denominados multimétodos para screening de varias sustancias simultáneamente en una sola corrida de HPLC (ver más abajo).

3. Confirmación por métodos químicos

La confirmación se realiza normalmente por métodos químicos como GC (gas chromatography – cromatografía de gases) o LC (liquid chromatography – cromatografía líquida, habitualmente de alta performance o HPLC – High Performance Liquid Chromatography) acoplados a un sistema de detección adecuado que suele ser la espectrometría de masa (MS – mass spectrometry). Para más información, ver Anexo II.

Los sospechosos que hayan surgido en el screening, si son falsos positivos, darán negativo en la GC o HPLC.

4. Bibliografía

Chromedia. *Chromatography Knowledge Base*.

<http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=muxadDsHqnOxmOIIeCzBaEjB> (último acceso: 22 de 12 de 2008).

Georg Uray, Gernot A. Strohmeier and Walter M. F. Fabian. *ECSOC4*.

<http://pages.unibas.ch/mdpi/ecsoc-4/a0010/a0010.htm> (último acceso: 22 de 12 de 2008).

Mohammad Sarwar, Ph.D., and John L. McDonald, B.S. *DEA Resources*.

http://www.usdoj.gov/dea/programs/forensicsci/microgram/journal071203/mj071203_pg4.html (último acceso: 22 de 12 de 2008).

Neogen Corporation. *Neogen Life Sciences*.

http://www.neogen.com/LifeSciences/F_Index.html (último acceso: 22 de 12 de 2008).

Thomas Tobin, Fernanda Camargo, Andreas Lehner, Wojciech Karpiesiuk, and Charlie Hughes. *Drugs*. <http://thomastobin.com/drugsmeds/drugsmeds.htm> (último acceso: 22 de 12 de 2008).

Upchurch Scientific. *Upchurch scientific: HPLC Introduction*.

<http://www.upchurch.com.cn/TechInfo/hplcIntro.asp> (último acceso: 22 de 12 de 2008).

ANEXO I: Métodos de screening

ELISA (Neogen Corporation)

Neogen Corporation ha desarrollado y comercializa kits para el ensayo de ELISA en muestras forenses.

Estos kits son considerados ultra sensibles, rápidos y confiables y son ampliamente usados en hipódromos en el mundo entero.

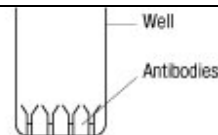
Teoría del ensayo

El ensayo se basa en la competencia entre la droga buscada y un conjugado droga-enzima por un número limitado de sitios de unión en una placa pre-tratada.

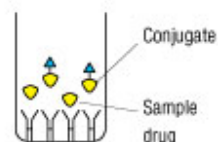
Procedimiento

1. Se agregan las muestras, estándares o calibradores a diferentes pozos de la microplaca pre tratada.
2. Se agrega el conjugado.
3. Se agita e incuba durante un tiempo preestablecido (habitualmente 1 hora). Durante la incubación ocurre la competencia entre el conjugado y la droga eventualmente presente en la muestra para unirse a los sitios de unión disponibles.
4. Se lava la placa para retirar todo el material que no se haya unido.
5. Se agrega un reactivo de desarrollo de color que genera un color más intenso cuanto menor sea la cantidad de droga unida a la placa.
6. Se leen las placas (visualmente o mediante lector) pasados 30 minutos.

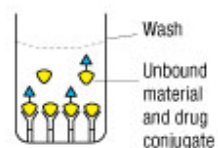
Plates are precoated with the antibody. The plate is ready for use. DO NOT WASH.



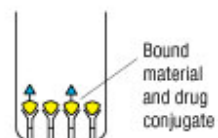
A sample or control is added to each well. Next the drug-enzyme conjugate is added and the mixture is incubated at room temperature.



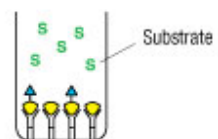
Wash the plate to remove all unbound materials.



The bound materials now remain in the microplate.



Add TMB substrate to each well and allow the color to develop.



Qualitative results are obtained by measuring the absorbance reading at 650 nm or 450 nm if acid stop is used.

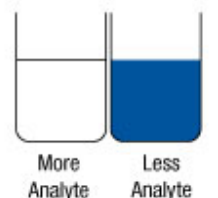


Fig. 1 Proceso de screening por ELISA competitivo (Neogen Corporation)

ANEXO II: Métodos cromatográficos

Fundamentos de los métodos cromatográficos de análisis:

- a. Un método de análisis por HPLC o GC se basa en la separación de sustancias en función de su diferente afinidad por la columna en que se inyectan (fase estacionaria) y la fase móvil que se hace pasar por la columna.
- b. Diferentes sustancias tienen diferentes afinidades y eso hace que presenten tiempos de retención diferentes (tiempo entre la inyección y la detección del pico característico, abreviado habitualmente como t_R).

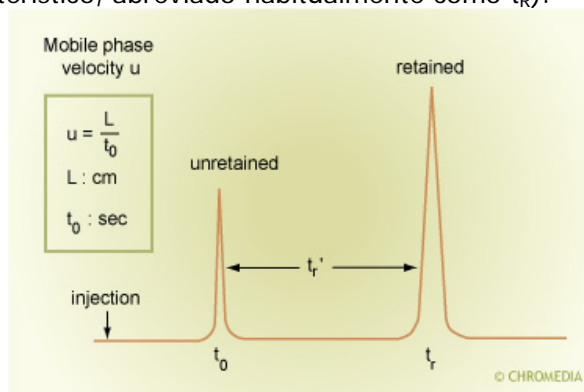


Fig. 2 Tiempo de retención en cromatografía (Chromedia s.f.)

- c. Las sustancias son detectadas al salir de la columna por diferentes métodos como puede ser en función de la absorción de luz UV (detección UV) o en función de la abundancia relativa de diferentes iones (detección por masa determinando los valores masa / carga de los iones en los que se fragmenta la molécula).

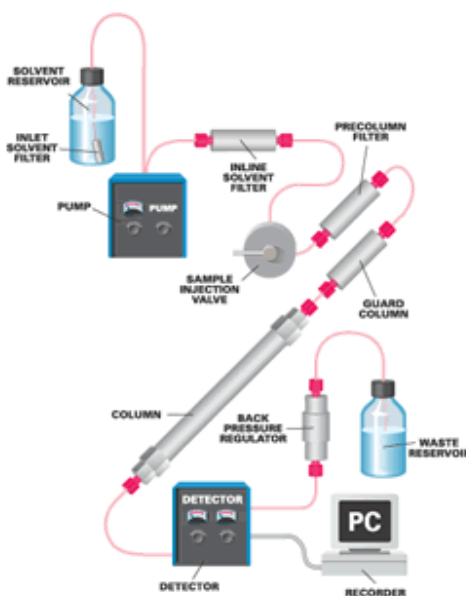


Fig. 3 Esquema de un equipo de LC (Upchurch Scientific s.f.)

- d. En una cromatografía con detección UV/vis (ultravioleta / visible), los criterios para determinar la identidad de una sustancia son:
- i. Tiempo de retención comparable al del estándar
 - ii. Espectro UV/visible comparable al del estándar

En caso de que existan sustancias con espectros UV muy similares debido a su similitud química, se requiere además que el método permita separar esos compuestos similares.

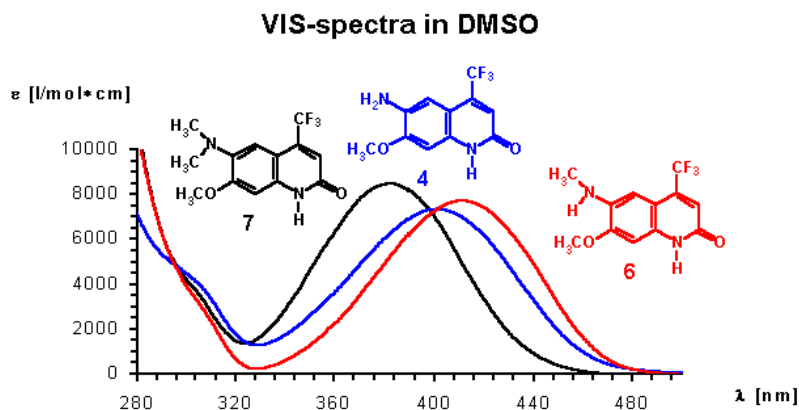


Fig. 4 Espectros de DMSO y derivados (Georg Uray)

- e. En una cromatografía con detección por masa, los criterios para determinar la identidad de la sustancia son habitualmente:
- i. Tiempo de retención comparable al del estándar
 - ii. Espectro de masa comparable al del estándar de acuerdo a criterios acordados internacionalmente

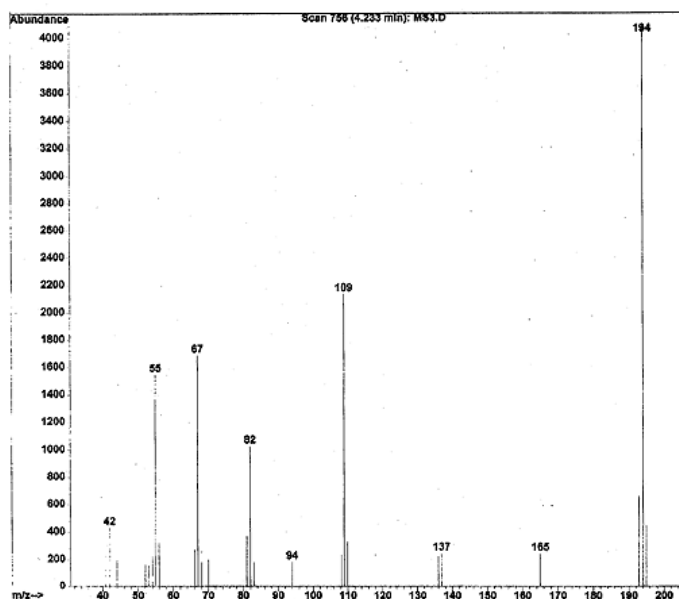


Fig. 5 Espectro de masa de la cafeína (Mohammad Sarwar)

Es posible además establecer otros criterios complementarios en los casos en que se busque metabolitos (resultados de la acción del organismo del equino sobre la droga) en lugar de la droga original (en inglés parent compound).