

Diálogo Forense  
Num. 5, Vol. 3, 2022  
ISSN: 2789-8458

# Implementación del análisis de drogas terapéuticas y/o de abuso en muestras de sangre por medio de técnica de inmunoensayo por Quimioluminiscencia utilizando el equipo Randox Evidence Investigator™

Mayra Judith Barrios Leguarca  
Laboratorio de Toxicología  
Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala -INACIF-  
mayrabarleg@gmail.com

Recibido: 25/03/2022  
Aceptado: 08/04/2022

**Palabras clave:** Inmunoensayo, quimioluminiscencia, biochip, sangre, drogas .

**Key words:** Immunoassay, chemiluminescence, biochip, blood, drug

## RESUMEN

Resumen El Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala (INACIF) es el responsable de analizar indicios biológicos en búsqueda de sustancias químicas, dentro de las que se encuentran las drogas. Debido a que los Laboratorios necesitan actualizar constantemente su tecnología, fue necesario implementar una técnica de inmunoensayo por quimioluminiscencia utilizando el equipo Randox Evidence Investigator™, Esta técnica es útil, ya que brinda resultados precisos y reproducibles. Para implementar dicha técnica se analizaron 10 muestras de sangre con resultado positivo para drogas comúnmente detectadas en el Laboratorio de Toxicología y 10 muestras de sangre con resultado negativo para drogas. Dicho análisis dio como resultado final el cumplimiento de lo esperado para drogas positivas y negativas. También se evaluó el tiempo invertido en el análisis el cual fue aproximadamente de 4 a 4.5 horas.

## ABSTRACT

The Toxicology Laboratory of the Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala -INACIF- is responsible for analyzing the biological signs in the search for chemical substances, among which drugs are found. Because Laboratories constantly need to update their technology, it was necessary to implement a new chemiluminescence immunoassay technique using the Randox Evidence Investigator™ kit. This technique is useful as it provides accurate and reproducible results. To implement this technique, 10 blood samples with a positive result for drugs habitually detected in the Toxicology Laboratory and 10 blood samples with a negative result for drugs were analyzed, said analysis gave as a final result the fulfillment of what was expected for positive and negative drugs. The time invested in analysis was also evaluated, which was approximately 4 to 4.5 hours.

## INTRODUCCIÓN

La Ley Contra la Narcoactividad, Decreto 48-92, en su artículo 2 define como droga a “toda sustancia o agente farmacológico que, introducido en el organismo de una persona viva modifica sus funciones fisiológicas y transforma los estados de conciencia” (Congreso de la República de Guatemala, 1992, Artículo 2). Esta definición es de gran interés en Toxicología Forense ya que esta rama aplica los aspectos médico-legales de los efectos nocivos que las drogas pueden provocar sobre los seres humanos (Bello y López, 2001).

El Laboratorio de Toxicología del INACIF es el responsable de analizar indicios biológicos en búsqueda de sustancias químicas, dentro de las que se encuentran sustancias volátiles (etanol, metanol, isopropanol y acetona), plaguicidas y drogas. En este también se realizan análisis sobre muestras de fluidos biológicos tomados de personas vivas o cadáveres, con el fin de determinar presencia de sustancias que pudieran causar daños o la muerte.

Dentro de los análisis que se realizan en el Laboratorio de Toxicología se encuentra el inmunoensayo de drogas en diferentes tipos de indicios. El laboratorio de Toxicología cuenta con un equipo de *RANDOX Evidence Investigator™*, adquirido por el INACIF en el año 2020 como una opción semiautomática para pruebas de tamizaje en investigación forense. Es reconocido por su versatilidad, robustez y métodos de generación de informes efectivos; además, el equipo ofrece la técnica de inmunoensayo por quimioluminiscencia, haciendo necesaria la implementación del mismo para emitir resultados precisos y reproducibles que puedan utilizarse en apoyo al Sistema de Justicia y en esclarecimiento de casos en los que el consumo de drogas tenga una implicación médico-legal (*Randox Laboratories Ltd*, 2016).

La técnica de Inmunoensayo por quimioluminiscencia consiste en la detección cualitativa de drogas o sus metabolitos mediante el inmunoanálisis competitivo por quimioluminiscencia; utiliza un sustrato quimioluminiscente con una etiqueta de peroxidasa de rábano picante (HRP) para la detección de anticuerpos o analitos unidos a la superficie del biochip (Sustrato sólido que contiene una matriz de regiones de prueba discreta que consta de diferentes anticuerpos inmovilizados específicos para diferentes clases de drogas) y por tanto, se observará una reducción de la señal quimioluminiscente emitida (*Randox Laboratories Ltd*, 2016), por ser una técnica presuntiva es necesario

que el resultado positivo de droga sea confirmado en equipos como Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC/MS) o Cromatógrafo líquido de ultra alto rendimiento acoplado a espectrómetro de masas tipo QToF (UPLC-QToF).

## MÉTODOS

El analizador *Evidence Investigator™* es un sistema de diagnóstico por imágenes de mesa para los ensayos con biochip. El inmunoensayo por quimioluminiscencia se realiza manualmente en un portador de biochips de 3 x 3 que se introduce en el *Randox Evidence Investigator™* para el análisis y captura de imágenes. Para garantizar la calidad del análisis realizado, se elaboran curvas de calibración y controles de calidad. El software *EvInvest* está incorporado al equipo y permite realizar la detección de la imagen para obtener los resultados finales listos para impresión (*Randox Laboratories Ltd*, 2016).

La implementación consistió en varias etapas, la primera de ellas fue realizar diez controles positivos, donde se evaluaron diferentes drogas que comúnmente se identifican en el Laboratorio de Toxicología, entre ellas: cocaína, metabolito de marihuana, benzodiazepinas y barbitúricos, estas drogas fueron detectadas en sangre y confirmadas en equipos de GC/MS o a UPLC-QToF. La segunda etapa consistió en evaluar diez controles negativos en muestras de sangre que anteriormente ya se habían analizado por otra técnica de inmunoensayo y dieron como resultado negativo para drogas, esto con el fin de determinar la selectividad del método.

Mientras que en la tercera etapa se evaluó el tiempo invertido en el que se ejecuta el análisis, desde el momento del muestreo de sangre hasta la impresión de reporte de resultados.

## MATERIALES

Muestras de sangre de cadáveres del Laboratorio de Toxicología del INACIF ya analizadas y confirmadas según el protocolo del laboratorio. Los reactivos, controles y curva de calibración utilizados durante el proceso de análisis fueron suministrados por el proveedor Randox.

## Preparación de la muestra

Se diluyeron las muestras de sangre en un factor cuatro con diluyente de muestras (DOA IWB P DIL SPE), para ello, se agregaron 50 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) del sobrenadante de cada muestra de sangre centrifugada en la otra serie de tubos ya rotulados con 150  $\mu\text{L}$  de diluyente de muestras.

## Protocolo de análisis

Se pipeteó 120  $\mu\text{L}$  de diluyente de análisis (DIL ASY) por biochip. Se agregaron 60  $\mu\text{L}$  de calibrador, control o muestra diluida en cada biochip y se agregaron 120  $\mu\text{L}$  de conjugado por biochip (imagen 1). Se colocó la bandeja portadora en la placa base del termoagitador. Se realizó incubación durante 30 minutos a 37 °C y 330 rpm (revoluciones por minuto), tras la incubación, se desechó el contenido de los biochips aplicando un movimiento rápido y preciso a la bandeja portadora.

Se realizaron lavados con solución tampón a cada biochip, golpeando suavemente todos los bordes de la bandeja portadora para desprender los reactivos atrapados debajo del biochip y, finalmente, se aplicó un movimiento rápido y preciso para desecharlos. Se realizaron 6 ciclos de lavado más con duración de 2 minutos, en cada ciclo de lavado se dieron pequeños golpes antes de desechar el lavado.

## Detección de imagen

Se inició el software *EvInvest*, en el que fue necesario cargar la secuencia e ingresar la información correspondiente de cada uno de los biochips en el orden establecido. En las bandejas portadoras secas (imagen 2) se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de reactivo indicador operativo LUM-EV841/PX a cada biochip; se cubrieron las bandejas portadoras para protegerlo de la luz por 2 minutos. Luego, se colocó individualmente cada bandeja portadora en el *Evidence Investigator*<sup>TM</sup> (imagen 3) y se realizó la lectura de cada detección de imagen utilizando el mismo software.

# RESULTADOS

Tabla 1. Controles positivos en muestras de sangre para drogas detectadas por inmunoensayo por quimioluminiscencia.

No.	Resultados esperados	Resultados de drogas en detección de imagen (concentración)
1	THC-m*/Cocaína	THC-m (+90.38) /BZG (+53.37)
2	Cocaína y metabolitos	BZG+(>240)
3	THC-m	THC-m (+19.44)
4	Cocaína y metabolito	BZG +(>240)
5	Midazolam (BENZ)	BENZ1 +(>76) Y BENZ2 (+13.04)
6	THC-m/Clonazepam (BENZ)	THC-m (+65.52) / BENZ3 (+35.36)
7	Midazolam (BENZ)	BENZ1 (+65.52)
8	THC-m/Midazolam (BENZ)	THC-m (+43.39) / BENZ3 (+43.26)
9	Fenobarbital (BARB) / Midazolam (BENZ)	BARB (+63.21) / BENZ1 +(>76)
10	Fenobarbital/Cocaína	BARB (+63.21) / BZG +(>240)

Fuente: Laboratorio de Toxicología -INACIF-

Donde THC-m: metabolito de Tetrahidrocannabinol (Metabolito activo de la marihuana), BENZ: benzodicepina, BZG: Benzoilecgonina (Metabolito activo de la cocaína), BARB: Barbitúrico. El valor dentro del paréntesis es la concentración detectada en la imagen del equipo.

Tabla 2. Controles negativos evaluados en muestras de sangre analizadas por inmunoensayo por quimioluminiscencia.

Droga	MX 1	MX 2	MX 3	MX 4	MX 5	MX 6	MX 7	MX 8	MX 9	MX 10
OXYC 1	-0.24	-0.3	-0.08	-0	-0.07	-0.14	-0.02	-0.15	-0.18	-0
OXYC2	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0
DMP	-0.05	-0.01	-0	-0	-0.02	-0.01	-0.01	-0.01	-0.03	-0
MPB	-11	-6.11	-0	-0	-7.94	-8.57	-4.09	-2.42	-6.94	-0
MAMP	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0
BARB	-0	-1.42	-0	-0	-0	-0	-0.72	-0.67	-1.41	-0
BENZ1	-0.05	-0.02	-0	-0	-0.01	-0	-0	-0	-0.13	-0
BENZ2	-0.29	-0	-0	-0	-0.01	-0	-0	-0	-0	-0
MDONE	-0	-0.05	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0
OPIAT	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0
PCP	-0.01	-0.02	-0.43	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0
BZG	-10	-2.73	-0.76	-1.83	-0.99	-0.92	-4.59	-0.82	-0.79	-0.99
ZOL	-0.18	-0.02	-0.01	-0	-0.08	-0.01	-0.03	-0	-0.08	-0
TCA	-4.01	-1.12	-0	-0	-4.25	-0	-0	-0	-4.16	-0
THC	-7.89	-1.9	-11.3	-0	-1.44	-1.78	-1.39	-1.61	-1.89	-0
TRM	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0
AMPH	-8.25	-7.48	-6.06	-6.68	-10.3	-6.68	-5.98	-4.53	-7.18	-0
FENT	-0.12	-0.06	-0.09	-0	-0.08	-0.08	-0.03	-0.07	-0.1	-0
BUP	-0	-0.04	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0.04	-0
BENZ3	-0.32	-0.23	-0.22	-0.06	-0.28	-0.27	-0.05	-0.16	-0.18	-0
OPDS	-0.25	-0	-0	-0	-0.03	-0	-0.03	-0	-0.04	-0

Fuente: Laboratorio de Toxicología -INACIF-

Donde OXYC: oxicodona, DMP: Dextrometorfano, MPB: Meprobamato, MAMP: Metanfetamina, BARB: Barbitúrico, BENZ: Benzodicepinas, MDONE: Metadona, OPIAT: Opiáceos, PCP: Fenciclidina, BZG: Benzoilecgonina (metabolito activo de cocaína), ZOL: zolpidem, TCA: Antidepresivos tricíclicos, THC: Tetrahidrocannabinol (Metabolito activo de la marihuana), TRM: Tramadol, AMPH: Anfetamina, FENT: Fentanilo, BUP: Buprenorfina, OPDS: Opioides.

Tabla 3. Tiempo invertido durante el proceso de análisis de inmunoensayo por quimioluminiscencia .

Cantidad de muestras procesados	Apoyo de técnico de Laboratorio	Rango de tiempo invertido (en horas)
54 muestras	SI	3.00 a 3.30
54 muestras	No	4.30 a 4.50

Fuente: Laboratorio de Toxicología -INACIF-

Se debe tomar en cuenta la preparación de curvas, muestra y controles, además de la incubación en termoagitador. El tiempo que toma el equipo en realizar la detección de la imagen es de 2.40 minutos los cuales van incluidos en la tabla 3.

## DISCUSIÓN

Para la primera etapa se evaluaron las drogas más comunes que se detectan en el Laboratorio de Toxicología; se tomaron en cuenta las muestras que dieron positivo y que fueron confirmadas con anterioridad en los equipos GC/MS y UPLC-QToF. La detección de las drogas descritas en la tabla 1, se debe a que la señal lumínica generada en cada una de las zonas de análisis del biochip se realiza mediante tecnología de imagen digital. El método empleado permite detectar en muestras biológicas un punto de corte de: Oxiconona (OXYC) 10 ng/mL, opiáceo y opiodes (OPIAT y OPDS) 10 ng/mL, dextrometorfano (DMP) 5 ng/mL, meprobamato (MPB) 100 ng/mL, Anfetamina (AMPH) 20 ng/mL, Metanfetamina (MAMP) 20 ng/mL, barbituricos (BARB) 50 ng/mL, benzodiazepinas (BENZ 1, 2 y 3) 10 ng/mL, metadona (MDONE) 10 ng/mL, fenciclidina (PCP) 5 ng/mL, metabolito de cocaína (BZG) 50 ng/mL, zolpidem (ZOL) 10 ng/mL, antidepresivos tricíclicos (TCA) 60 ng/mL, Cannabionoides (THC metabolito de marihuana) 10 ng/mL, tramadol (TRM) 5 ng/mL, fentanilo (FENT) 1 ng/mL y buprenorfina (BUP) 1 ng/mL. Las muestras que se utilizaron en la tabla 1 tienen una concentración (valor dentro del paréntesis) que sobrepasa el punto de corte de la droga, mostrando así en la detección de imagen un resultado positivo para dicha droga, cumpliendo con lo esperado para el análisis.

Para la segunda etapa se evaluaron los controles negativos, la imagen detectada determinó una concentración, la cual se observa en la tabla 2; dicha concentración tiene un valor negativo, por lo que indica que está por debajo del punto de corte, dando como resultado negativo para toda la lista de drogas que detecta la técnica, cumpliendo así con lo esperado para dicho análisis.

En la tabla 3 se evaluó el tiempo invertido durante el análisis, en el cual se debe considerar que con el apoyo de un técnico el tiempo invertido disminuye aproximadamente en una hora, esto debido a que se requiere de organización, ingreso de información específica en el software y revisión en el protocolo del análisis por la cantidad de muestras que se analizan por cada bandeja portadora.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al personal del Laboratorio de Toxicología del INACIF por su labor diaria en apoyo al Sistema de Justicia; también, al Director del INACIF en la Administración 2017-2022, M.Sc. Fanuel García por promover la investigación científica en el INACIF.



## REFERENCIA

Bello, J., y López, A., (2001). Fundamentos de Ciencia Toxicológica. España. Díaz de Santos. Pp. 18

Congreso de la República de Guatemala. (1992). Decreto 48-1992, Ley contra la Narcoactividad. Diario de Centro América, Guatemala, 24 de septiembre de 1992.

Insertos de los reactivos, controles y calibradores aportados por la casa comercial RANDOX.

Randox Laboratories Ltd (2016). Instructivo RANDOX Drogas matriz DOA IWB P. Reino Unido

Randox Laboratories Ltd. (2016). Manual del operador Evidence Investigator, V03.0.1. Reino Unido

Randox Laboratories Ltd (2020). Validación RANDOX DOA ultra whole blood array (DOA ULTRA WB). Reino Unido

Randox Laboratories Ltd. (2022). Biochip Array Technology.  
Recuperado: <https://www.randox.com/multiplex-biochip-testing/>

Skoog, D., West, D., (2015). Fundamentos de Química Analítica. 9a Edición. Cengage Learning. Pp.770

Stashenko, E., & Martínez, J. R. (2012). GC-MS: herramienta fundamental para el análisis de drogas de uso ilícito. Scientia Chromatographica, 4(1), 21-33.

SWGTOX, (2013). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, Doc 003, revisión 1.

## FIGURAS

**Figura 1.** Bandeja portadora en proceso de colocación de muestra



Fuente: Laboratorio de Toxicología  
-INACIF- 2022

**Figura 2.** Bandeja portadora de biochips con muestra de sangre



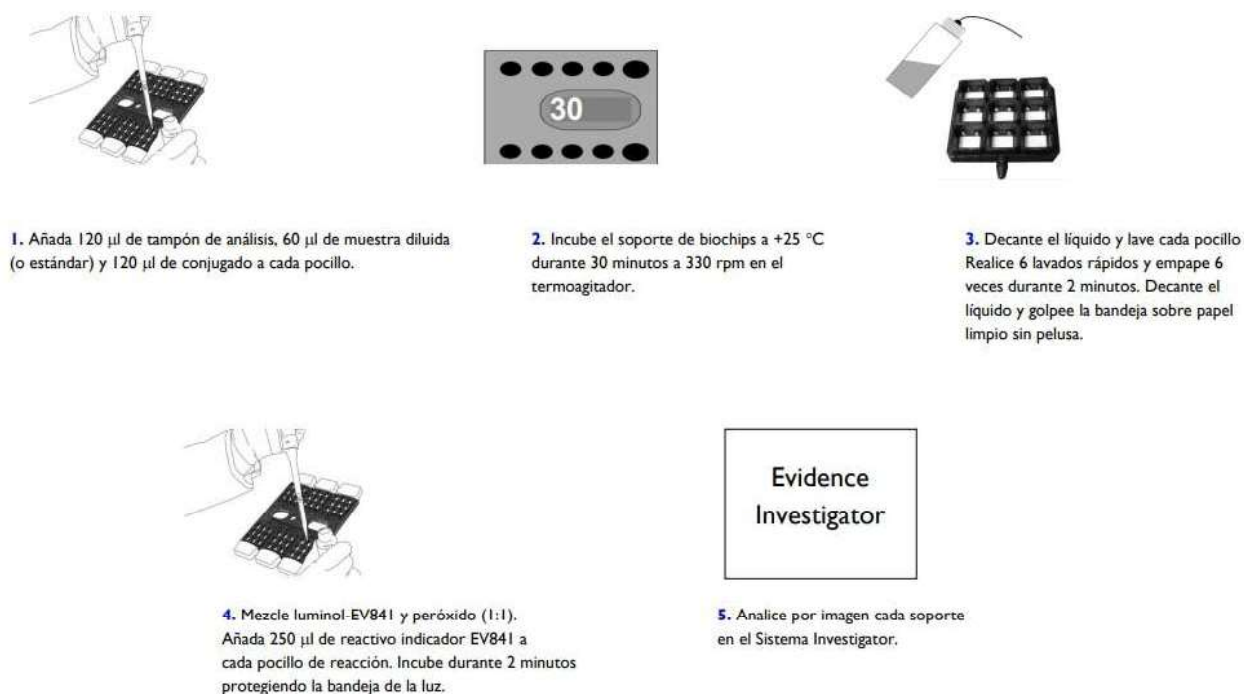
Fuente: Laboratorio de Toxicología  
-INACIF- 2022

**Figura 3.** Colocación de bandeja portadora en el equipo



Fuente: Laboratorio de Toxicología  
-INACIF- 2022

**Figura 4.** Protocolo de análisis de inmunoensayo por quimioluminiscencia en muestras de sangre



Fuente: Randox, (2016)

**Figura 5.** Lectura de la detección de imagen en el equipo Randox Evidence Investigator TM

Sample Code	DF	BENZ1	BENZ2	MDONE	OPIAT	PCP	BZG
✓ TESMX01ND	4	-0.05(<75)	-0.29(<75)	-(0)	-(0)	-0.01(<20)	-10(<50)
✓ TESMX02ND	4	-0.02(<75)	-(0)	-0.05(<40)	-(0)	-0.02(<20)	-2.73(<50)
✓ TESMX03ND	4	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-0.43(<20)	-0.76(<50)
✓ TESMX04ND	4	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-1.83(<50)
✓ TESMX05ND	4	-0.01(<75)	-0.01(<75)	-(0)	-(0)	-(0)	-0.99(<50)
✓ TESMX06ND	4	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-0.92(<50)
✓ TESMX07ND	4	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-4.59(<50)
✓ TESMX08ND	4	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-0.82(<50)
✓ TESMX09ND	4	-0.13(<75)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-0.79(<50)
✓ TESKT121120	4	-1.21(<10)	-0.01(<10)	-0.34(<5)	-39.62(<100)	-1.08(<20)	-18.4(<50)

Fuente: Laboratorio de Toxicología -INACIF- 2022