

Estabilidad de metabolitos del cannabis y cocaína en orina conservada a -20 °C en laboratorio de Armada (San Fernando), durante un periodo de tiempo superior a 1 año

González Gómez C.¹, Arazo Guerrero O.², Álvarez García A.³, Martín Pacheco JF.⁴, Campello Márquez E.⁴

Sanidad mil. 2017; 73 (2): 97-99, ISSN: 1887-8571

RESUMEN

Antecedentes: El consumo de drogas constituye un problema en el medio militar, siendo el cannabis y la cocaína, las drogas ilegales con una mayor prevalencia de consumo. Los laboratorios situados en establecimientos farmacéuticos son los encargados de la realización del análisis preliminar de cribado de muestras, como lo marca la Instrucción Técnica 1/2012 de IGESAN, siendo confirmados los resultados positivos de éstos, en el Instituto de Toxicología de la Defensa. Las muestras cuyos resultados sean positivos a drogas de abuso se conservarán durante seis meses (excepto Orden Judicial o expediente disciplinario en curso) a -20 °C, por si se requiere repetir la determinación. Los metabolitos presentes en la orina pueden deteriorarse durante su almacenamiento y conservación, obteniendo resultados distintos si reanalizamos la muestra. Así, es importante para el laboratorio conocer la estabilidad de los metabolitos presentes en dichas muestras. **Objetivo:** Estudiar la estabilidad de los metabolitos del cannabis y cocaína en orina, después de haber sido conservadas a -20 °C durante más de un año. **Material y métodos:** 91 muestras de orina que resultaron positivas (65 a metabolitos del cannabis, 25 a metabolitos de cocaína y 1 a cannabis y cocaína), utilizando el analizador Cobas Integra 400 plus® (método semicuantitativo-cualitativo que usa una técnica inmunológica, con puntos de corte de 50 ng/ml para cannabis y 300 ng/ml para cocaína). Fueron conservadas en tubos de plástico a -20 °C durante más de un año. Tras descongelar y agitar suavemente para homogeneizarlas, se reanalizaron con el mismo analizador. **Resultados:** De los 66 muestras positivas a metabolitos de cannabis se produjo una disminución media respecto a los valores iniciales de -22,89% (rango +43,15 a -73,36). De las 26 muestras positivas a metabolitos de cocaína se produjo una disminución media respecto a los valores iniciales de -4,02% (rango de +7,03 a -49,01). **Conclusiones:** Observamos que los metabolitos del cannabis presentes en las orinas congeladas durante más de un año, disminuyen en mayor medida que los de la cocaína. Resultaron porcentajes similares a los obtenidos por otros autores en el caso de cannabis, aunque no así en caso de cocaína.

PALABRAS CLAVE: Cannabis, Cocaína, Orina, -20 °C.

Stability of cannabis metabolites and cocaine in urine preserved at -20°C in Armada (San Fernando) laboratory, over a period of time of more than 1 year

SUMMARY: **Antecedents:** Drugs consumption constitutes a problem in the military media, being cannabis and cocaine the illegal drugs with a highest prevalence of consumption. Laboratories situated in pharmaceutical establishments are responsible for carrying out the preliminary analysis of screening samples, as it's shown the I.T. 1/2012 of IGESAN, being confirmed the positive results of the sein the Toxicology Institute of Defense. Samples whose results are positives to abused drugs would be kept for six months at -20 °C, if required by repeating the test. Metabolites are present in urine could be deteriorated during storage and conservation, getting different results if we go over the sample. This is important for laboratories to know the stability of the metabolites present in the samples. **Objective:** to investigate cannabis and cocaine metabolite's stabilities in urine, after have been kept in -20 °C during more than a year. **Material and methods:** 91 urine samples turned out positives (65 to cannabis, 25 to cocaine and 1 to both), using the analyzer Cobas Integra 400 plus® (semiquantitative-qualitative method using a nimmunological technique, with cut off so 50 ng/ml for cannabis and 300 ng/ml for cocaine). They were stored in plastic tubes at -20 °C during more than a year. After to defrost and shaking soft lytohomogenize, they were reanalyze with the same analyzer. **Results:** for the 66 positive samples of cannabis metabolites it produced a mean decrease from initial values of -22.89% (range -73.36% to +43.15%). For the 26 positive samples of cocaine metabolites it produced a mean decrease from initial values of -4.02% (range -49.01% to +7.03%). **Conclusions:** we could notice that cannabis metabolites present in the more than a year frozen urines, decrease in a greater extent than those of cocaine. Cannabis percentages were similar to those obtained by other authors, although not in cocaine metabolites case.

KEYWORDS: Cannabis, Cocaine, Urine, -20 °C.

¹ Cte.Farmacéutico. Servicio Farmacéutico en San Fernando. Jefatura de Apoyo Sanitario de la Bahía de Cádiz. San Fernando, Cádiz. España.

² Técnico de Laboratorio. Servicio Farmacéutico en San Fernando. Jefatura de Apoyo Sanitario de la Bahía de Cádiz. San Fernando. Cádiz. España.

³ Auxiliar de Clínica. Servicio Farmacéutico en San Fernando. Jefatura de Apoyo Sanitario de la Bahía de Cádiz. San Fernando. Cádiz. España.

⁴ Licenciado en Química. Servicio Farmacéutico en San Fernando. Jefatura de Apoyo Sanitario de la Bahía de Cádiz. San Fernando. Cádiz. España.

Dirección para correspondencia: M.^a Carmen González Gómez. Jefatura de Apoyo Sanitario de la Bahía de Cádiz. Servicio Farmacéutico en San Fernando. Población Naval «San Carlos» (Edificio Clínica Militar 1.ª planta). 11100 San Fernando. Cádiz. España. Tfno: 956598890. Fax: 956598887.

Recibido: 2 de diciembre de 2016

Aceptado: 24 de febrero de 2017

doi: 10.4321/S1887-85712017000200004

INTRODUCCIÓN

El consumo de drogas constituye un grave problema a nivel mundial con importantes repercusiones en el ámbito de la salud. El medio militar no es ajeno a este problema, siendo de especial importancia porque sus cometidos están relacionados con actividades de riesgo.

Los laboratorios situados en establecimientos farmacéuticos son los encargados de la realización del análisis preliminar de cribado de muestras, como lo marca la Instrucción Técnica 1/2012 de la Inspección General de Sanidad (IGESAN). Siendo confirmados los resultados positivos de estos, en el Instituto de Toxicología de la Defensa (ITOXDEF). Las muestras cuyos resultados sean positivos a drogas de abuso se conservaran a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante seis meses (excepto Orden Judicial o expediente disciplinario en curso) por si se requiere repetir la determinación¹.

El cannabis y la cocaína son las drogas ilegales con una mayor prevalencia de consumo. Los metabolitos de cannabis y cocaína pueden ser detectados en orina tras su consumo, pero éstos pueden deteriorarse durante su almacenamiento y conservación, debido a numerosos factores como puede ser el pH de la orina, tipo de material del contenedor en el que se deposita la orina, temperatura, etc.²⁻⁵, obteniendo resultados distintos si reanalizamos la muestra.

Así, es importante para el laboratorio conocer la estabilidad de los metabolitos presentes en dichas muestras por si fuese necesario volver a analizarlas.

Estudiar la estabilidad de los metabolitos del cannabis y cocaína en orina, después de haber sido conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante más de un año.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el Servicio Farmacéutico de San Fernando encuadrado en Jefatura de Sanidad Bahía de Cádiz dependiente de Armada, se procesaron noventa y una muestras de orina procedentes de militares, que resultaron positivas a metabolitos de cannabis y cocaína (sesenta y cinco a metabolitos de cannabis, veinticinco a metabolitos de cocaína y una a cannabis y cocaína), utilizando el analizador Cobas Integra 400 plus[®] de Roche, previamente calibrado y utilizando controles positivos y negativos según instrucciones del fabricante antes de realizar el análisis de las orinas a estudiar, para la detección cualitativa-semicuantitativa de cannabinoides y el metabolito de la cocaína, benzoilecgonina. El analizador utiliza un método basado en la interacción cinética de micropartículas en solución (KIMS), medida a través de los cambios producidos en la transmisión de la luz (en una muestra exenta de drogas de abuso, las micropartículas fijadas a anticuer-

pos se unen a los conjugados solubles de la droga, induciendo la formación de agregados de partículas. Dado que la reacción de agregación continúa produciéndose en ausencia de droga en la muestra, la absorbancia aumenta. En una muestra que contiene la droga a determinar, esta compete con el derivado de la droga unido a partículas por los anticuerpos libres. Los anticuerpos unidos a drogas dejan de estar disponibles para inducir la agregación de partículas, inhibiéndose, la formación de retículos de partículas. La presencia de droga en la muestra disminuye la absorbancia). El contenido de droga de la muestra se determina en relación al valor obtenido para una concentración conocida de la droga.

Se utilizó como punto de corte 50 ng/ml para cannabinoides y 300 ng/ml para metabolitos de cocaína. Considerando un resultado preliminar positivo si el resultado obtenido era igual o superior al punto de corte y negativo si era inferior a este. Todos los resultados presuntamente positivos fueron enviados al Laboratorio de referencia (ITOXDEF), que al realizar la analítica por el método de Cromatografía de Gases / Espectroscopia de Masas fueron confirmados como positivos.

Las noventa y una muestras de orina que habían dado positivas, fueron conservadas congeladas en tubos de plástico a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de tiempo superior a doce meses (media 16 meses). Tras descongelar y agitar suavemente para homogeneizar, se reanalizaron con el mismo analizador Cobas Integra 400 plus[®].

Para el procesado de las muestras de orina fueron codificadas de forma numérica para preservar la privacidad de su origen, se ha mantenido en todo momento la anonimidad y privacidad del personal del cual provenían de acuerdo a la Ley Orgánica de Protección de Datos 15/1999.

RESULTADOS

Las concentraciones de los metabolitos de cannabis y cocaína en las muestras de orina antes (concentración inicial) y después de haber sido congeladas (concentración final) se muestran en la Tabla 1.

En la mayoría de las muestras (89,4% que presentaban cannabis y 77% para las de cocaína) se observó una disminución en la concentración tras el almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aunque en un menor porcentaje (9% de las muestras con cannabis y 23% de las de cocaína) se pudo observar un aumento en la concentración. En una muestra (1,5% que presentaba cannabis) no varió la concentración (Tabla 2).

Esta variabilidad ya ha sido descrita por algunos autores^{6,7}. En el estudio de Dugan y colaboradores afirman que no es posible predecir con un alto grado de fiabilidad, un aumento o disminución después de la congelación, en su trabajo las ori-

Tabla 1. Concentraciones iniciales y finales del metabolito.

Droga Metabolitos	N.º	Concentración Inicial (ng/ml)			Concentración Final (ng/ml)		
		Rango	Media	ds	Rango	Media	ds
Cannabis	66	908 (52-960)	192,65	185,87	797 (34-831)	152,33	161,36
Cocaína	26	9299 (311-9610)	1200,35	1840,05	4610 (290-4900)	1006,92	1043,95

ds: desviación estándar.

Tabla 2. Variaciones en la concentración de las muestras de orina congeladas durante más de un año.

Sustancia (número)	Incremento concentración	Disminución concentración	Sin variación
Metabolitos de Cannabis (66)	6	59	1
Metabolitos de Cocaína (26)	6	20	-

nas estudiadas para benzoilecgonina, 32 presentaron aumento del metabolito post-congelación respecto a 17 que disminuían y para metabolitos de cannabis las muestras que aumentaron su concentración tras el almacenamiento fueron de 17, disminuían 27 y 4 permanecieron invariables.

En nuestra serie de sesenta y seis muestras positivas a cannabis se produjo una disminución media respecto a los valores iniciales de -22,89% (rango +43,15% a -73,36%); (IC95%: -27,46 a -18,31).

De las veintiséis muestras positivas a metabolitos de cocaína se produjo una disminución media respecto a los valores iniciales de -4,02% (rango de +7,03 a -49,01), (IC95%: -8,12 a +0,07).

En aquellas muestras que disminuían su concentración post-congelación, en siete muestras de orina con metabolitos de cannabis el valor estaba por debajo del *cut-off* cuando volvió a medirse y en cincuenta y dos por encima. En el caso de las muestras con metabolitos de cocaína en dos muestras estaba por debajo del *cut-off* y dieciocho por encima de dicho punto de corte.

A las series de resultados obtenidos antes y después de su almacenamiento se aplicó la prueba de Wilcoxon, prueba no paramétrica, ya que los valores seguían una distribución asimétrica para lo que se usó el programa SPSS v.18, mostrándonos que existían diferencias significativas en la disminución tras la congelación, con una $p < 0,001$ para los metabolitos del cannabis y para el metabolito de cocaína $p = 0,016$.

DISCUSIÓN

El estudio presenta como limitación la alta incertidumbre que acompaña al método semicuantitativo empleado en las mediciones, pero al no disponer de otro método, es el que usamos para orientar de forma aproximada como varía la concentración. Se observó que los metabolitos del cannabis presentes en las orinas congeladas por más de un año, disminuían en mayor medida que los de la cocaína (-22,89% frente a -4,02%). El mayor porcentaje de pérdida para los derivados del cannabis frente al de cocaína podría explicarse por los procesos de adsorción de estos al material plástico, como ya ha sido observado con anterioridad en otros estudios como el de Asbjorg⁴. En dicho estudio, donde la muestra era sangre conteniendo metabolitos de cannabis y almacenada en envases de vidrio y de plástico, se observó que en estos últimos se perdió un tanto por ciento importante del metabolito

del cannabis, tetrahidrocannabinol, permaneciendo invariable en los viales de vidrio a igualdad de tiempo almacenado.

Para el caso del cannabis, si comparamos con otros autores^{6,7}, encontramos de forma parecida que aproximadamente un 40% de las muestras presentan una disminución en el rango de 0 a -25%. Siendo el rango más común de variación en nuestra serie el intervalo de -10% a -40% (43 de 66), lo que supone un 65,15% de las muestras (Tabla 3).

En el caso del metabolito de la cocaína, benzoilecgonina, el intervalo de -10% a +10%, es donde se concentra el cambio en la concentración en el mayor número de muestras (23 de 26), lo que su pone un 88% (Tabla 3). Este último resultado difiere de los presentados por otros autores como Dugan and Bogeman⁷, que señalan un porcentaje de aproximadamente 73% (36 de 49) con un cambio en la concentración en el intervalo de -25% a 25% (16 de -25% a 0% y 20 de +1 a +25%).

CONCLUSIONES

Se concluye, que en el supuesto de tener que repetir un análisis después de haber sido congelado un periodo de tiempo superior a un año, habría que considerar la posible pérdida de metabolitos en el cannabis, no siendo tan importante dicha pérdida para los metabolitos de la cocaína.

BIBLIOGRAFÍA

- Instrucción Técnica 1/12 de Inspección General de Sanidad, por la que se regula el funcionamiento de los laboratorios de análisis de drogas del Ministerio de Defensa.
- Levine B, Smith ML. Stability of Drugs of Abuse in Biological Specimens. *Forensic Sci Rev*.1990;(2):147-57.
- Goding Fraga S., Diaz-Flores Estevez JF., Diaz Romero C. Stability of Cannabinoids in Urine in Three Storage Temperatures. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 1998;28(3):160-162.
- Asbjorg Solberg C. Tetrahidrocannabinol Stability in Whole Blood: Plastic versus Glass Containers. *Journal of Analytical Toxicology*. 1986;10:129-131.
- Vasiliades J. Long-Term Stability of Ecgonine Methyl Ester in Urine. *Journal of Analytical Toxicology*. 1993;17:253
- Romberg RW., Past MR. Reanalysis of forensic urine specimens containing benzoilecgonine and THC-COOH. *J. Forensic. Sci*. 1994;39(2):479-485.
- Dugan S., Bogema S., Schwartz RW., Lappas NT. Stability of drugs of abuse in urine samples stored at -20 °C. *Journal of Analytical Toxicology*. 1994;18(7):391-396.

Tabla 3. Cambios en la concentración de los metabolitos de Drogas de abuso en orina tras la congelación a -20 °C.

Sustancia (metabolitos)	N.º	Variación media (%)	Distribución de los cambios en la concentración (%)								
			< -55	-55 a -40	-40 a -25	-25 a -10	-10 a 0	0,1 a 10	10 a 25	25 a 40	>40
Cannabis	66	-22,89	1	9	24	19	7	4	1	0	1
Cocaína	26	-4,02	0	1	0	2	17	6	0	0	0