

Originalarbeiten / Original Works

**Immunhistochemischer Arzneimittelnachweis
in Autopsiematerial***

M. Krämer und R. Poetzsch-Heffter

Abteilung Rechtsmedizin I (Allg. Gerichtl. Medizin) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Hospitalstraße 17–19, D-2300 Kiel, Bundesrepublik Deutschland

Immunohistochemical Identification of Drugs in Autopsy Material

Summary. Drugs (barbiturates) could be qualitatively identified in formalin-fixed and in paraffin-embedded autopsy material, as well as in fresh-frozen unfixed tissue by using the PAP method. Sensitivity could be considerably increased by application of an additional antibody. The practical use of this kind of determination is the possibility of retrospective examination if more suitable material is not available.

Key words: Identification of drugs, in autopsy material – Formalin-fixed autopsy material, identification of drugs

Zusammenfassung. An formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Autopsiematerial und an Kryostatschnitten wurden mittels PAP-Methode Arzneimittel (Barbiturate) qualitativ nachgewiesen. Die Sensitivität konnte durch einen zwischengeschalteten Antikörper erheblich verstärkt werden. Die praktische Bedeutung dieses Nachweises liegt in der Möglichkeit nachträglicher Untersuchungen, wenn geeigneteres Material nicht zur Verfügung steht.

Schlüsselwörter: Arzneimittelnachweis, in Autopsiematerial – Formalinfixiertes Autopsiematerial, Arzneimittelnachweis

Seit einigen Jahren werden Antikörper auch bei der Bestimmung von zahlreichen Drogen und Pharmaka in Körperflüssigkeiten, z. B. in Form des Enzymimmunoassay verwendet. Rubenstein, Schneider und Ullman publizierten 1972 als erste einen homogenen Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Morphin im Harn. Zahlreiche andere homogene Assays für Betäubungs-, Schlaf- und Beruhigungsmittel, Weckamine, kardioaktive Substanzen, Antibiotika, Antikonvulsiva, Zytostatika, Antidepressiva und Antiasthmatica wurden seitdem entwickelt.

Die von Sternberger et al. 1970 erstmals beschriebene Peroxydase-Antiperoxydase-Technik wurde erfolgreich zum Nachweis von intrazellulären Immunglobulinen (Burns et al. 1974), von intrazellulären Antigenen in menschlichen

* Herrn Prof. Dr. med. O. Grüner zum 65. Geburtstag gewidmet
Sonderdruckanfragen an: Dr. M. Krämer (Adresse siehe oben)

Leukozyten (Mason et al. 1975) und von Immunglobulinen an Membranen und im Zytoplasma menschlicher Leukozyten (Mason et al. 1977) verwendet; außerdem gelangte sie mit verschiedenen Abwandlungen auch beim Nachweis von Viren (Löhler 1982) und von Hepatitis-B-Antigenen (Huang 1975) zum Einsatz. Die außerordentlich hohe Sensitivität und Spezifität dieser Methode veranlaßte uns zu prüfen, ob Antikörper gegen Arzneimittel, die routinemäßig beim Emit-Test verwendet werden, auch bei der PAP-Technik zum Arzneimittelnachweis in Geweben geeignet sind.

Material und Methodik

Es wurde formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes sowie tiefgefrorenes Nierenmaterial von Sektionsfällen mit toxikologisch gesicherter Barbituratvergiftung (Allo-, Amo-, Apro-, Brallo-, Buta-, Pheno- und Secobarbital meist kombiniert) verwendet. Das eingebettete Gewebe wurde zunächst in Xylol entparaffiniert. Dann wurden in sämtlichen Schnitten die unspezifischen (endogenen) Peroxydasen mit 0,3%iger H_2O_2 -Lösung in Methanol (30 min) blockiert. Nach 10-minütiger Inkubation mit deaktiviertem Schweine-Normalserum (Verdünnung 1:5) erfolgte die Behandlung der Schnitte mit spezifischem Antiserum (Reagenz A-Emit-Dau/Barbiturat, Merck, Verdünnung 1:50, 30 min). Als Sekundär-Antikörper wurde ein peroxydasemarkiertes Anti-Schaf-Serum vom Kaninchen verwendet (Dakopatts, Verdünnung 1:100, 30 min); dann folgte die Inkubation mit Diamino-Benzidin-Lösung (pH 7,6, 10 min). Für die Gegenfärbung verwendeten wir saures Hämalaun (5 min), die Schnitte wurden in Eukitt eingedeckt. Zwischen den einzelnen Schritten lag jeweils ein Waschvorgang mit PBS-Puffer (pH 7,4).

Zur Steigerung der Sensitivität wurde ein Teil der Schnitte zusätzlich mit einem Anti-Kaninchen-Serum von der Ziege als Tertiär-Antikörper (Behring, Verdünnung 1:50, 30 min) und anschließender Kopplung an PAP-Komplex (Dakopatts, 1:100, 20 min) behandelt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Abb. 1 und 2 zeigen im Vergleich zu der Negativkontrolle Abb. 3, daß Barbiturate in den Gewebsschnitten trotz Fixierung und Paraffineinbettung nachweisbar sind. Ähnliche Resultate ergeben sich auch bei Verwendung von Kryostatschnitten. Wir haben beobachtet, daß der im Vergleich zur üblichen Methode zusätzlich eingefügte Inkubationsschritt mit Anti-Kaninchen-Immunglobulin und PAP vom Kaninchen die Empfindlichkeit der Methode erheblich verstärkt. Damit gelingt der Nachweis von Butabarbital bei einer Serumkonzentration im oberen therapeutischen Bereich von 14 mg/l sowie bei toxischen bzw. letalen Serumkonzentrationen der anderen aufgeführten Barbiturate (bei Phenobarbital: 88 mg/l). Hinsichtlich der Spezifität dürfte aufgrund der Anwendung gleicher Antikörper ein Vergleich zum homogenen Enzymimmunoassay (Emit) von Merck u. E. möglich sein, so daß bei positiver Reaktion ein wesentlicher Hinweis auf das Vorhandensein von Barbituraten gegeben ist. Störmöglichkeiten liegen hierbei in erster Linie in Kreuzreaktionen der Antikörper mit Metaboliten anderer Arzneimittel oder gewebeeigenen Antigenen. Bekannt sind falsch positive Reaktionen mit nicht strukturverwandten Verbindungen wie z. B. Metaqualon, Acetylsalicylsäure oder Diazepam in höheren Konzentrationen. Hierbei könnten auch Kreuzreaktionen mit sekundären und tertiären Antikörpern eine Rolle spielen. Um zuverlässige Aussagen machen zu können, sind Kontrollen ohne Substrat bzw. Antikörper unumgäng-

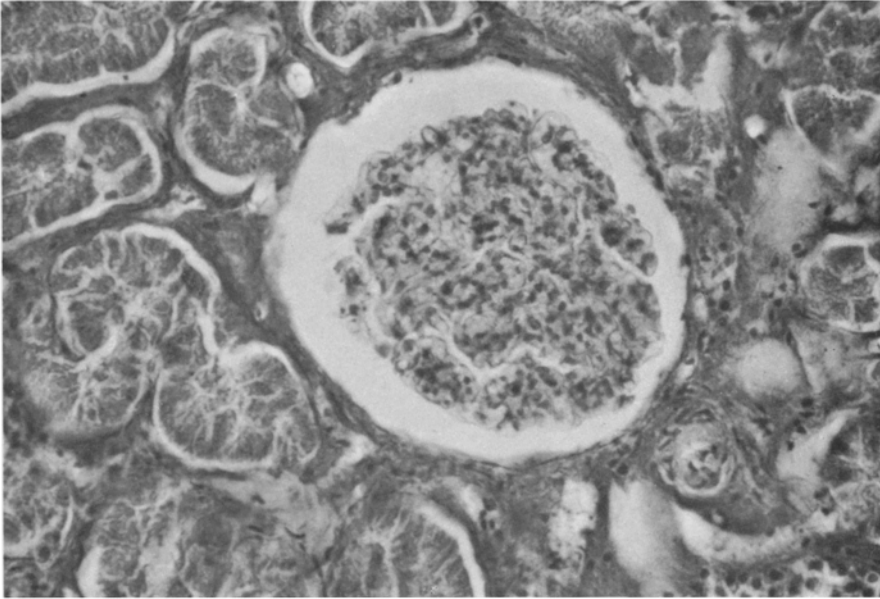


Abb.1. Nierenrinde. Positiver Nachweis von Barbiturat im Interstitium

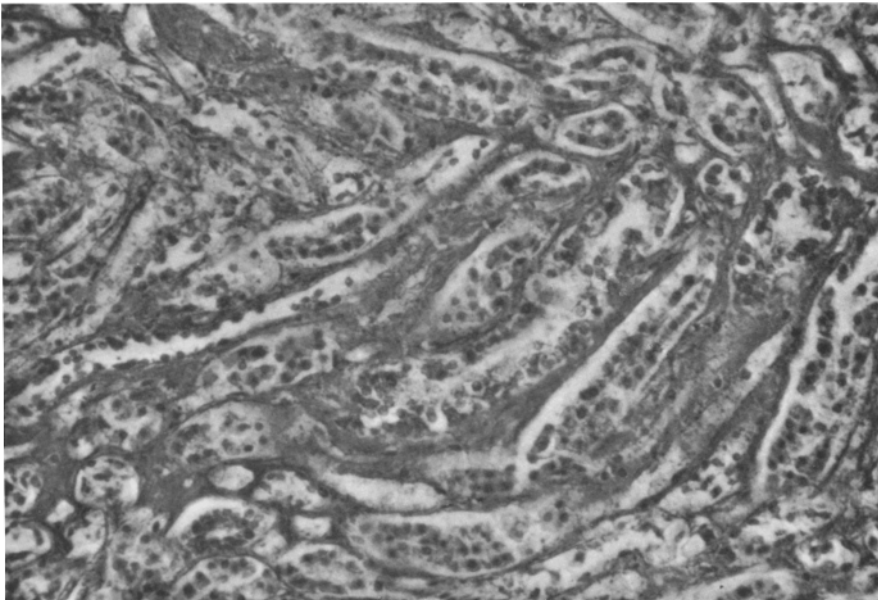


Abb.2. Nierenmark. Positiver Nachweis von Barbiturat im Interstitium und Tubulusepithel

lich. Unsere Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß ein qualitativer Nachweis eines Arzneimittels auch mittels PAP-Technik sowohl in Frischgeweben, wie auch in Paraffin eingebetteten Geweben mit den entsprechenden Einschränkungen hinsichtlich der Spezifität möglich ist, wenn ein geeignetes Antiserum

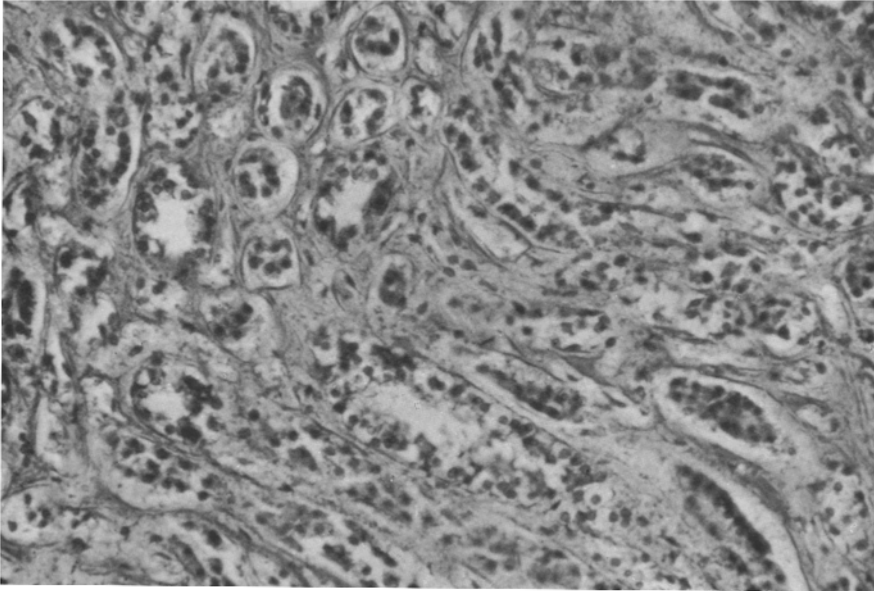


Abb.3. Nierenmark. Negativkontrolle/Barbiturat

zur Verfügung steht. Diese Möglichkeit des Nachweises von Arzneimitteln kann Bedeutung erlangen, wenn für toxikologische Untersuchungen notwendiges Material nicht mehr vorhanden ist, es sollte jedoch möglichst für die forensische Bewertung eine Bestätigungsanalyse vorgenommen werden.

Literatur

- Burns J, Hambridge M, Taylor CR (1974) Intracellular immunoglobulins. A comparative study on three standard tissue processing methods using horseradish peroxidase and fluorochrome conjugate. *J Clin Pathol* 27: 548–557
- Huang S-N (1975) Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Lab Invest* 33: 88–95
- Löhler J (1982) Virusinfektionen des Zentralnervensystems. Nachweis viraler Antigene in paraffin-eingebettetem Autopsiematerial mit Hilfe der PAP-Technik (Sternberger). *Acta Histochem Suppl XXV*: 107–111
- Mason DY, Farrell C, Taylor CR (1975) The detection of intracellular antigens in human leucocytes by immunoperoxidase staining. *Br J Haematol* 31: 361–370
- Mason DY, Labaume S, Preud'homme JL (1977) The detection of membrane and cytoplasmic immunoglobulins in human leucocytes by immunoperoxidase staining. *Clin Exp Immunol* 29: 413–421
- Rubenstein KE, Schneider RS, Ullman EF (1972) "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. *Biochem Biophys Res Commun* 47: 846–851
- Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG (1970) The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18: 315–333

Eingegangen am 5. März 1984