

Boric acid causing false-negative ethyl glucuronide immunoassay screenings is not detected by common sample checks – Indication for revised sample checking or enhanced visual control of urine voiding?

Reinhild Beyreiß, Stefanie Schröfel, Karsten Stemmerich, Torsten Arndt

Bioscientia Institut für Medizinische Diagnostik GmbH,
Konrad-Adenauer-Straße 17, D-55218 Ingelheim, Germany; torsten.arndt@bioscientia.de

Aims: Boric acid is a bulk chemical that can be introduced into urine by (household-)chemicals, food, pharmaceuticals, homeopathics, boric acid containing urine containers originally intended for microbiological investigations, and by manipulative urine spiking. Boric acid is known to cause false-negative results for the DRI EIA Ethyl Glucuronide (EtG) assay. We have been interested whether common urine manipulation checks detect unphysiological boric acid (borate) urine contents. **Methods:** Ten native spot urine samples were transferred to Urin-Monovette 10 mL Borsäure tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and analysed by DRI EIA Ethyl Glucuronide and CEDIA Sample Check assays (both by ThermoFisher Scientific Microgenics, Passau, Germany) with an AU680 analyzer (Beckman-Coulter, Krefeld, Germany), urine manipulation test stick UrineCheck 7 (nal von minden, Moers, Germany) and urine manipulation test stick Urin Verfälschungstest (Diagnostik Nord, Schwerin, Germany). Confirmatory EtG analysis was done by a DIN17025-accredited LC-MS/MS on a QTRAP 5500 (Sciex, Darmstadt, Germany). **Results and Discussion:** Two out of the 10 urine samples were tested false-negative for EtG with the immunoassay (<0.1 vs. 2.0 mg/L and <0.1 vs. 4.4 mg/L, EIA vs. LC-MS/MS, cut-off 0.1 mg/L each) and 6 were tested positive but with lower EtG results compared to LC-MS/MS. Immunoassay EtG values ranged from <0.1 to 1200 mg/L, LC-MS/MS values from <0.1 to 2000 mg/L, being approx. up to 400-fold higher for a specific urine (0.8 vs. 350 mg/L). Three test stick results indicated increased urine density. Out of these, 2 showed an elevated creatinine by the Jaffe method, proofing a high concentration of the urines. Only 1 urine was tested abnormal by the Sample Check Assay and a different one by the oxidants test field of the Urin Verfälschungstest (4 identical readings by 4 toxicologists). **Conclusion:** High concentrations of boric acid, interfering with the DRI EIA EtG assay and causing false-low or false-negative EtG screening results, are not detected by common urine manipulation checks. Revised sample checking or use of mass spectrometric EtG analysis methods seem to be indicated and visual control of urine voiding is surely a prerequisite for preventing manipulative boric acid urine spiking.

1. Einleitung

Borsäure (H_3BO_3 , Molmasse 61,83 g/mol) ist eine schwache anorganische Säure, deren Weltjahresproduktion bei über 2.000.000 Tonnen liegt [1]. Sie ist ein Zwischenprodukt zur Herstellung z. B. von Borosilikatglas, Porzellan und Emaille, wird in Spül- und Desinfektionsmitteln, Insektiziden und Fungiziden eingesetzt [1,2] und ist in Deutschland bei Pharmaka obsolet, aber für homöopathische Präparate erlaubt, wenn deren Borgehalt die Grenzwerte für Trinkwasser nicht überschreitet [3]. Borsäure ist als Konservierungsmittel E 284 für Lebensmittel zugelassen, allerdings beschränkt auf eine Verwendung bei Kaviar [4]. Borsäure wird zu 85-100 % über den Urin ausgeschieden. Mittlere physiologische Urinkonzentrationen (berechnet als Borat) waren studienabhängig 2,2 bzw. 3,9 mg/L [2].

Borsäure soll durch Komplexierung von für Bakterien wichtigen Vitaminen desinfizierend wirken [5]. Dies wird bei Verwendung borsäurehaltiger Urinröhrchen zur Stabilisierung von Urinproben für mikrobiologische Analysen genutzt [6]. Allerdings wird in einer aktuellen S3-Leitlinie vor falsch-negativen Leukozytennachweisen durch eine gestörte Leukozytenesterase-Reaktion und vor Fehlbefunden bei Urinkulturen gewarnt [7].

Die Verwendung von Borsäure-Röhrchen kann auch zur Stabilisierung von Urinproben für die Analytik von Ethylglucuronid (EtG) beitragen [8]. Allerdings können der immunologische Nachweis von EtG durch Borsäure beeinträchtigt und falsch-niedrige oder falsch-negative Werte gemessen werden [9]. Durch diesen Effekt wird aus unserer Sicht Borsäure als ein Manipulationsmittel, z. B. bei Abstinenzkontrollen, interessant.

Ziel der Arbeit war, zu prüfen, ob weit verbreitete Urin-Verfälschungstests eine unphysiologische Borsäurekonzentration in der Urinprobe erkennen und damit falsch-niedrige oder falsch-negative immunologische EtG-Befunde vermeiden können.

2. Material und Methoden

Es wurden 10 native Spontanurinproben in Borsäure-Urinröhrchen (Urin-Monovette 10 mL Borsäure, Präparierungskonzentration 15 mg Borsäure/mL; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Die Analysen für Ethylglucuronid (DRI EIA, Cut-off: 0,1 mg/L, analytischer Messbereich (AMR): 0,1-2,0 mg/L) und Kreatinin (DRI, Jaffe, kinetisch) sowie der Sample Check Assay (CEDIA), alle von ThermoFisher Scientific Microgenics (Passau, Deutschland), wurden mit einem AU680 (Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland) durchgeführt. Die EtG-Bestätigungsanalyse erfolgte mit einer nach den GTFCh-Richtlinien [10] validierten und DIN17025-akkreditierten LC-MS/MS-Methode (Cut-off: 0,1 mg/L, AMR: 0,05-10,0 mg/L) unter Verwendung einer QTRAP 5500 (Sciex, Darmstadt, Deutschland).

Die Urinteststreifen UrineCheck 7 (nal von minden, Moers, Deutschland; Testfelder Kreatinin, Nitrit, Glutaraldehyd, pH, Spezifische Dichte, Oxidantien, Pyridinium Chlorochromat) und Urin Verfälschungstest (Diagnostik Nord, Schwerin, Deutschland; Testfelder Kreatinin, Nitrit, Glutaraldehyd, pH, Spezifische Dichte, Oxidantien/Pyridinium Chlorochromat) wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet und von 4 Toxikologen unabhängig voneinander beurteilt. Tabelle 1 zeigt jeweils die Mehrheitsergebnisse dieser Auswertungen.

3. Ergebnisse

Die Urinprobe 10 (Tab. 1) war im Sample Check auffällig. Urin 8 wurde mit dem Teststreifen Urin Verfälschungstest positiv auf Oxidantien getestet. Für diese 2 Urine und Urinprobe 7 zeigte der Teststreifen UrineCheck 7 eine erhöhte spezifische Dichte an (Tab. 1).

Tabelle 1 fasst die Analysenergebnisse zusammen. Die Messwerte für EtG sind in der LC-MS/MS-Bestätigungsanalyse bis zu einem Faktor von ca. 400 höher als beim immunologischen Verfahren (Tab. 1: Probe 9). Für zwei Urine (Proben 8 und 10) ist der Unterschied zwischen dem immunologischen Messwert und dem Messwert der LC-MS/MS-Analyse mit einem Faktor von 1,2 bzw. 1,7 relativ gering (280 mg/L vs. 330 mg/L bzw. 1200 mg/L vs. 2000 mg/L; EIA vs. LC-MS/MS). Diese EtG-Ergebnisse wurden allerdings für beide Urine nach Urinverdünnung erhoben, da der für den Immunoassay vom Hersteller vorgegebene und der für die LC-MS/MS von uns festgelegte analytische Messbereich bei Analyse der unverdünnten Urine jeweils überschritten wurde. Durch diese Verdünnung wird vermutlich der störende Einfluss der Borsäure auf den immunologischen Test reduziert, was zu einer Annäherung an den durch Borsäure unbeeinflussten LC-MS/MS-Messwert führen sollte.

4. Diskussion

Die Befundlage lässt keinen Zusammenhang zwischen der Gegenwart hoher Borsäuregehalte in den 10 Urinproben und dem Ausgang der Manipulationstests erkennen.

Für 2 der 3 bzgl. spezifischer Dichte abnormal getesteten Urine wurde nasschemisch eine signifikant erhöhte Kreatininkonzentration bestimmt (Tab. 1: Proben 7 und 10). Diese gilt als Maß für die Urinkonzentration [11], wobei hohe Kreatininkonzentrationen einen hochkonzentrierten (medizinische Umgangssprache „hochgestellten“) Urin mit entsprechend hoher spezifischer Dichte anzeigen. Zumindest 2 der 3 positiven Testergebnisse zur spezifischen Dichte finden damit ein unabhängiges labordiagnostisches Korrelat.

Die Störung des immunologischen EtG-Tests durch Borsäure ist für den Ausgang der toxikologischen Untersuchung von 2 der 10 Proben besonders kritisch (Tab. 1: Proben 3 und 4). Für diese beiden Proben wurden, bei negativen immunologischen EtG-Screeningergebnissen, deutlich über dem Cut-off von 0,1 mg/L liegende EtG-Konzentrationen mit LC-MS/MS gefunden. Sie lagen bei 2,0 bzw. 4,4 mg/L (Tab. 1). Da ein negatives Screening nach allgemein akzeptierter Vorgehensweise einen Analysengang beendet und nicht durch LC-MS/MS geprüft wird und da keines der Manipulations-Testsysteme die Proben 3 und 4 als auffällig erkannte (Tab. 1), wären hier 2 falsch-negative EtG-Befunde zu verzeichnen gewesen.

Anders verhält sich die Situation für die Proben 5-10, für die das immunologische Screening positiv ausfällt. Hier werden im Vergleich zur LC-MS/MS-Analyse deutlich niedrigere Ergebnisse erhalten, die aber noch immer über dem Cut-off von 0,1 mg/L liegen und damit, als positiv bewertet, eine LC-MS/MS-Analyse nach sich gezogen hätten (Tab. 1).

Tab. 1. Ethylglucuronid- und Manipulationstest-Ergebnisse für 10 Urinproben in Sarstedt Urin-Monovette-10 mL Borsäure-Röhrchen. Cut-off EtG-EIA und EtG-LC-MS/MS jeweils 0,1 mg/L. Akzeptanzbereich Sample Check 85-105 % [12], Referenzbereich Kreatinin Frauen 260-2170 mg/L, Männer 390-2590 mg/L [11,13].

Probe	EtG EIA [mg/L]	EtG LC-MS/MS [mg/L]	Kreatinin Jaffe, kinetisch [mg/L]	Sample Check nasschemisch [%]	Verfälschungstest Teststreifen normal/ abnormal	UrineCheck 7 Teststreifen normal/ abnormal
1	<0,1	<0,1	1143	92	normal	normal
2	<0,1	<0,1	508	94	normal	normal
3	<0,1	2,0	1547	89	normal	normal
4	<0,1	4,4	1167	94	normal	normal
5	1,2	14	870	93	normal	normal
6	2,0	38	413	95	normal	normal
7	1,8	81	2909	90	normal	abnormal (spez. Dichte)
8	280	330	1316	85	abnormal (Oxidantien)	abnormal (spez. Dichte)
9	0,8	350	1323	92	normal	normal
10	1200	2000	5028	80	normal	abnormal (spez. Dichte)

Borsäure kann durch orale Aufnahme, Resorption über die Schleimhäute und transdermal bei geschädigter Haut in den menschlichen Körper gelangen [1,2]. Unter physiologischen Bedingungen und „normaler“ Umweltbelastung liegt die Ausscheidung im Urin im unteren einstelligen mg/L-Bereich [2]. Für diese Konzentrationen wurde nach unserer Kenntnis bisher nicht über Störungen enzymatischer Bestimmungen, z. B. im immunologischen EtG-Screening, berichtet. Diesbezüglich sollten eher unphysiologisch hohe Borsäurekonzentrationen kritisch

sein, wie sie z. B. infolge einer vom Probennehmer irrtümlichen und vom Labor nicht erkannten Verwendung von Borsäure-Röhrchen (ca. 15 g Borsäure/L bei der von uns getesteten Urin-Monovette 10 mL Borsäure) oder nach manipulativer Zugabe von Borsäure oder Boraten zum Urin auftreten. Während Borsäure-Röhrchen prinzipiell an ihrem Aufdruck und/oder der von normalen Urinröhrchen verschiedenen Deckelfarbe zu erkennen sein sollten, ist dies für eine Zugabe von Borsäure zum Urin weder visuell anhand von Probenröhrchen und Probenbeschaffenheit noch mit den hier untersuchten Manipulationstests möglich.

Lösungsansätze für dieses (prä)analytische Problem wären a) die konsequente Anwendung massenspektrometrischer Analyseverfahren oder, wenn dieses aus wirtschaftlichen und/oder organisatorischen Gründen nicht möglich ist, b) eine konsequente Sichtkontrolle bei der Urinabgabe, wie sie z. B. in [13] gefordert ist. Alternativ wäre c) ein modifiziertes Sample Check Prozedere mit einem Borsäuretest anzustreben. Borsäure kann z. B. durch eine Farbreaktion mit Curcumin nachgewiesen werden [2,14]. Ob diese Reaktion, auf der auch ein kommerziell verfügbarer Borsäure-Teststreifen basiert, für die Matrix Urin geeignet ist, wird derzeit geprüft.

Anmerkung: Im Rahmen der hier vorgestellten Studie wurde zudem getestet, ob Borsäure auf immunologische Drogenscreenings einen störenden Effekt zeigt. Für Amphetamine, Opiate, Kokain, Cannabis, EDDP und Benzodiazepine wurde dies mit dem CEDIA-Verfahren nicht beobachtet, gleiches gilt für den Kreatinin DRI-Test.

5. Schlussfolgerung

Hohe Borsäurekonzentrationen im Urin stören den DRI EIA EtG Assay und führen zu falsch-niedrigen oder falsch-negativen EtG-Screening-Ergebnissen. Sie werden durch gebräuchliche Urin-Manipulationstests nicht erkannt, bei Borsäurezugabe zur Urinverfälschung auch nicht durch die optische Prüfung von Probenröhrchen und Probenbeschaffenheit. Diesem Problem könnte durch modifizierte Manipulationstests oder konsequente Anwendung massenspektrometrischer EtG-Analysenverfahren entsprochen werden. Die visuell kontrollierte Urinabgabe bleibt derzeit ein unverzichtbares Element zur Vermeidung falsch-negativer immunologischer EtG-Befunde, z. B. durch Borsäurezugabe zum Urin.

6. Referenzen

- [1] BMG Engineering AG: Studie zum Umgang mit Bor bei der Altlastenbeurteilung vom 22.01.2013 im Auftrag des Kantons Aargau, Schweiz; verfügbar unter https://www.ag.ch/media/kanton_aargau/bvu/dokumente_2/umwelt_natur_landschaft/bauen_umwelt_1/bauen_auf_altlasten_un_d_belasteten_standorten_1/Studie_zum_Umgang_mit_Bor_bei_der_Altlastenbeurteilung.pdf; abgerufen am 13.07.2017.
- [2] Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 10th ed., Seal Beach, California, 2014, pages 255-257.
- [3] Blaschek W, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U, Keller K, Reichling J, Schulz V (Hrsg.) Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen, Band 3 Bev-Ced. 6. Aufl., Wiss Verlagsges Stuttgart, Springer Heidelberg, 2007, Seiten 139-141.
- [4] Zusatzstoff-Zulassungsverordnung vom 29. Januar 1998 (BGBl. I S. 230, 231), die zuletzt durch Artikel 3 der Verordnung vom 21. Mai 2012 (BGBl. I S. 1201) geändert worden ist.
- [5] Hollemann AF, Wiberg E. Lehrbuch der Anorganischen Chemie. 101. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1995, Seite 1036.
- [6] Meers PD, Chow CK. Bacteriostatic and bacteriocidal actions of boric acid against bacteria and fungi commonly found in urine. J Clin Pathol 1990;43:484-487.
- [7] Interdisziplinäre S3-Leitlinie Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten. Aktualisierung 2017. AWMF-Register-Nr. 043/044, Version 1.1-2, Aktualisierung 4/2017.
- [8] Thierauf A, Serr A, Halter C, Al-Ahmad A, Rana S, Weinmann W. Influence of preservatives on the stability of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine. Forensic Sci Int 2008;182:41-45.
- [9] Gnann H, Wurst F, Thon N, Haschke E, Halter C, Weinmann W. Auswirkung von Konservierungsmitteln bei der Ethylglucuronidbestimmung von Urinproben mittels Immunoassay (DRI) und LC-MS/MS. Toxichem Krimtech 2008;76:110 (Abstract).
- [10] Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen mit Anhängen A und B. Toxichem Krimtech 2009;76:142-208.
- [11] Gressner AM, Arndt T (Hrsg.). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Kreatinin. 2. Aufl., Springer, Heidelberg, Seiten 813-814.
- [12] Herstellerangabe, Packungsbeilage10001636-5_DE(2012 07).
- [13] Schuber W, Dittmann V, Brenner-Hartmann J (Hrsg.). Urteilsbildung in der Fahreignungsbegutachtung. Beurteilungskriterien. 3. Aufl., Kirschbaum Verlag, Bonn, Seite 251.
- [14] Kliegel W. Bor in Biologie Medizin und Pharmazie Physiologische Wirkungen und Anwendung von Borverbindungen, Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, 1980, Seite 429.