

# NicAlert™

**DEN NicAlert™ STREIFEN NIEMALS IN DEN MUND NEHMEN**

## **VORGESEHENE ANWENDUNG**

NicAlert™ ist für die Feststellung des Raucherstatus oder anderer Formen des Konsums von Tabakprodukten bestimmt. Zu den Beispielen der Anwendung gehören die Feststellung, ob ein Teenager oder Sportstudent raucht, ob ein Antragsteller für eine Versicherung die Vorbedingungen für eine Nichtraucher-Prämie erfüllt und ob ein Teilnehmer an einer Raucherentwöhnungsstudie das Rauchen erfolgreich aufgegeben hat. NicAlert™ ist nicht zur medizinischen Diagnostik oder für therapeutische Zwecke vorgesehen.

## **HINTERGRUND**

Kenntnis und Bewusstsein der mit dem Kontakt mit Tabakprodukten, insbesondere mit dem Zigarettenrauchen, einhergehenden Risiken sind Allgemeingut und publiziert. Tatsächlich ist das Zigarettenrauchen als eine der signifikantesten Ursachen von Tod und Krankheit in den USA identifiziert worden. (Surgeon General's Report of the U.S. Public Health Service – Bericht des Generalstabsarztes des Öffentlichen Gesundheitswesens der USA – für das Jahr 2000). Das Rauchen ist als Ursache von 87% der Todesfälle durch Lungenkrebs, 21% der Todesfälle durch koronare Herzkrankheiten, 18% der Todesfälle durch Schlaganfälle und 82% der Todesfälle wegen chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung genannt worden (1, 2). Signifikant erhöhte Risiken von Erkrankung und Tod gehen auch mit anderen Formen des Tabakkonsums einher, wie das Pfeifen- und Zigarrenrauchen und der Genuss von Kautabak (3, 4).

Zusätzlich zur Berichterstattung über die eigenen Rauchgewohnheiten ist die Prüfung durch biochemische Marker eine praktisch durchführbare und zunehmend eingesetzte Methode. Früher sind die Kontrolle von Kohlenstoffmonoxid (CO) und für Nikotinmetaboliten spezifische Untersuchungen eingesetzt worden. Die im Körper vorgefundenen natürlichen CO-Spiegel sind relativ niedrig und steigen bei der Inhalation von Tabakrauch beträchtlich an. Der Nikotingehalt im Urin ist kein zuverlässiger Indikator des Raucherstatus, denn das Nikotin hat eine kurze Halbwertszeit und wird rasch in das Kreislaufsystem metabolisiert. Unter den Hauptmetaboliten ist Kotinin ein passender Kandidat als Marker, denn es besitzt eine relativ lange Halbwertszeit von 10 – 40 Stunden und hat sich als sensibler und spezifischer als das CO-Monitoring zur Messung des Raucherstatus erwiesen (5). Die für die Kotinin-Messung eingesetzte Referenzmethode ist die Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS).

## **TESTPRINZIP**

NicAlert™ ist ein Immunoassay, das mit monoklonalen Antikörpern beschichtete Goldpartikel und eine Reihe von Aviditäts-“Fallen” verwendet, die eine Quantifizierung erlauben.

Monoklonale Antikörper gegen Kotinin werden auf Goldpartikel aufgetragen, die auf der Kompresse zum Auftragen der Probe lagern. Das gesamte in der Probe enthaltene Kotinin bindet an den Antikörper auf dem Goldpartikel. Wenn das Kotinin an den Partikel bindet, besetzt es eine Bindungsstelle. Die Intensität der Fähigkeit eines Partikels, an eine Falle zu binden, ist eine Funktion der Anzahl nicht besetzter Bindungsstellen; je mehr Bindungsstellen verfügbar sind, desto grösser ist die Bindungsfähigkeit. Somit vermindert jedes gebundene Kotinin die Bindungsfähigkeit des Partikels, und man kann einen sehr schwachen Bindungspartner in der Falle einsetzen, um Partikel ohne gebundenes Kotinin einzufangen. Nachfolgende Fallen zunehmender Avidität auf die Partikel können diejenigen Partikel einfangen, die noch nicht in der Falle eins gebunden sind. Die Anzahl besetzter Bindungsstellen ist eine Funktion der Kotininmenge, und daher steht die vom Gold zurückgelegte Strecke in einer direkten Beziehung zur Kotininmenge in der Probe.

## **GELIEFERTE TEILE**

Jedes NicAlert™ Streifen Test Kit enthält individuelle Folienbeutel geschweisste NicAlert™ - Streifen. Der Streifen kann sowohl mit Speichel als auch mit Urin benutzt werden. Wenn Sie Speichel testen wollen, müssen Sie das Set zur Speichelentnahme verwenden.

**NicAlert™ Saliva Collection Kits.** Jedes Speichelentnahme-Set enthält:

- Trichter zur Speichelabgabe
- 2 ml Röhrchen zum Auffangen der Speichelprobe
- Schnappverschlüsse für Speichelproben-Röhrchen

*Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Teile:* Handschuhe oder eine Pinzette für die Handhabung des Streifens nach der Benutzung.

WAHLWEISE: Supermint®, tictac®, oder anderer weisser Pfefferminz zur Stimulierung des Speichelflusses.

## **WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

### **\*KEINEN TEIL DES NicAlert™ IN DEN MUND STECKEN ODER SCHLUCKEN.**

- Die Aufnahme und Verarbeitung von Speisen und Getränken in der Nähe des NicAlert™ oder während der Durchführung des Tests ist NICHT empfohlen.
- Die Proben sollten bei Raumtemperatur getestet werden.
- Die Verfälschung der Proben kann zu einem fehlerhaften Ergebnis führen. Besteht der Verdacht einer Verfälschung, entnehmen Sie eine weitere Probe und wiederholen Sie den Test.
- Verwenden Sie den NicAlert™ innerhalb von 10 Minuten nach Öffnen des Folienbeutels.
- Hat der Klient einen trockenen Mund, können Sie seinen Speichelfluss mit Hilfe von Supermint® oder tictac® oder einem anderen weissen Pfefferminz stimulieren. Das Pfefferminz kann zusammen mit dem Speichel in das Röhrchen gespuckt werden, anschliessend muss der Test sofort durchgeführt werden.

## **LAGERUNG**

Die NicAlert™ Teststreifen sollen bei Raumtemperatur, vor direktem Sonnenlicht geschützt, in den versiegelten Folienbeuteln gelagert werden. Die Streifen können bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwendet werden. Ist der Folienbeutel geöffnet, muss der Streifen innerhalb von 10 Minuten verwendet werden.

## **PROBEENTNAHME**

Der **Speichel** sollte innerhalb 4 Stunden nach der Probeentnahme getestet werden. Der Speichel kann bis zu 3 Tage lang aufbewahrt werden, wenn er unmittelbar nach der Gewinnung auf 4 °C gekühlt oder sofort auf -20 °C eingefroren wird, sofern eine längere Lagerung erforderlich ist. Gelagerte Proben müssen vor der Durchführung des Tests auf Raumtemperatur erwärmt werden. Bei Verdacht auf Verfälschung oder Kontamination darf die Probe nicht eingesetzt werden. **Verwenden Sie kein Sinus-Exsudat als Speichelquelle.**

Der **Urin** sollte innerhalb 4 Stunden nach der Probeentnahme getestet werden. Der Urin kann bis zu 3 Tage lang aufbewahrt werden, wenn er unmittelbar nach der Gewinnung auf 4 °C gekühlt oder sofort auf -20 °C eingefroren wird, sofern eine längere Lagerung erforderlich ist. Gelagerte Proben müssen vor der Durchführung des Tests auf Raumtemperatur erwärmt werden. Bei Verdacht auf Verfälschung oder Kontamination darf die Probe nicht verwendet werden.

Speichel- und Urinproben sollten als potenziell infektiös und als biologisches Risiko gehandhabt werden.

## **TESTVERFAHREN SPEICHEL:**

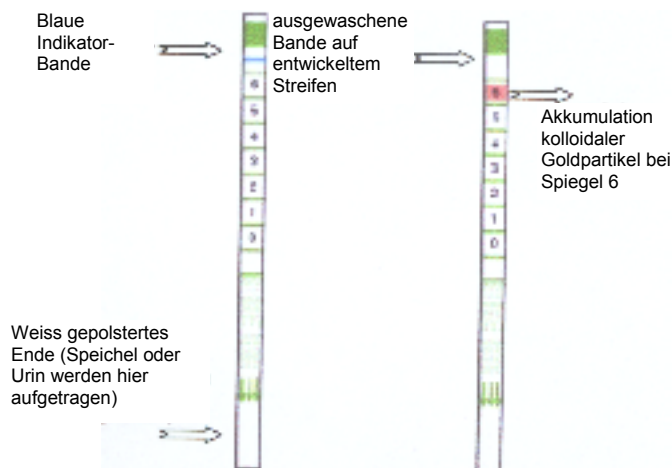
1. Setzen Sie den Trichter in das Röhrchen ein. Führen Sie Speichel in den Trichter ein, und zwar in ausreichender Menge, um mindestens 1/3 des Röhrchens zu füllen.
2. Entsorgen Sie den Trichter und setzen Sie den Stopfen auf das Röhrchen, indem Sie ihn aufdrücken, bis er einrastet.
3. Öffnen Sie durch Ziehen am seitlichen Einschnitt einen Beutel mit einem NicAlert™ -Streifen und legen Sie den Streifen auf eine flache Unterlage.
4. Kippen Sie das verschlossene Röhrchen. Drücken Sie langsam 8 Tropfen der Speichelprobe aus dem Röhrchen direkt auf das wattierte weisse Ende des Streifens (die grüne Zone befindet sich am entgegengesetzten Ende des Streifens).
5. Lassen Sie den Streifen auf einer flachen Oberfläche ruhen, bis der rote Bereich in den darüber liegenden weissen Bereich übertragen wird. Warten Sie, bis sich Banden entwickeln. Lesen Sie die Streifen ab, nachdem die blaue Bande am Ende des Streifens praktisch verschwunden ist. Ist die blaue Bande nach 20 Minuten nicht verschwunden, tragen Sie zusätzliche Tropfen der Probe auf und inkubieren Sie weitere 20 Minuten (Speichel kann bei manchen Klienten sehr viskos sein, weshalb er gelegentlich längere Zeit braucht, um nach oben zu wandern).

- In mindestens einem der Bereiche muss eine rote Färbung erscheinen (Spiegel 0 - 6). Andernfalls sind die Testergebnisse ungültig. **Verswindet auch nach der zusätzlichen Inkubation die blaue Bande nicht, oder das Ergebnis erscheint nicht als diskrete Banden, sondern als diffuser Strich, dann ist die verwendete Speichelprobe zu viskos. Wiederholen Sie den Test nicht mit der gleichen Probe. Gewinnen Sie mit Hilfe von Supermint® oder tictac®, usw., eine andere Probe, und führen Sie den Test mit einem neuen NicAlert™-Streifen durch.**

#### TESTVERFAHREN URIN:

- Der Test kann durch Eintauchen oder durch Einsickern oder „Wicking“ (wie unten beschrieben) durchgeführt werden.
- Sammeln Sie den Urin in einem sauberen Behälter, z.B. einem 2 Unzen-Becher.
- EINTAUCHEN** – Halten Sie den Streifen mit Handschuhen oder mit einer Pinzette am grünen Ende, tauchen Sie das weiche Watteende des Streifens in den Urin bis zu einer Tiefe von 1.5 cm (nicht tiefer) ein und lassen es 5 Sekunden eingetaucht. Ziehen Sie den Streifen heraus und legen Sie ihn 10 – 15 Minuten flach auf eine Unterlage, bis die blaue Testbande verschwindet.  
**EINSICKERN** – Füllen Sie  $\frac{1}{4}$  Urin in einen kleinen Behälter bis zu einer Tiefe von nicht mehr als 1.5 cm, halten Sie den Streifen mit Handschuhen oder einer Pinzette, legen Sie ihn in den Behälter und lassen ihn dort. Der Streifen kann herausgenommen werden, nachdem die blaue Testbande verschwunden ist. Der Streifen wird sich nicht überentwickeln.
- In mindestens einem der Bereiche muss eine rote Färbung erscheinen (Stufen 0 - 6). Andernfalls sind die Ergebnisse ungültig, und der Test muss wiederholt werden.

**Abbildung 1: Ablesen des NicAlert™ Ergebnisses**



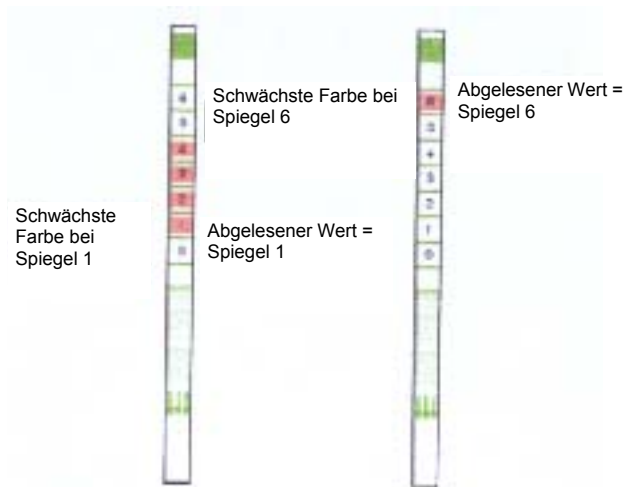
A) Nicht entwickelter NicAlert™ positiver Streifen

B) Entwickelter NicAlert™ (Spiegel 6)

#### ERGEBNISSE UND INTERPRETATION

**Lesen Sie die Ergebnisse als niedrigste verfärbte Zone.** Zeichnen Sie den Spiegel als Wert zwischen 0 und 6 auf. In Abbildung 2 finden Sie Beispiele dafür, wie die Resultate abgelesen werden sollen.

**Abbildung 2: Beispiele für das Ablesen der mit NicAlert™ erzielten Resultate.**



### INTERPRETATION

Spiegel 0 = Schwächste Farbe bei Spiegel 0 = als Spiegel 0 eintragen.  
 Spiegel 1 = Schwächste Farbe bei Spiegel 1 = als Spiegel 1 eintragen.  
 Spiegel 2 = Schwächste Farbe bei Spiegel 2 = als Spiegel 2 eintragen, usw.

Im Urin weist ein NicAlert™ -Resultat bei **Spiegel 3 (100-200 ng/ml)** oder mehr auf den Konsum von Tabakprodukten hin: siehe Tabelle 2a

Im Speichel weist ein NicAlert™ -Resultat bei **Spiegel 1 (10-30 ng/ml)** oder mehr auf den Konsum von Tabakprodukten hin: siehe Tabelle 2b

**Der NicAlert™ Teststreifen kann jederzeit nach Vollendung des Tests abgelesen werden. Sofern er nicht der Wirkung des Sonnenlichts ausgesetzt ist, kann der Streifen stabile Daten liefern (>3 Jahre).**

**Drücken Sie die Ergebnisse als "Spiegel" aus: NicAlert™ wurde so entworfen, dass jeder Spiegel einem Konzentrationsbereich für Kotinin und/oder 3-Hydroxikotinin entspricht (siehe Tabelle 1).**

<b>Tabelle 1. Kotinin-Äquivalente für jeden Spiegel:</b>	
Spiegel	Kotinin-Äquivalente (ng/ml)
0	1 – 10
1	10 – 30
2	30 – 100
3	100 – 200
4	200 – 500
5	500 – 2000
6	> 2000

Um ein semiquantitatives Mass für die Exposition gegenüber Tabak zuweisen zu können, sollte der Spiegel als "Kotinin-Äquivalente" ausgedrückt werden, denn der Test bestimmt sowohl das Kotinin als auch das Hydroxikotinin. Kotinin-Äquivalente sind die angenäherte Konzentration von Kotinin und Hydroxikotinin in der Probe.

<b>Tabelle 2a: Vergleich der Sensitivität und Spezifität von NicAlert™, GC/MS und STC Elisa und STC Autolyten-Assays im Urin (mit cutoff-Werten)</b>				
<b>Sensitivität</b>				
Anzahl Tabak-konsumenten	NicAlert™	GC/MS	STC Elisa	STC Auto Lyte®
133	100 ng/ml	50 ng/ml	500 ng/ml	500 ng/ml
	87 %	83 %	68 %	70 %
<b>Spezifität</b>				
Anzahl verbaler Nichtkonsumenten				
56	100 %	100 %	100 %	100 %

<b>Tabelle 2b: Vergleich der Sensitivität und Spezifität von NicAlert™ mit STC Elisa im Speichel (mit cutoff-Werten)</b>				
<b>Sensitivität</b>				
Anzahl Tabak-konsumenten	NicAlert™	GC/MS	STC Elisa	STC Elisa
102	10 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml	30 ng/ml
	75 %	75 %	68 %	63 %
<b>Spezifität</b>				
Anzahl verbaler Nichtkonsumenten				
46	100 %	100 %	100 %	100 %

### **GRENZEN DES VERFAHRENS**

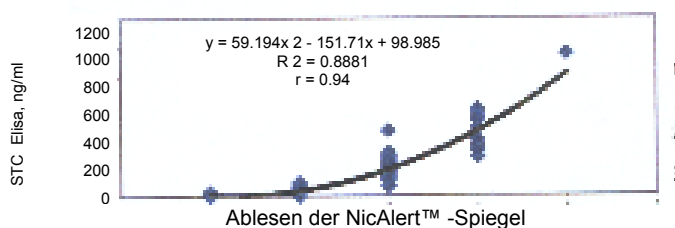
Der NicAlert™-Test ist nicht für medizinisch-diagnostische oder therapeutische Zwecke bestimmt. Ein positives Ergebnis zeigt lediglich die Exposition gegenüber Tabakprodukten sowie das Vorliegen von Kotinin und Hydroxikotinin in der Probe an. Falsche Resultate können durch technische oder Durchführungsfehler sowie durch Verfälschung oder Kontamination der Probe verursacht werden.

### **LEISTUNGSMERKMALE**

#### **Vergleich zwischen NicAlert™ und dem STC Elisa Assay**

Eine Gruppe von 150 Speichelproben wurde einem Feldversuch mit dem NicAlert™ unterzogen, die Proben ins Labor eingeschickt und mit Hilfe des STC Kotinin – Elisa untersucht. Für die Bestimmung der Exposition gegenüber Tabakprodukten wurde ein cutoff-Spiegel von 10 ng/ml verwendet. Die Korrelation zwischen dem NicAlert™ und Elisa - Assay betrug  $r = 0.94$ . Siehe Abbildung 3 und Tabellen 2a und 2b.

**Abbildung 3: Vergleich zwischen den mit NicAlert™ und STC Elisa ermittelten Kotininspiegeln**



## Präzision

### Variation innerhalb eines Streifens

Ein negativer Speichelpool wurde durch Versetzen mit Kotinin auf Spiegel von 60, 300 und 2100 ng/ml gebracht. Jeder Pool wurde 10 Mal mit dem NicAlert™ getestet. Bei allen 10 Replikaten der 60 ng/ml-Kotininmischung wurde ein Spiegel von 2 (30 - 100 ng/ml) abgelesen. Bei allen 10 Replikaten der 300 ng/ml - Kotininmischung wurde ein Spiegel von 4 (200 - 500 ng/ml) abgelesen. Bei allen 10 Replikaten der 2100 ng/ml-Kotininmischung wurde ein Spiegel von 6 ( $\geq 2000$  ng/ml) abgelesen.

### Tag-zu-Tag-Variation

Ein erwiesenermassen Kotinin-negativer Speichelpool von Nichtraucherern wurde durch Versetzen mit Kotinin auf Spiegel von 60, 300 und 2100 ng/ml gebracht. Jeder Pool wurde 10 Mal bei 10 voneinander abhängigen Gelegenheiten über einen Zeitraum von 10 Tagen mit dem NicAlert™ getestet. Bei allen zehn Gelegenheiten über diesen Zeitraum von 10 Tagen erbrachte die 60 ng/ml-Kotininmischung einen Spiegel von 2 (30 - 100 ng/ml). Entsprechend erbrachte über den gleichen Zeitraum bei allen 10 Gelegenheiten die 300 ng/ml-Kotininmischung einen Spiegel von 4 (200 - 500 ng/ml) und die 2100 ng/ml-Kotininmischung einen Spiegel von 6 ( $\geq 2000$  ng/ml).

## Interferenzen

### 1. pH

Teilmengen eines negativen Speichelpools (bei pH 7.2) wurden mit 1M Zitronensäure auf pH 4, 4.5, 5 und 6 eingestellt. Zusätzlich wurde 0.5 M Natriumkarbonat verwendet, um Teilmengen des Speichels auf pH 8, 9, 9.5 und 10 einzustellen. Anschliessend wurden alle Speichelproben mit Kotinin versetzt und auf einen Spiegel von 150 ng/ml gebracht. Alle versetzten Proben wurden sofort mit dem NicAlert™ getestet. Die Ergebnisse befinden sich in der Tabelle 3.

**Tabelle 3: Die Auswirkung des pH-Wertes auf den NicAlert™**

pH	Am NicAlert™ abgelesene Werte	
	Erwartet	Real
4	3	3
4,5	3	3
5	3	3
6	3	3
7,2	3	3
8	3	3
9	3	3
9,5	3	3
10	3	4

Der NicAlert™-Test erbrachte wie erwartet ein Ergebnis zwischen pH 4 und 9.5. Der normale pH – Bereich für Speichel liegt bei 6.5 – 6.9, und der Speichel verfügt bekanntlich über eine hohe Pufferkapazität (7), d.h., er besitzt eine starke Tendenz, Veränderungen des pH-Wertes zu widerstehen.

## 2. Komponenten einer Kreuzreaktion

**Hydroxikotin:** Hydroxikotin wurde mit einem negativen Speichelpool versetzt und auf Spiegel von 0.125, 0.25, 0.5, 1 und 2 µg/ml gebracht. Alle Lösungen wurden mit dem NicAlert™ getestet. Alle Hydroxikotinpiegel zeigten eine Kreuzreaktivität ~25%.

**Nikotin:** Nikotin wurde mit einem negativen Speichelpool versetzt und auf Spiegel von 2, 10 und 20 µg/ml gebracht. Alle Lösungen wurden mit dem NicAlert™ getestet. Die nicht versetzten sowie die 2 µg/ml-Mischungen zeigten einen Spiegel von 1. Die 10 und 20 µg/ml-Mischungen zeigten einen Spiegel von 2, was auf eine maximale Kreuzreaktivität von < 1% hinweist.

Folgende weitere Pyridinderivate wurden mit einem negativen Speichelpool versetzt und auf einen Spiegel von 50 µg/ml gebracht: Niacinamid, Nikotinsäure (Niacin), Nikotinhydrazid, Isonikotinhydrazid, Iproniazidphosphat, Metyrapon, Isonikotinsäure. Alle Lösungen wurden mit NicAlert™ getestet und erbrachten einen Spiegel von 0, was als negatives Ergebnis zu werten ist.

## 3. Andere Interferenz-Substanzen

Ein durch Versetzten mit Chlorpheniramin auf einen Spiegel von 200 µg/ml gebrachter negativer Speichelpool beeinträchtigte den Assay nicht; der Test ergab als Resultat einen Spiegel von 0, was als negatives Ergebnis gewertet wird. Glukose, Ascorbinsäure, Albumin und Hämoglobin wurden mit 0 µg/ml (Kontrolle) und entweder 500 µg/ml oder 50 µg/ml mit einem Speichelpool versetzt, der auf einen Kotininspiegel von 120 ng/ml (Spiegel 3) gebracht worden war, und dem Test durch NicAlert™ unterzogen (Tabelle 4). Bei allen diesen Verbindungen wurde ein Spiegel von 3 abgelesen, woraus hervorgeht, dass diese Substanzen keine Interferenzen verursachten, die die Kotininergebnisse beeinträchtigen könnten.

**Tabelle 4: Auswirkungen von Glukose, Albumin, Hämoglobin und Ascorbinsäure auf NicAlert™**

Zugesetzte Substanz	Mischungs-Spiegel; µg/ml	Am NicAlert™ abgelesene Werte (120 ng/ml Kotinin)	
		Erwartet	Real
Glukose	0	3	3
	500	3	3
Ascorbinsäure	0	3	3
	500	3	3
Albumin	0	3	3
	50	3	3
Hämoglobin	0	3	3
	50	3	3

## BIBLIOGRAPHIE

1. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health: Cancer Prevention Awareness Survey, Washington DC, Government Printing Office 1983.
2. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control: Reducing the Health Consequences of Smoking, 25 Years of Progress, A Report of the Surgeon General, Rockville, MD. Office on Smoking and Health 1989.
3. US Department of Health Education and Welfare, Smoking and Health, A Report of the Surgeon General, Office on Smoking and Health 1979a.
4. US Department of Healthy People, The Surgeon General's Report on Health Promotion and Disease Prevention 1979b.
5. Murray R.P., et. al., "Error in Smoking Measures: Effects of Intervention on Relations of Cotinine and Carbon Monoxide to Self-Reported Smoking," Am. J. Public Health, 83: 1251-1257, 1993.

6. Byrd G.D., Davis R.A., Caldwell W.S., Robinson J.H, and de Bethizy J.D., "A further study of FTC yield and nicotine absorption in smokers." *Psychopharmacology*, 139(4): 291-2, 1998.
7. Birkhed D., and Heintze U. *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology*,
1. Tenovuo J., Odont D. (Eds.) CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, Vol. 1: pp. 52-55, 1989.