Laboratorní diagnostika návykových látek

Jana Pinkavová
Upraveno dle prezentace
Veroniky Pleškové

Za jakým účelem se stanovují návykové látky?

- v rámci policejních kontrol
- k odlišení symptomů nebo k ujištění, že pacient není pod jejich vlivem před některými lékařskými zákroky
- sledování dodržování léčby
- u těhotných žen, které mají v anamnéze dřívější užívání drog (užitečné pro následnou péči o novorozence)
- někteří zaměstnavatelé vyžadují drogový screening jako součást vstupních nebo preventivních prohlídek (zejména u osob, které při výkonu svého povolání mohou ohrozit zdraví a životy ostatních lidí – řidiči MHD, zdravotnický personál apod.)

Stanovení na několika úrovních:

- **Orientační** (vhodné i pro terénní účely)
- **Semikvantitativní** (drogový screening v klinických laboratořích)
- **Konfirmační** (analýza ve specializovaných toxikologických laboratořích)

Orientační testy

- patří do kategorie testů POCT (rychlá analýza v terénu, u lůžka apod.)

- materiál: sliny, moč, krev, pot, pevné látky (ubrousky na kokain)

- možná detekce několika druhů drog v rámci jednoho testu

- nižší spolehlivost (95 %), možná falešná pozitivita či falešná negativita (v dané skupině nemusí reagovat všechny strukturní deriváty)

- nemohou samy o sobě odlišit nelegální užívané drogy od komponent stejné třídy, které mohou být obsaženy v předepisovaných lécích (FP)

V případě pozitivního výsledku orientačního testu je třeba zajistit materiál a zaslat ho k vyšetření ve specializované toxikologické laboratoři, která k takové analýze má oprávnění!

Princip stanovení

Imunochromatografická technika podélného toku reagencií proužkem porézní membrány (angl. Lateral Flow Immunoassay; zkr. *LFIA*)

- Kompetice drogy ve vzorku se značeným konjugátem drogy imobilizovaným na membráně o vazbu na specifickou protilátku imobilizovanou v testovací a kontrolní zóně testu

- **Nízká koncentrace drogy ⇨ vazba značeného konjugátu na specifickou protilátku v testovací zóně ⇨** *vznik barevné linie*

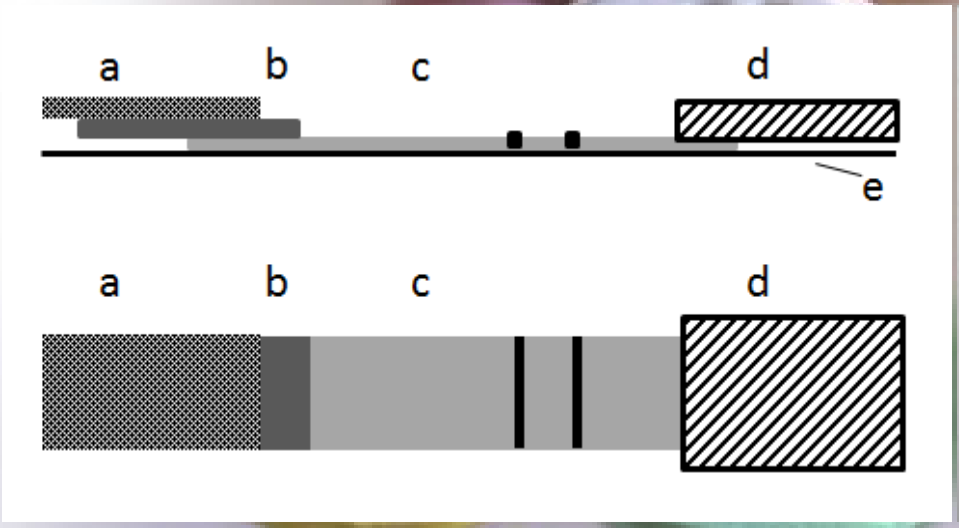
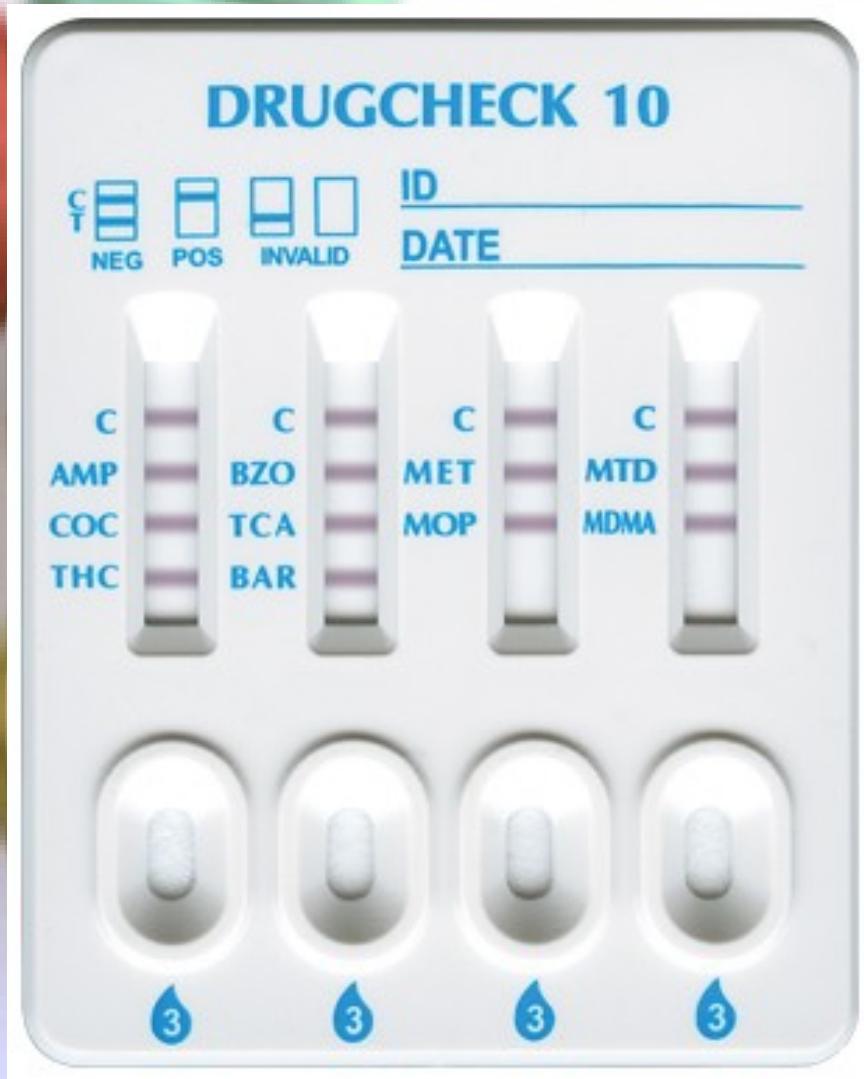


Schéma uspořádání membrán v LFIA testu (nárys a půdorys); *a* – podložka pro vzorek, *b* – podložka pro konjugát, *c* – membrána s testovací a kontrolní linkou v detekční zóně, *d* – absorpční podložka, e – plastová výztuž membrány
Ukázka membránového testu v kazetě; a – uspořádání membrán v kazetě, b – výsledek testu standardního roztoku bez analytu a s vysokou koncentrací analytu (*www.chemickelisty.cz*)

Drogový screening pomocí testovacích kazet

Metoda LFIA

- Kompetice drogy ve vzorku se značeným konjugátem drogy imobilizovaným na membráně o vazbu na specifickou protilátku imobilizovanou v testovací a kontrolní zóně testu



Drogový screening v klinické laboratoři

Imunochemická vyšetření

- **semikvantitativní stanovení** (výsledek je pouze orientační, vyžaduje potvrzení a upřesnění více specifickou nezávislou metodou)

- screeningové metody mohou sloužit pro zaměření na další analytické postupy – vstupní náhled na soubor látek

- uvážení možností imunochemických metod a správná interpretace výsledků slouží k rychlému řešení akutních intoxikací

- materiál: jednorázová moč

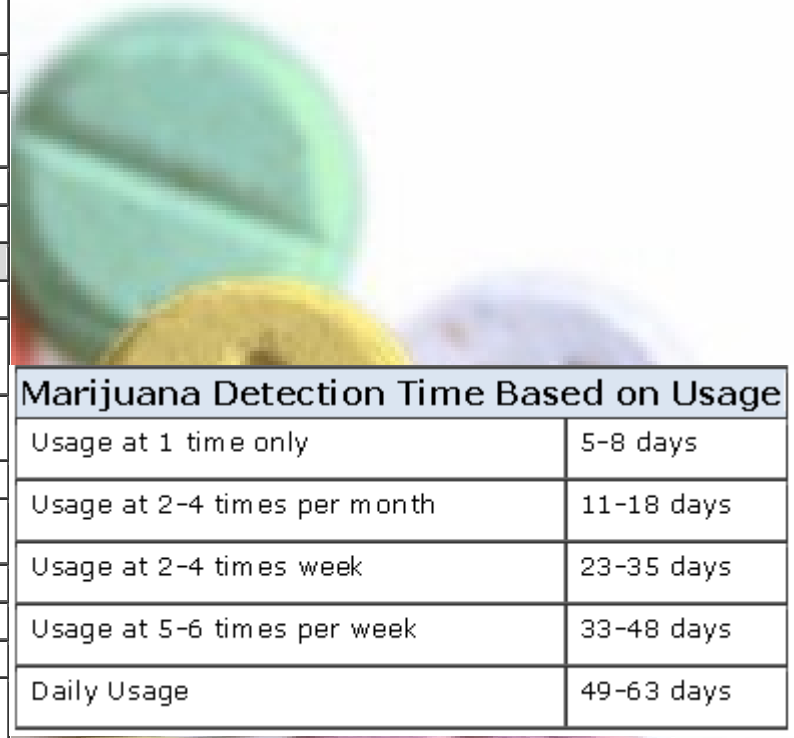
  nevyžadují izolaci a zakoncentrování analytu
  vysoká citlivost
  vysoká rychlost
  jednoduchost, nenáročnost na kvalifikaci
  vhodné pro automatizaci
  vhodné pro sériová vyšetření

Kinetická interakce mikročástic v roztoku - *KIMS*

- protilátka proti příslušnému analytu v moči je kovalentně vázána na mikročástice a derivát analytu je připojen k makromolekule
- kinetická interakce mikročástic v roztoku je vyvolána vazbou konjugátu analytu na protilátku na mikročástici a je měřena jako změna průchodu světla.
- mezi konjugátem a nekonjugovaným analytem ve vzorku probíhá kompetitivní reakce o vazebná místa protilátky proti analytu navázané na mikročástice
- přítomnost analytu ve vzorku úměrně snižuje nárůst absorbance vůči koncentraci drogy ve vzorku

Metoda	Měřící rozsah (ng/ml)	Cut off (ng/ml)	Negativní (ng/ml)	Pozitivní (ng/ml) číselná hodnota	Pozitivní (ng/ml)
Amfetamin/ metamfetamin	300 – 5000	1000	< 1000	1000 – 5000	> 5000
Barbituráty	100 – 400	200	< 200	200 – 400	> 400
Benzodiazepiny	150 – 3000	300	< 300	300 – 3000	> 3000
Marihuana	20 – 300	50	< 50	50 – 3000	> 300
Opiáty	600 – 8000	2000	< 2000	2000 – 8000	> 8000
Kokain	150 – 3000	300	< 300	300 – 3000	> 3000
Metadon	150 – 2000	300	< 300	300 – 2000	> 2000
Fencyklidin	12,5 - 50	50	< 50	-	> 50

Substance	Medical Uses	Drug Detection Times
Stimulants		
Amphetamine	Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), obesity, narcolepsy	2-5 days
Cocaine	Local anesthetic, vasoconstrictor	2-5 days
Methamphetamine	ADHD, obesity, narcolepsy	3-5 days
Methylphenidate	ADHD, narcolepsy	1-2 days
Nicotine	Treatment for nicotine dependence	4-10 days
Hallucinogens and Other Compounds		
LSD	None	7-10 days
Mescaline	None	5-7 days
Phencyclidine & Analogs	Anesthetic (veterinary)	2-8 days
Psilocybin	None	5-7 days
Amphetamine variants	None	5-7 days
Marijuana	Limited, Analgesic	*
Hashish	Limited, Analgesic	*
Tetrahydrocannabinol	Antiemetic	*
Anabolic Steroids	Hormone Replacement Therapy	Oral: up to 3 weeks (for testosterone and others); Injected: up to 3 months (Nandrolone up to 9 months)
Opiates and Morphine Derivatives		
Codeine	Analgesic, antitussive	5-7 days
Heroin	None	5-7 days
Methadone	Analgesic, treatment for opiate dependence	5-7 days
Morphine	Analgesic	5-7 days
Opium	Analgesic, antidiarrheal	5-7 days
Depressants		
Alcohol	Antidote for methanol poisoning	24-48 hours
Barbiturates	Anesthetic, anticonvulsant, hypnotic, sedative	2 days - 4 weeks
Benzodiazepines	Antianxiety, anticonvulsant, hypnotic, sedative	7-10 days
Methaqualone	None	2 weeks



Marijuana Detection Time Based on Usage	
Usage at 1 time only	5-8 days
Usage at 2-4 times per month	11-18 days
Usage at 2-4 times week	23-35 days
Usage at 5-6 times per week	33-48 days
Daily Usage	49-63 days

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS)

- velká specifita hmotnostních spekter - **jsou standardem pro identifikaci neznámých látek v toxikologii**

- reprodukovatelné retenční parametry, mezilaboratorní přenos retenčních dat, databáze retenčních indexů

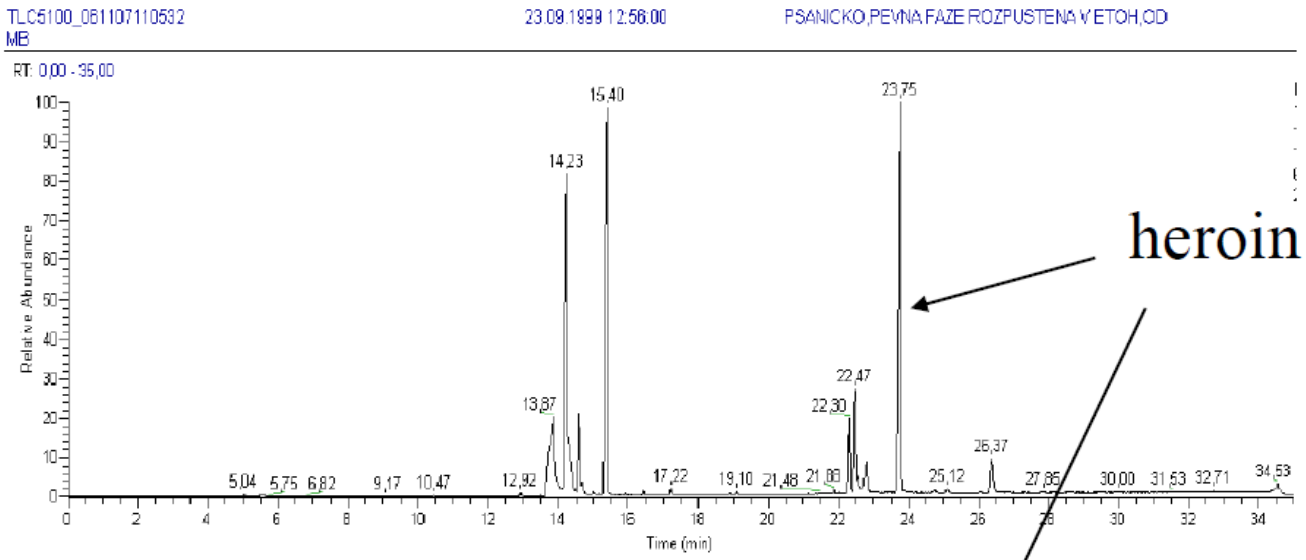
- velká separační účinnost GC kapilár

- použití:

  chemická identifikace širokého spektra neznámých látek
  potvrzovací analýzy užší skupiny látek
  kvantifikace – stanovení známé látky

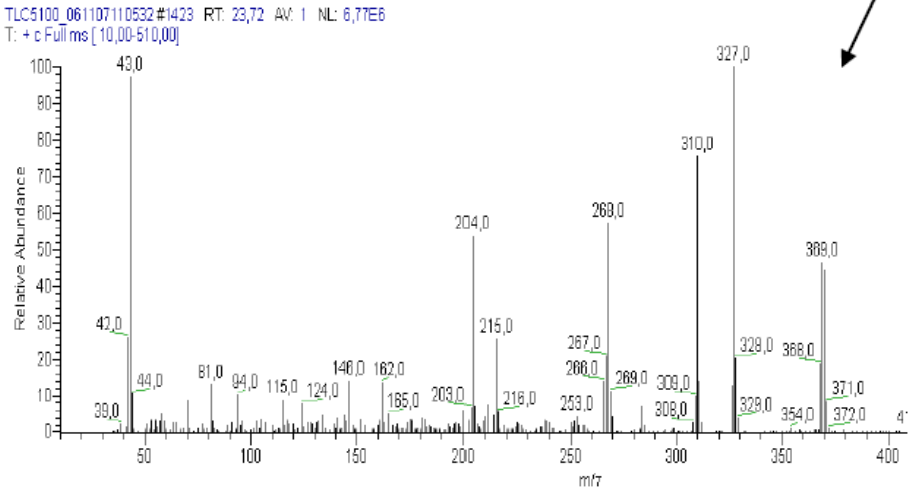
GC-MS: potvrzení přítomnosti heroinu

GC-MS Total Ion Chromatogram – analýza substance



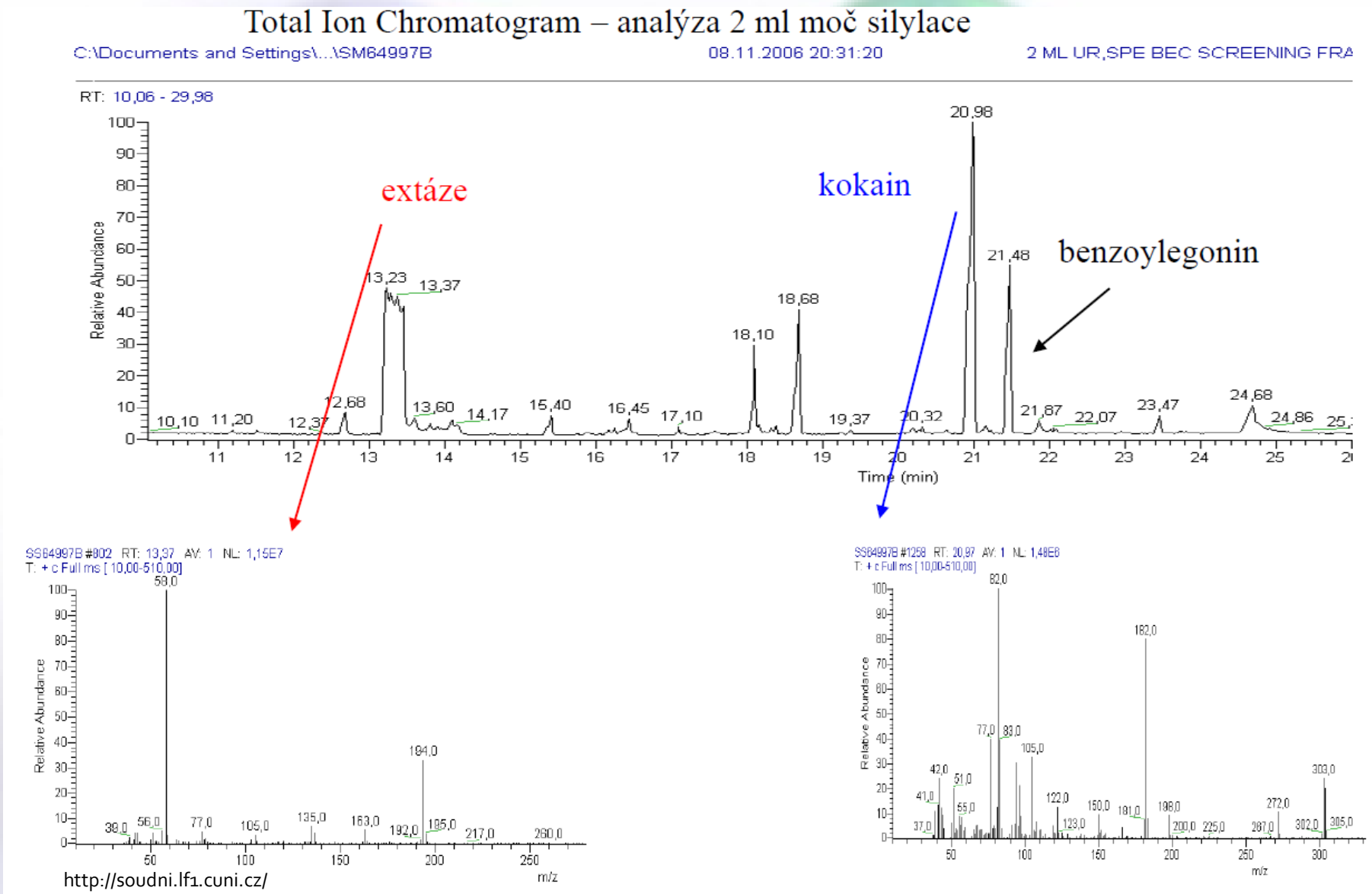
heroin

MS spektrum heroinu



http://soudni.lf1.cuni.cz/

GC-MS: intoxikace kokainem a extází



http://soudni.lf1.cuni.cz/

Tenkovrstevná chromatografie (TLC)

- využívá princip dělení směsi látek mezi stacionární a mobilní fázi - využívá adsorpční a rozdělovací chromatografii
- využívá princip extrakčního chování nox – dělení na látky bazické, kyselé a neutrální
- denzitometrická kvantifikace (UV, VIS)
- jednoduché a rychlé provedení
- při dobré volbě extrakce a detekčních činidel poskytuje velmi dobré kvalitativní rozlišení neznámé látky

Tenkovrstevná chromatografie (TLC)

- způsob provedení:

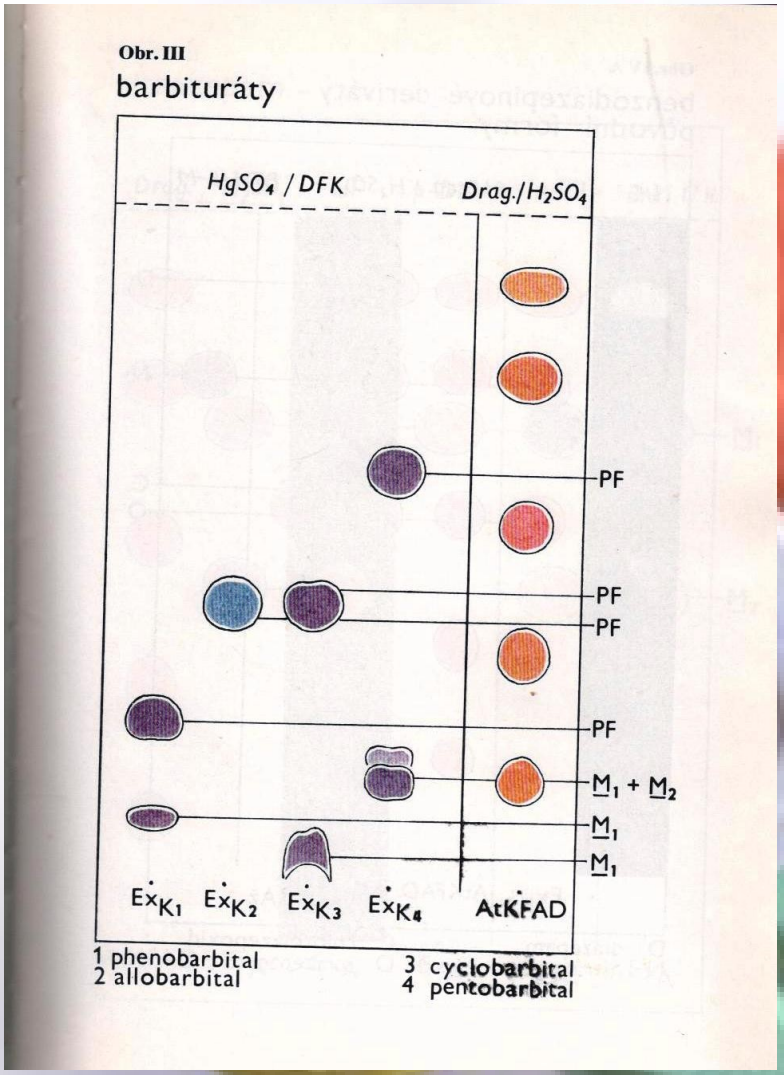
  Stacionární fáze – silikagel (kyselina křemičitá), oxid hlinitý, komerční přípravky: silufol, kieselgel G

  Mobilní fáze – směs organických rozpouštědel

- R_F faktor – podíl vzdálenosti skvrny látky od startu a vzdálenosti čela rozpouštědla

- R_F faktor ovlivňuje:
  chemická struktura látky
  složení mobilní fáze
  pH
  teplota, vlhkost
  materiál nosiče

Tenkovrstevná chromatografie (TLC)



Mateia Pharmaceutika 5, 1986
Ex_K – extrakt moče z kyselého prostředí
AtKFAD – standard (atropin, kodein, phenmetrazin, aminophenazon, diazepam)
$HgSO_4$ / DFK - $HgSO_4$ s difenylkarbazonem
Drag. / H_2SO_4 – Dragendorffovo činidlo s H_2SO_4
PF – původní forma
Mx – analyticky významné metabolity

„Osvědčená detekce barbiturátů a jejich metabolitů je způsob, který využívá vytváření málo rozpustných komplexů s rtuťnatými ionty.
Následnou aplikací difenylkarbazolu se citlivost detekce zvyšuje, zcitlivění takto provedení detekce má především význam pro ty barbituráty, u nichž je komplexotvornost s rtuťnatými ionty snížena (allobarbital).“

Konfirmační analýza návykových látek

- **základní princip toxikologie: potvrzování výsledků navzájem nezávislými metodami**

- klinický a forenzně toxikologický standard současnosti: metody hmotnostní spektrometrie v tandemu s plynovou nebo kapalinovou chromatografií **GC-MS, LC-MS** - bezpečná identifikaci neznámé látky a přesné stanovení její koncentrace

- výsledky takového konfirmačního vyšetřování je jako jediné možné použít i pro soudně-lékařské účely (tedy pouze laboratoře forenzní toxikologie, soudní toxikologie) http://www.soudnilekarstvi.cz/wp-content/uploads/2014/10/Seznam-laboratoří-kvalifikovaných-pro-vyšetřování-specifikovaných-návykových-látek.pdf

- materiál: moč, krev, sliny, pot, vlasy, žaludeční obsah, tkáně, podezřelé látky

Další toxikologická vyšetření v klinické laboratoři

- **Deriváty Hb** (COHb, MetHb, SulfHb, CNHb) - přímá spektrofotometrie - analyzátory ABR s fotometrickým systémem, paralelní stanovení Hb, oxyHb
- **Ethanol, Methanol, Ethylenglykol** – osmolární okno
- **TDM** (Therapeutic Drug Monitoring) **–** imunoanalýza, HPLC, LC-MS
- **Li, Pb** - AAS

Kazuistika

- žena, 71 let, lečí se s hypertenzí a štítnou žlázou, přijata na JIP pro dušnost, slabost, pocit na omdlení, bolest hlavy, opakovaně přítomny stavy “zahledění“ trvající pár sekund. Při příjmu je při vědomí, ale nekontaktní.
- vyšetřena na neurologii, CT negativní
- Laboratorní nález: pozitivní marihuana - výsledek konfirmován v Ústavu soudního lékařství (zkřížená reakce vyloučena)
- Pacientka požívání marihuany neguje, včera večeřela bramborák, který jí donesl vnuk….
- 4. den hospitalizace stabilní předána na stand. odd., po kompenzaci TK propuštěna do domácí péče

Otrava alkoholy

Etanol

- akutní: excitační a narkotický účinek na CNS, metabolická acidóza, hypoglykémie, hyperurikémie, ↑ ALT, ↑ osmolalita

- chronický účinek: steatóza až cirhóza jater, ↑GMT, ↑%CDT
-
- **> 3‰ :** kóma, křeče, hypotermie (podchlazení), hrozí smrt vyvolána útlumem dechového centra a oběhovým selháním

- u alkoholika nebo osoby dlouhodobě nadužívající alkohol vzniká jakási "rezistence" (odolnost) a tyto stavy mohou nastoupit až ve vyšším stupni opilosti)

Otrava alkoholy

Metanol

- Nejdříve příznaky podobné ethanolu (lehká opilost, horší artikulace) poté 12 – 24 hod. bez příznaků (s kombinaci s alkoholem až 36 hod.) , následuje bolet hlavy, dušnost, bolest břicha , křeče, snížená ostrost vidění, rozvrat met. Procesů

- toxické účinky met. produktů – formaldehydu (na zrakový nerv), kys. mravenčí (met. acidóza)

- tox. dávka – 0,1 ml/ kg, smrtelná dávka – 1 ml/kg

- Léčba: podání antidota (etanol, fomepizol) min. tvorbu tox. produktů (kompetitivní inhibice alkoholdehydrogenázy); HD – odstraňuje metanol i jeho metabolity, koriguje metalické poruchy

Otrava alkoholy

Ethylenglykol

- metabolizován v játrech působením alkohol - a aldehyd-dehydrogenázy na silné kyseliny (glyoxalovou, šťavelovou, oxalovou),
- vzniká těžká metabolická acidóza, která se prudce zhoršuje a ohrožuje život otráveného
- kys. oxalová se váže s Ca, depozita krystalů šťavelanu vápenatého vedou k poškození buněk (mozek, ledviny, myokard, plíce), také výrazné ↑↑ osmolality
- tox. dávka 200 mg/l, smrtelná dávka: 850- 2000 mg/l (nejednotné údaje)

Otrava alkoholy

Ethylenglykol

- Příznaky otravy: opilost bez zápachu alkoholu
- Neurologické stádium (30 min. – 12 h. po požití) opilost, euforie, smazaná řeč, ospalost, zvracení. Během 4-12 h. rozvoj met. acidózy
- Kardiopulmonální stádium (12-24 h.) – tachykardie, hypo nebo hypertenze, težká m. acidóza a s hyperventylací a selháváním orgánů
- Renální stádium –(24 -72 h.) – hematurie, albuminurie, selhání ledvin, ne vždy úprave fce ledvin
- Léčba: podání etanolu (100x vyšší afinita k ADH); HD – odstraní ET i metabolity, upraví acidózu

Kazuistika

- žena, 62 let, s hepatální cirhózou, t.č. 2 roky abstinuje od alkoholu
-
- nalezena doma zmatená se sklenicí modré tekutiny na dně, prázdné blistry od léků (benzodiazepiny), volána RZS

- při příjmu porucha vědomí, těžká metabolická acidóza
- vstupní laboratorní nález:

  ph 6,96 [7,35-7,43]; osmolalita 358 mmol/kg ; Na 141 mmol/l;
  urea 1,8 mmol/l, glu 8,1 mmol/l, ethanol – 0 mmol/l,
  tox. screening - neg.

- osmolal gap = 66 mmol/kg

	10.9.2015 8,50 hod.		10.9.2015 10,20 hod.	10.9.2015 16,30 hod.	10.9.2015 20 hod.	10.9.2015 24 hod.	11.9.2015 1,30 hod
Glukóza (mmol/l);[3,9-5,6]	8,1			6,2	8,7	13,0	11,6
Urea (mmol/l);[1,7-8,3]	1,8		2,1				
Na (mmol/l);[136-145]	141		145	144	142	140	141
Osmolalita (mmol/l);[275 - 295]	358		351	312	312	327	330
Ethanol (mmol/l)	0		33,7 (1,5 ‰)	13,2 (0,6 ‰)	19,6 (0,9 ‰)	44,3 (2,0 ‰)	47,4 (2,1 ‰)
Vypočítaná osmolalita	292			310	312	337	341
Osmolální okno	66			2	0	10	11
Ethylenglykol (g/l)	?	3,69					

Závěr: otrava ethylenglykolem
Terapie: opakovaná dialýza,
terapie alkoholem 1- 1,5 ‰

	11.9.2015 6 hod.	11.9.2015 19 hod.	12.9.2015 5 hod.
Glukóza (mmol/l);[3,9-5,6]	8,3	6,1	5,7
Urea (mmol/l);[1,7-8,3]	0,8		2,0
Na (mmol/l);[136-145]	142	140	139
Osmolalita (mmol/l);[275 - 295]	330		285
Ethanol (mmol/l)	44,6 (2,0 ‰)	11,1 (0,5 ‰)	0
Vypočítaná osmolalita	338		285,7
Osmolální okno	8		0,7
Ethylenglykol (g/l)			negativní