



Laboratorní diagnostika návykových látek

Jana Tomanová

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 léčích (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 reagensií 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

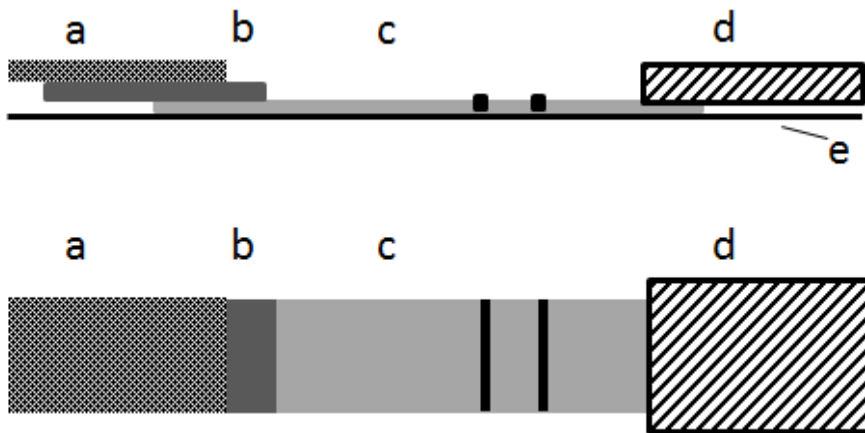


Schéma uspořádání membrán v LFIA testu (nárys a půdorys); *a* – podložka pro vzorek, *b* – podložka pro konjugát, *c* – membrána s testovací a kontrolní linkou v detekční zóně, *d* – absorpční podložka, *e* – plastová výztuž membrány

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 mikročastic v roztoku - *KIMS*

- protilátka proti příslušnému analytu v moči je kovalentně vázána na mikročástice a derivát analytu je připojen k makromolekule
- kinetická interakce mikročastic v roztoku je vyvolána vazbou konjugátu analytu na protilátku na mikročastici 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

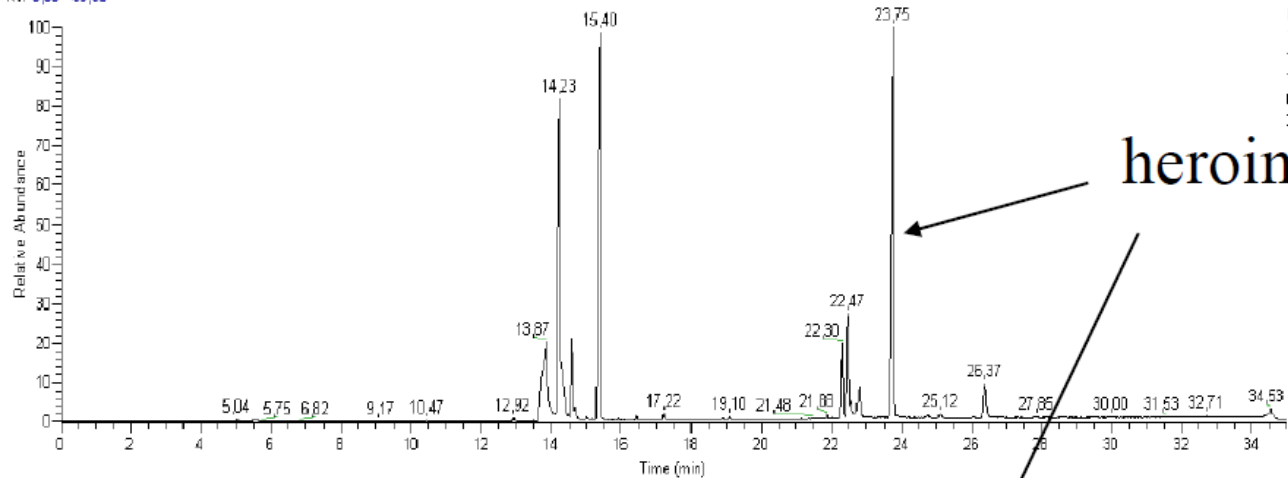
TLC5100_061107110532

23.09.1999 12:56:00

PSANICKO,PEVNA,FAZE,ROZPUSTENA V,ETOH,OD

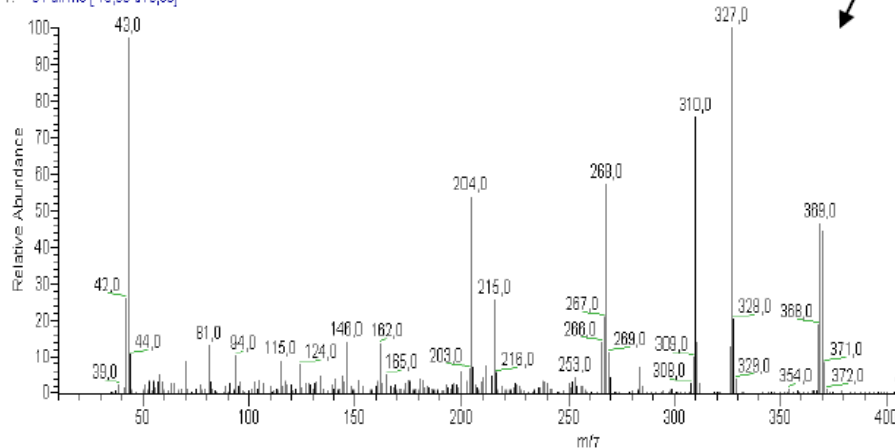
ME

RT: 0.00 - 35.00



MS spektrum heroinu

TLC5100_061107110532#1423 RT: 23,72 AV: 1 NL: 6,77E6
T: + c Full ms [10,00-510,00]



GC-MS: intoxikace kokainem a extází

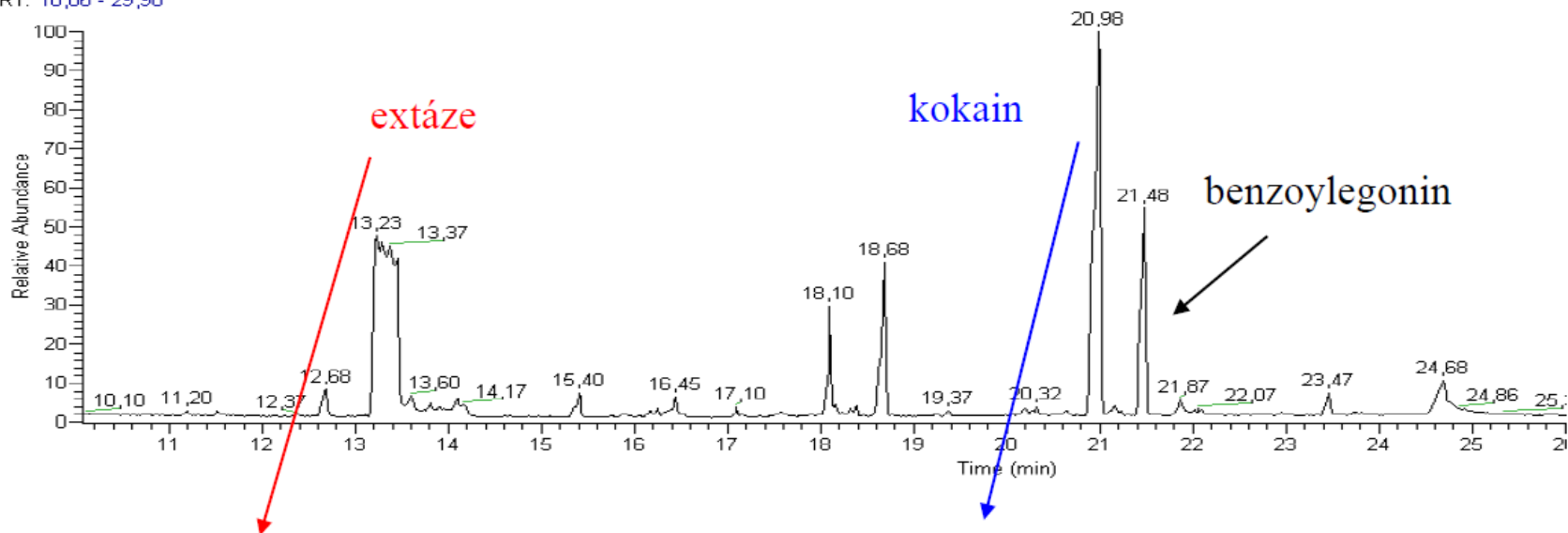
Total Ion Chromatogram – analýza 2 ml moč silylace

C:\Documents and Settings\...\ISM64997B

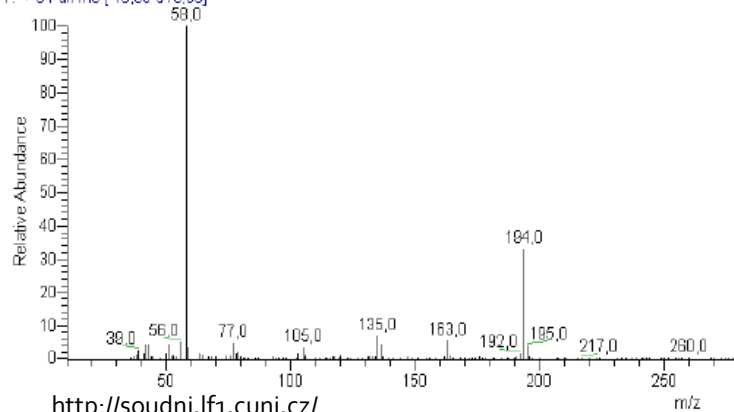
08.11.2006 20:31:20

2 ML UR,SPE BEC SCREENING FRA

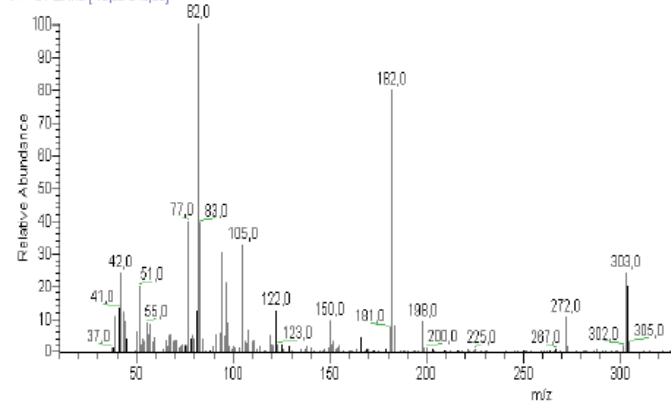
RT: 10,06 - 29,98



SS64997B#002 RT: 13,37 AV: 1 NL: 1,15E7
T: + c Full ms [10,00-510,00]



SS64997B#1258 RT: 20,97 AV: 1 NL: 1,48E6
T: + c Full ms [10,00-510,00]



<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 nosiče – 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



Tenkvrstevná chromatografie (TLC)

- způsob provedení:

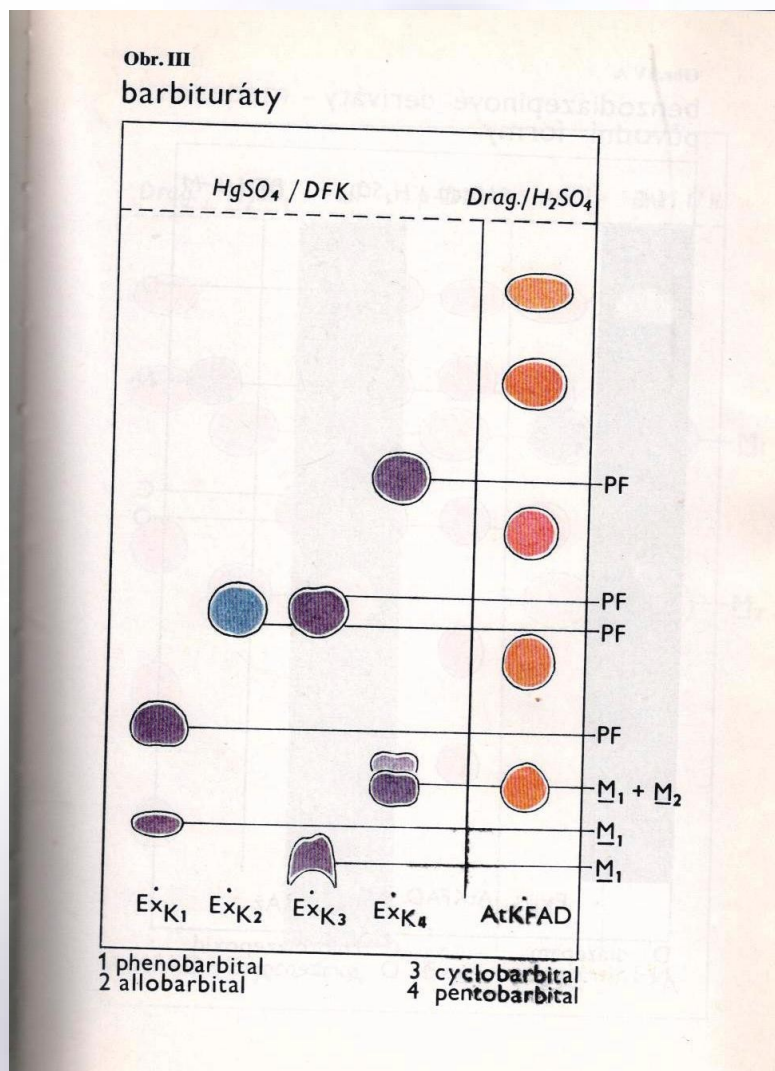
Stacionární fáze – silikagel (kyselina křemičitá), oxid hlinitý, komerční přípravky: silufol, kieselgel G

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



Tenkvrstevná 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

M_x – analyticky významné metabolity

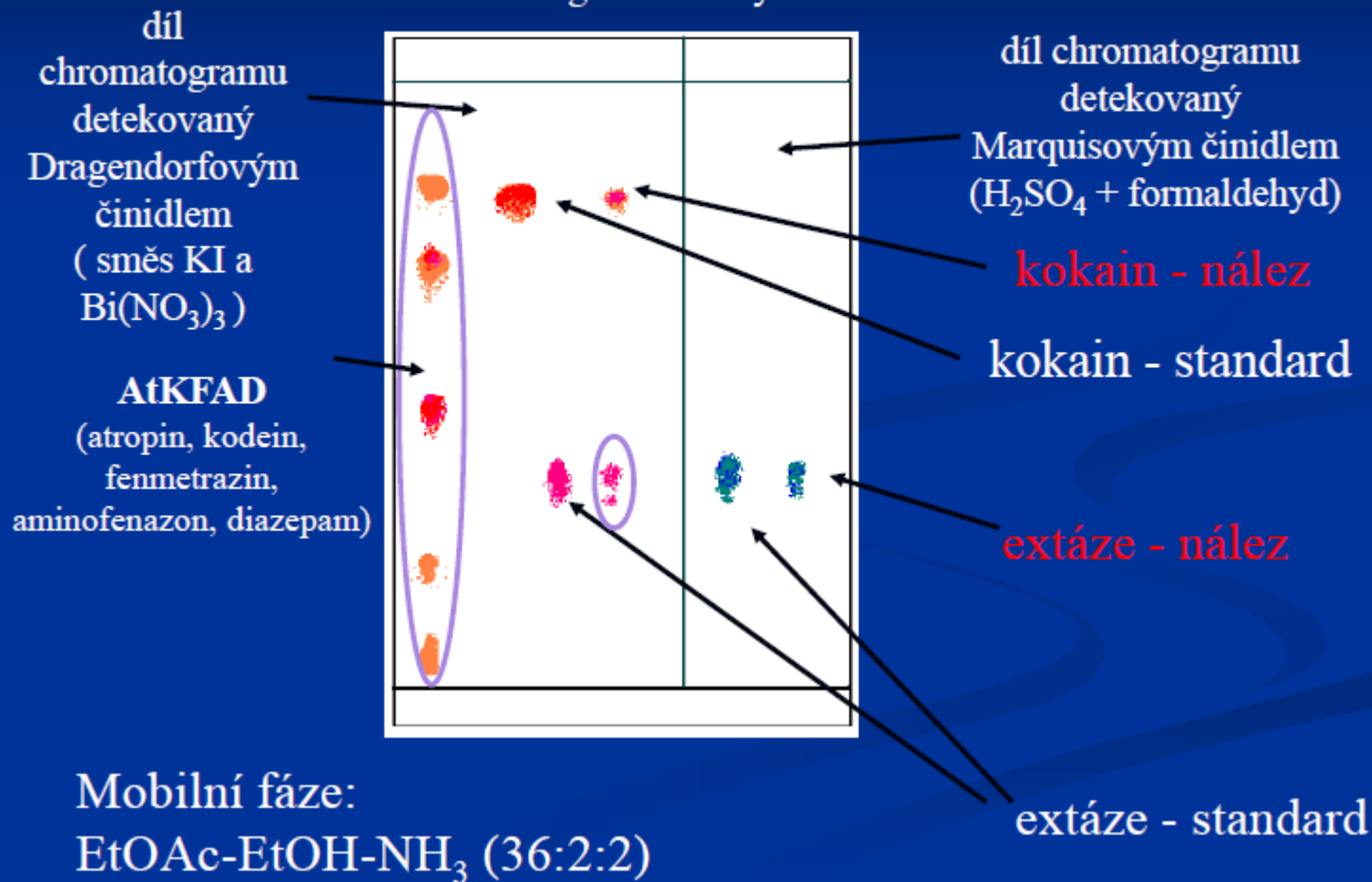
„Osvědčená detekce barbiturátů a jejich metabolitů je způsob, který využívá vytváření málo rozpustných komplexů s rtuťnatými ionty.

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).“

Dragendorffovo činidlo (vodný roztok jodidu draselno-bismutitého) je barevné činidlo používané k důkazu přítomnosti alkaloidů ve zkoumaném vzorku. Pokud jsou ve vzorku obsaženy alkaloidy, reagují s Dragendorffovým činidlem za vzniku oranžové až oranžovočervené sraženiny.

TLC intoxikace kokainem a extází

TLC chromatogram – analýza 50 ml moč



Z přednášky Doc. Ing. Drahomíry SPRINGER, Ph.D.

EMIT (Enzyme-multiplied immunoassay technique)

- Homogenní kompetitivní imunoanalýza
- kompetice mezi látkou ve vzorku a látkou značenou enzymem o vazebná místa na protilátce.
- Enzym = glukoso-6-fosfát dehydrogenáza (G6PDH)
- aktivní enzym mění NAD na NADH → změna absorbance
- aktivita enzymu klesá při vazbě protilátky, proto lze koncentraci látky ve vzorku měřit podle změny aktivity enzymu.

Př. Kotinin v moči (DRI Cotinine Assay, ThermoScientific/ cobas c8000, Roche)

- Referenční meze kotininu v moči

<30 (nekuřáci)

50-500 (vystavení nikotinu – lehký/pasivní kuřák)

>500 (abúzus tabákových výrobků)

Vzorek č.	Udaná expozice	Výsledky [ng/ml]
1	do 5 cigaret denně	389
2	10-15 denně	2009
3	10-15 denně	971
4	15-20 denně	1304
5	20-25 denně	1848
6	25-30 denně	1517
7	15-20 denně	2142
8	10-15 denně	615
9	10-15 denně	589
10	10 denně	1746
11	nekuřák	0
12	příležitostně	0
13	nekuřák	0
15	nekuřák	3
16	nekuřák	0

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 - analyzátoři 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 potvrzen 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, \uparrow ALT, \uparrow osmolalita
- chronický účinek: steatóza až cirhóza jater, \uparrow GMT, \uparrow %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 kombinací s alkoholem až 36 hod.) , následuje bolest 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, těžká 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

