

Laboratorní diagnostika návykových látek

Mgr. Zuzana Stražilová

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 reagensí 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**

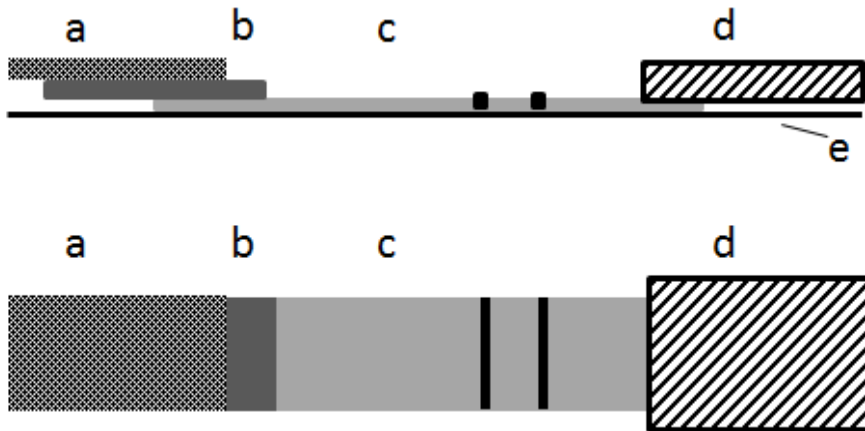


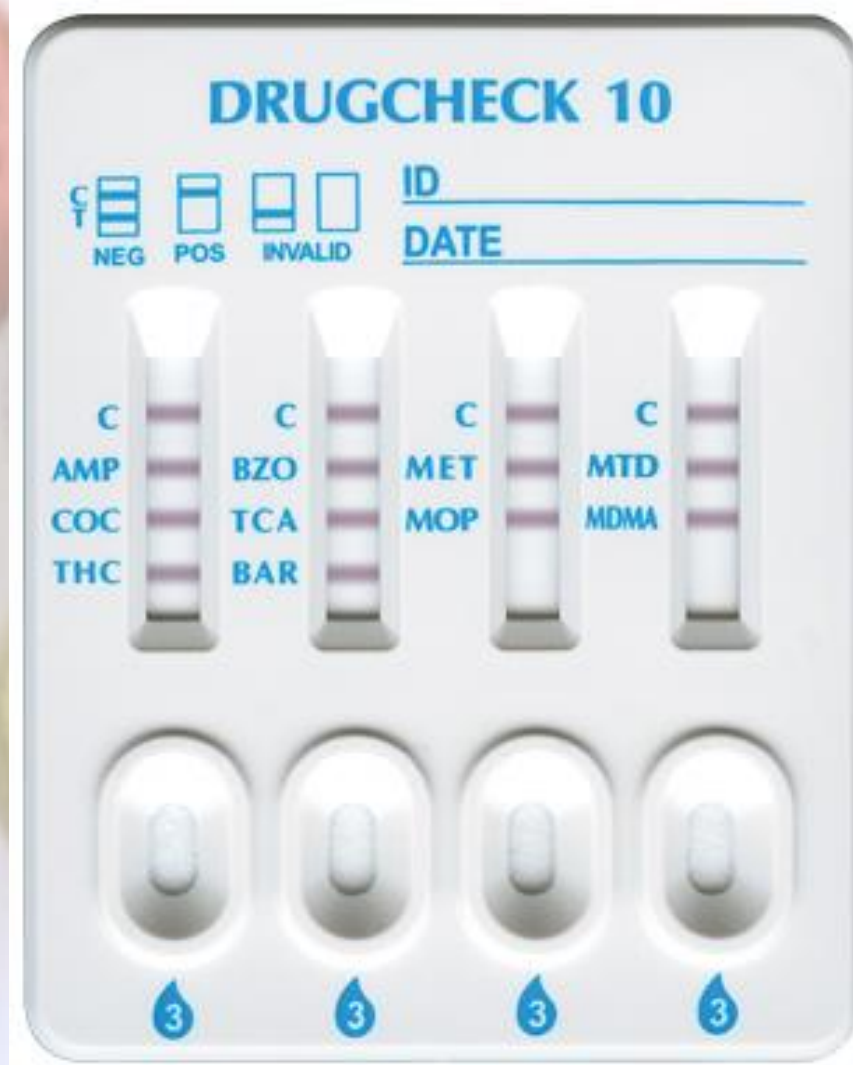
Schéma uspořádání membrán v LFIA testu (nárys a půdorys); *a* – podložka pro vzorek, *b* – podložka pro konjugát, *c* – membrána s testovací a kontrolní linkou v detekční zóně, *d* – absorpční podložka, *e* – plastová výztuž membrány

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

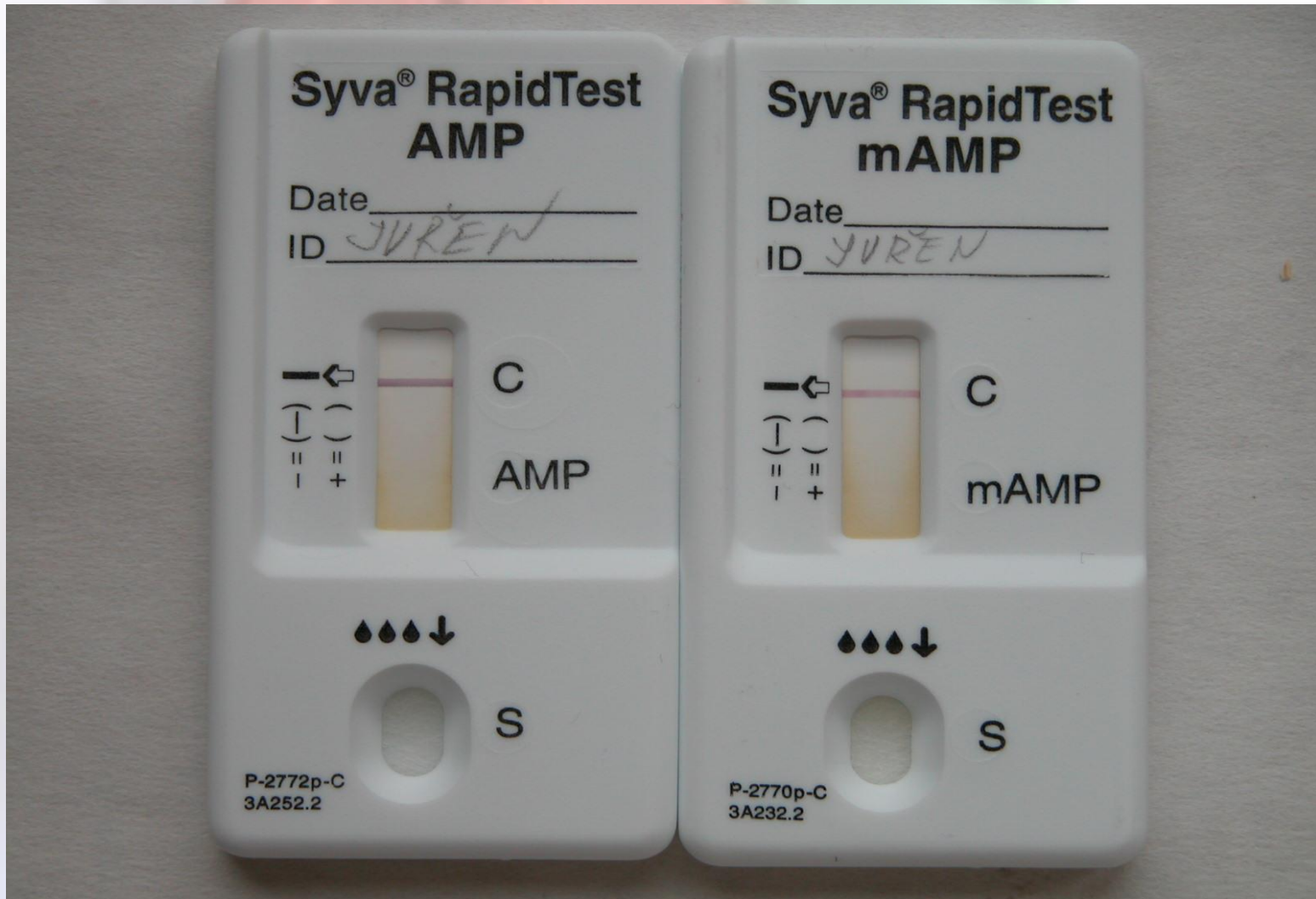
Metoda LFIA

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



Jiný příklad:

Kazetový test Syva® RapidTest (pozitivní na amfetaminy)



Metody stanovení

1. Chromatografické metody

HPLC

HPLC/MS

LC/MS

GC/MS

TLC



2. Imunoanalytické metody

a) fluorescenční imunoanalýza
(FIA, FPIA, DELFIA)

b) enzymová imunoanalýza
(EMIT, ELISA, MEIA, CEDIA)

c) luminiscenční imunoanalýza
(LIA, ILMA, CMIA, ECLIA, ...)

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



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

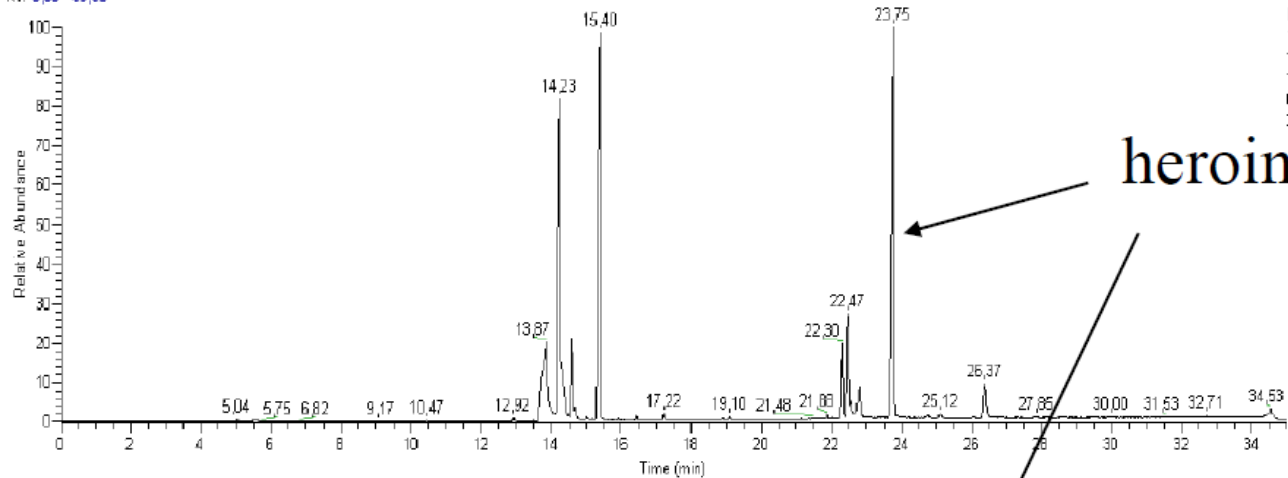
TLC5100_061107110532

23.09.1999 12:56:00

PSANICKO,PEVNA,FAZE ROZPUSTENA V ETOH,OD

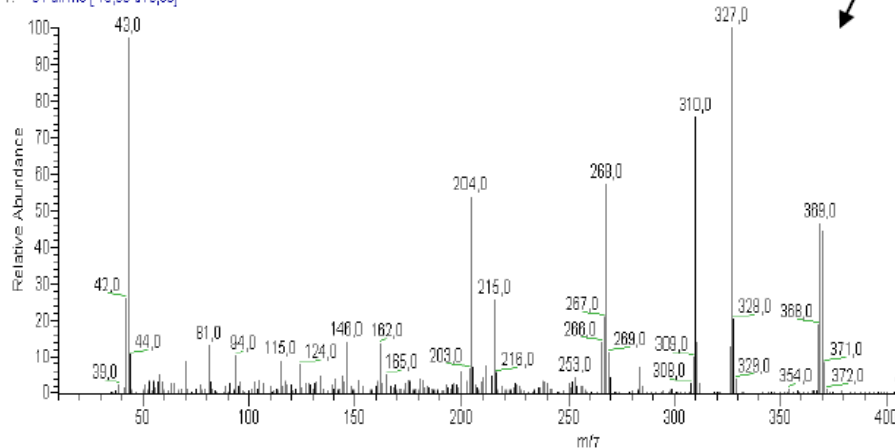
ME

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

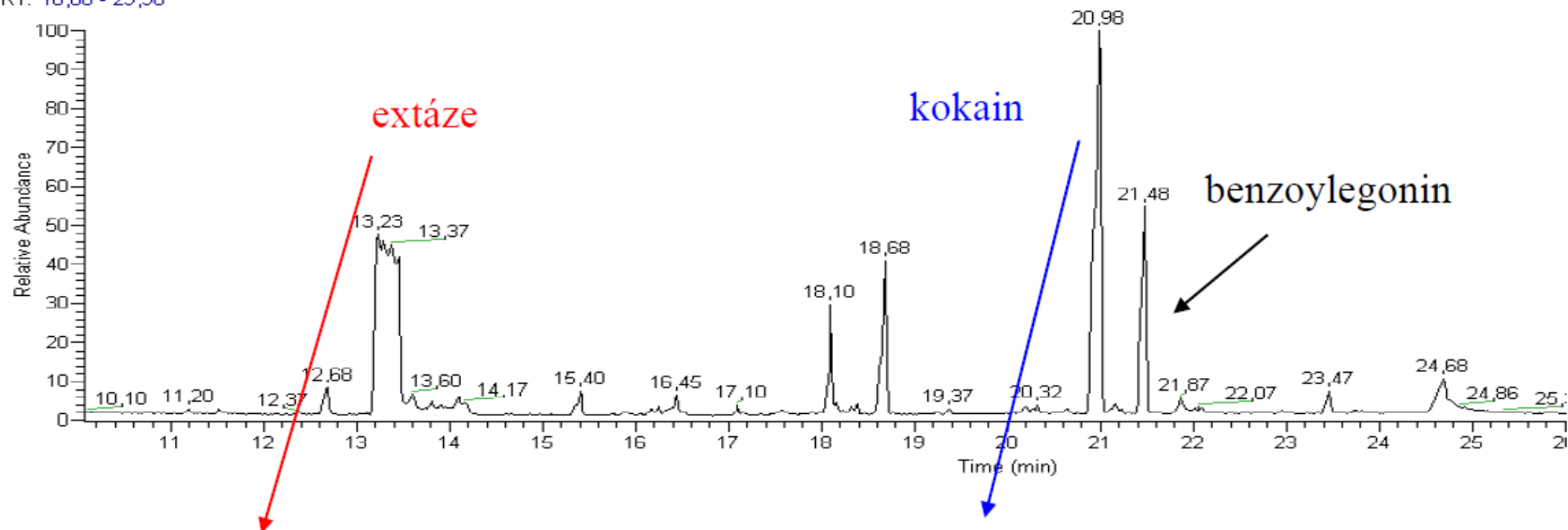
Total Ion Chromatogram – analýza 2 ml moč silylace

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

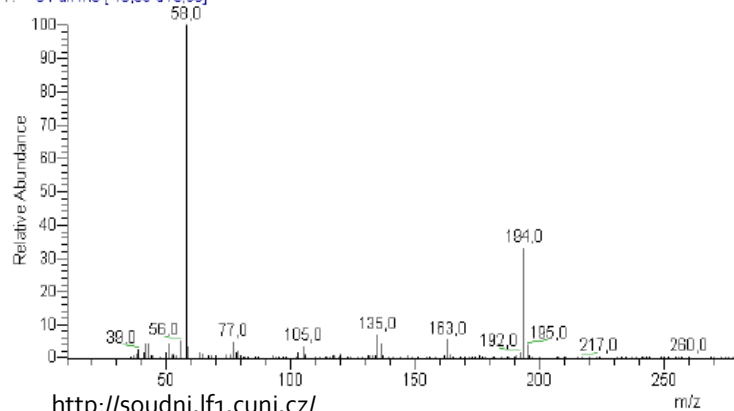
08.11.2006 20:31:20

2 ML UR,SPE BEC SCREENING FRA

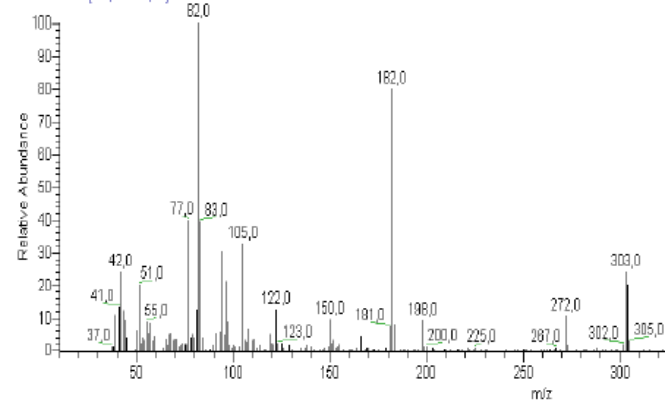
RT: 10,06 - 29,98



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/>

Tenkvrstevná chromatografie (TLC)

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



Tenkvrstevná chromatografie (TLC)

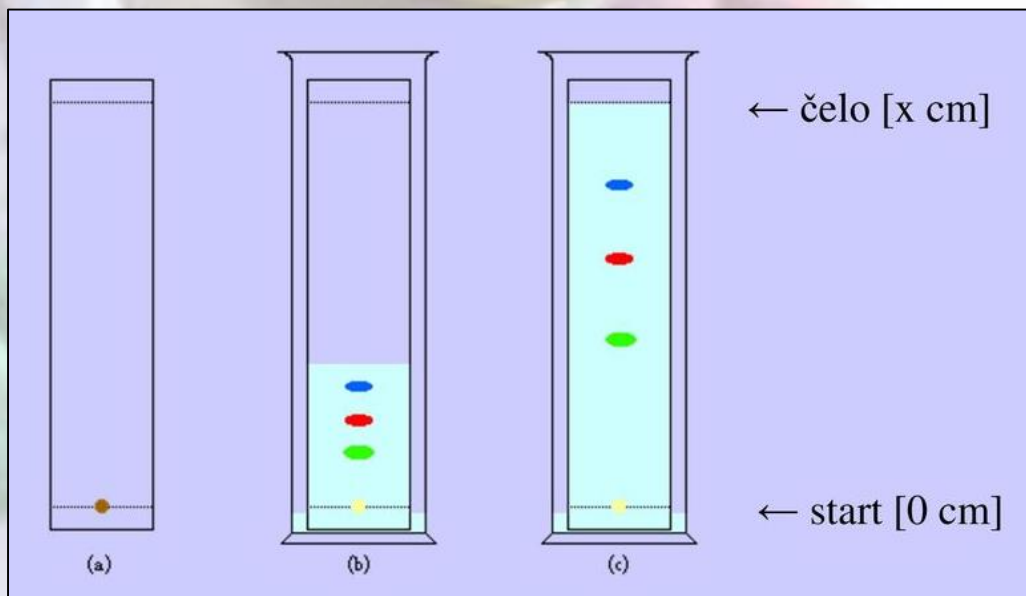
- způsob provedení:

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

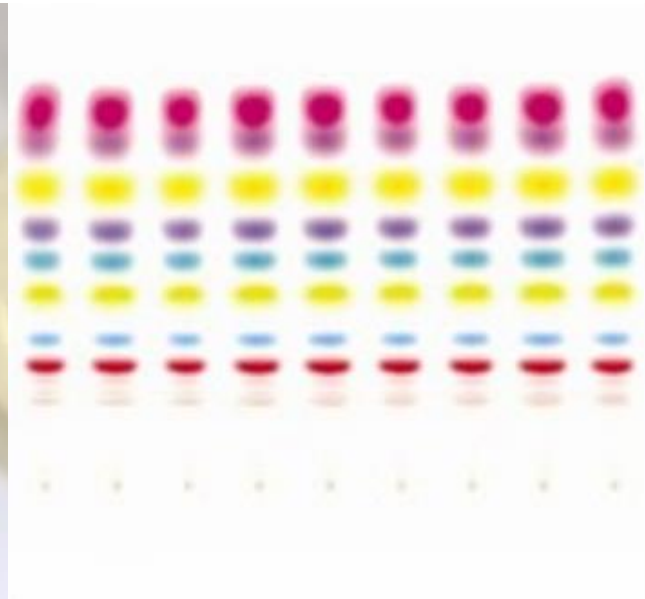
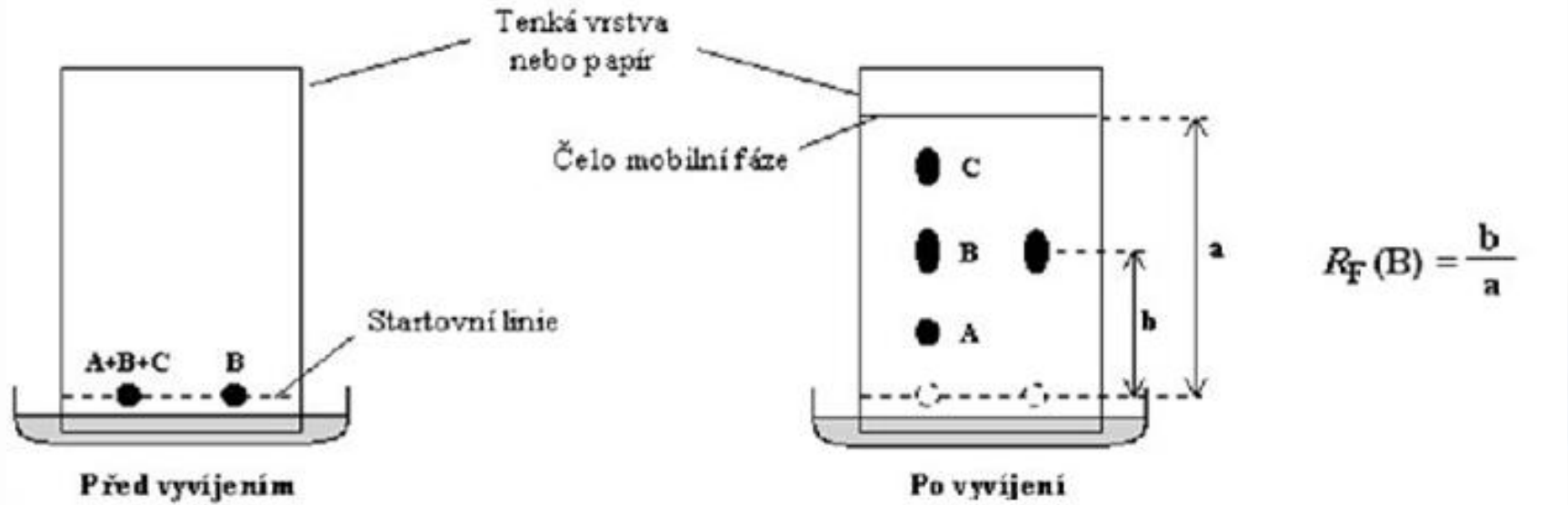
Mobilní fáze – směs organických rozpouštědel

- R_F faktor – podíl vzdálenosti středu 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)



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.soudnikarstvi.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



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
-
- $> 3\text{‰}$: 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