

Screeningové metody v toxikologii

M. Balíková

Ústav soudního lékařství a toxikologie

1. LF UK a VFN v Praze

Noxy v toxikologické laboratoři dle požadavků na vyšetření:

- ❑ (Anorganické látky, kovy)
- ❑ Kouřové plyny, CO
- ❑ Plynné a těkavé organické látky, alkoholy
- ❑ Méně těkavé organické látky, glykoly
- ❑ Organické extraktivní noxy, léčiva, návykové látky

Toxikologická laboratorní diagnostika – komplexní úkol

- 1) anamnéza, účinky nox
- 2) farmakokinetika, biotransformace
- 3) analyticko-chemické adekvátní řešení

Typické nálezy z praxe

Pacient	Anamnestické údaje	Laboratorní toxikologické nálezy
M-26 let	Hluboké kóma, těžká hypotenze, srdeční dysrytmie, anurie, suspektně toxikoman nebo epileptik	ŽO: prothiaden Sérum: prothiaden 10590 ng/ml northiaden 455 ng/ml (ter. rozmezí 50 – 150 ng/ml)
Ž-20 let	Somnolentní Suspektně alkohol, brufen	Krev: ethanol 2,69 g/kg Sérum: alprazolam 59 mg/ml (ter. rozmezí 5-50 ng/ml) ŽO: ibuprofen, kodein, fluoxetin Moč: ibuprofen + metab., kodein, fluoxetin, salicyláty, kofein
M-21 let	Bezvědomí, křeče	Moč: methamfetamin, amfetamin, efedrin, metabolity bromazepamu
Ž-21 let	Bezvědomí, oběhové selhání, Sectral 20 tbl. x 400 mg, úmrtí - sebevražda	ŽO: acebutolol Moč: acebutolol + metab.
M-53 let	Bez potíží, omylem 2 loky FRIDEXU před 45 min	Sérum: EG 337 ng/ml Moč: EG 9640 ng/ml

Dvojí typ toxikologických analýz

Cílená potvrzovací analýza - existence podezření

Systematická toxikologická analýza (STA):

- 1) Vyhledávání neznámé noxy, screening, detekce
- 2) Potvrzení předpokládané noxy, identifikace individua
- 3) Případná kvantifikace známé látky, stanovení

1 + 2 = průkaz

**Základní princip v toxikologii:
potvrzování výsledků nezávislými metodami**

Toxikologické analýzy - 1

- ❑ STA - systematické vyhledávání neznámé noxy
- ❑ Cílené analýzy: rozlišení nox určité skupiny
 - potvrzení předpokládané noxy
 - kvantitativní analýzy

Organické noxy - Kombinace metod v současnosti:

- ✓ imunochemických
- ✓ chromatografických
- ✓ spektrálních

Toxikologické analýzy - 2

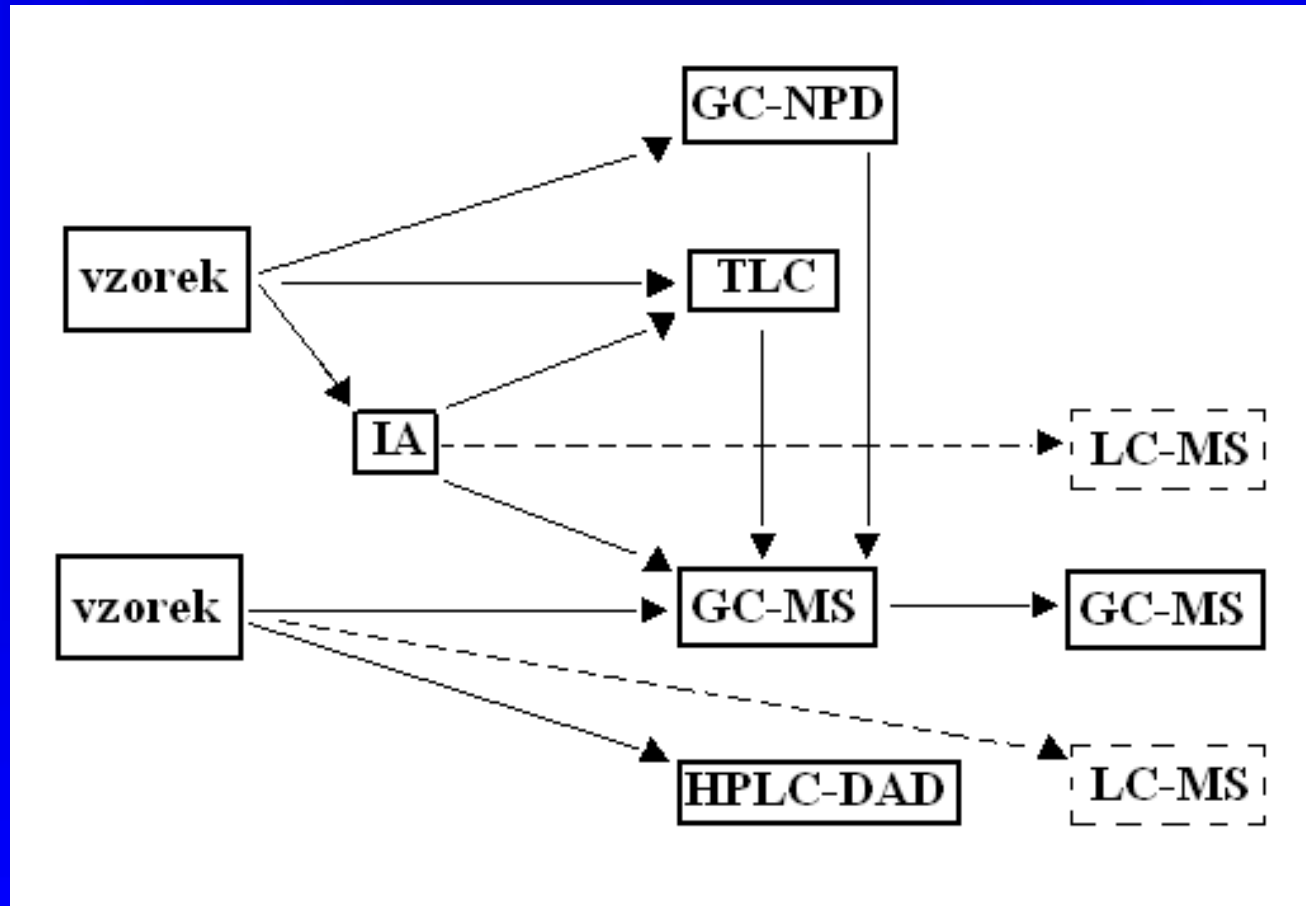
Dnešní analytické metody pro organické noxy:

Typ metody	Některé varianty
IA	EMIT, FPIA, CEDIA, KIMS.....
TLC	UV, detekce chemická
HPLC	Refraktometrie, EC, UV, DAD
LC-MS, LC-MS/MS	ESI, APCI
GC	TCD, FID, NPD, ECD
GC-MS, GC-MS/MS	EL, PICL, NICI

Forenzně toxikologický standard pro organické látky:
chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií

(WADA, SOFT, TIAFT)

STA - organické extraktivní noxy průkaz neznámé látky



Imunochemické metody v toxikologii-1

Princip:

Interakce cílové molekuly (antigen) s protilátkou

Kompetice měřeného analytu (léčivo) ve vzorku = antigen Ag (hapten) se značenou formou téhož analytu = antigen Ag* o vazebná místa na fixním množství protilátky = antibody Ab za vzniku biospecifické vazby za tvorby imunokomplexů:



Podíl vázaného značeného analytu je nepřímo úměrný koncentraci měřeného analytu ve vzorku

Imunochemické metody v toxikologii-2

Měřitelný signál - značená droga nebo protilátka

Značení: *radioizotopem (RIA)

*enzymem (EMIT, CEDIA, ELISA)

*fluorescenční látkou (FIA, FPIA)

*chemiluminiscenční látkou (LIA) ...

Metody heterogenní: separace značené drogy vázané v imunokomplexu od volných značených molekul v roztoku
- všechny metody RIA - vyšší citlivost po separaci
Metoda ELISA - měřena značená protilátka vázaná

Metody homogenní: bez separace frakcí, jednodušší, rychlejší - optické metody enzymové, fluorescenční.....

Imunochemické metody v toxikologii-3

Antigeny Ag : makromolekuly (polymery, peptidy, proteiny)

- ❑ navozují specifickou imunitní reakci
- ❑ specificky reagují s protilátkami

Hapten: nízkomolekulární látka (léčivo) navázaná na vysokomolekulární nosič

Protilátky Ab: bílkoviny (glykoproteiny)

- ❑ vykazují specifickou vazebnou schopnost vůči antigenu na jehož podnět se vytvořily

Enzymové imunometody v toxikologii

EMIT : Enzyme **M**ultiplied **I**munoassay **T**echnique

- ❑ značení enzymem bakteriální glukóza-6-fosfát dehydrogenáza (G6PDH)
- ❑ nízká koncentrace analytu Ag - zůstává větší množství volné protilátky Ab
- ❑ nevázaná protilátka inhibuje enzym ve značeném Ag* tedy snižuje jeho aktivitu
- ❑ vysoká koncentrace analytu Ag - méně volné protilátky - větší aktivita enzymu
- ❑ fotometrické měření enzymové aktivity, 340 nm
substrát NAD → NADH

Typy imunometod - typy protilátek

1) Screeningové - záchytové metody pro skupiny látek Orientační metody

Protilátky záměrně připraveny pro záchyt skupiny strukturně blízkých látek - **např. barbituráty**

2) Kvantitativní metody pro stanovení specifikované látky

Protilátky cíleně připraveny proti determinantní struktuře, která je specifická jen pro jedno chemické individuum - **např. fenobarbital**

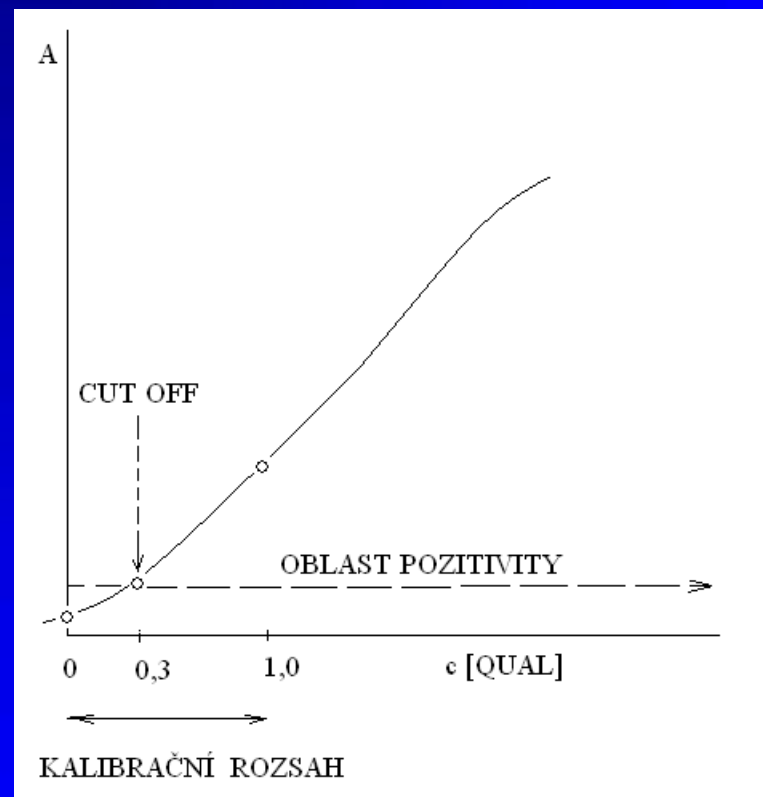
Imunochemický screening

Cut off value

Uzanční hodnota

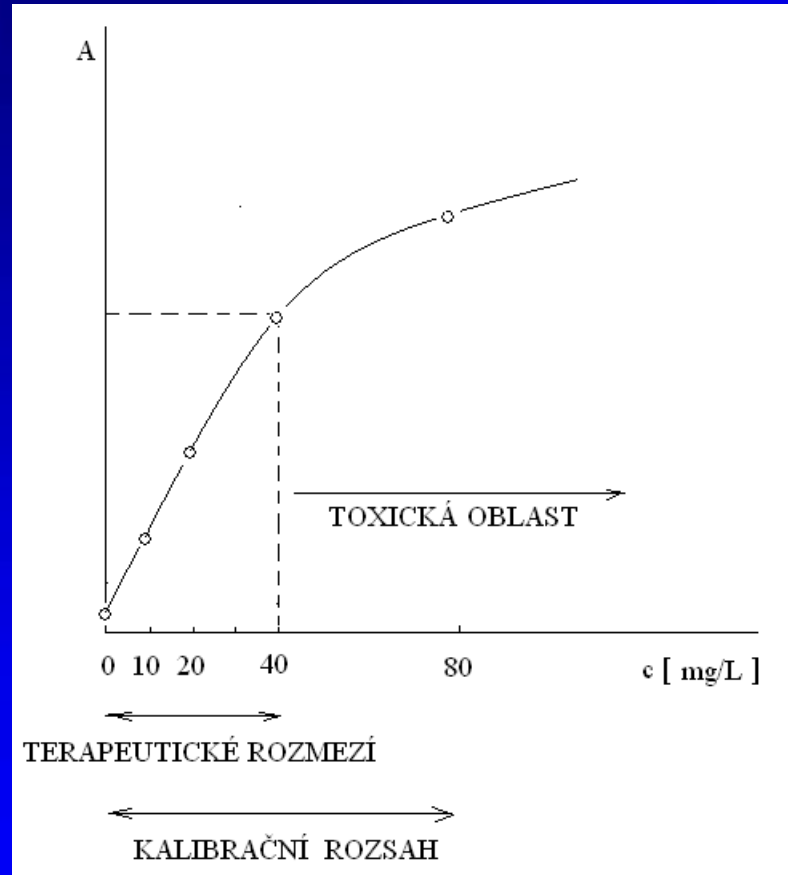
Pomocí kalibrátoru na jednu látek ze skupiny nastavení hranice mezi pozitivními a negativními vzorky

Např. záchyt barbiturátů v moči bez jejich rozlišení



Imunochemické stanovení

EMIT stanovení
fenobarbitalu v séru



Imunochemický screening

Interpretace

- ❑ křížové reakce - různá reaktivita příbuzných látek: morfin-glukuronidy, 6-acetylmorfin, kodein, dihydrokodein, hydrokodon, hydromorfon, oxykodon, levorfanol
- ❑ křížová reaktivita závisí na typu protilátky použité metody, značná variabilita v selektivitě metod
- ❑ pozitivní detekce opiátů ve směsi bez znalosti jejich zastoupení neodpovídá kvantitě (!)
- ❑ výskyt falešné positivity
- ❑ výskyt falešné negativity

FP - Falešná pozitivita

- Záchyt ve screeningu není závěrem vyšetření
- Není průkazem konkrétní noxy (drogy)
- Vyhýbáme se raději pojmu pozitivní
- U všech typů imunoscreeingů je možná FP
Numerické hodnoty z analyzátoru neodpovídají kvantitě, jsou sumární hodnotou reaktivit různých látek. Slouží jen vnitrolaboratorní potřebě

Např. záchyt amfetaminů může být způsoben:

- a) pervitin, extáze, efedrin...
- b) zvýšené endogenní aminy (např. při stresu...)
- c) aminy z potravy (tyramin, cyclohexylamin...)
- d) hnilobné aminy (beta-fenylethylamin, tyramin...)

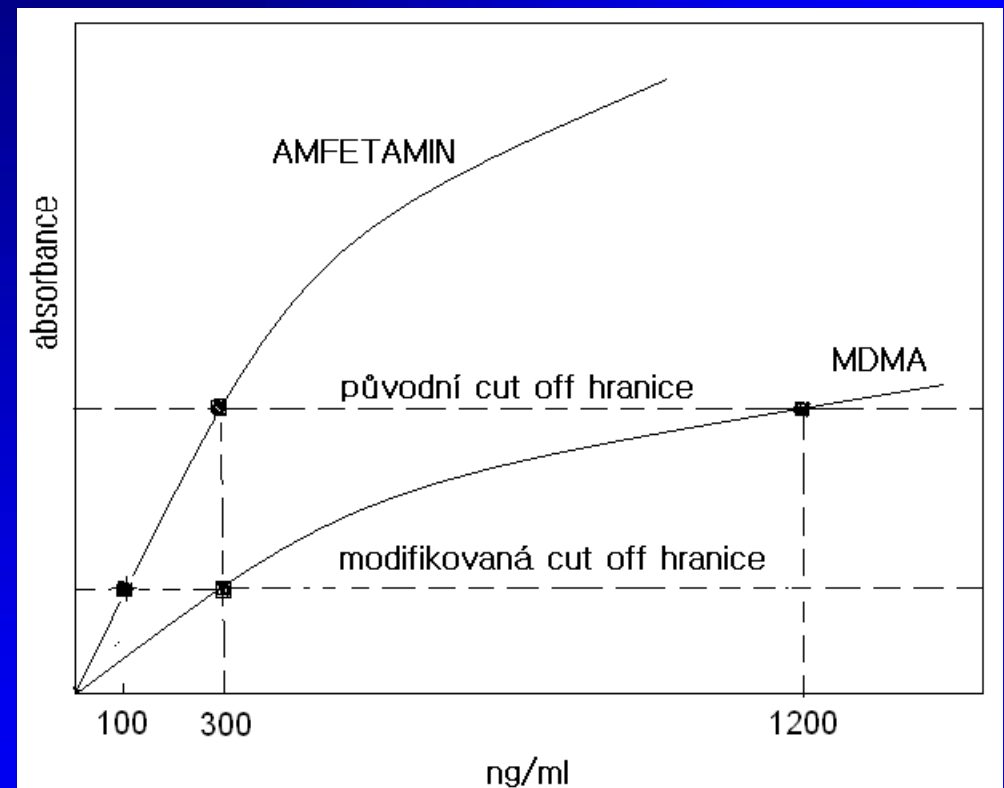
Imunochemický screening

Nastavení cut-off hodnoty

Léčiva - nastavení podle toxických hodnot - problém variability toxicity uvnitř skupiny (benzodiazepiny)

Návykové látky - USA legislativa pro vybrané skupiny NL

Klinický analyzátor - flexibilní nastavení cut-off dle účelu



Imunochemický screening Předávkování benzodiazepiny

Př. EMIT

Kalibrace diazepam

INTOXIKACE

BENZODIAZEPINY ?

Farmakologická
potence - variabilní

Variabilita dávkování

Variabilní hladiny

Řešení: **snížení původní cut off hodnoty (10 ng/ml)**

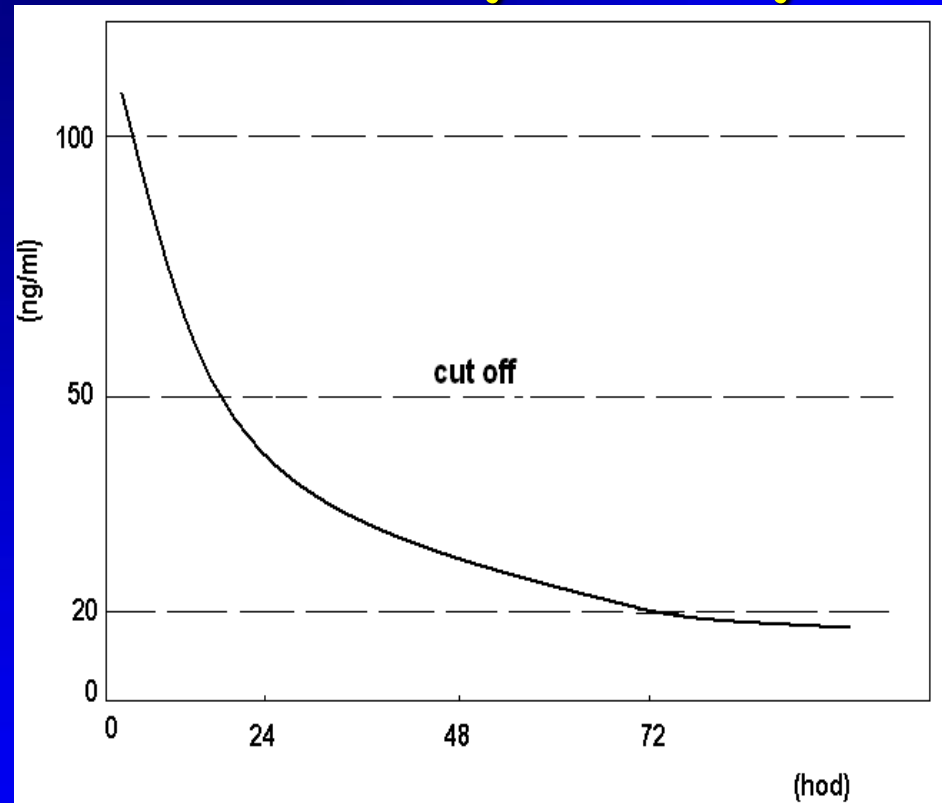
	EMIT reaktivita (ng/ml)	Terapeutické rozneží (ng/ml)
NOXA		
DIAZEPAM	> 300	20 – 2000
OXAZEPAM	> 2000	100 – 1500
LORAZEPAM	> 2000	80 – 250
CLONAZEPAM	> 2000	5 – 150
NITRAZEPAM	> 2000	30 – 90
FLUNITRAZEPAM	> 2000	5 – 15
BROMAZEPAM	> 2000	80 – 200
aj.	> 2000	

Mez záchyty (cut off) Různé metody a různé výsledky

Př.

Doba záchyty
kanabinoidů v moči

Vylučování metabolitu
THCOOH močí
standardní cigareta
marihuany s obsahem
27 mg 9-THC



Snížení meze záchyty - optimalizace výsledků FN/FP
Nutnost potvrzování specifickou metodou např. GC-MS

Imunochemický screening - Selektivita

Falešná pozitivita (FP) : záchyt nechtěných látek

- ❑ interferují nesledované příbuzné látky (aminy)
- ❑ inteferují strukturně odlišné noxy ve vysokých koncentracích (metabolity některých léčiv)

Falešná negativita (FN) :

- ❑ v zaměřené skupině nereagují všechny strukturní deriváty (deriváty amfetaminu)
- ❑ nastavení cut off hodnoty neodpovídá účelu vyšetření (benzodiazepiny při předávkování)
- ❑ záměrná manipulace se vzorkem, ředění moče, přidavek adulterantů (glutaraldehyd, bělidla)

Imunochemický screening

Specificita protilátek metody

- Různé metody (EMIT, CEDIA, FPIA...) – různá specificita protilátek, různé křížové reakce pro individuální látky – variabilní úhrnná skupinová odezva metody – orientační výsledek, nutné potvrzení, interpretace jako semikvantita je nesprávná!
- **Př. záchyt aminů v moči a výsledná numerická hodnota:**
 - a) metoda EMIT : numerický výsledek **24**
(interpretace – bez záchytu)
 - b) metoda CEDIA: numerický výsledek **550**
(interpretace – suspektní záchyt)

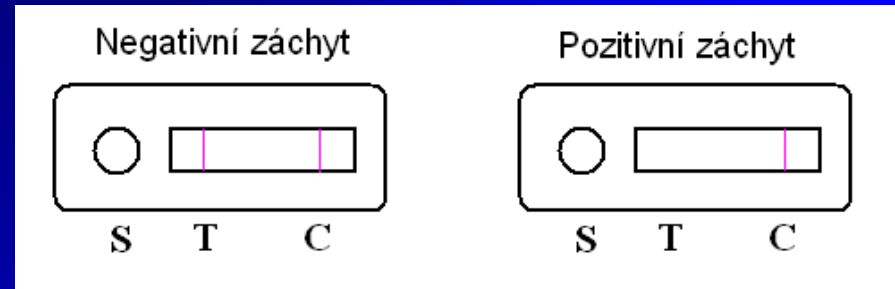
POZOR: Numerická hodnota imunozáchytu použité metody je pouze relativní číslo – **není semikvantita !!!**
Nemá vztah ke konkrétní substanci

Terénní imunochemické testy

S - značená protilátka

T - vázaná droga

C - kontrola validity testu



Vývoj terénních kazetových testů „point of care“
původně pro moč, později také sérum, sliny

Modifikace ELISA - „lateral flow immunoassay“

Protilátka - často značena koloidálním zlatem
nebo barevnými částicemi latexu

Intenzita barevné linie (**T**) je nepřímo úměrná záchytu

Vizuální nebo digitální odečet zbarvení

Pevné hodnoty „cut off“

Imunochemický screening - souhrn

Přednosti v toxikologických aplikacích:

- ❑ Úprava vzorku žádná nebo minimální
- ❑ Vysoká citlivost
- ❑ Rychlé získání výsledku
- ❑ Vstupní náhled - zaměření na cílená potvrzení
- ❑ Snadné technické provedení
- ❑ Nároky na kvalifikaci, zacvičení malé
- ❑ Možnost automatizace v sériových kontrolách

Nevýhody:

- ❑ Nepokrývá řadu potencionálních nox ve vzorku
- ❑ Nerozlišuje jednotlivé noxy, interference

Finance:

Stálý přísun
spotřebních
reagencií

Chromatografický záchyt nox

Přednosti

- ❑ Široká škála záchytu předem neznámých organických extraktivních nox
- ❑ Flexibilní otevřené systémy – aktualizace a rozšiřování
- ❑ Záchyt individuálních substancí – nikoliv skupin
- ❑ Větší selektivita záchytu

Nevýhody

- ❑ Nutná úprava vzorku – extrakce
- ❑ Časově náročnější získání výsledku
- ❑ Odborně personálně náročnější

Finance:

Investice -
(vyjma TLC

Provozní náklady
nižší než IA

Tenkovrstevná chromatografie TLC

Schéma záchyty kodeinu a volných met.
v extraktu moče (U_A) pH~10

Adsorbent : Kieselgel G Merck

Základní mob. fáze: octan ethylnatý-ethanol-amoniak 36:2:2

Barevná detekce: modif. činidlo Dragendorffovo (Kaiser-Jori)

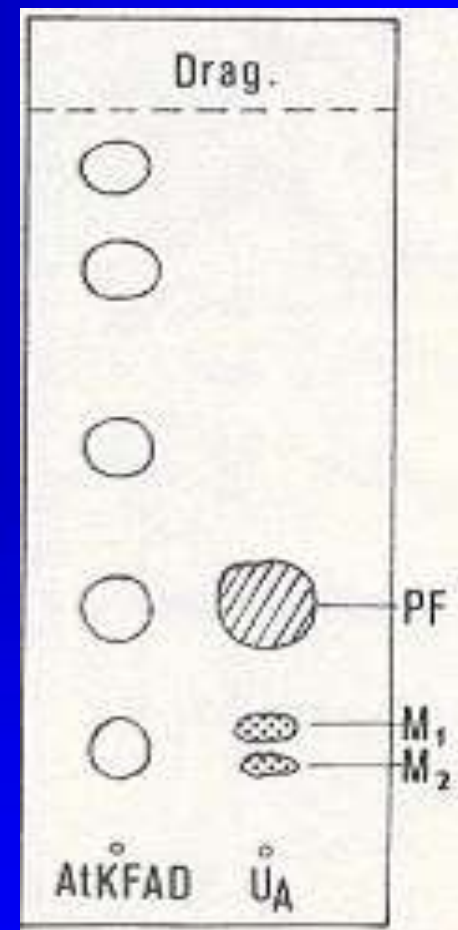
Směs referenčních standardů AtKFAD

Záchytový systém TLC-CR - indikátory:

- 1) Extrahovatelnost - acidobazicitá noxy
- 2) Poloha skvrn vůči referenci AtKFAD
- 3) Barevný odstín se sadou detekč. reag.

→ Výběr kandidátů nox pro potvrzení či vyloučení - identifikace noxy

Nutná standardní srov. substance !!!

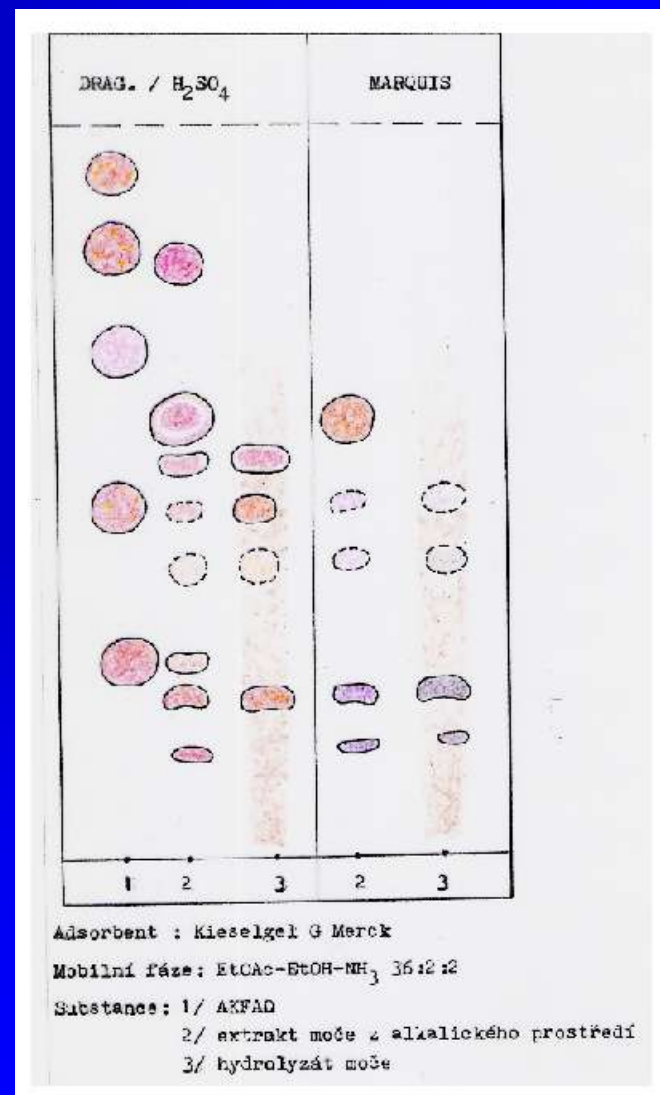


TLC reálný chromatogram Extrakt moče

System J. Večerková

Podezření na intoxikaci
opiáty a methamfetaminem,
(vedlejší detekce nikotin)

Následné upřesnění GC-MS



TLC screening neznámých nox

Výhody:

- 1) Nulové investice, provozní náklady nízké
- 2) Otevřený a flexibilní systém
- 3) Záchyt chemických individuí

Nevýhody:

- 1) Nemusí postačovat v nízkých koncentracích (krev)
- 2) Nároky na větší objem vzorku
- 3) Separační účinnost nemusí postačovat (srov. GC...)
- 4) Dostupnost referenčních substancí, hl. metabolitů
- 5) Specializovaný, zaškolený personál

Plynová chromatografie se specifickou detekcí GC-NPD

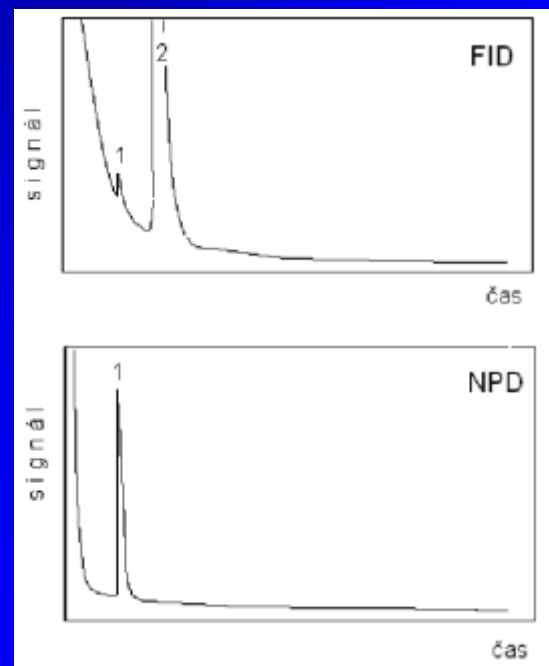
Plynová chromatografie - značná separační účinnost

- ❑ Menší objemy vzorků ve srov. s TLC
- ❑ Větší nároky na čistotu extraktů

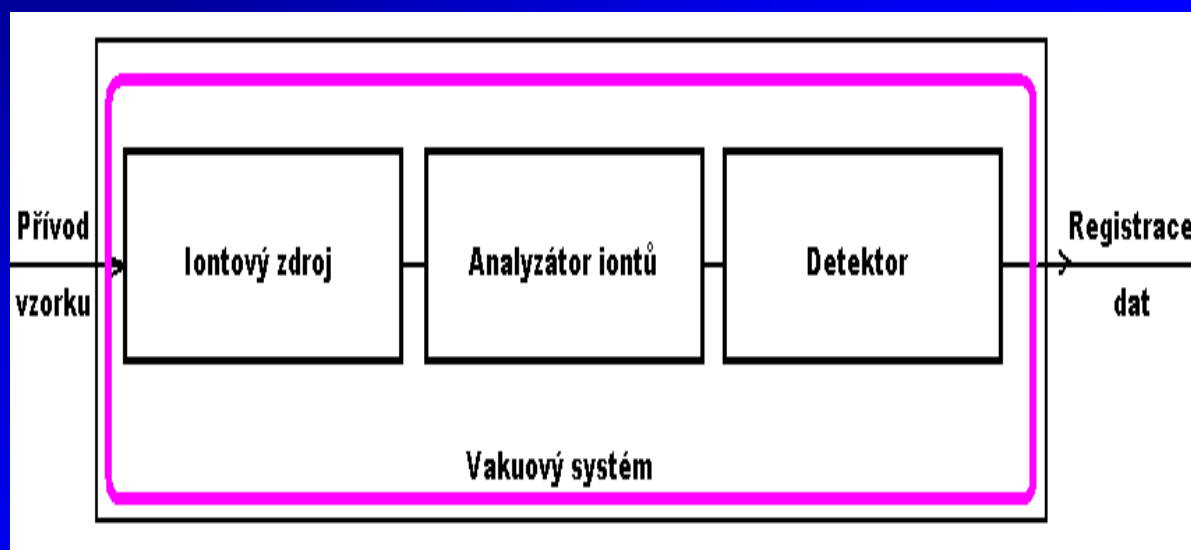
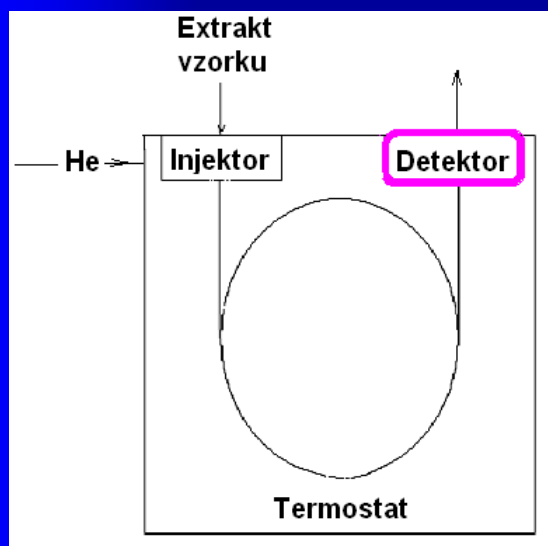
Specifická detekce NPD:

*látky s dusíkem či fosforem,
většina léčiv a drog, alkaloidy aj.*

- ❑ Potlačen signál rozpouštědla
- ❑ Retenční charakteristika noxy
- ❑ Možná koeluce více látek
- ❑ Nepostačuje k identifikaci noxy
- ❑ Nutné potvrzovací kroky



Plynový chromatograf s hmotnostní detekcí GC-MSD



GC

SEPARACE

MSD

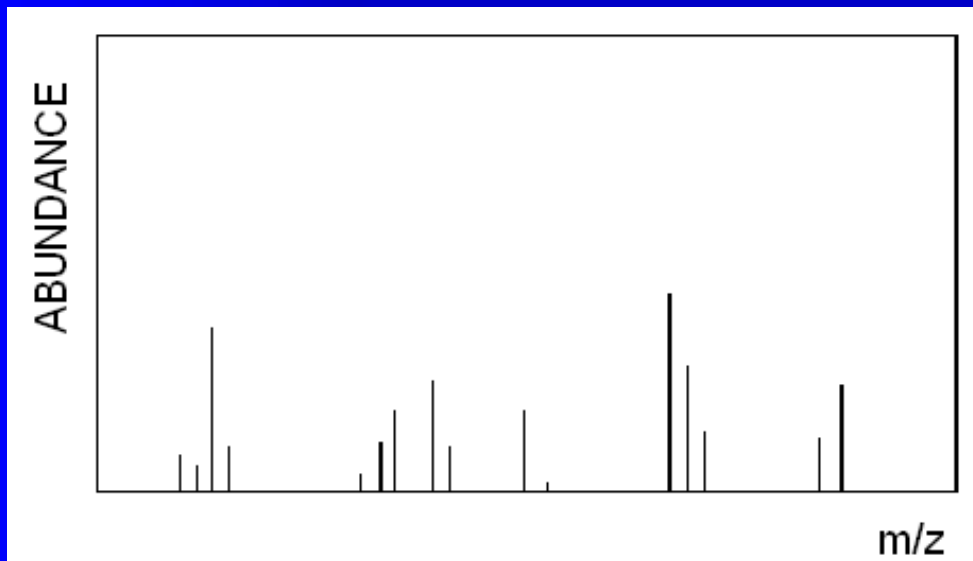
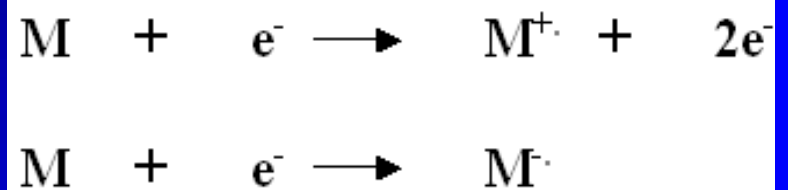
DESTRUKČNÍ DETEKCE

Hmotnostní spektra

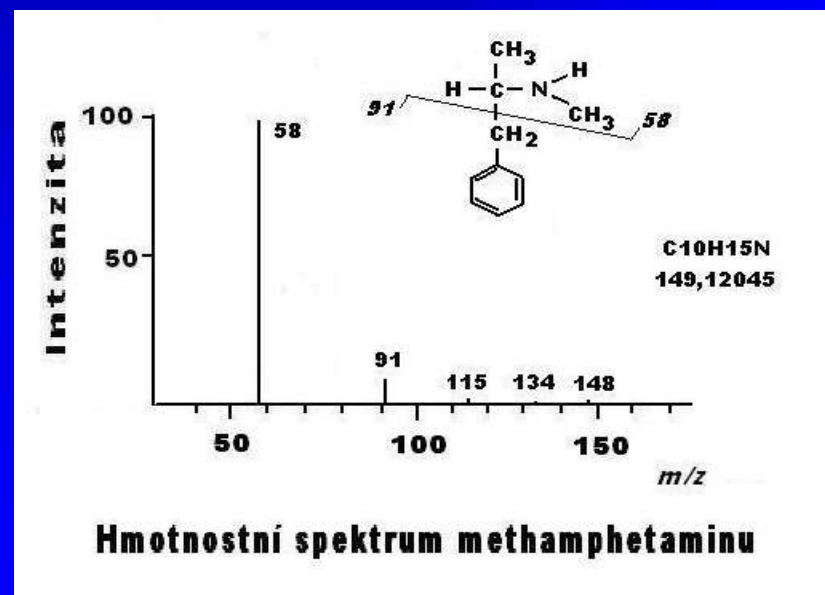
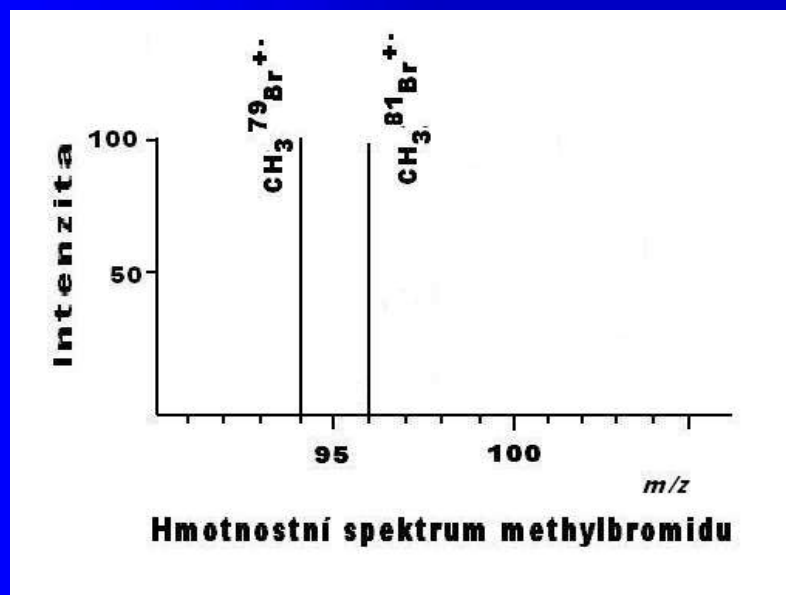
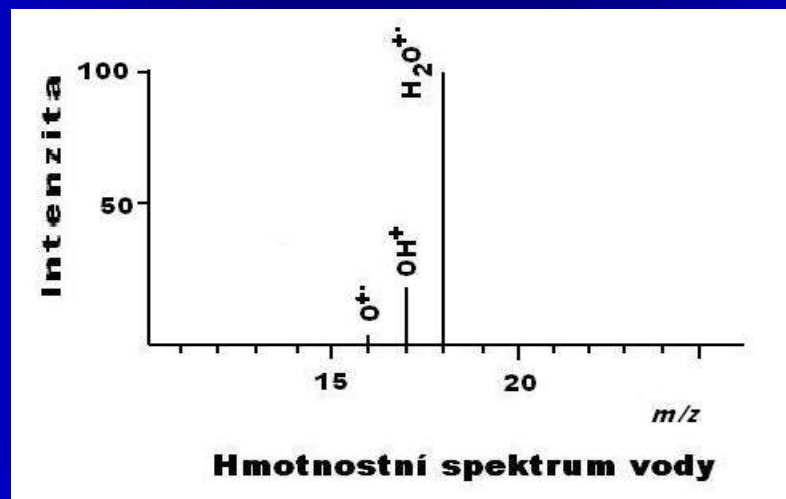
Reprodukovatelná fragmentace vstupujících molekul do iontového zdroje dle energie strukturálních vazeb

Databáze spekter - spektrální knihovny

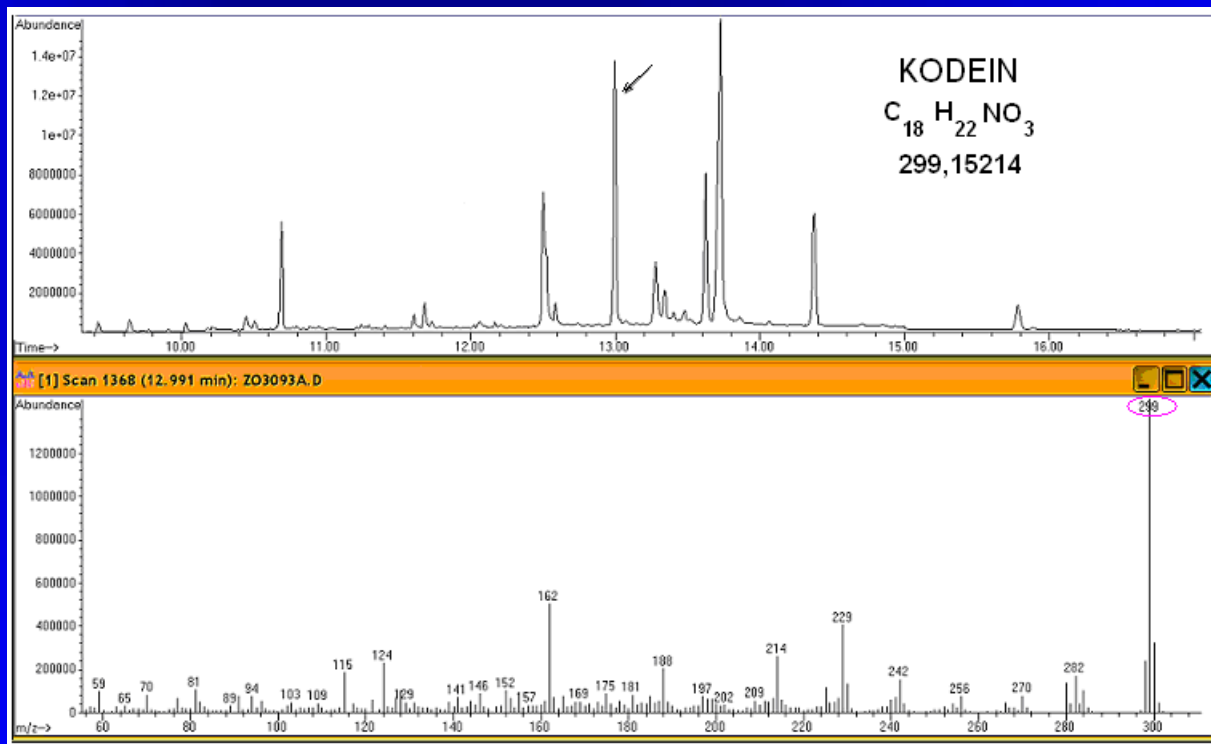
Ionizace nárazem elektronů :



Příklady hmotnostních spekter



Tandemová plynová chromatografie s hmotnostní detekcí GC-MS

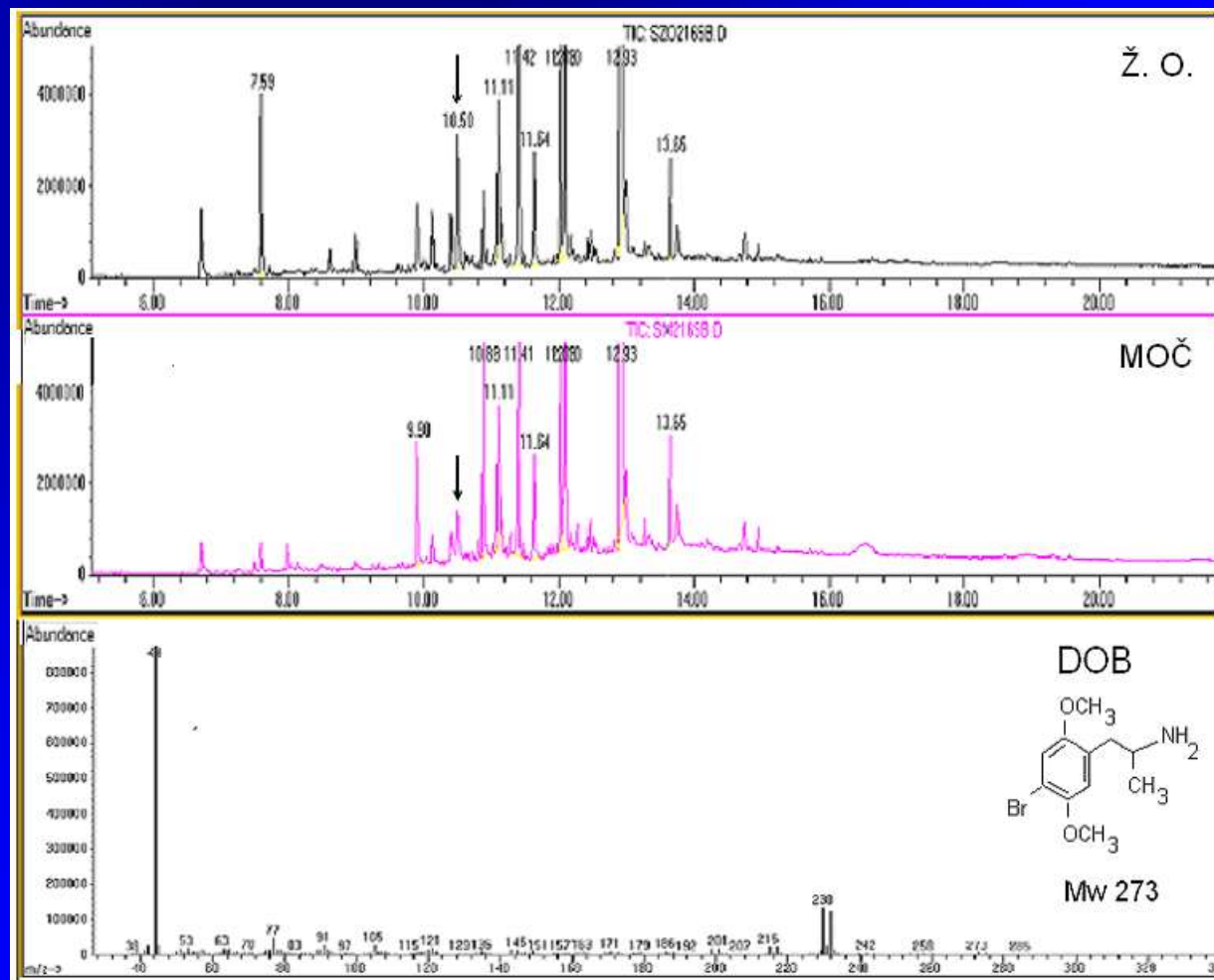


Kodein: M^+ (299) kvazimolekulární ion

GC-MS screening neznámé noxy

Extrakty bazí
ethylacetátem
pH 10 - 12

Porovnání s
knihovnou
spekter



GC-MS potvrzení po acetylaci

Extraktivní
acetylace
hydrolyzátu
moče

Porovnání p. f.
po acetylaci s
vlastním
standardem

Suspektně
metabolit (?)

