

# Laboratorijska obrada akutno intoksiciranog pacijenta

---

Štingl, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:470557>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska**  
**dijagnostika**

**Kristina Štingl**

**LABORATORIJSKA OBRADA AKUTNO**  
**INTOKSICIRANOG PACIJENTA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska**  
**dijagnostika**

**Kristina Štingl**

**LABORATORIJSKA OBRADA AKUTNO**  
**INTOKSICIRANOG PACIJENTA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**

**Rad je ostvaren u:** Kliničkom bolničkom centru Osijek, Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku

**Mentor rada:** doc. dr. sc. Sanja Mandić, spec. med. biochem. i lab. medicine

Rad ima **47 listova, 3 tablice i 16 slika.**

## **Zahvala**

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Sanji Mandić na izdvojenom vremenu, iskazanom trudu, posvećenosti i susretljivosti, čija mi je pomoć uvelike olakšala pripremu i pisanje ovoga diplomskog rada. Također, zahvaljujem Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku jer mi je omogućio izvođenje praktičnoga dijela rada.*

*Zahvalu dugujem i svojim roditeljima, sestri, dečku i prijateljima koji su mi od prvoga dana bili podrška, pružili su mi pomoć kad god je bilo potrebno i bez kojih put do diplome zasigurno ne bi bio isti.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Akutna intoksikacija .....	1
1.1.1. Lijekovi .....	1
1.1.2. Sredstva ovisnosti .....	2
1.2. Metabolizam otrova .....	4
1.3. Kliničke manifestacije akutnih intoksikacija .....	5
1.4. Laboratorijska obrada pacijenta .....	6
1.5. Uzorci za toksikološku analizu .....	7
1.5.1. Urin .....	7
1.5.2. Krv .....	8
1.6. Metode u toksikološkoj analizi .....	8
1.6.1. Metode probira .....	8
1.6.2. Metode potvrde .....	9
2. HIPOTEZA .....	11
3. CILJ .....	12
4. MATERIJALI I METODE .....	13
4.1. Ustroj studije .....	13
4.2. Materijali .....	13
4.3. Metode .....	13
4.3.1. Imunokromatografska test pločica (TCA) .....	13
4.3.2. Enzimatski homogeni imunotest (EMIT) .....	16
4.3.3. Plinska kromatografija spregnuta masenom spektrometrijom (GC-MS) .....	17
4.4. Statistička analiza podataka .....	22
5. REZULTATI .....	23
6. RASPRAVA .....	28
7. ZAKLJUČAK .....	32
8. SAŽETAK .....	33
9. SUMMARY .....	34
10. LITERATURA .....	35
11. ŽIVOTOPIS .....	37

## Popis kratica

GABA	Gama aminomaslačna kiselina (engl. <i>Gamma aminobutyric acid</i> )
SŽS	Središnji živčani sustav
TCA	Triciklički antidepresivi
LSD	Dietilamid lizergične kiseline (engl. <i>Lysergic acid dietilamide</i> )
PCP	Fenciklidin
$\Delta^9$ -THC	$\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol
MDA	Metilendioksiamfetamin
MDMA	Metilendioksimetamfetamin
MDEA	Metilendioksietilamfetamin
EMIT	Enzimatski homogeni imunotest (engl. <i>Enzyme-multiplied immunoassay technique</i> )
GC-MS	Plinska kromatografija spregnuta masenom spektrometrijom (engl. <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> )
LC-MS/MS	Tekućinska kromatografija spregnuta s dvojnomo spektrometrijom masa (engl. <i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> )
SIM	Način praćenja pojedinog iona (engl. <i>Selected ion monitoring</i> )
G6PDH	Glukoza-6-fosfatdehidrogenaza
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid (engl. <i>N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i> )
TMCS	Trimetilklorosilan (engl. <i>Trimethylchlorosilane</i> )
COHP	Centar za objedinjeni hitni prijam
BAR	Barbiturati



MTD	Metadon
OPI	Opijati
AMF	Amfetamini/metamfetamini
COC	Kokain (engl. <i>Cocaine</i> )
SSRI	Selektivni blokator ponovnega unosa serotonina (engl. <i>Selective serotonin reuptake inhibitor</i> )

## **Popis tablica**

Tablica 1: Toksidromi određenih lijekova i sredstava ovisnosti.....	5
Tablica 2: Rezultati analize urina i krvi EMIT i GC-MS metodom.....	23
Tablica 3: Pojedinačni rezultati za svaku testiranu supstancu (N = 23).....	25

## Popis slika

Slika 1: Syva <sup>®</sup> RapidTest d.a.u. <sup>®</sup> TCA kit (fotografija autorice).....	14
Slika 2: Syva <sup>®</sup> RapidTest d.a.u. <sup>®</sup> TCA imunokromatografska pločica i jednokratna pipeta (fotografija autorice) .....	15
Slika 3: Nanošenje uzorka u jažicu (fotografija autorice).....	15
Slika 4: Očitavanje rezultata (negativno) (fotografija autorice).....	16
Slika 5: Siemens EMIT Viva E automatski analizator (fotografija autorice) .....	16
Slika 6: Syva EMIT II Plus set reagensa za detekciju kokaina (fotografija autorice) .....	17
Slika 7: De-tox tube A (fotografija autorice) .....	18
Slika 8: Uparavanje organskoga dijela nakon ekstrakcije (fotografija autorice) .....	19
Slika 9: Postavljanje uzorka na GC-MS (fotografija autorice) .....	20
Slika 10: Uvjeti za GC (fotografija autorice) .....	20
Slika 11: Uvjeti za MS (fotografija autorice).....	21
Slika 12: MS uvjeti za THC i THC-COOH (fotografija autorice).....	21
Slika 13: Rezultati imunokemijskoga testiranja (fotografija autorice) .....	26
Slika 14: Rezultati GC-MS metodom (kromatogram).....	26
Slika 15: Analiza pika (acetaminofen) (fotografija autorice).....	26
Slika 16: Maseni spektar analiziranoga pika (acetaminofen) (fotografija autorice) .....	27

## 1. UVOD

### 1.1. Akutna intoksikacija

Akutna intoksikacija predstavlja stanje uzrokovano naglim izlaganjem organizma prekomjernoj količini otrova. Akutno su intoksicirani pacijenti često u vrlo teškom kliničkom stanju, ponekad i životno ugroženi pa im je potrebna brza i adekvatna medicinska skrb. Većina takvih pacijenata zahtijeva hospitalizaciju na odjelu objedinjenoga hitnog prijema, a manji dio bude prebačen na jedinicu intenzivnoga liječenja. Međutim, kako kod većine akutnih otrovanja izlučivanjem otrova iz organizma prestaju i znakovi otrovanja, trajanje hospitalizacije u većine (70%) akutno otrovanih bolesnika iznosi 24 sata (1). Za razliku od akutnih otrovanja kod djece, koja su najčešće slučajna, kod odraslih se u najviše slučajeva radi o namjernim otrovanjima. Akutne se intoksikacije češće pojavljuju kod muškaraca, i to mlađih odraslih. Pravovremena identifikacija supstance, koja je uzrokovala intoksikaciju, i rano liječenje važni su za dobru prognozu. Iako je broj toksikološki značajnih akutnih intoksikacija relativno velik, smrtni su ishodi svedeni na minimum.

#### 1.1.1. Lijekovi

Kao gotovo najlakše dostupne supstance, lijekovi se s pravom nalaze pri samom vrhu uzroka akutnih otrovanja. Iako je njihova namjena prvenstveno terapijska, česti su slučajevi njihove zloupotrebe radi učinka kojega ti lijekovi pružaju korisniku. Među njima se kao najčešći izdvajaju psihofarmaci, odnosno hipnotici, antidepresivi i antipsihotici iza kojih slijede analgetici/antipiretici, odnosno nesteroidni antireumatici.

Hipnotici (sedativi) su lijekovi koji imaju depresivno djelovanje na središnji živčani sustav (SŽS). Glavni su predstavnici te skupine barbiturati i benzodiazepini. Oni se vežu za receptore gama aminomaslačne kiseline (GABA) u mozgu te tako uzrokuju sedaciju. Barbiturati su derivati barbiturne kiseline koji imaju sedativna, antikonvulzivna i anestetička svojstva. Zbog jakoga toksičnog učinka u kombinaciji s još nekim depresorom SŽS-a, najčešće alkoholom, nisu više toliko prisutni u kliničkoj praksi. Stoga su zbog bolje učinkovitosti, sigurnosti i minimalnih nuspojava barbiturate zamijenili benzodiazepini. Iako je njihova toksičnost manja od barbiturata, problem je kod tih lijekova izazivanje jake psihičke i

fizičke ovisnosti jer se nakon duže upotrebe stvara tolerancija pa pacijenti često znaju uzimati veće doze da bi postigli željeni učinak. Najznačajniji je predstavnik Diazepam.

Triciklički se antidepresivi (TCA) koriste za liječenje endogene depresije i neuropatske boli. Blokiraju ponovnu pohranu serotonina i norepinefrina čime se postiže terapijski učinak, no istovremeno se javljaju brojne nuspojave. U širokoj su upotrebi, no imaju uzak terapijski raspon, stoga se kod slučajnoga ili namjernog predoziranja mogu javiti teži simptomi kao posljedica pojačanoga farmakološkog odgovora.

U skupinu antipsihotika, koji predstavljaju još jednu skupinu često zloupotrijebljivanih lijekova, pripadaju fenotijazini. Koriste se za liječenje psihijatrijskih poremećaja (shizofrenije, bipolarnoga poremećaja), no dio se upotrebljava i u obliku antiemetika i antihistaminika. Njihovo je glavno djelovanje blokada dopaminskih D<sub>2</sub> receptora kao i ostalih receptora (histaminskih, muskarinskih, adrenergičnih) u SŽS-u čime se smanjuju psihotični simptomi, međutim česte su i nuspojave. Iako su relativno sigurni ako se koriste samostalno, u kombinaciji s drugim lijekovima mogu dovesti do težih intoksikacija.

Neopioidni su analgetici lijekovi koji se koriste za smanjivanje bola, bez učinka na SŽS (ne uzrokuju gubitak svijesti). Dva su najčešće korištena: acetaminofen i salicilati. Acetaminofen je vrlo opasan u povišenim koncentracijama jer ima izrazitu hepatotoksičnost. Salicilati pripadaju velikoj skupini nesteroidnih antireumatika te se zbog dokazanoga antitrombotičnog djelovanja klinički češće primjenjuju kao profilaktička terapija za kardiovaskularne bolesti. U slučaju predoziranja, njihovo produljeno izlučivanje i pojačan farmakološki učinak rezultiraju teškom kliničkom slikom takvih pacijenata.

### **1.1.2. Sredstva ovisnosti**

Sredstva se ovisnosti definiraju kao supstance koje se radi svoga određenog učinka na organizam i stvaranja osjećaja ugone zloupotrijebljavaju, odnosno stvaraju potrebu korisnika za stalnim uzimanjem, što dovodi do nastanka ovisnosti. Sredstva se ovisnosti dijele prema: farmakološkom djelovanju (opijati/narkotici, halucinogeni, stimulansi SŽS-a, depresori SŽS-a), podrijetlu (prirodna, polusintetska, sintetska) i kemijskim svojstvima (kisela, bazična, neutralna, amfoterna).

## 1. UVOD

Opijati ili narkotici su sredstva ovisnosti prirodnog, polusintetskog i sintetskog podrijetla koji uzrokuju analgeziju. Glavni su opijati opijum, njegov alkaloid morfin, heroin, kodein i metadon. Opijum je prirodni narkotik dobiven od nezrelih glavica bijeloga maka. Ono je, što ga čini jakim analgetikom, prisutstvo njegovih aktivnih supstanci zvanih alkaloidi, od kojih su najvažniji morfin, kodein, tebain, noskapin i papaverin. Morfin je glavni alkaloid opijuma. Kodein je slabijega analgetskog učinka te je zbog djelovanja na refleks kašlja najčešće prisutan u antitusicima. Heroin je polusintetska supstanca gotovo trostruko jačega učinka od morfina koja učestalom upotrebom izaziva jaku ovisnost. Metadon je sintetski opijat s jakim analgetskim učinkom koji se zbog uzrokovanja apstinencijskoga sindroma koristi za odvikavanje ovisnika od opijata, ali ujedno izaziva ovisnost.

Halucinogeni su skupina sredstava ovisnosti koji uzrokuju halucinacije i tzv. *tripove*, odnosno vizualne ili auditivne događaje bez odgovarajućega vanjskog podražaja. Uzrokuju subjektivne promjene u percepciji, mislima i svijesti. Prema podrijetlu dijele se na prirodne (kanabinoidi, psilocibinske gljive, meskalin), polusintetske (dietilamid lizergične kiseline; LSD) i sintetske halucinogene (fenciklidin; PCP). Ono je, što ih razlikuje od ostalih sredstava ovisnosti, to što ne izazivaju fizičku i psihičku ovisnost. Kanabis je najčešće korištena ilegalna droga u Republici Hrvatskoj. Nazivi kanabis, marihuana ili hašiš se odnose na cvjetove, lišće, stabljike i sjemenke vrste konoplje *Cannabis Sativa* (2). Različiti pripravci kanabisa variraju u postotku  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinola ( $\Delta^9$ -THC-a), glavne psihoaktivne komponente kanabisa zaslužne za djelovanje na psihološko stanje čovjeka.

Stimulansi imaju aktivirajuće djelovanje na SŽS. Njihovi su predstavnici amfetamini (metamfetamini), kokain i efedrin. Amfetamini su velika skupina stimulansa kojoj pripadaju amfetamin, metamfetamin, metilendioksiamfetamin (MDA), metilendioksimetamfetamin (MDMA) i metilendioksietilamfetamin (MDEA). Kokain je najjači prirodni psihostimulans koji čestim korištenjem izaziva ovisnost i ostavlja teške posljedice na organizam. Efedrin je također prirodan stimulans sličnoga djelovanja kao amfetamini i adrenalin, najčešće prisutan u sastavu kapi za nos i lijekova protiv astme.

## 1.2. Metabolizam otrova

Da bi se bolje razumjelo djelovanje supstanci, odnosno njihovih metabolita na organizam, važno je poznavati njihov metabolizam tj. apsorpciju, distribuciju, biotransformaciju i izlučivanje.

Unosom određene toksične tvari preko kože, probavnog, respiratornog trakta ili nekoga drugog puta unosa započinje apsorpcija. Stanična membrana predstavlja glavnu barijeru prolazu stranih tvari na putu toksikanta iz vanjske sredine do ciljnog mjesta u organizmu (3). Bilo pasivnim transportom (difuzija) ili aktivnim transportom (endocitoza, kotransport), toksini se apsorbiraju i odlaze u krvotok gdje se dalje odvija distribucija.

Nakon ulaska u krvotok toksična tvar raspodjeljuje se u organe i tkiva. Na raspodjelu tvari prvenstveno utječe prokrvljenost ciljnih tkiva, raspoloživost mjesta vezanja, fizikalno-kemijska svojstva tvari, pH okoline i afinitet tvari za određene dijelove tkiva.

Biotransformacija se odvija uglavnom u jetri, u periodu apsorpcije u krvotok i eliminacije, i to u 2 faze. Reakcijama se 1. faze (oksidacija, redukcija, hidroliza) događaju promjene u strukturi toksičnih tvari. Tim se putem ksenobiotici uglavnom inaktiviraju, međutim neki postaju farmakološki aktivni, nekad i više od izvornoga spoja. U reakcijama se 2. faze odvija konjugacija s endogenim spojevima: glukuronskom i sulfatnom kiselinom, glicinom i glutationom. Tako nastaju inaktivirani, polarniji i topljiviji spojevi koji se lakše izlučuju iz organizma.

Eliminacija se toksičnih tvari odvija različitim putovima, od kojih je najznačajniji bubrežni. Osim bubrezima, ksenobiotici i njihovi metaboliti nakon konjugacije dopijevaju u žuč, a potom se izlučuju fecesom. Eliminacija je otrova moguća i drugim putovima, ali su oni manje značajni.

Općenito, na sam metabolizam toksikanata utječe mnogo čimbenika: dob, spol, genetski čimbenici, oštećenja ekskretornoga sustava jetre/bubrega, sama priroda toksina, interakcije s drugim supstancama itd. Stoga je potencijalni toksični učinak toksina na organizam različit i individualan, kao i odgovor organizma na njegovu prisutnost.

### 1.3. Kliničke manifestacije akutnih intoksikacija

Učinci su toksičnih supstanci uvjetovani njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, količinom uzete supstance, načinom unošenja, interakcijom s nekim drugim supstancama, dobi, spolom i zdravstvenim stanjem pojedinca. S obzirom na vrijeme pojavljivanja u odnosu na dozu, štetni učinci mogu biti brzi ili odgođeni (4). Oni mogu napraviti reverzibilnu ili ireverzibilnu štetu na organizmu. Važnu ulogu u jačini učinka ima i tolerancija, odnosno smanjena osjetljivost organizma na djelovanje nekoga toksina nastala zbog prijašnje izloženosti. Ovisno o tome o kojoj se supstanci radi i koji receptorski sustav ta supstanca pobuđuje, različiti su i klinički znakovi otrovanja tzv. toksidromi. Toksidrom predstavlja karakteristične i tipične aspekte otrovanja, međutim, ne mora biti specifičan za jednu toksičnu etiologiju (5). Toksidromi vezani za lijekove i sredstva ovisnosti i njihovo djelovanje na SŽS, odnosno psihu čovjeka i druge organske sustave (probavni, kardiovaskularni, respiratorni) prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1: Toksidromi određenih lijekova i sredstava ovisnosti**

<b>TOKSIDROM</b>	<b>SUPSTANCA</b>	<b>PSIHOLOŠKI SIMPTOMI</b>	<b>FIZIOLOŠKI SIMPTOMI</b>
<b>Sedativno- hipnotički</b>	Barbiturati, benzodiazepini, fenotijazini, etanol	Depresija, pospanost, konfuzija, sedacija	Bradikardija, hipotenzija, nistagmus, respiratorna depresija, koma*
<b>Antikolinergični</b>	Triciklički antidepresivi, fenotijazini, kanabis	Euforija, anksioznost, paranoja, konfuzija, halucinacije, delirij, sedacija	Tahikardija, midrijaza, smanjena peristaltika, suha koža/sluznice, hipertermija, retencija urina



Tablica 1: Toksidromi određenih lijekova i sredstava ovisnosti (nastavak tablice)

TOKSIDROM	SUPSTANCA	PSIHOLOŠKI SIMPTOMI	FIZIOLOŠKI SIMPTOMI
<b>Opioidni</b>	Morfin, heroin, kodein, tramadol, metadon	Euforija, disforija, ošamućenost, pospanost	Bradikardija, hipotenzija, mioza, smanjena peristaltika, respiratorna depresija, koma
<b>Simpatomimetički</b>	Amfetamini, metamfetamini, kokain, efedrin, PCP	Agitacija, euforija, energičnost, uzbuđenost, pojačana budnost, halucinacije	Tahikardija, hipertenzija, midrijaza, hipertermija, aritmije, konvulzije
<b>Serotoninski sindrom</b>	LSD, amfetamini, metamfetamini, kokain, TCA, kodein, tramadol	Agitacija, anksioznost, dezorjentiranost, konfuzija, uzbuđenost	Tahikardija, hipertenzija, midrijaza, dijareja, tahipnea, hipertermija, znojenje, konvulzije

\*kod uzimanja benzodiazepina s drugim depresorima SŽS-a

#### 1.4. Laboratorijska obrada pacijenta

Akutno se intoksicirani pacijenti uglavnom zaprimaju u jedinice objedinjenoga hitnog prijema. Nakon fizikalnoga pregleda i uzete anamneze takvim pacijentima uzimaju se uzorci za toksikološku analizu i ostale laboratorijske pretrage. S obzirom na to da je klinička slika takvih pacijenata često nespecifična, pacijenti uglavnom nekontaktibilni, a anamneza dobivena od pratnje često oskudna, najčešće se upućuje zahtjev za toksikološkom analizom svih dostupnih analita iz hitnoga programa pretraga. S obzirom na to da se često radi o

životno ugroženim pacijentima, važno je da se toksikološko testiranje napravi u što kraćem vremenu. Uz to, važno je dobiti pouzdan i sveobuhvatan nalaz na temelju kojega bi pacijent primio adekvatnu terapiju.

### **1.5. Uzorci za toksikološku analizu**

U hitnim stanjima poput akutnoga otrovanja važno je imati reprezentativne uzorke, a koji uzorci će se uzeti ovisi o stanju pacijenta, načinu konzumacije i toksokinetici supstance na koju se sumnja. Najprikladniji je uzorak za toksikološku analizu urin jer je koncentracija otrova i njegovih metabolita u tom uzorku najveća, pa je i identifikacija najlakša. Za utvrđivanje je koncentracije otrova najbolji uzorak krvi. Naime, koncentracija je otrova u krvi uobičajeno u dobroj korelaciji s farmakološkim učinkom. Iako rijetko, za toksikološku analizu akutno intoksiciranih pacijenata može se koristiti i želučani sadržaj. Taj se uzorak dobiva lavažom, a prihvatljiv je za analizu isključivo ako je otrov uzet na usta. Prednost je toga uzorka što se otrov često nalazi u visokoj koncentraciji pa ga je lako identificirati.

#### **1.5.1. Urin**

Urin je najčešće korišten uzorak u toksikološkim testiranjima. Prednosti su toga uzorka što se dobiva neinvazivnim postupkom, obično u dovoljno velikoj količini kojom se kasnije može manipulirati prilikom analize. Ima širok dijagnostički prozor, što znači da se u urinu lijekovi i sredstva ovisnosti mogu dokazati duži vremenski period u odnosu na krv, pogotovo oni kratkoga vremena poluživota ( $T_{1/2}$ ). U njemu je prisutna puno veća koncentracija analita u odnosu na druge uzorke i sadrži manji broj analita koji mogu biti uzrok interferencija. Osim toga, većina komercijalno dostupnih testova za toksikološki probir predviđena je upravo za analizu uzorka urina. Međutim, taj uzorak ima i neke nedostatke, a jedan je od njih mogućnost manipulacije uzorkom (smanjenje/povećanje pH-a, dilucija, korištenje surfaktanta) kojom se otežava sam proces analize i utječe na smanjenje koncentracije testirane supstance uslijed čega testiranja mogu imati lažno negativan rezultat. Također, taj je uzorak prikladan za kvalitativne analize.

### 1.5.2. Krv

Krv, serum ili plazma važni su u toksikologiji zbog dobivanja informacija o koncentraciji supstance na koju se sumnja da je uzrok otrovanja. Rezultati koncentracije u krvi uglavnom koreliraju s farmakološkim učinkom spoja, pa tako i sa stanjem pacijenta. Tako rezultati testiranja mogu imati prediktivni značaj u svezi s daljnjim učincima trovanja. Krv sadrži uglavnom nepromijenjene analite te se koristi za kvantitativna određivanja ili neka ciljana određivanja kod kojih koncentracija toksične tvari ima utjecaj na težinu kliničke slike (npr. hepatotoksični učinak paracetamola). Nedostatak je krvi kao uzorka to što se dobiva invazivnom metodom i ima uzak detekcijski prozor. Zbog toga se lijekovi i sredstva ovisnosti koji imaju kratki  $T_{1/2}$  teže dokazuju. Što se tiče samih testova za probir u krvi, oni su rijetko dostupni za takve analize.

## 1.6. Metode u toksikološkoj analizi

Idealni bi testovi trebali pouzdano detektirati što veći broj supstanci u što kraćem vremenu. Iako tehnologija svakim danom napreduje, takvi testovi još uvijek ne postoje na tržištu. Stoga je potrebno kombinirati više analitičkih metoda. Prvi korak toksikološke analize uglavnom je identifikacija spoja od interesa, nakon čega slijedi njegova kvantifikacija (6). Osnovna je podjela metoda u toksikologiji na metode probira (skrining) i metode potvrde. Skrining metode koriste se kao preliminarni testovi čije je rezultate, ako su pozitivni, potrebno potvrditi specifičnom metodom.

### 1.6.1. Metode probira

Metode su probira najčešće kvalitativni i brzi testovi visoke osjetljivosti, ali nedovoljne specifičnosti. Najčešće se koriste imunokromatografske i imunokemijske metode. I jedne i druge su jednostavne, brze i uglavnom dovoljno osjetljive. Za njihovu provedbu nisu potrebni skupa oprema i analitičko iskustvo. Međutim, veliki je nedostatak tih metoda nedovoljna specifičnost zbog koje strukturno slični spojevi mogu interferirati i davati lažno pozitivne rezultate. Osim toga, te su metode ograničene na relativno mali broj skupina spojeva

pa njihovom upotrebom često dolazimo u opasnost da se otrovanja, koja nisu pokrivena panelom, ne utvrde.

Imunokromatografski su testovi imunoanalize u jednom stupnju na čvrstoj fazi namijenjeni za kvalitativnu toksikološku analizu. Temelje se na principu visoko specifične reakcije između antigena i antitijela koja se koristi za analizu specifičnih spojeva u biološkom uzorku. Test se zasniva na kompeticiji lijeka i konjugata lijeka za vezanje na antitijela.

Imunoanalize se koriste za kvalitativno, semi-kvantitativno i kvantitativno određivanje supstanci. Dijele se na homogene, heterogene, kompetitivne i nekompetitivne. Češće su u upotrebi homogeni i kompetitivni imunoeseji. U takvoj se metodi reakcija između analita i antitijela odvija u homogenoj otopini nakon što se uzorak doda u smjesu reagensa. Najčešće se analit iz uzorka natječe s analitom konjugiranim s nekim obilježivačem (fluoresceinom, enzimom) za vezno mjesto na antitijelu. Što je više analita iz uzorka vezano za antitijelo, više je slobodnih obilježenih antigena koji daju signal. Jačina je toga signala, koji se mjeri spektrofotometrijski na određenoj valnoj duljini, proporcionalna količini analita u uzorku. Granična vrijednost služi za razlikovanje pozitivnih i negativnih rezultata i varira od metode do metode. Često se u rutini koristi enzimatski homogeni imunotest (engl. *Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*; EMIT).

### 1.6.2. Metode potvrde

Metode su potvrde metode koje se provode nakon preliminarnoga analiziranja uzorka u slučaju pozitivnoga ili nedovoljno sveobuhvatnoga rezultata analize. One se provode kromatografskim tehnikama koje se temelje na separaciji analita na temelju razlika u fizikalno-kemijskim svojstvima. U kromatografiji mobilna faza putuje kroz stacionarnu fazu i pri tome nosi uzorak čiji se sastojci prilikom putovanja zbog interakcije sa stacionarnom fazom kreću različitom brzinom (6). Nakon što se analiti razdvoje u koloni, potrebno ih je detektirati. Spojevi se mogu razlikovati na temelju retencijskoga vremena koje je karakteristično za svaki spoj u točno određenim kromatografskim uvjetima. Specifičan je detektor kromatografskoga sustava maseni spektrometar koji omogućava specifičnu identifikaciju spojeva na temelju njihovih karakterističnih masenih spektara. Danas su u rutinskoj upotrebi najčešće vezani sustavi plinske kromatografije s masenom spektrometrijom

## 1. UVOD

(GC-MS) i tekućinske kromatografije spregnute s dvojnomo spektrometrijom masa (LC-MS/MS). Iako svaka od njih ima svoje prednosti i nedostatke, „zlatni standard“ u toksikologiji je GC-MS metoda.

GC-MS se temelji na razdvajanju sastavnica smjese između plinovite i čvrste/tekuće faze s obzirom na njihov afinitet za stacionarnu fazu. Nakon toga, detekcija razdvojenih analita odvija se u masenom spektrometru gdje se nakon fragmentacije i ionizacije (najčešće ionizacijom elektronima) fragmenti detektiraju s obzirom na omjer mase i naboja ( $m/z$ ). Rezultat je takve analize kromatogram koji predstavlja odziv detektora. Kromatogram sadrži pikove koji se potom analiziraju na način da se maseni spektar svakoga pika uspoređuje unaprijed utvrđenim matematičkim algoritmom sa spektrima masa iz baze podataka. Kombinacija kromatografskog razdvajanja i detekcije s pomoću masenog spektrometra omogućuje razlikovanje analita koji imaju isto vrijeme zadržavanja ili slični prikaz ioniziranih ulomaka u masenom spektrometru (6). GC-MS ima visoku specifičnost, precizna je metoda za kvantifikaciju i ima nizak limit detekcije i kvantifikacije. Moguća je detekcija velikoga broja analita istovremeno (tzv. *scan mode*), ali i pojedinačna potvrda odabranih analita (engl. *Selected-Ion Monitoring; SIM mode*). Nedostatci su joj ograničenost na hlapljive, termostabilne i nepolarne spojeve male molekulske težine (uglavnom  $< 500$  Da). U analitičkom je dijelu potrebna veća ekspertiza analitičara u svezi sa samim izvođenjem testiranja i evaluacijom rezultata. Uzorak za analizu potrebno je prethodno pripremiti (ekstrakcijom i eventualno derivatizacijom) što produljuje vrijeme analize te je cijena instrumentacije i pojedinačnoga testiranja velika.

**2. HIPOTEZA**

Hipoteza je ovoga istraživanja da se rezultati hitnoga toksikološkog testiranja akutno intoksiciranih pacijenata imunokemijskom metodom moraju naknadno provjeriti GC-MS metodom u svrhu dobivanja sveobuhvatnijega i pouzdanijeg toksikološkog nalaza.

### 3. CILJ

Ovim bi istraživanjem, koje obuhvaća analizu uzoraka akutno intoksiciranih pacijenata, trebalo procijeniti značaj primjene GC-MS analize u odnosu na primijenjenu imunokemijsku tehniku i procijeniti prednosti i nedostatke obiju metoda.

### 4. MATERIJALI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Provedeno je presječno istraživanje.

#### 4.2. Materijali

U istraživanju su korišteni uzorci krvi i urina 29 pacijenata zaprimljenih u Centar za objedinjeni hitni prijam (COHP) Kliničkoga bolničkog centra Osijek (KBCO) zbog sumnje na akutnu intoksikaciju. Uzorci su skupljani tijekom perioda od 2 mjeseca. Uzorci su venske krvi uzorkovani u *BD Rapid Serum Tube* (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) epruvete od 5 mL bez antikoagulansa s dodatkom trombina. Uzorci su krvi potom centrifugirani 10 minuta na 3500 rpm, a tako je se dobiven uzorak seruma dalje koristio za analizu. Uzorci su urina prikupljeni u sterilne spremnike za urin.

#### 4.3. Metode

U istraživanju su korištene dvije tehnike: imunokemijska i GC-MS. Uzorci su urina prvo ispitivani imunokemijskom tehnikom (imunokromatografskom i imunokemijskom metodom u otopini), a potom GC-MS metodom. Uzorci su seruma analizirani samo GC-MS metodom.

##### 4.3.1. Imunokromatografska test pločica (TCA)

Siemens Syva<sup>®</sup> RapidTest d.a.u.<sup>®</sup> TCA, korišten u ovom ispitivanju, je brzi kvalitativni imunokromatografski test za dokazivanje prisutnosti TCA-a u urinu. Test pločica sastoji se od membrane koja sadrži testnu liniju obloženu poliklonalnim antitijelima za nortriptilin, kontrolnu liniju obloženu IgG antimišjim antitijelima ovce i membranu koja sadrži obojeno koloidno zlato konjugirano s mišjim IgG antitijelima i konjugatom nortriptilina. Uzorak se urina nanese u jažicu za uzorak (*sample well*) te on kapilarnim silama



#### 4. MATERIJALI I METODE

putuje membranom do testne linije. Ukoliko je TCA prisutan u urinu pacijenta, utoliko se on natječe s obojenim konjugatom TCA za poliklonalna antitijela što rezultira pozitivnim nalazom, a pokazuje se izostankom obojenja testne linije.



**Slika 1: Syva® RapidTest d.a.u.® TCA kit (fotografija autorice)**

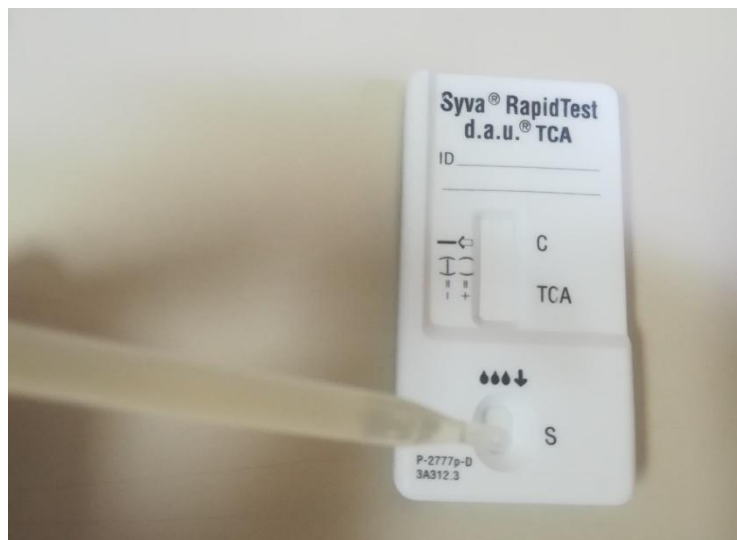
Protokol je sljedeći:

1. Označi se test pločica s podacima pacijenta čiji uzorak testiramo.
2. Otprilike 110  $\mu\text{L}$  (oko 3 kapi) uzorka urina nanese se pomoću jednokratne pipete u jažicu za uzorak na vertikalno postavljenu pločicu (Slika 3).
3. Nakon 5 minuta, ne više od 10 minuta nakon nanošenja uzorka, očita se rezultat prikazan u test prozorčiću (Slika 4).

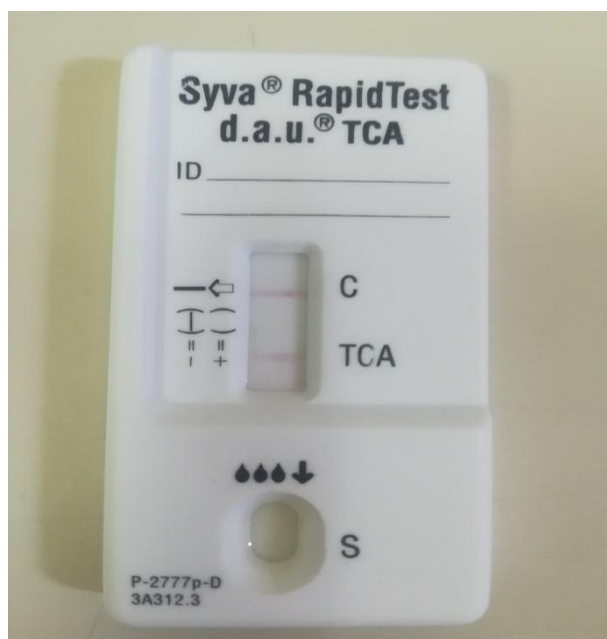
#### 4. MATERIJALI I METODE



**Slika 2: Syva® RapidTest d.a.u.® TCA imunokromatografska pločica i jednokratna pipeta (fotografija autorice)**



**Slika 3: Nanošenje uzorka u jažicu (fotografija autorice)**



**Slika 4: Očitavanje rezultata (negativno) (fotografija autorice)**

#### 4.3.2. Enzimatski homogeni imunotest (EMIT)

Za preliminarno je testiranje ostalih lijekova i sredstava ovisnosti (benzodiazepina – BZO, barbiturata – BAR, metadona – MTD, opijata – OPI, amfetamina/metamfetamina – AMF, kokaina – COC, THC) korištena EMIT metoda i automatski analizator Siemens EMIT Viva E (Slika 5). Instrument služi za kvalitativnu ili semikvantitativnu analizu navedenih supstanci u urinu.



**Slika 5: Siemens EMIT Viva E automatski analizator (fotografija autorice)**

#### 4. MATERIJALI I METODE

EMIT metoda temelji se na kompeticiji između droge u uzorku i droge obilježene enzimom glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PDH) za vezna mjesta na antitijelu. Mjeri se aktivnost enzima, koja pada vežući se za antitijelo, jer je onemogućeno vezanje supstrata. Ukoliko je droge iz uzorka više nego droge obilježene enzimom, utoliko će se slobodni aktivni enzim procesom redukcije nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) pretvoriti u NADH, a ta se promjena mjeri spektrofotometrijski na određenoj valnoj duljini. Za analizu se koriste setovi reagensa (Syva® EMIT II Plus) za svaku pojedinu drogu (Slika 6). Reagensi se moraju prije stavljanja na analizator pripremiti prema uputama, a sadrže antitijelo/supstrat reagens i reagens s enzimom G6PDH. Za svaku je drogu deklarirana preporučena granična koncentracija (amfetamini 1000 ng/mL; THC 50 ng/mL; ostale supstance 300 ng/mL).



**Slika 6: Syva EMIT II Plus set reagensa za detekciju kokaina (fotografija autorice)**

Količina urina potrebna za izvođenje analize oko 200  $\mu$ L. Ukoliko je urin zamućen, utoliko ga je potrebno prethodno centrifugirati. pH vrijednost urina, koja se preporuča, varira od kiselog do blago lužnatoga (4,5 – 8,0).

#### 4.3.3. Plinska kromatografija spregnuta masenom spektrometrijom (GC-MS)

Za analizu je uzoraka GC-MS metodom korišten uređaj GCMS-QP2010 (Shimadzu, Japan). Uređaj se sastoji od dvije međusobno povezane jedinice: plinskoga kromatografa (GC) i masenoga spektrometra (MS). Kao mobilna faza GC-a korišten je inertni plin helij,

#### 4. MATERIJALI I METODE

99,99%-tne čistoće i kapilarna kolona Agilent J&W dimenzija 30 m x 0,250 x 0,25  $\mu\text{m}$ . Unutrašnjost je kolone obložena čvrstom stacionarnom fazom DM-5MS koja se sastoji od 5 % difenila i 95 % dimetil polisiloksana.

Prije puštanja uzorka na analizu potrebno je napraviti ekstrakciju uzorka. U ovom je istraživanju za pripremu uzorka korištena ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid-liquid extraction*; LLE) koristeći DE-TOX-TUBE A (*Dyna-tek Industries*) (Slika 7). De-tox tube A sadrži smjesu organskih otapala i puferirajućih soli (pH = 9). LLE je relativno jednostavna i brza metoda ekstrakcije kojom se tvari s obzirom na topljivost i pH ekstrahiraju iz uzorka (anorganskoga dijela vodenoga otapala) u organsko otapalo. Često se koristi kao priprema uzorka za GC-MS te je važna kada je potrebno brzo odrediti i izolirati nepoznate analite iz uzorka. Postupak se ekstrakcije provodi na način da se uzorak doda u ekstrakcijsku tubu do oznake, nakon čega se tuba lagano mućka, a potom centrifugira na 3000 rpm. Nakon centrifuge odvoji se gornji organski sloj u vajalicu za uparavanje. Uparavanje do suhoga provodi se u struji dušika (Slika 8). Upareni se ostatak potom otopi u maloj količini (oko 150  $\mu\text{L}$ ) etilacetata i stavi na nosač uzorka na GC-MS-u (Slika 9).



**Slika 7: De-tox tube A (fotografija autorice)**

Osim ekstrakcije, radi poboljšanja hlapljivosti, učinkovitosti razdvajanja, postizanja temperaturene stabilnosti i smanjenja interferencija, ponekad je potrebno napraviti i

#### 4. MATERIJALI I METODE

derivatizaciju. Ona se u većini slučajeva radi u obliku alkiliranja, acetiliranja, siliranja, esterifikacije ili oksidacije. Za THC i THC-COOH korištena je metoda siliranja.

Postupak za ekstrakciju i derivatizaciju THC/THC-COOH-a odvija se u nekoliko koraka:

1. U De-tox tube A se pipetira 2 mL uzorka urina te dodaje 200  $\mu$ L 6M NaOH.
2. Ostavi se da odstoji na sobnoj temperaturi 30 min.
3. Centrifugira se 10 min na 3000 rpm.
4. Nakon centrifuge, u supernatant dodaje se 400  $\mu$ L koncentrirane octene kiseline.
5. Dodaje se acetatni pufer čiji je pH = 4 do ukupnoga volumena od 5 mL da bi se smanjio pH prije same ekstrakcije.
6. Nadalje, dodaje se 2 mL smjese heksan-etilacetat u omjeru 80 : 20.
7. Promućka se, centrifugira 10 min na 3000 rpm i pipetom odvoji organski dio u staklenu bočicu za GC-MS.
8. Organski se dio upari u struji dušika do suhoga.
9. Na suhi se ostatak dodaje 30  $\mu$ L N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) + trimetilklorosilana (TMCS) (derivatizacijski reagens za siliranje; omjer 99 : 1) te se tuba zatvori.
10. Ostavi se da odstoji na sobnoj temperaturi 30 min te se analizira u načinu praćenja pojedinoga iona (engl. *Selected ion monitoring mode; SIM mode*).



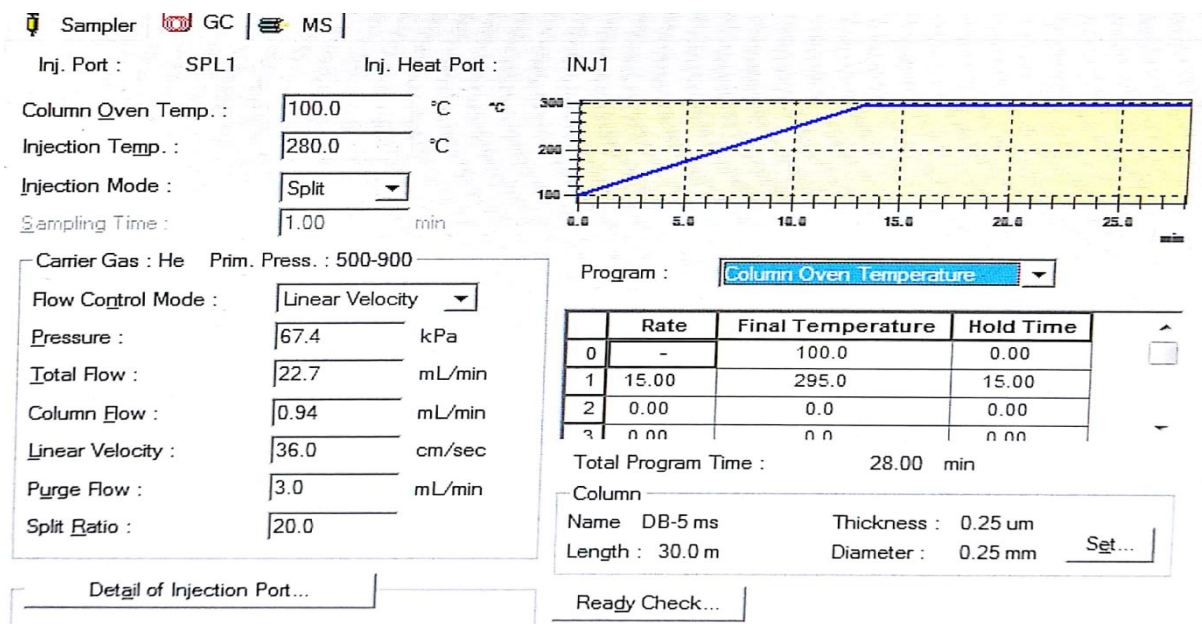
**Slika 8: Uparavanje organskoga dijela nakon ekstrakcije (fotografija autorice)**

#### 4. MATERIJALI I METODE



**Slika 9: Postavljanje uzorka na GC-MS (fotografija autorice)**

Uvjeti korišteni u plinskoj kromatografiji prikazani su na Slici 10.



**Slika 10: Uvjeti za GC (fotografija autorice)**

#### 4. MATERIJALI I METODE

Nakon razdvajanja uzorka u GC-u, uzorak prelazi u MS. Uvjeti analize korišteni za praćenje svih iona u MS-u prikazani su na Slici 11. Ti su uvjeti korišteni za toksikološki probir.

GCMS-QP2010

Ion Source Temp.: 300 °C  
 Interface Temp.: 310 °C    Detector Voltage:  Relative to the Tuning Result     Absolute  
 Solvent Cut Time: 2 min    0.1 kV  
 Micro Scan Width: 0 u    Threshold: 0

Use MS Program:     GC Program Time: 28.00 min

Group#1 - Event#1

	Start Time (min)	End Time (min)	Acq. Mode	Event Time(sec)	Scan Speed	Start m/z	End m/z	Ch1 m/z	Ch2 m/z
1	2.50	28.00	Scan	0.15	3333	35.00	500.00		
2	0.00	0.00	Scan	0.00	0	0.00	0.00		

**Slika 11: Uvjeti za MS (fotografija autorice)**

Za analizu THC i THC-COOH korišten je *SIM mode*. Temperaturni su uvjeti jednaki prethodnim uvjetima za MS. Ioni su, koji se detektiraju, 371, 386, 303 (m/z) za THC i 371, 473, 488 (m/z) za THC-COOH. Uvjeti su metode prikazani na Slici 12.

GCMS-QP2010

Ion Source Temp.: 300 °C  
 Interface Temp.: 310 °C    Detector Voltage:  Relative to the Tuning Result     Absolute  
 Solvent Cut Time: 2 min    0.1 kV  
 Micro Scan Width: 0 u    Threshold: 0

Use MS Program:     GC Program Time: 28.00 min

Group#1 - Event#1

	Start Time (min)	End Time (min)	Acq. Mode	Event Time(sec)	Scan Speed	Start m/z	End m/z	Ch1 m/z	Ch2 m/z	Ch3 m/z	Ch4 m/z	Ch5 m/z
1	10.00	20.00	SIM	0.30	0			371.00	386.00	303.00	473.00	488.00
2	0.00	0.00	Scan	0.00	0	0.00	0.00					

**Slika 12: MS uvjeti za THC i THC-COOH (fotografija autorice)**



#### 4.4. Statistička analiza podataka

Rezultati su istraživanja prikazani tablično. Pomoću rezultata dobivenih imunokemijskom metodom, određena je osjetljivost i specifičnost te metode kao i pozitivna (PPV) i negativna prediktivna vrijednost (NPV). Osjetljivost i specifičnost izračunate su pomoću sljedećih formula:

$$\text{Osjetljivost} = \frac{\text{stvarno pozitivni}}{\text{stvarno pozitivni} + \text{lažno negativni}} (\%)$$

$$\text{Specifičnost} = \frac{\text{stvarno negativni}}{\text{stvarno negativni} + \text{lažno pozitivni}} (\%)$$

Pozitivna prediktivna vrijednost i negativna prediktivna vrijednost izračunate su pomoću sljedećih formula:

$$\text{PPV} = \frac{\text{stvarno pozitivni}}{\text{stvarno pozitivni} + \text{lažno pozitivni}} (\%)$$

$$\text{NPV} = \frac{\text{stvarno negativni}}{\text{stvarno negativni} + \text{lažno negativni}} (\%)$$

## 5. REZULTATI

Ovim su istraživanjem analizirani uzorci krvi i urina 29 pacijenata. Budući da je kod 6 pacijenata naknadno isključena prisutnost lijekova i sredstava ovisnosti, daljnjom su obradom obuhvaćena 23 pacijenta prosječne dobi 42 godine (16 do 67). Među njima je bilo 8 pacijenata ženskoga i 15 pacijenata muškoga spola. Rezultati su analize urina i krvi prikazani u Tablici 2. Pojedinačni rezultati za svaku supstancu prikazani su u Tablici 3.

**Tablica 2: Rezultati analize urina i krvi EMIT i GC-MS metodom**

EMIT	GC-MS	
URIN	URIN	KRV
NEG	Karbamazepin i metaboliti	Karbamazepin
BZO	Venlafaksin, norvenlafaksin, diazepam, nordazepam	Venlafaksin
BZO	Acetaminofen, propifenazon, tramadol, N-desmetil tramadol, bisoprolol, zolpidem, alprazolam	Propifenazon, tramadol
COC	Kokain metil ekgonin, kokain	Kokain metil ekgonin, kokain
NEG	Fentanil, norfentanil, ekgonin metil ester, ibuprofen, metamizol	Biperiden
AMF, BZO	Amfetamin i metaboliti, metadon, oksazepam	-
BZO	Propranolol, diazepam, nordazepam	Propranolol, diazepam, nordazepam
NEG	Acetaminofen, bisoprolol	-
NEG	Ketoprofen	Ibuprofen, ketoprofen

Tablica 2: Rezultati analize urina i krvi EMIT i GC-MS metodom (nastavak tablice)

EMIT	GC-MS	
URIN	URIN	KRV
NEG	Acetaminofen	Acetaminofen
TCA, BZO	Fluvoksamin, kofein, kvetiapin, nordazepam, mirtazapin	Kofein, diazepam, nordazepam, mirtazapin, kvetiapin
BZO, TCA, THC	Diazepam, THC-COOH, promazin i metaboliti	Diazepam
OPI	Propifenazon, acetaminofen, kodein	Acetaminofen
OPI, BZO	Acetaminofen, lidokain, tramadol, diazepam, nitrazepam, klozapin, alprazolam	Acetaminofen, lidokain, tramadol, klozapin, alprazolam
TCA, BZO	Valproična kiselina, lidokain, biperiden, levopromazin, olanzapin, haloperidol	Valproična kiselina
THC	THC-COOH	THC-COOH
BZO, MTD	Diazepam, nordazepam, metadon	Metadon, diazepam, nordazepam
OPI	Tramadol	Tramadol i metaboliti
TCA	Promazin i metaboliti	Promazin i metaboliti
MTD, BZO	Metadon, nordazepam	Metadon, diazepam
BZO	Metronidazol, diazepam	Metronidazol, diazepam, nordazepam
OPI	Morfin, kodein	-
BZO	Diazepam, nordazepam	Diazepam, nordazepam

Tablica 3: Pojedinačni rezultati za svaku testiranu supstancu (N = 23)

SUPSTANCA	STVARNO POZITIVNI	STVARNO NEGATIVNI	LAŽNO POZITIVNI	LAŽNO NEGATIVNI
<b>BZO</b>	11	11	1	0
<b>BAR</b>	0	23	0	0
<b>TCA</b>	0	19	4	0
<b>MTD</b>	2	20	0	1
<b>COC</b>	1	21	0	1
<b>OPI</b>	1	19	3	0
<b>AMF</b>	1	22	0	0
<b>THC</b>	2	21	0	0
<b>Σ</b>	<b>18</b>	<b>156</b>	<b>8</b>	<b>2</b>

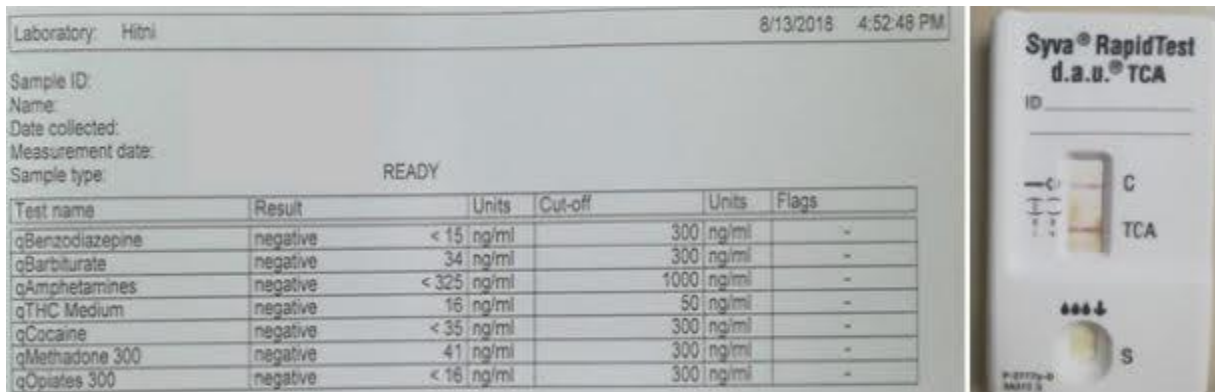
Rezultati su usporedbe pokazali da je 8 rezultata dobivenih imunokemijskom metodom bilo lažno pozitivno, 18 stvarno pozitivno, 156 stvarno negativno i 2 lažno negativna.

Iz tih rezultata proizlazi da je osjetljivost imunokemijskoga testa 90 %, a specifičnost 95 %. Pozitivna prediktivna vrijednost iznosi 69 %, a negativna prediktivna vrijednost 98 %. Međutim, ti se rezultati odnose samo na usporedbu rezultata koje je moguće analizirati korištenim imunokemijskim metodama. Također, osjetljivost, specifičnost, PPV i NPV dobiveni su uzimajući u obzir pojedinačne rezultate za svaki parametar u imunokemijskom testiranju. Gledajući sveobuhvatne nalaze dobivene GC-MS metodom, utvrđeno je da je samo 6 pacijenata imalo nalaz imunokemijskim testom koji je bio sukladan nalazu GC-MS metodom. Kod tih su pacijenata GC-MS metodom nađene samo supstance koje su dale pozitivan nalaz imunokemijskim testiranjem. 17 je pacijenata imalo supstance koje imunokemijskom metodom nije bilo moguće potvrditi ni isključiti.

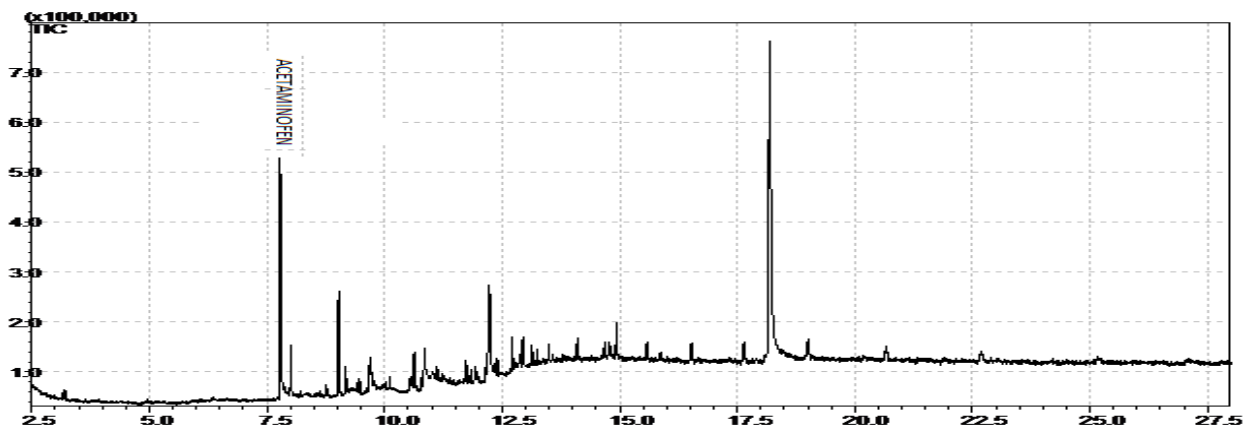
U nastavku je prikazan primjer toksikološke analize urina jednoga pacijenta imunokemijskom i GC-MS metodom. Preliminarnim je imunokemijskim testiranjem dobiven

## 5. REZULTATI

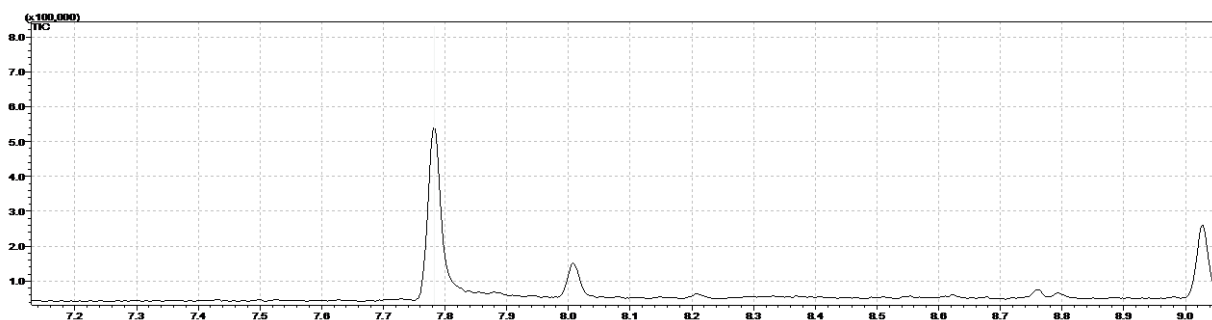
negativan nalaz probira na lijekove i sredstva ovisnosti (Slika 13). Nakon toga je napravljena analiza GC-MS metodom te je analizom dobiven kromatogram (Slika 14), u kojem je potom napravljena analiza pojedinačnih pikova (Slika 15) kojom su dobiveni maseni spektri (Slika 16). U konkretnom je slučaju utvrđena prisutnost analgoantipiretika acetaminofena.



Slika 13: Rezultati imunokemijskoga testiranja (fotografija autorice)

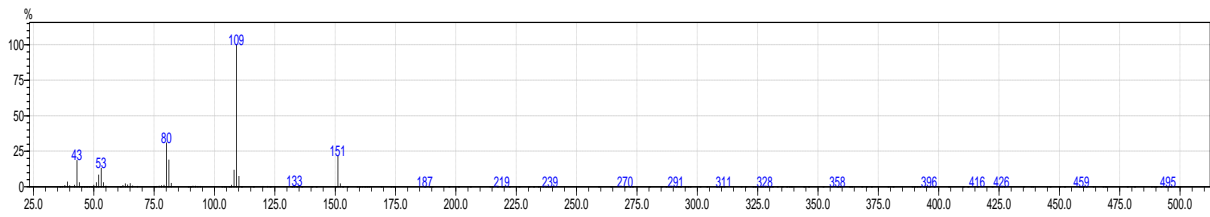


Slika 14: Rezultati GC-MS metodom (kromatogram) (fotografija autorice)



Slika 15: Analiza pika (acetaminofen) (fotografija autorice)

## 5. REZULTATI



**Slika 16: Maseni spektar analiziranoga pika (acetaminofen) (fotografija autorice)**

## 6. RASPRAVA

U ovom su istraživanju rezultati pokazali prisutnost velikoga broja različitih supstanci pronađenih u urinu i krvi pacijenata koji su zaprimljeni u COPH zbog sumnje na akutnu intoksikaciju. Testiranjem je dobivena zadovoljavajuća osjetljivost (90 %) i dobra specifičnost (95 %) imunokemijskih testova. Uobičajeno se imunokemijski testovi smatraju dovoljno osjetljivi, ali nedovoljno specifični, što nije pokazano ovim rezultatom. Međutim, rezultati ovoga istraživanja imaju ograničenja zbog maloga broja testiranih pacijenata i zbog relativno male zastupljenosti testiranih supstanci u njihovim uzorcima. Pouzdaniji bi se rezultati dobili ispitivanjem specifičnosti i osjetljivosti svakoga ispitivanog analita zasebno, no zbog prethodno navedenih ograničenja, to u ovom slučaju nije bilo moguće.

Najveći je broj stvarno pozitivnih rezultata analize urina dobiven za benzodiazepine (11 pacijenata). Istovremeno su benzodiazepini u krvi dokazani kod 7 pacijenata. Jedan je pacijent imao lažno pozitivan nalaz budući da u njegovu uzorku nije nađen nijedan lijek iz te skupine. U njegovu su uzorku urina nađeni valproična kiselina, lidokain, biperiden, levopromazin, olanzapin i haloperidol. Širok raspon korištenja benzodiazepina otežava razlikovanje farmakološke upotrebe od zloupotrebe navedenih supstanci kod probira urina na droge (7). Zbog usmjerenosti imunokemijskih testova uglavnom na glavne metabolite (oksazepam, nordiazepam), uzimajući u obzir metabolizam pojedinih BZO-a, teško je odrediti radi li se o akutnoj primjeni ili o ovisnosti. Kao i većina imunokemijskih metoda, imunokemijski testovi za benzodiazepine također mogu dati lažno pozitivne i lažno negativne rezultate. Sertalin i oksaprozin pokazali su se kao spojevi koji imaju križnu reaktivnost s benzodiazepinima (7). Sertalin, antidepresiv iz skupine selektivnih blokatora ponovnoga unosa serotonina (engl. *Selective serotonin reuptake inhibitor* – SSRI), pokazao je sklonost lažno pozitivnim rezultatima. Oksaprozin kao predstavnik nesteroidnih antireumatika može dati lažno negativne rezultate prilikom testiranja na benzodiazepine. Zbog toga je poželjno imati uvid u listu lijekova koje pacijent uzima (ako ih uzima) da ne bi došlo do pogrešnih zaključaka.

Triciklički su antidepresivi pokazali najveći broj lažno pozitivnih rezultata (4 pacijenta). Testovi su na TCA tijekom povijesti imali visok udio lažno pozitivnih rezultata (8). U ovom istraživanju jednom pacijentu s pozitivnim nalazom TCA imunokemijskim

## 6. RASPRAVA

testiranjem potvrdnom metodom utvrđeno je prisustvo kvetiapina u urinu i serumu. Kvetiapin je antipsihotik prepisivan za liječenje shizofrenije. U pismu uredniku Sloana, Havera i Saxona iz 2000. godine piše da su u njihovom istraživanju pacijenti, kojima je prepisan kvetiapin, imali lažno pozitivne rezultate testa na tricikličke antidepresive testirane u urinu (9). To je najvjerojatnije posljedica križne reakcije zbog strukturne sličnosti kvetiapina s TCA-om. U ovom je istraživanju kod pacijenta, pozitivnoga na TCA u urinu GC-MS metodom uz ostale analite, pronađen olanzapin (antipsihotik). On je također bio testiran u istraživanju Sloana i suradnika te je pokazao minimalnu križnu reaktivnost s TCA (9). To bi mogao biti razlog lažno pozitivnoga rezultata dobivenoga u ovom istraživanju. Nekoliko je izvješća objavljeno o interferencijama fenotijazepina u imunokemijskim testovima na TCA (10). S obzirom na to da je u provedenom istraživanju u tri slučaja pronađen promazin, a u jednom metabolit levopromazin (lijekovi iz skupine fenotijazina), moguće je da su upravo oni uzrok lažno pozitivnih rezultata na TCA u ovom istraživanju. TCA prilikom akutne intoksikacije ima utjecaj na kardiovaskularni sustav. Najčešći je kardiovaskularni učinak sinusna tahikardija koja se može pripisati inhibiciji ponovne pohrane norepinefrina i antikolinergijskoga djelovanja (11). Zbog toga je vrlo važan monitoring pacijenata na terapiji TCA-om i onih koji su njima intoksicirani.

Imunokemijsko je testiranje na opijate dalo tri lažno pozitivna rezultata. Mnogi smatraju da imunokemijski testovi na opijate mogu detektirati sve opioidne supstance. Većina je komercijalnih imunokemijskih testova usmjerena prema slobodnom morfinu i imaju različite stupnjeve križne reaktivnosti s kodeinom, 6-monoacilmorfinom, oksikodonom, hidromorfonom i konjugiranim metabolitima tih droga (12). To može stvarati probleme prilikom interpretacije rezultata. Budući da kodein i heroin u konačnici daju morfin kao metabolit, moguće je donijeti krive zaključke o zloupotrebi npr. heroina ako analitičar nije upoznat s terapijom koju pacijent uzima (npr. antitusik s kodeinom). Stoga je važno prije testiranja pregledati listu lijekova te ukoliko ih pacijent uzima, utoliko odbaciti sumnje na korištenje ilegalnih supstanci. Upravo je sličan primjer dobiven u ovom istraživanju – jednom je pacijentu, koji je imunokemijski bio pozitivan na opijate u urinu, GC-MS metodom pronađen kodein. Osim kodeina, pronađeni su i propifenazon i acetaminofen. Upravo propifenazon, acetaminofen, kodein i kofein su glavne sastavnice Caffetina – nesteroidnoga antireumatika i antipiretika. Poznavajući sastav lijekova i njihovih metabolita, moguće je



dokazati radi li se o zloupotrebi ilegalnih supstanci. Također, da bi se što jednostavnije odredila prisutnost opijata kod intoksiciranih pacijenata sa sumnjom na korištenje opijata ili pacijenata bez jasnih kliničkih znakova intoksikacije, poželjno je sniziti graničnu vrijednost testa iako se time povećava rizik od lažno pozitivnih rezultata. Isto tako, korištenjem imunokemijskoga testa usmjerenog na glavni metabolit heroina, 6-monoacetil morfin (6-MAM) omogućilo bi se lakše prepoznavanje pacijenata koji su konzumirali heroin ako se testiranje odvija u detekcijskom prozoru. U dva je slučaja pozitivna na OPI potvrdnom metodom pronađen tramadol – sintetski opioid. U istraživanju je Saitmana i sur. (8) navedeno da tramadol daje križnu reaktivnost prilikom imunokemijskoga testiranja na opijate, što bi moglo objasniti lažno pozitivne rezultate ovoga istraživanja.

Nadalje, dobiven je jedan lažno negativan rezultat za metadon. Budući da je u tom slučaju pacijent bio negativan pri testiranju krvi, a u urinu je imunokemijski i GC-MS metodom utvrđena prisutnost amfetamina i benzodiazepina uz metadon, može se pretpostaviti da je pacijent uzeo metadon određeni period prije provođenja testiranja, odnosno da je prošlo dovoljno vremena da se metadon eliminiira iz organizma (> 25 h) te su koncentracije metadona bile ispod granice detekcije.

Kao što je i prije navedeno, za velik je broj rezultata, koji su imunokemijski bili negativni, naknadno GC-MS metodom utvrđena prisutnost supstanci koje mogu dovesti do teškoga zdravstvenog stanja pacijenta ako je došlo do ingestije većih doza (karbamazepin, acetaminofen). Kod jednoga je pacijenta utvrđena prisutnost karbamazepina, često prepisivanoga antiepileptika, u urinu i serumu GC-MS metodom. Karbamazepin se obično smatra lijekom izbora za parcijalne napadaje (sa ili bez sekundarne generalizacije) i može biti značajan u prevenciji primarno generaliziranih toničko-kloničkih napadaja (13). Karbamazepini imaju korelaciju doza – učinak te pri većim koncentracijama mogu dovesti do težih kardiovaskularnih komplikacija. Koma, hipoventilacija, aritmije, nestabilna hemodinamika pa čak i smrt mogu se pojaviti pri intoksikaciji karbamazepinom (14). Takvi se simptomi lako mogu poistovjetiti s intoksikacijama nekim drugim lijekovima ili sredstvima ovisnosti te je stoga potrebno dodatno toksikološko testiranje. Budući da karbamazepini nisu u panelu lijekova koji se mogu dokazati imunokemijski, dobiven je negativan rezultat koji upućuje na važnost primjene GC-MS metode.

## 6. RASPRAVA

Acetaminofen, odnosno paracetamol gotovo je najčešće upotrebljavan analgopiretik u svijetu. U visokim dozama, paracetamol ima jak hepatotoksični učinak te može dovesti do teških posljedica za jetru. U ovom je istraživanju pronađen kod 4 pacijenta, a kod 3 je se pacijenta nalazio u urinu i serumu. Rano prepoznavanje i brzo liječenje s N-acetilcisteinom može spriječiti ozljedu jetre (15). Budući da acetaminofen, kao i karbamazepin, nije u panelu za imunokemijsko testiranje, dokazan je tek GC-MS metodom. Time je se omogućila brza reakcija liječnika i osigurala promptna terapija takvim pacijentima koji bi u suprotnoj situaciji mogli imati teške posljedice.

U hitnim je slučajevima, kao što je akutna intoksikacija, potrebno brzo i sa što većom točnosti odrediti supstancu koja je mogući uzrok otrovanja. Probir se urina na droge često radi na rutinskim imunokemijskim analizatorima zbog jednostavnosti korištenja, relativno niske cijene, brzoga dobivanja rezultata i sposobnosti detekcije više različitih droga i skupina droga (16). Osim navedenih prednosti, postoji i nekoliko nedostataka imunokemijskih metoda. Jedan je od najvažnijih problema literaturno opisanih nedovoljna specifičnost te metode. Nedovoljna je specifičnost posljedica križnih reakcija između strukturno sličnih analita pri čemu dolazi do lažno pozitivnih rezultata. Prisutni su i lažno negativni rezultati, npr. u slučajevima razrijeđenoga urina ili testiranja van detekcijskoga prozora supstance koju je pacijent uzeo. Ograničenost detektiranja samo određenih supstanci iz panela, čime se mogu izostaviti supstance, koje su mogući uzroci intoksikacije, također predstavlja još jedan nedostatak tih metoda. Osim toga, imunokemijskim testiranjem nije moguće utvrditi o kojem se točno spoju iz neke skupine radi, što je važan podatak jer se terapijske i toksične koncentracije lijekova iz iste skupine mogu značajno razlikovati. Također, nije moguće odrediti koliko je vremena prošlo od intoksikacije. Stoga se najčešće nakon probira poseže za pouzdanijom, potvrdnom i sveobuhvatnom metodom kao što je GC-MS, koja se smatra „zlatnim standardom“ u toksikologiji, što potvrđuju i mnogi radovi sa sličnim rezultatima kao u ovom istraživanju.

### 7. ZAKLJUČAK

Od ukupno 23 testirana pacijenta, samo je njih 6 imalo nalaz dobiven imunokemijskom metodom sukladan nalazu GC-MS metodom. 8 je nalaza bilo lažno pozitivno, a 2 lažno negativna. Osim toga, 16 je pacijenata imalo supstance koje imunokemijskim testiranjem nije moguće detektirati. Imunokemijska se metoda, iako vrlo jednostavna i brza, pokazala nedovoljno pouzdanom. Nasuprot tome, GC-MS metoda je relativno zahtjevna i dugotrajna, međutim omogućava dobivanje pouzdanoga i sveobuhvatnog nalaza, tako da je njezina primjena poželjna kad god je to moguće. Potvrdu je metodu naročito važno provesti kada su rezultati imunokemijskoga testiranja pozitivni i kada kliničko stanje pacijenta ne odgovara nalazu preliminarnoga testiranja.

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Akutno otrovanje predstavlja stanje u kojem je potrebna hitna reakcija liječnika da bi se pravovremeno primijenila prava terapija. Budući da je stanje akutne intoksikacije često nespecifično prema simptomima, a pacijenti nerijetko bez svijesti, potrebna je brza toksikološka analiza. Za analizu se trebaju koristiti adekvatni uzorci koji će dati najviše informacija o uzetoj supstanci, među kojima se izdvajaju urin i krv. Imunokemijske su metode brze i jednostavne za korištenje, no zahtijevaju potvrdu točnijom metodom. Iako je GC-MS metoda zahtjevnija i potrebna je ekspertiza analitičara, i dalje se smatra najpouzdanijom za toksikološko testiranje.

**Cilj:** Cilj je ovoga istraživanja usporediti rezultate toksikološkoga probira imunokemijskom metodom s rezultatima GC-MS analize i procijeniti prednosti i nedostatke dviju metoda.

**Materijali i metode:** U ovom presječnom istraživanju korišteni su uzorci urina i krvi (seruma) 23 pacijenta prosječne dobi 42 godine zaprimljenih u COPH-u zbog sumnje na akutno otrovanje tijekom perioda od 2 mjeseca. Analiza je uzoraka urina rađena EMIT metodom na automatskom analizatoru Siemens EMIT Viva E i GC-MS metodom na uređaju GCMS-QP2010 (Shimatzu, Japan) nakon prethodne pripreme urina tekućinskom ekstrakcijom.

**Rezultati:** Od ukupno 23 testirana pacijenta, samo je njih 6 imalo nalaz dobiven imunokemijskom metodom sukladan nalazu GC-MS metodom. 8 je nalaza bilo lažno pozitivno, a 2 lažno negativna. Osim toga, 16 je pacijenata imalo supstance koje imunokemijskim testiranjem nije moguće detektirati.

**Zaključak:** Imunokemijska je metoda prikladna za toksikološki probir, međutim nedovoljno je specifična i podliježe lažno pozitivnim rezultatima, stoga se rezultati moraju dodatno potvrditi pouzdanijom metodom poput GC-MS metode.

**Ključne riječi:** otrovanje; EMIT; GCMS

## 9. SUMMARY

### **Laboratory management of acutely intoxicated patient**

**Introduction:** Acute poisoning represents a state in which a physician's rapid reaction is necessary to timely apply the right therapy. As the state of acute intoxication is frequently nonspecific by symptoms and patients are often unconscious, a rapid toxicological analysis is needed. Adequate samples should be used for the analysis, which will give the most information about the taken substance, particularly about urine and blood. Immunoassays are fast and easy to use, but require verification by a more accurate method. Although the GC-MS method is more demanding and an analyst's expertise is needed, it is still considered to be the most reliable for toxicological testing.

**Objective:** The objective of this research is to compare the results of toxicological immunoassay screening with the GC-MS analysis results and to estimate advantages and disadvantages of the two methods.

**Materials and methods:** This cross-sectional research used urine and blood (serum) samples of 23 patients aged 42 on average admitted in the emergency department due to suspected acute poisoning over a period of 2 months. The urine sample analysis was performed by the EMIT method on Siemens EMIT Viva E automated analyser and by the GC-MS method on GCMS-QP2010 (Shimatzu, Japan) appliance after a prior preparation of the urine sample by liquid-liquid extraction.

**Results:** Out of 23 patients tested in total, only 6 of them had a finding obtained by the immunochemical method consistent with the results obtained by the GC-MS method. 8 findings were false positive and 2 false negative. In addition, 16 patients had substances that cannot be detected by immunoassay.

**Conclusion:** Immunoassay is suitable for toxicological screening, but it is not specific enough and is subject to false positive results, so the results must be additionally confirmed by a more reliable method such as the GC-MS method.

**Keywords:** poisoning; EMIT; GCMS

**10. LITERATURA**

1. Granić P, ur. Laboratorijska dijagnostika akutnih otrovanja. Zagreb: Medicinska naklada: Hrvatska komora medicinskih biokemičara; 2006.
2. Štingl K. Post-mortem toksikologija: metode dokazivanja kanabinoida (završni rad). Zagreb: Zdravstveno Veleučilište; 2016.
3. Klapac T, ur. Osnove toksikologije s toksikologijom hrane. Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet; 2011.
4. Plavšić F, Žuntar I. Uvod u analitičku toksikologiju. 1. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2006.
5. Mégarbane B. Toxidrome-based Approach to Common Poisonings. *Asia Pac J Med Toxicol.* 2014;3:2-12.
6. Debeljak Ž, ur. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju: elektroforetske i kromatografske separacije. Zagreb: Medicinska naklada: Hrvatska komora medicinskih biokemičara; 2018.
7. Moeller KE, Lee KC, Kissack JC. Urine drug screening: Practical Guide for Clinicians. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(1):66-76.
8. Saitman A, Park HD, Fitzgerald RL. False-Positive Interferences of Common Urine Drug Screen Immunoassays: A Review. *J Anal Toxicol.* 2014;38:387-396.
9. Sloan KL, Haver VM, Saxon AJ. Quetiapine and false-positive urine drug testing for tricyclic antidepressants. *Am J Psychiatry.* 2000;157(1):148-9.
10. Garg U. Pitfalls in measuring Antidepressant Drugs. U: Dasgupta A, urednik. *Handbook of Drug Monitoring Methods: Therapeutics and Drugs of Abuse.* Totowa/New Jersey: Humana Press; 2008. str. 148-163.
11. Kerr GW, McGuffie AC, Wilkie S. Tricyclic antidepressant overdose: a review. *Emerg Med J.* 2001;18:236–241

## 10. LITERATURA

12. Wu AHB, McKay C, Broussard LA, Hoffman RS, Kwong TC, Moyer TP i sur. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Recommendations for the Use of Laboratory Tests to Support Poisoned Patients Who Present to the Emergency Department. *Clin Chem.* 2003;49(3):357-379.
13. Aronson JK, ur. Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions. Amsterdam: Elsevier Science; 2015.
14. Karaman K, Türkdoğan KA, Deniz AT, Çanakçı SE. Which is the best in carbamazepine overdose? *Clin Case Rep.* 2017;5(10):1612–1615.
15. Hodgman MJ, Garrard AR. A review of acetaminophen poisoning. *Crit Care Clin.* 2012;28(4):499-516.
16. Johnson-Davis KL, Sadler AJ, Genzen JR. A Retrospective Analysis of Urine Drugs of Abuse Immunoassay True Positive Rates at a National Reference Laboratory. *J Anal Toxicol.* 2016;40(2):97-107.

## 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Kristina Štingl

**Datum i mjesto rođenja:** 09. 01. 1995., Zagreb

**Adresa i mjesto stanovanja:** Selska cesta 183, Zagreb

**Telefon/mobitel:** 01/ 3024 965; 098/9602 724

**Adresa e-pošte:** kristina.stingl@gmail.com

### **Obrazovanje:**

- 2009. – 2013.: Klasična gimnazija u Zagrebu
- 2013. – 2016.: Zdravstveno veleučilište u Zagrebu; preddiplomski stručni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika
- 2016. – 2018.: Medicinski fakultet u Osijeku; diplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika