

Laboranalytik bei Vergiftungen

– was ist notwendig?



Department Klinische Chemie, Klinikum Schwabing



Jürgen
Hallbach

Akute Vergiftungen & Laboratoriumsmedizin: Diskussion mit dem Kliniker



- Fragestellung: Screening, Therapiekontrolle?
- Klinischer Zustand des Patienten?
- Prämedikation vor der Probengewinnung?
- Dringlichkeit der Untersuchungen?
- Anamnese, Symptome, bereits erfolgte Therapie?
- Präanalytische Besonderheiten?
- Toxikologische Erstbewertung?
- Proben: Art, Menge, Besonderheiten



Jürgen
Hallbach

Anforderungen an die toxikol. Analytik

Ideal wäre es, wenn die toxikologische Ausschlussdiagnostik sehr schnell die Diagnose „Vergiftung“ weitgehend ausschließen oder bestätigen könnte.

Australische Studie: Befragung von 159 Intensivstationen (Herkunftsland der DRG):

- 60-90% der Intensivstationen sind regelmäßig mit einem Urinscreening für Drogen und TDM mittels Immunoassay versorgt.
- komplexere oder **schwierigere Bestimmungsverfahren stehen nur für 7 bis 23% der Anforderer regelmäßig zur Verfügung.**
- Wartezeiten auf das Ergebnis eines „General unknown screenings“ bei komatösen Patienten:
 - Keine Ergebnisse innerhalb von 12 Stunden**
 - 15.6% der Ergebnisse innerhalb von 24 Stunden
 - weitere 40.6% der Ergebnisse innerhalb 24-48 Stunden



Jürgen
Hallbach

Klinische Strategie nach A. Proudfoot

- Notwendigkeit lebenserhaltender Maßnahmen?**
- Bestätigung der Verdachtsdiagnose Vergiftung**
- Identifizierung der Giftstoffe**
- Therapiemaßnahmen gegen die Giftwirkungen auf Organfunktionen**
- Prognose bezüglich Zeitverlauf / Outcome**
- Exploration psychiatrischer Gesichtspunkte**

städtisches
> **Klinikum
München**



Jürgen
Hallbach

Gifte / Vergiftungen für die eine quantitative Bestimmung im 24h-Dienst benötigt wird:

Salicylate	Photometrie	Hämodialyse
Paracetamol	Immunoassay	N-Acetylcystein
Lithium	Flammenphotometrie	Hämodialyse
Theophyllin	Immunoassay	Hämoperfusion
Herzglykoside	Immunoassays	Fab-Antikörper
Methanol	Osmo, GC headspace	Ethanol, Fomepizol
Ethylenglykol	Osmo, GC headspace	Ethanol, Fomepizol
Eisen	Komplexometrie, Transferrin	Desferrioxamin
CO	CO-Hb	hyperbarer Sauerstoff
Meth-Hb-Bildner	MetHb	Methylenblau
Ethanol	enzymatisch mit ADH	Hämodialyse
Organophosphate	CHE	Antidote

Gifte / Vergiftungen für die eine qualitative Bestimmung im 24h-Dienst benötigt wird:

Amphetamine	FPIA	Psychose
Antidepressiva	FPIA	Cardiotoxizität
Barbiturate	FPIA	narkotisierend
Benzodiazepine	FPIA	Flumazenil
Cocain	FPIA	symptomatisch
Opiate	FPIA	Naloxon
.....		



Hallbach J, Guder WG: Mechanized toxicological serum tests in screening hospitalized patients. J Clin Chem Clin Biochem 1991, 29, 537-547.

Hallbach J in: DFG: Einfache toxikologische Laboratoriumsuntersuchungen bei akuten Vergiftungen. VCH Weinheim 1995.

**Jürgen
Hallbach**

Akute Vergiftungen: Paracetamol

Analytik

Immunchemische Bestimmung (Analysengerät)

Klinik

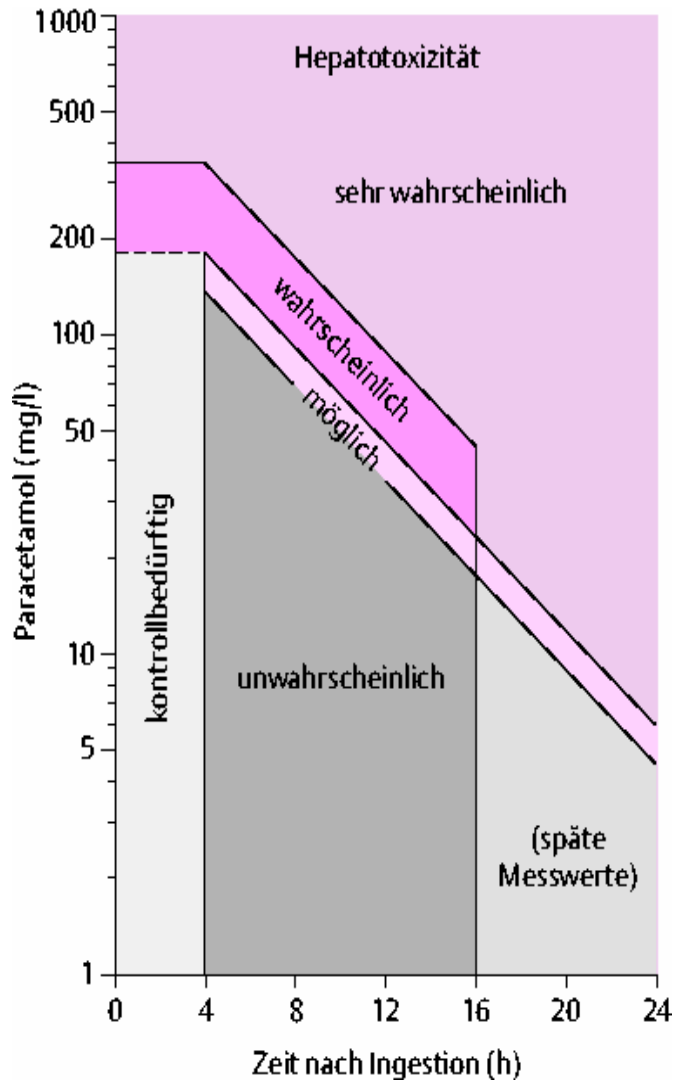
Anfangs symptomlos,
später Hepatotoxizität (Leberenzyme, Quickwert)

Beurteilung / Therapie

Gefährdung bei Überschreitung der Grenzkonzentrationen im Diagramm nach Rumack
Therapie: Antidotinfusion (N-Acetylcystein),
Lebertransplantation



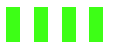
Akute Vergiftungen: Paracetamol



Paracetamol

**Beurteilung /
Therapie**

**Gefährdung bei Überschreitung der
Grenzkonzentrationen im Diagramm nach
Rumack
Therapie: Antidotinfusion (N-Acetylcystein),
Lebertransplantation**



Akute Vergiftungen: Salicylat

Analytik

Immunchemische Bestimmung (Analysengerät)

Klinik

Zunächst gastrointestinale Symptome, im weiteren
Metabolische Acidose und Kußmaul-Atmung

Beurteilung / Therapie

Therapeutisch: Aktivkohle. Treten salicylatinduzierte
Krämpfe auf oder liegt die Konzentration über
1000 mg/l, so kann eine Hämodialyse oder besser
noch eine Hämo-perfusion indiziert sein.



Akute Vergiftungen: Amphetamine

Analytik

Immunochemische Bestimmung (Analysengerät)
Kreuzreaktivitäten:
D,L-Amphetamin 100%; D,L-Methamphetamin 33%;
3,4-Methylendioxyamphetamin (MDMA) 33%;
MDA 33%; MDE 12.5%; 4-Methyl-2,5-dimethoxyamphetamin (DOM) 1%; MBDB, BDB u.a. ?

Klinik

Stimulation des Kreislaufzentrums, Agitiertheit,
Erschöpfungszustände, depressive Verstimmungen.

Beurteilung / Therapie

Therapie: Symptomatisch, Ansäuern des Urins,
Kalziumantagonisten bei Tachykardien



Akute Vergiftungen: Antidepressiva tricycl.

Analytik

Immunchemische Bestimmung (Analysengerät)
Kreuzreaktivitäten:
Imipramin 100%; Amitriptylin 100%; Nortriptylin 100%; Desipramin 100%, Clomipramin 25%; Doxepin 11%; Opipramol 50%; Trimipramin 10%

Klinik

Zu den Nebenwirkungen der tricyclischen Antidepressiva gehören anticholinerge Wirkungen, Potenzstörungen, Schwitzen und Herzrhythmusstörungen. Letztere sind bei Vergiftungen entscheidend

Beurteilung / Therapie

Therapie: Monitoring, Aktivkohle, Physostigmin, wenn anticholinerge Effekte im Vordergrund stehen

Wegen der erheblichen Kreuzreaktivität mit anderen Substanzgruppen kommt der Substanzidentifizierung eine besondere Bedeutung zu.



Akute Vergiftungen: Barbiturate

Analytik

Immunchemische Bestimmung (Analysengerät)
Kreuzreaktivitäten:
Secobarbital 100%, Phenobarbital 30%, Pento-
barbital 30%, Talbutal 30%, Aprobarbital 30%,
Allobarbital 15%, Thiopental 3%, Hexobarbital <1%,
Methohexital <1%

Klinik

Ursprünglich wurden die Barbiturate als Hypnotika eingeführt. Indikationen für den Einsatz von Barbituraten sind Krampfleiden, Hirnödemtherapie und Narkoseeinleitung

Beurteilung / Therapie

Therapie: Bei positivem Befund sollte die Serumkonzentration bestimmt werden. Maßnahmen sind forcierte Diurese, ggf. Hämo-perfusion.



Akute Vergiftungen: Benzodiazepine

Analytik

Immunochemische Bestimmung (Analysengerät)
Kreuzreaktivitäten:
100% bei Nordazepam, Diazepam, Bromazepam, Clonazepam, Flunitrazepam, Lorazepam
20% Clobazam, Lormetazepam

Klinik

Für die Interpretation der Plasmakonzentration ist es außerordentlich wichtig zu wissen, ob eine Therapie (Toleranzentwicklung) oder ein Abusus besteht. Bei gleicher Konzentration kann diese symptomfrei toleriert werden oder zu tiefem Koma führen.

Beurteilung / Therapie

Therapie: Benzodiazepinantagonist Flumazenil.
Dessen Wirkzeit ist unter Umständen deutlich kürzer als die des eingenommenen Benzodiazepins.



Akute Vergiftungen: Kokain

Analytik

Immunchemische Bestimmung (Analysengerät)
des Kokainmetabolit Benzoyllecgonin
Kreuzreaktivitäten:
Kokain < 3%, Ecgonin < 3%

Klinik

Zu den Symptomen gehören Agitiertheit, Psychose,
Mydriasis, Grand-mal-Anfälle, ventrikuläre Arrhythmien,
ggf. malignes neuroleptisches Syndrom

Beurteilung / Therapie

Therapie: supportiv, forcierte Diurese, ggf.
Hämoperfusion.



Akute Vergiftungen: Opiate

Analytik

Immunchemische Bestimmung (Analysengerät)
Kreuzreaktivitäten:
Morphin 100%; mit hoher Kreuzreaktivität werden Codein, Dihydrocodein und Hydrocodon erfasst.
Nicht nachgewiesen werden Opiode.

Klinik

Zu den Symptomen gehören Euphorie, Analgesie, Miosis, zentrale Atemdepression und Stimulation des Brechzentrums

Beurteilung / Therapie

Therapie: die schwere Opiatintoxikation ist durch einen Atemstillstand gekennzeichnet. Lässt sich dieser durch Opiatantagonisten (Naloxon) nicht beheben, muss der Patient intubiert u. beatmet werden



Toxikologie – aktuelle Strategie

- Serum: Basisprogramm, mechanisiert
- Serum: GC-MS

- Urin: - HPLC (Remedi)
- GC-MS (nach TMS-Derivatisierung)

Weitere Untersuchungen:
Osmolalität, Cyanid, CHE, Forrest-Reaktion etc.

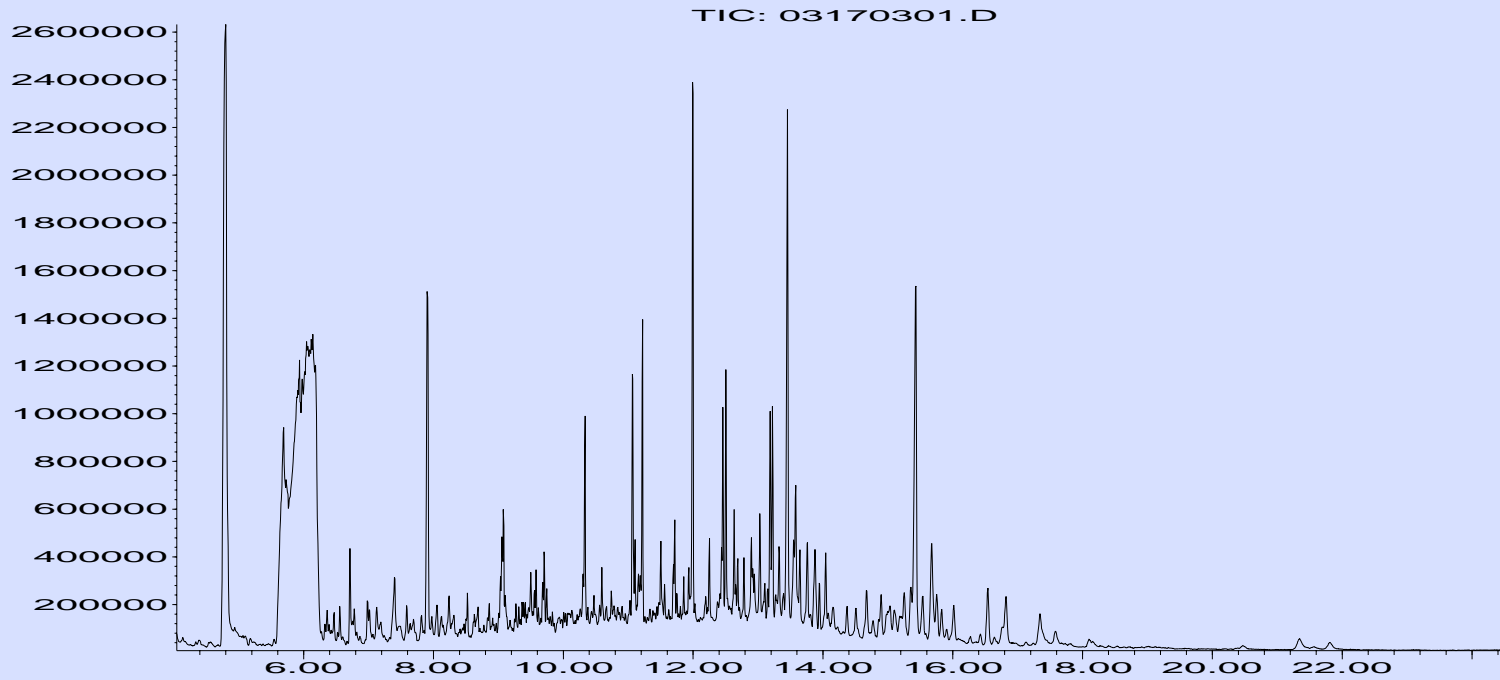
➔ Falldiskussion



Jürgen
Hallbach

GCMS

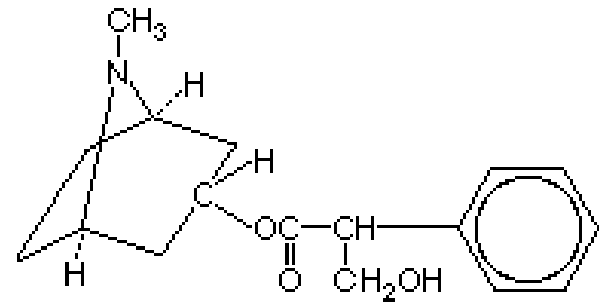
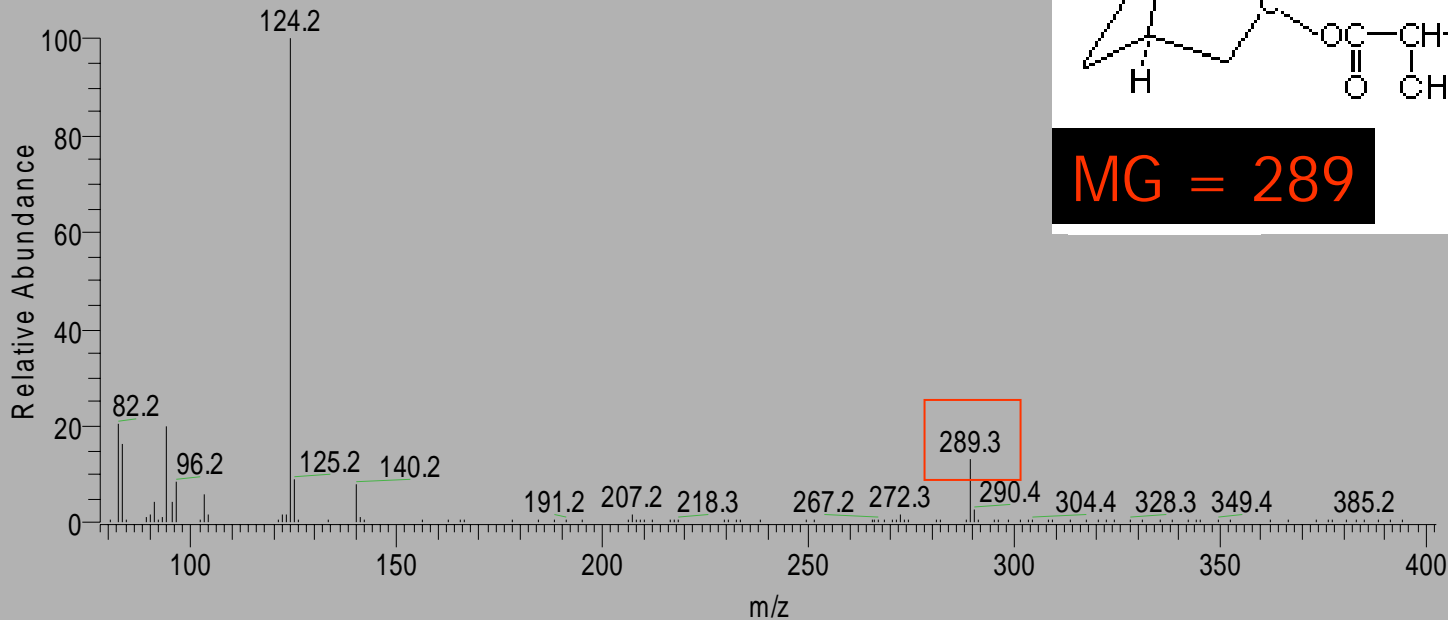
Abundance



Jürgen
Hallbach

GC-MS Massenspektrum von Atropin

Atropin#874 RT: 14.62 AV: 1 SB: 353 13.91-14.56, 15.44-16.64 NL: 1.42E6
T: {0,0} + c EI det=500.00 Full ms [80.00-400.00]



MG = 289

Toxikologie – aktuelle Strategie:

Fallbeispiel

- Serum: Basisprogramm, mechanisiert:
 - Benzodiazepine, Opiate
- Urin:
 - HPLC (Remedi)
 - GC-MS (nach TMS-Derivatisierung):
 - Aminoflunitrazepam,
 - Nordazepam,
 - Oxazepam,
 - Midazolam,
 - 6-Monoacetylmorphin,
 - Morphin, Codein,
 - Meperidin = Pethidin (Dolantin)



Jürgen
Hallbach

Toxikologische Analytik: Heute und morgen

H. Kerkdijk, NFI (Nederlands Forensisch Instituut):

- The level of toxicological analysis within a laboratory depends on the skills and creativity of its employees
- In the end the boundary of the level of toxicological analysis that can be reached is determined by the specifications of the instrument.

For many years GC-MS and LC-DAD were the instruments of choice in toxicological analysis and many methods and screening procedures are still based on their use.

GC-MS methods are often compromised of a derivatisation step, a SPE or LLE clean-up and dissolution into a non-polar solvent in order to enable the analysis of the mainly polar basic compounds from the hydrophilic blood matrix.



Jürgen
Hallbach

H. Kerkdijk, NFI (Nederlands Forensisch Instituut):

Nowadays the superiority of GC-MS and LC-DAD instruments no longer holds true. Due to the constant improvement in performance and robustness LC-MS/MS and **LC-TOF**/Orbitrap are now believed to be superior.

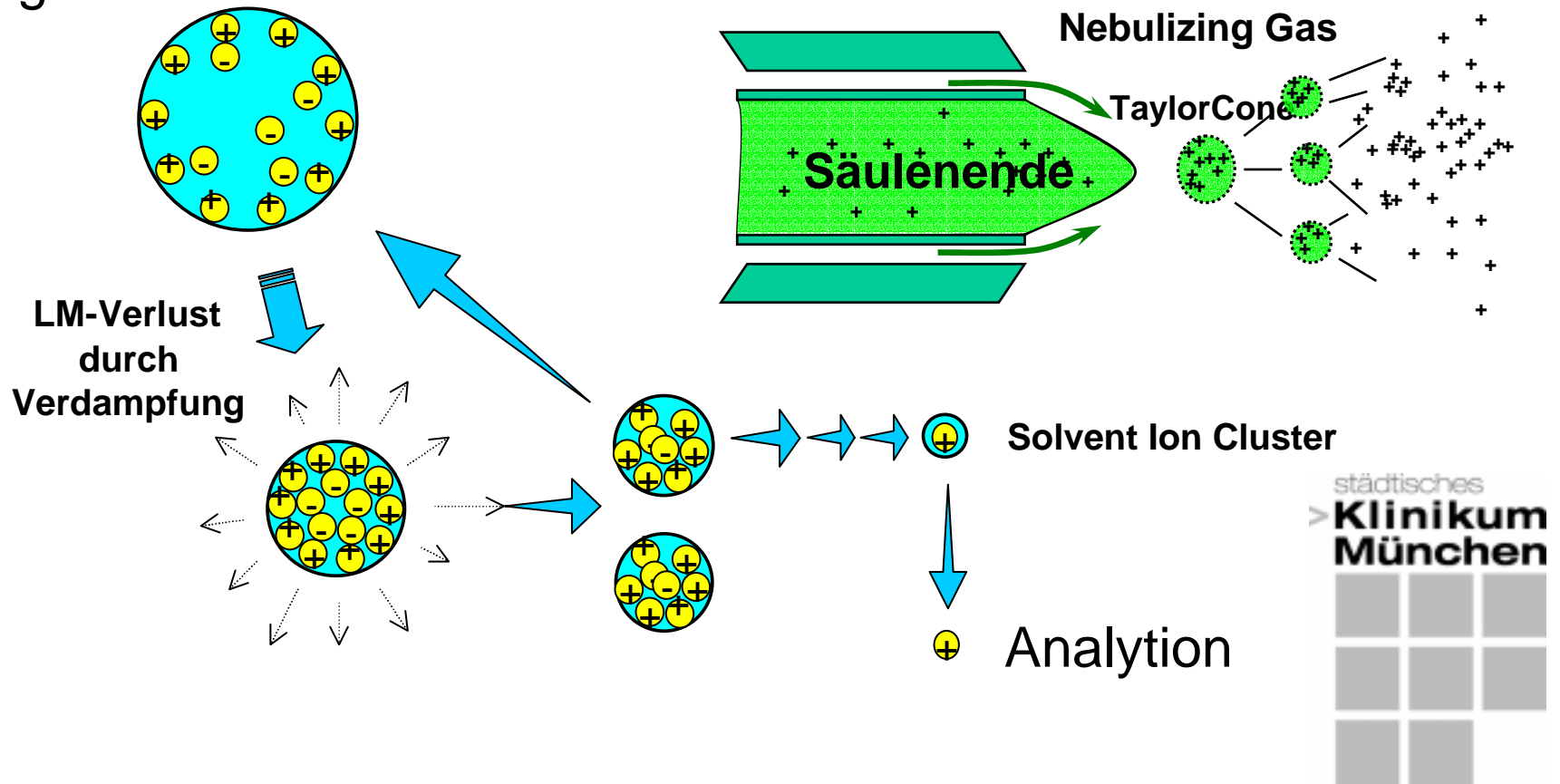
Worldwide toxicological laboratories are exploring the capabilities of LC-MS and rapidly replacing existing quantification methods and screening procedures by methods based on LC-MS. It seems that new boundaries can be reached.



Jürgen
Hallbach

LC-MS: Elektrospray-Ionisierung (ESI)

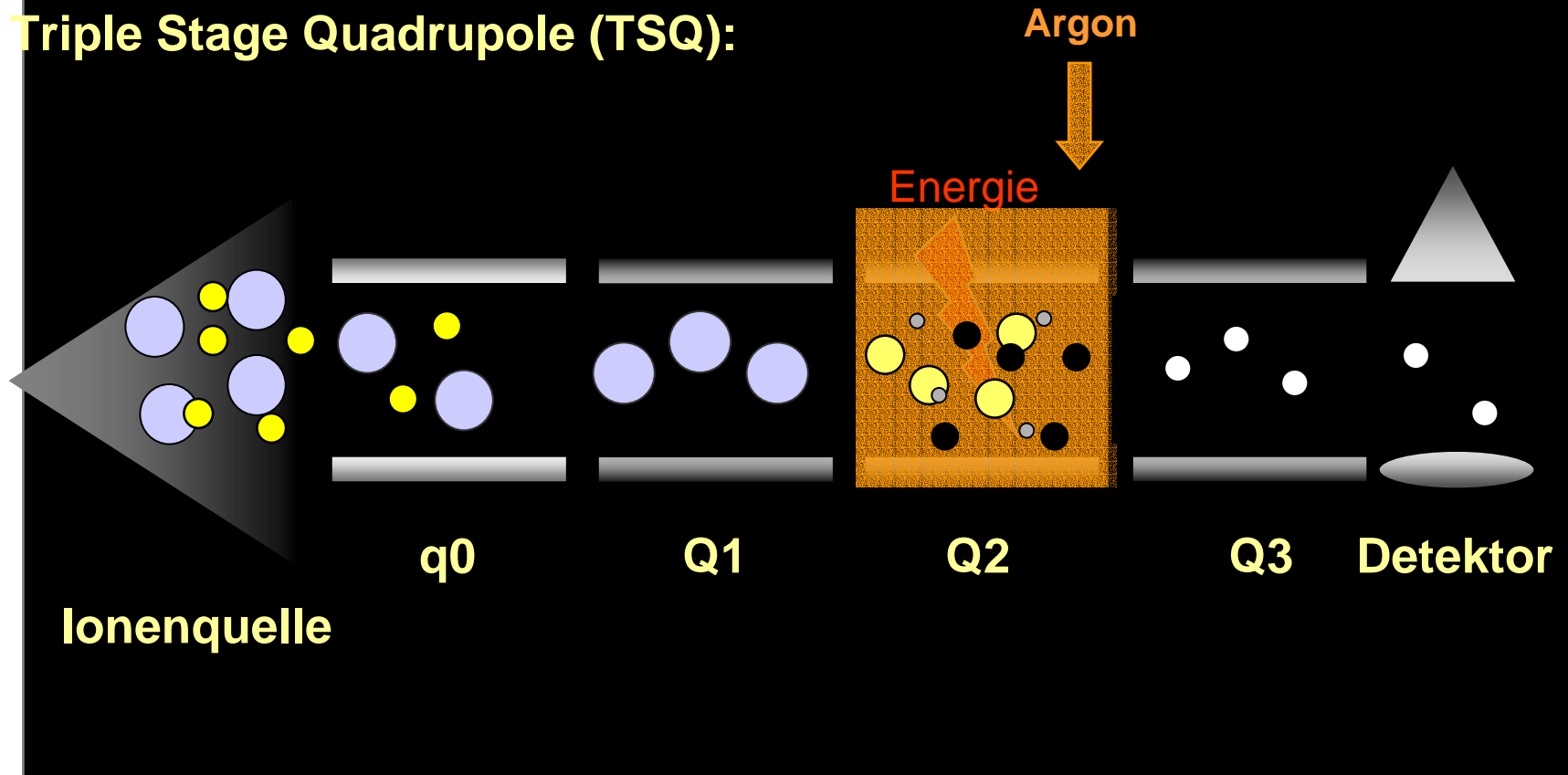
Flüssigkeitströpfchen mit geladenen Teilchen



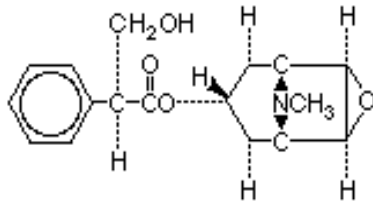
Jürgen
Hallbach

Tandem-Massenspektrometrie LC-MS

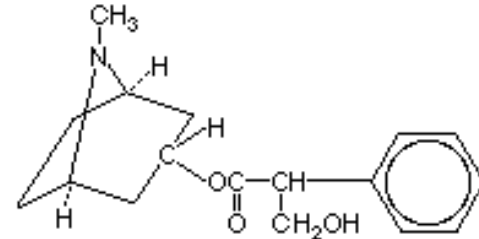
Triple Stage Quadrupole (TSQ):



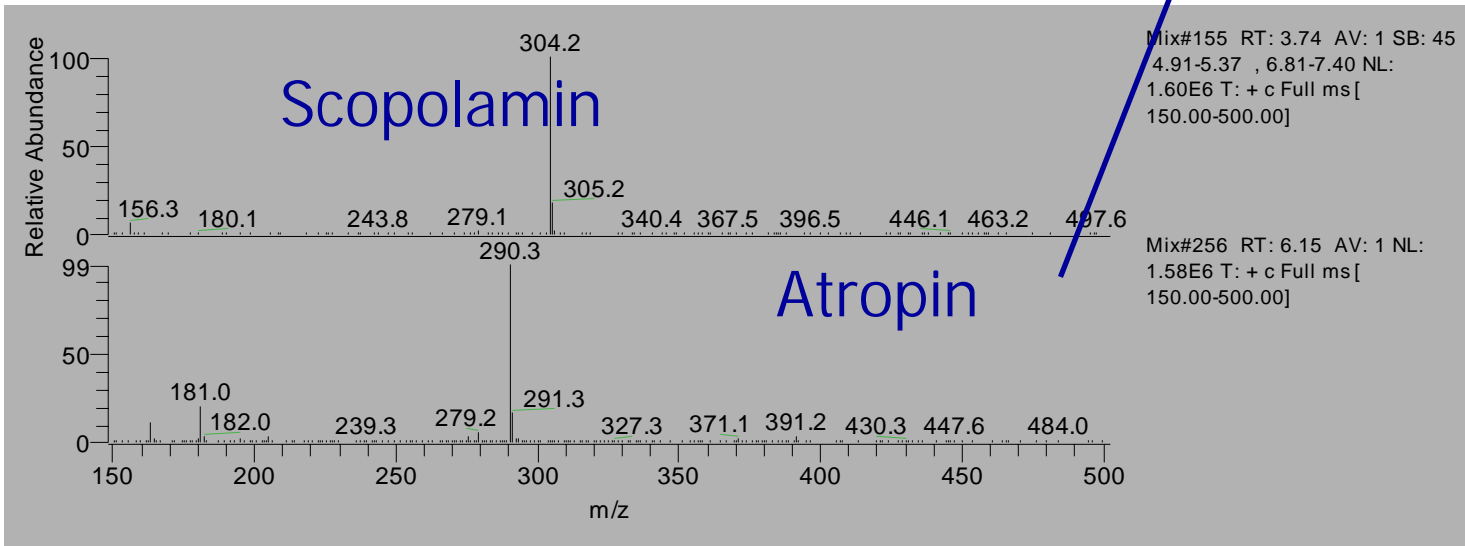
LC-MS Spektrum von Atropin (ESI)



MG = 303



MG = 289

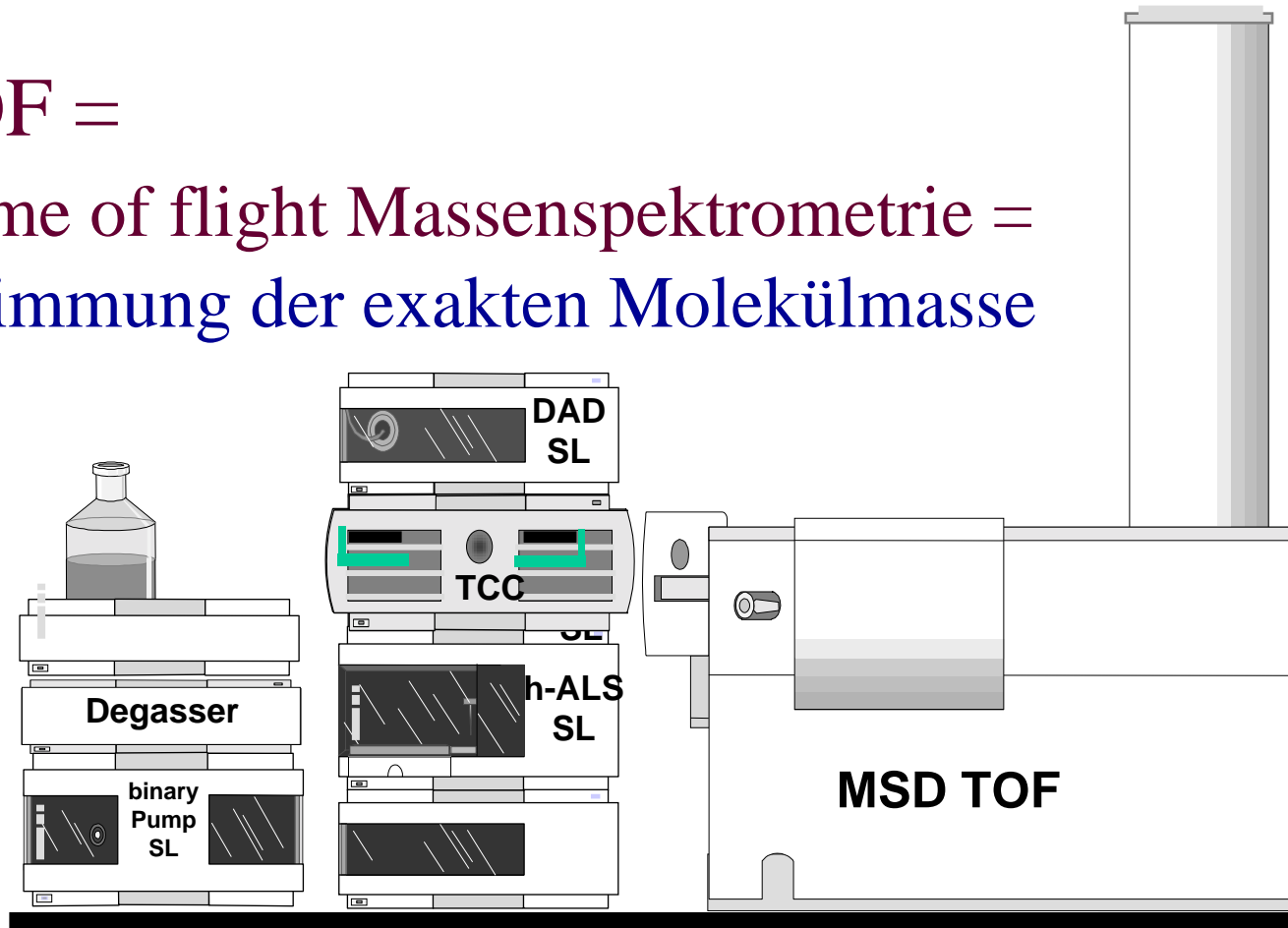


Jürgen
Hallbach

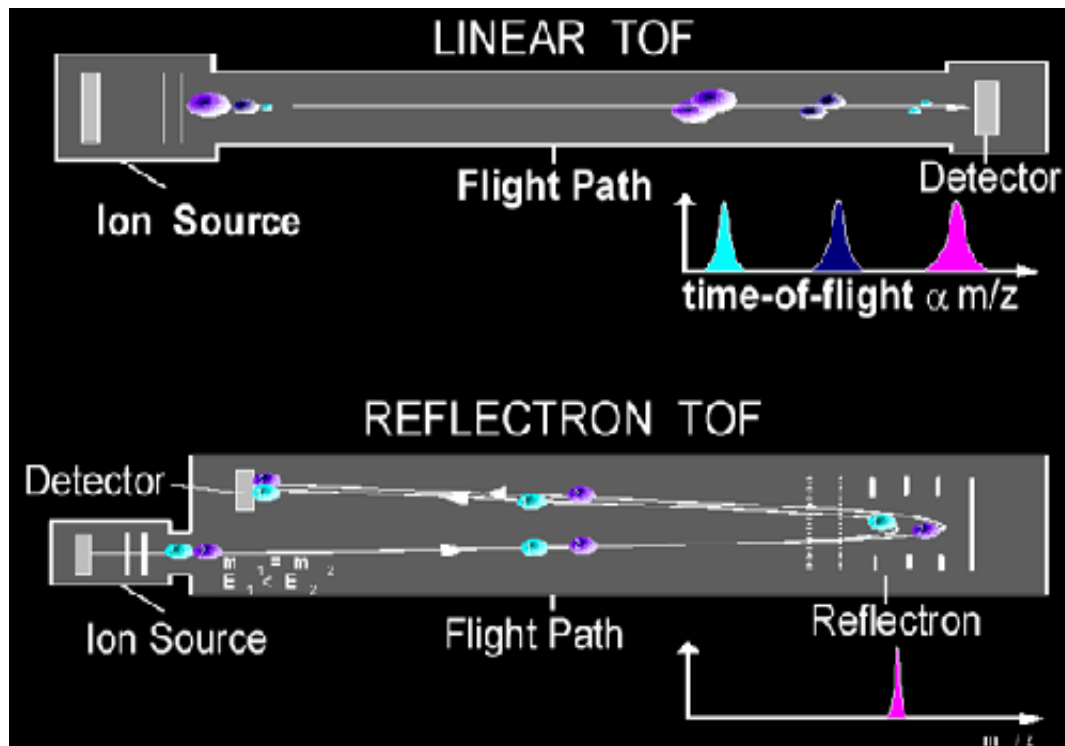
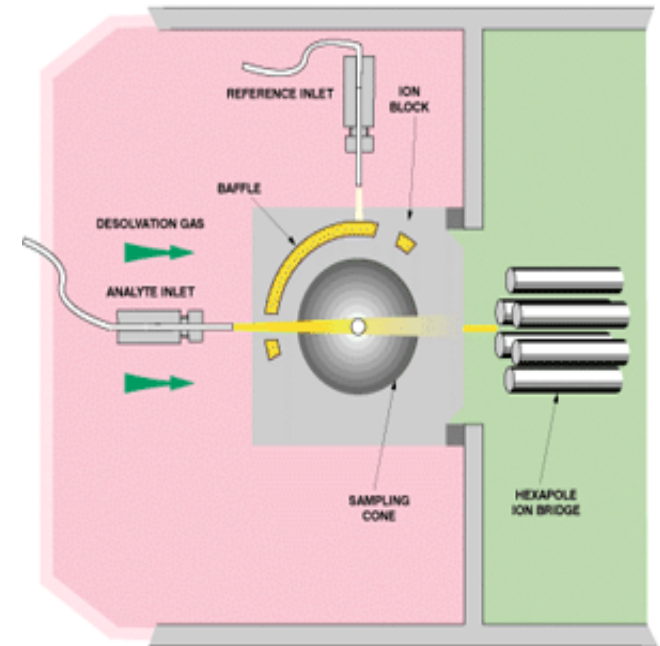
Identifizierung durch exakte physiko-chemische Eigenschaften schon lange üblich, wie z.B.:

- Schmelzpunkt, Dichte oder Molekülmasse

TOF =
time of flight Massenspektrometrie =
Bestimmung der exakten Molekülmasse



Prinzip der hochauflösenden Massenbestimmung (TOF)



städtisches
> **Klinikum
München**



Jürgen
Hallbach

LC-MS-TOF

Hochauflösende Massenspektrometrie im Massenbereich von z.B. 100 –1100 amu, ergibt eine theoretische parallele Nachweisbarkeit von:

1000 Substanzen bei einer Auflösung von +/- 1 amu

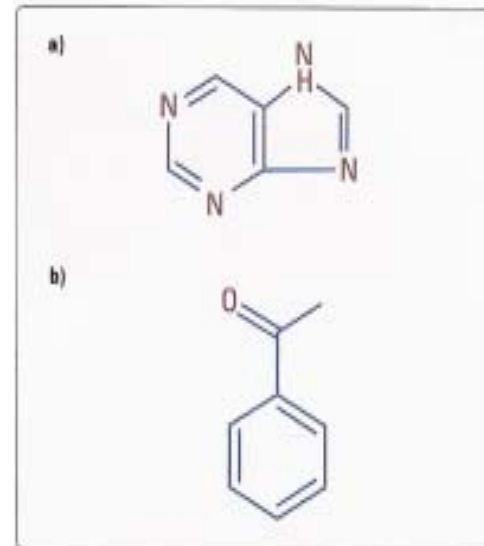
10.000 Substanzen bei einer Auflösung von +/- 0.1 amu

10.000.000 Substanzen bei einer Auflösung von +/- 0.0001 amu

Purin (a) und Acetophenon (b) haben beide formal die Masse 120.

Exakt ist die Masse von Purin 120.0436 und von Acetophenon 120.0575.

Aufgrund der Massendifferenz von 0.0139 u sind beide eindeutig unterscheidbar.



Projekt: TOF Etablierung in der Klinischen Chemie

1. Peak im Chromatogramm
2. Exakte Masse
3. Hitliste mit passenden Summenformeln
4. CAS-Service: zugehörige Strukturformeln und Substanzdaten
5. Verifizierung der Identifizierung mittels Vergleichssubstanz
6. Datenarchivierung
7. **Aufbau einer Vergleichsbibliothek**



Jürgen
Hallbach

LC-MS-TOF

# Agilent TOF Formula data store				
# Version: 1.0				
# Copyright (c) 2006		Klinikum Bogenhausen		
#	Toxicological database			
#Formula		Mass	Compound name	Description
C10H11NO		161,084064	Abikoviromycin	Virucide
C30H40O6		496,282489	Absinthin	Biomolecule
C25H43NO18		645,248014	Acarbose	Enzyme inhibitor
C29H48O2Br2		586,202106	Acebrochol	Hypnotic
C6H10O4		146,057909	Aceburic acid	Analgesic
C18H28N2O4		336,204907	Acebutolol	Beta-Blocker
C15H23N3O2		277,179027	Acecaïnide	Antiarrhythmic
C9H15N2O3Br		278,026605	Acecarbromam	Hypnotic
C9H15NO2		169,110279	Aceclidine	Parasympathomim.
C16H13NO4Cl2		353,022163	Aceclofenac	Antiphlogistic



Jürgen
Hallbach

LC-MS-TOF

Compound List

Compound#	Experiment#	Retention Time	Mass	*Volume
1	1	13.44	224.34347	2173.11
2	1	13.43	405.79653	1031.84
3	1	12.3	325.00018	830.35
4	1	11.12	163.48923	811.66



Jürgen
Hallbach

LC-MS-TOF

Mass Value = 329.0567

#	Ion	Retention Time	Mass	Volume
1	M-H	11.23	328.04942	14.02
2	M-H+1	11.23	329.0496	2.72

Mass Value = 329.0567

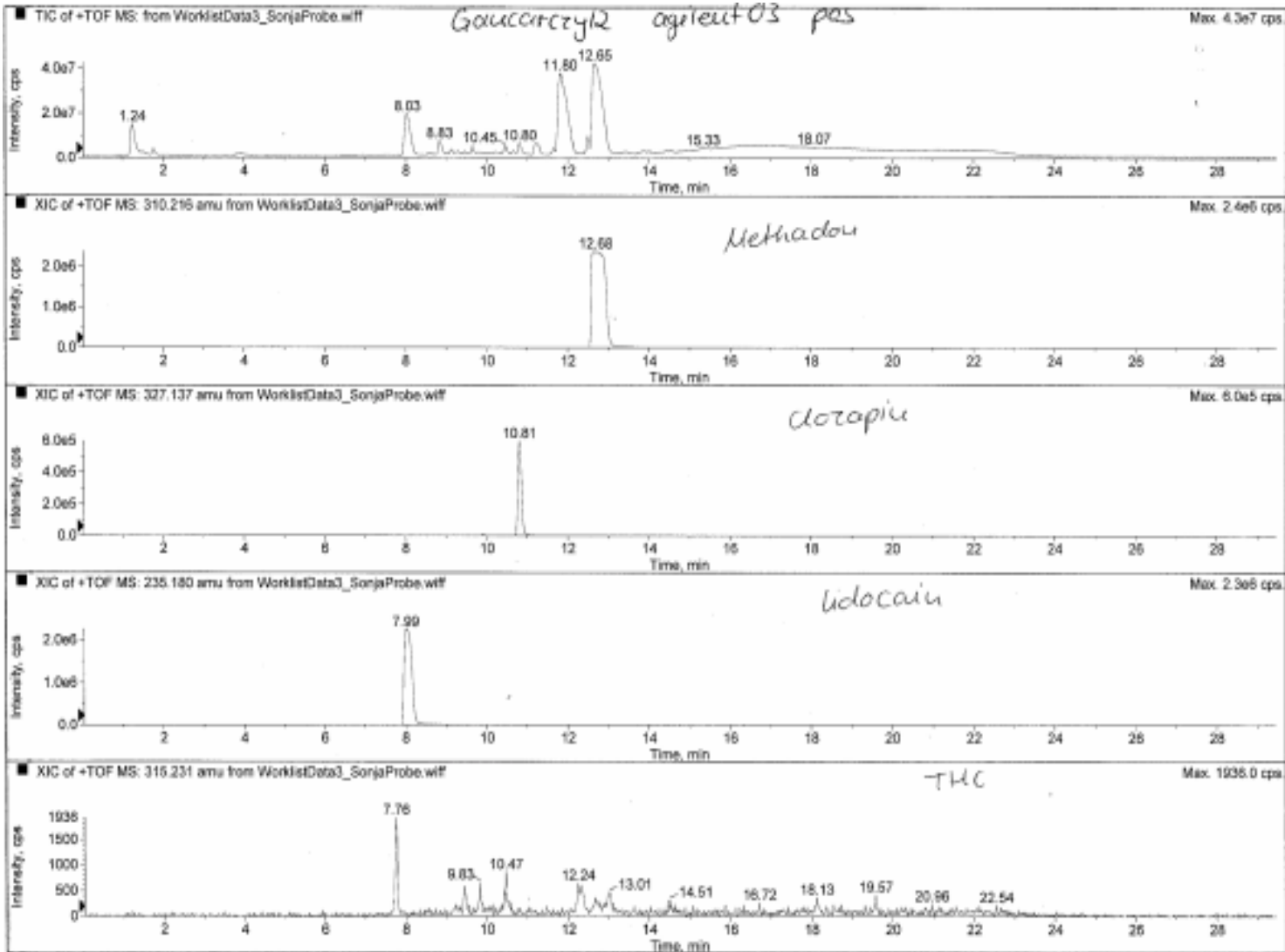
#	Formula	Compound	Mass	Error (mDa) * F
1	C16H12N3O3Cl	Methylclonazepam	329.05672	-0.02



r (mDa) * Error (ppm)	Ret. Time Error	Description
-0.02	-0.1	-- Tranquilizer

Jürgen
Hallbach

LC-MS-TOF



Jürgen
Hallbach

LC-MS-TOF (ff)

Mass Value = 152.04734

#	Ion	Retention Time	Mass	Volume
1	M+H	5.54	153.05462	153.86
2	M+H+1	5.55	154.05797	11.89
3	M+H+2	5.57	155.06028	0.33

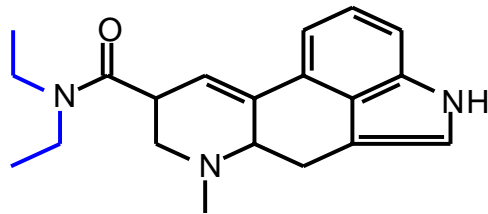
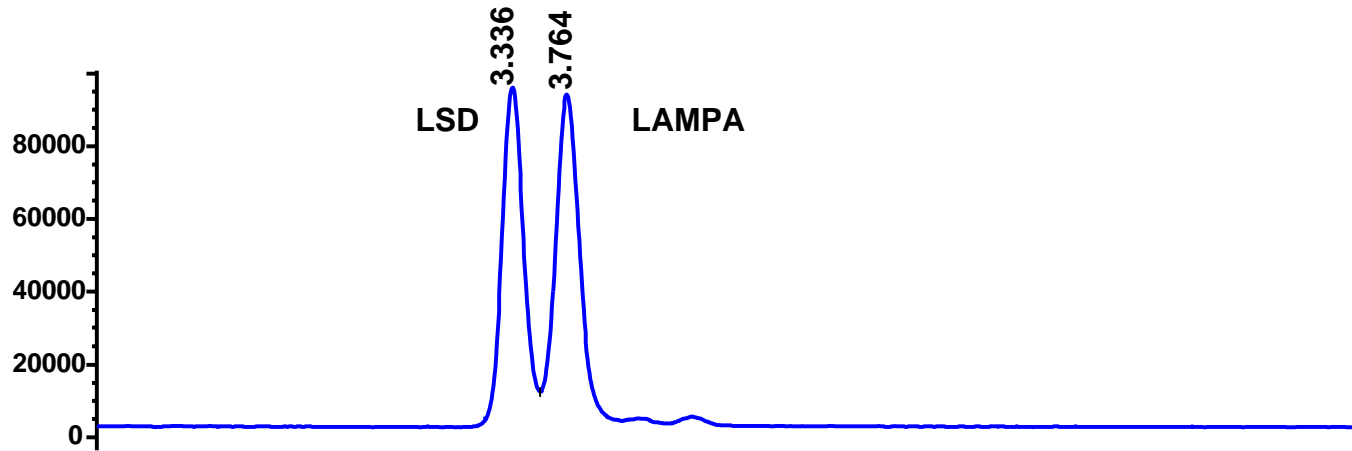
Mass Value = 152.04734

#	Formula	Compound	N
1	C ₈ H ₈ O ₃	Methylsalicylate	
2	C ₈ H ₈ O ₃	Phenoxyacetic acid	
3	C ₈ H ₈ O ₃	Mandelic acid	
4	C ₈ H ₈ O ₃	Hydroxyphenylacetic acid. 3-	
5	C ₈ H ₈ O ₃	Hydroxyphenylacetic acid. 4-	

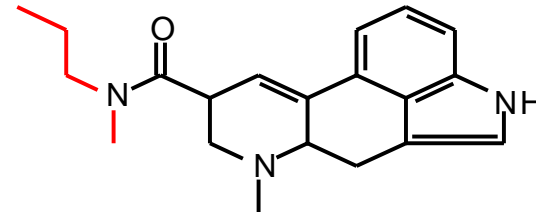
städtisches
**>Klinikum
 München**



Bsp.: Detektion von LSD und seinem Hauptmetaboliten LAMPA



LSD
Lysergic acid diethyl amide
MW 323.43



LAMPA
Lysergic acid methylpropyl amide
MW 323.43

Qualitätssicherung: Ringversuch TX1-2006

Wissenschaftliche Betreuung: Degel, Hallbach

Fallgeschichte:

Eine 21-jährige Patientin wird nach einem selbstverursachten Autounfall in die unfallchirurgische Aufnahmestation eines Großklinikums eingeliefert. Dort erfolgt zunächst ein Frakturausschluß (bestehende Kieferprellung, V.a. Commotio cerebralis).

Die Patientin ist kurzzeitig bewusstlos (ca. 30 Minuten), später somnolent und verhangen. Die Pupillen sind mittelgroß, die Atmung ist unauffällig. Sie hatte bereits am Unfallort einmal gekrampft und erlitt in der Klinik noch mehrere Krampfanfälle. Schließlich erbrach sie mehrmals, unter anderem mindestens 20 „kleine rosa Pillen“.

Aufgrund der Symptomatik wird sie intern auf eine Intensivstation des Klinikums verlegt.



Jürgen
Hallbach

Aufgabenstellung:

Zur Abklärung der vermuteten Intoxikation wird Urin in das Labor gesandt. Eine Blutprobe wird zur Ethanolbestimmung ebenfalls eingesandt, das Ergebnis ist negativ ($<0,1$ g/L).

Die Urinprobe soll im General Unknown Screening untersucht werden.

Die Ergebnisse sollen unter Bezugnahme auf die Fallgeschichte interpretiert werden.

Ringversuch TX1-2006

Rücklauf Ergebnisbögen: 65

Identifizierung der Hauptkomponente: 48

Identifizierung der zusätzlich relevanten Substanz: 8

Angabe falscher (toxikologisch relevanter Substanzen): 5

Zutreffender Interpretationsansatz: 19



Jürgen
Hallbach

Identifizierung der Hauptkomponente: 48

Tilidin

Identifizierung der zusätzlich relevanten Substanz: 8

Naloxon

Zutreffender Interpretationsansatz: 19

z.B.: Die Bewusstlosigkeit und Somnolenz lassen auf die Einnahme von Tilidin schließen. Auch die Krampfanfälle und das Erbrechen lassen sich darauf zurückführen. Die unauffällige Atmung lässt den Schluß zu, dass ebenfalls Naloxon eingenommen wurde. Es dient als Antidot bei Opioidvergiftungen.



Jürgen
Hallbach

Warum immer Chromatographie?

1. Fall aus der klinischen Drogentherapie:

Patientin, 37 Jahre:

Immunchemische Befunde:

- Benzodiazepine positiv
- Cocain positiv
- Methadon positiv

Chromatographisch:

- Temazepam (GCMS)
- Cocain und Metabolit (HPLC, GCMS) + Cocaethylen (GCMS)
- Clomethiazol (GCMS)
- Ibuprofen (GCMS)



Warum immer Chromatographie?

2. Fall: Männlich, 35 Jahre:

Intoxikationsverdacht mit „LSD“

Immunchemische Befunde:

- Benzodiazepine positiv

Chromatographisch:

- Nordazepam, Oxazepam, Midazolam (GCMS)
- Morphin (HPLC, GCMS) und Codein (GCMS)
- Fentanyl (GCMS)
- Buprenorphin (GCMS)
- Paracetamol (GCMS)
- Lidocain und Metabolit (HPLC, GCMS)



Fallbeispiel: Vergiftungen mit Amitriptylin:

3. Fall:

Patientin: 45 Jahre, Klinikaufnahme 20 Uhr

Befunde: Koma, QRS-Verbreiterung, Sinusbradykardie, catecholaminpflichtig

Laborbefunde:

Amitriptylin: 1,3 mg/l

Amitriptylin und Metabolite: 1,7 mg/l (toxisch ab 0,5 mg/l)

Paracetamol: 25,5 mg/l

Codein: 0,45 mg/l

Zusätzlich: Propyphenazon-Nachweis, Coffein-Nachweis



Fallbeispiel: Vergiftungen mit Amitriptylin:

4. Fall:

Kind: 2,5, 11 Uhr Ingestion von bis zu 25 mg Saroten retard,
Klinikaufnahme (Kinder-Intensiv) 19 Uhr

Laborbefunde auswärts:

Tricyclische Antidepressiva immunologisch: 0,117 mg/l (toxisch ab 0,5 mg/l)

Eigene Laborbefunde:

- Amitriptylin/Serum: 0,05 mg/l
- Nortriptylin/Serum: 0,07 mg/l
- Amitriptylin/Urin: 0,5 mg/l
- Amitriptylin : Metabolite/Urin: 1 : 19



Fallbeispiel: Vergiftungen mit Amitriptylin (Fortsetzung):

Aus dem BEFUND:

- Die Befundkonstellation spricht für eine zeitlich zurückliegende Amitriptylinintoxikation (Halbwertszeit > 8h).
- Die gemessene Plasmakonzentration liegt bereits wieder im therapeutischen Bereich.
- Aufgrund der hohen Konzentration von Metaboliten im Urin sollte im Blut ursprünglich eine deutlich höhere Amitriptylinkonzentration vorgelegen haben

•FAZIT:

Der immunologische Vorbefund wurde zwar bestätigt, das Ausmaß der Vergiftung aber nur durch die zusätzliche Urinuntersuchung offenkundig.

Bei schwieriger Familiensituation (Tod von Großmutter und Vater innerhalb einer Woche) war der vermutliche Einnahmezeitpunkt um einen Tag falsch angegeben worden.



Fall 5:

Ein 10 jähriges Kind fühlt sich morgens nicht ganz wohl, geht dann aber doch in die Schule. In der Pause muss das Kind erbrechen, vor Unterrichtsschluß kollabiert es.

Das Kind wird auf eine Kinderintensivstation verbracht.

Nach neurologischer und internistischer Abklärung ergibt sich ein Vergiftungsverdacht. Im Kliniklabor wird ein „negatives“ Drogenscreening durchgeführt.

Toxikologische Laboranalytik:

Um 22 Uhr fanden sich in unserem Labor im Urin große Mengen Chlorprothixen-Metaboliten und im Serum Chlorprothixen ca. 10-fach oberhalb des therapeutischen Bereichs.

Später räumte die Mutter ein, dass sie dem Kind morgens Hustensaft aus der Hausapotheke gegeben habe. Dieser erwies sich „unerklärlicherweise“ als Chlorprothixen.



Zusammenfassung

- Bei unklaren Fällen sollte eine Intoxikation durch toxikologische Analytik ausgeschlossen oder bestätigt werden
- Giftnotruf in Anspruch nehmen
- Sich über den Untersuchungsumfang (Methodik) und die Qualitätssicherung (Ringversuchszertifikate) des toxikologischen Labors informieren
- Telefonischen Kontakt mit dem Untersuchungslabor aufnehmen
- Bei positiven Drogenbefunden Bestätigungsanalytik konsequent durchführen lassen