

Diagnostyka laboratoryjna w toksykologii weterynaryjnej

Eliza Anna Niemczycka¹, Urszula Bracha*, Klaudia Dubniewicz*

z Katedry Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR w Krakowie¹

Laboratory diagnostics in veterinary toxicology

Niemczycka E.A.¹, Bracha U., Dubniewicz K., Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical College of Jagiellonian University, University Centre of Veterinary Medicine, Jagiellonian University-Agricultural University in Cracow¹

The aim of this article was to present laboratory methods used in veterinary toxicology together with the choice of material or specimen for analysis, securing the sample and procedure of preparing this chosen material for sending to laboratory with covered letter. Poisoned animals are an important group of veterinary patients. Finding of the cause of poisoning, gives not only an opportunity to apply targeted treatment. It significantly helps to prevent similar poisoning in the future, gives a confirmed diagnosis to the owner and becomes one more important clinical experience to veterinarian. Laboratory result may serve as an evidence in the court in a poisoning case also. Every step of choosing the material for analysis, then securing the sample, and preparing it for transportation, with properly constructed cover letter, to appropriate, preferably authorized laboratory, is extremely important to the reliable result of investigation.

Keywords: veterinary toxicology, laboratory methods, samples.

* Studentki VI roku (U.B.) i V roku (K.D.) Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR w Krakowie, Studenckie Koło Naukowe Praktyczna Toksykologia Zwierząt.

Lekarze weterynarii spotykają się w swojej praktyce z zatruciami u różnych gatunków zwierząt. Diagnostyka zatruc stanowi więc bardzo ważną część medycyny weterynaryjnej, a identyfikacja substancji będącej przyczyną zatrucia umożliwia właściwe ukierunkowanie postępowania leczniczego. Nawet wtedy, gdy z przyczyn technicznych identyfikacja trucizny następuje już po wyleczeniu pacjenta lub po jego śmierci, w dalszym ciągu pełni ważną rolę. Pomaga

bowiem w zapobieżeniu podobnym zatruciom w przyszłości, a także w znalezieniu ewentualnego sprawcy zatrucia. Daje także odpowiedź właścicielowi, jaka była pewna przyczyna choroby jego zwierzęcia. Wzbogaca również wiedzę i doświadczenie lekarza. Ponadto wyniki badania laboratoryjnego nierazko stanowią późniejszy dowód w sprawie sądowej o umyślne zatrucie. Obecne metody laboratoryjne dają ogromne możliwości w precyzyjnym rozpoznawaniu związków będących przyczynami zatruc. Niniejszy artykuł ma za zadanie przedstawić sposoby pobierania i zabezpieczenia próbek do badań toksykologicznych, przygotowanie ich do transportu i transport oraz sposoby napisania pisma przewodniego. Omówione zostały również niektóre metody diagnostyki laboratoryjnej wykorzystywane do identyfikowania trucizn w medycynie weterynaryjnej.

Sposoby pobierania i zabezpieczania próbek do badań toksykologicznych, przygotowanie do transportu i transport

Jednym z najważniejszych czynników analizy toksykologicznej jest odpowiednio pobrany materiał. Niejednokrotnie warunkuje on postawienie prawidłowej diagnozy zatrucia. O wyborze decydują dane z wywiadu oraz znajomość właściwości trucizny, jej metabolizmu, droga wniknięcia do organizmu oraz czas, jaki upłynął od chwili zatrucia (1). Dlatego też do badań toksykologicznych wybiera się materiał, w którym najłatwiej wykryć truciznę (znajduje się w największej ilości i niezmięnionej postaci bądź ma powinowactwo do określonych tkanek i narządów.

W przypadku zatruc zawsze należy zakładać, że właściciel zatrutego zwierzęcia (zwierząt) może na drodze sądowej domagać się odszkodowania za poniesione straty. Materiał zatem musi być pobrany, przechowywany i transportowany tak, aby jego pochodzenie było nie tylko znane, ale i możliwe do udowodnienia. Do minimum należy ograniczyć liczbę osób stykających się z próbkami oraz zachować pełną dokumentację przypadku (1).

Próbki od zwierząt podejrzanych o zatrucie można pobierać przyżyciowo (przed podaniem leków) i pośmiertnie. Jeśli zwierzę żyje, ale wykazuje objawy wskazujące na zatrucie, należy jak najszybciej je zabezpieczyć i w miarę możliwości, biorąc pod uwagę kondycję zwierzęcia, pobrać krew, mocz, kał, wymiociny lub popłuczyny z żołądka (2). Mocz jest szczególnie ważny, gdyż wydalanych w nim jest wiele trucizn i ich metabolitów (arsen, ołów, barbiturany, nikotyna, antymon i inne). Próbki sierści, skóry lub jej wytworów są odpowiednie przy skórnych narażeniach na truciznę, np. pestycydy fosforoorganiczne czy permetryna (3).

Wersenian sodu (EDTA) jest preferowanym antykoagulantem przy pobieraniu pełnej krwi (3), za wyjątkiem badań w kierunku podejrzenia o zatruciu metalami ciężkimi (1). Heparyna jest akceptowalna w pewnym przypadkach, jednak występuje tendencja do jej unieczynnienia, powstawania skrzepów i tym samym niepowodzenia testów (3). Krew pełna przed analizą powinna zostać schłodzona. Osocze lub surowica również są odpowiednim materiałem do badań (4).

W przypadku śmierci zwierzęcia należy bezzwłocznie przeprowadzić sekcję zwłok (2). Jeśli nie jest to możliwe bezpośrednio po upadku, zwłoki trzeba pozostawić w warunkach chłodniczych lub zamrozić. W trakcie sekcji należy pobierać odpowiedni materiał do badań toksykologicznych. Najczęściej pobierane są: wątroba, treść przewodu pokarmowego, nerki, śledziona, płuca, serce, mózg, żółć, gałka oczna, tłuszcz brzuszny (3). Krew można pobrać bezpośrednio z serca, zaś mocz bezpośrednio z pęcherza moczowego. Zwłoki małych zwierząt można przesać do płacówki badawczej w całości. W celu wykluczenia innych przyczyn śmierci równolegle można pobrać próbki do badania histopatologicznego (10% formalina) i mikrobiologicznego (do jałowych, sterylnych pojemników) – dotyczy to tylko próbek świeżych. Po przeprowadzeniu sekcji, pobraniu i zabezpieczeniu próbek należy wykonać raport ze szczegółowym opisem wszystkich zaobserwowanych zmian.

Czasami zdarza się przesyłanie próbek środowiskowych – gleby czy wody, ale bez tkanek pochodzących od zatrutych zwierząt (np. ryb) czy płynów ustrojowych. Ustalenie przyczyny może być w takim przypadku utrudnione, gdyż w środowisku trucizna ulega bardzo dużemu rozcieńczeniu i jej stężenie musi być bardzo wysokie, aby można je było wykryć.

Poszczególne próbki umieszcza się w czystych pojemnikach szklanych lub atestowanych pojemnikach plastikowych (5). Nie należy wkładać materiałów absorbujących (gaza, wata, ręczniki). Nie wolno przesyłać próbek w pojemnikach metalowych, brudnych, a zwłaszcza z pozostałościami po różnych środkach chemicznych.

Suchy materiał biologiczny, jak włosy, powinien być pobierany do oddychających pojemników (papierowe koperty, papierowe torby). Pasze treściwe można przesać w torbach papierowych lub plastikowych, pasze objętościowe w workach papierowych, a kiszonki w czystych opakowaniach szklanych. Przykłady próbek, wraz z zalecaną ilością, sposobem przechowywania i celem analizy dokładniej omówiono w **tabeli 1**. W przypadku zatruc pszczoł do badania należy przesać próbkę podstawową zawierającą minimum 200 sztuk martwych owadów (ok. 1 szklanka) oraz skażone rośliny, próbkę preparatu użytego do zabiegu agrotechnicznego, próbkę ziemi z plantacji poddanej zabiegowi oraz próbki plastrów ulowych (pierzgi, miodu, czerwii o wymiarach 10 × 10 cm).

Każda próbka powinna być zapakowana oddzielnie, a pojemnik opatrzony etykietą z kolejnym numerem i opisem zawartości. Nie wolno oznakowywać nakrętki, ponieważ może ulec zgubieniu lub pomieszaniu. Jednym z najczęściej popełnianych błędów jest przesyłanie próbek różnych narządów w jednym opakowaniu. Od różniczenie poszczególnych tkanek po rozmrożeniu może być problematyczne, ponadto warunki takie sprzyjają kontaminacji poszczególnych tkanek. Pobrane próbki powinny być zabezpieczone przed przypadkowym lub umyślnym uszkodzeniem, zanieczyszczeniem lub ingerencją osób postronnych. Można opakowanie okleić taśmą i umieścić na niej pieczęć firmową, datownik itp.

Próbki po pobraniu należy jak najszybciej dostarczyć do laboratorium (najlepiej schłodzone lub zamrożone). Nie należy dodawać żadnych środków konserwujących (chyba, że laboratorium wskaże inaczej). Aby próbki dotarły w odpowiednim stanie, należy je umieścić w styropianowym pudełku z wkładami mrożącymi lub zamrożoną butelką wody.

Stan, w jakim próbki dotrą do laboratorium, decyduje o tym, czy zostaną one dopuszczone do badań. Osoba przeprowadzająca badanie toksykologiczne może odstąpić od badań, jeśli uzna, że próbka nie jest zdatna do badań (np. daleko posunięty proces rozkładu, rozmrożenie) lub jeśli przystąpi do badań, to wynik może być niereprezentatywny.

Pismo przewodnie

Pismo przewodnie jest dokumentem, który należy przesać do laboratorium wraz z materiałem przeznaczonym do badania toksykologicznego. Poprawnie wypełnione pismo powinno zawierać informacje niezbędne do prawidłowego przeprowadzenia badania toksykologicznego oraz pozwalające na zredukowanie czasu i kosztów procesu analitycznego. Zazwyczaj laboratoria posiadają własne formularze. W dokumencie należy podać powód podjęcia badania toksykologicznego oraz jego kierunek, a także istotne informacje dotyczące pobranego materiału oraz samego pacjenta, które mogą być pomocne w toku identyfikacji trucizny. Pismo przewodnie powinno zawierać:

- 1) informacje podstawowe: dane właściciela zwierzęcia/zwierząt (imię, nazwisko, adres), dane zwierzęcia (gatunek, rasa, płeć, wiek);
- 2) informacje na temat pobranego materiału: rodzaj (np. krew/surowica/mocz/treść żołądka/całe zwłoki

Tabela 1. Pobieranie próbek do badań toksykologicznych

Materiał	Ilość	Sposób przechowywania	Cel analizy
Próbki pobierane przyżyciowo			
Krew	5–10 ml	próbówki z antykoagulantem (EDTA, heparyna), schłodzone Uwaga: nie stosować EDTA przy podejrzeniu zatrucia metalami ciężkimi	metale ciężkie, cyjanki, antykoagulanty, amoniak, pestycydy
Surowica	5–10 ml	próbówki bez antykoagulantu (na tzw. skrzep), schłodzone	metale, azotany (III) i azotyny (V), amoniak, glikol etylenowy, alkaloidy, toksyna botulinowa, elektrolity
Płyn mózgowo-rdzeniowy	1 ml	próbówki bez antykoagulantu (na tzw. skrzep)	sód
Mocz	50 ml	plastikowy jałowy kubeczek lub słoik, schłodzony	alkaloidy, metale, leki, antybiotyki, szczawiany, insektycydy, herbicydy
Kał	250 g	plastikowy jałowy kubeczek lub słoik, schłodzony	leki, trucizny wydalane głównie z żółcią
Wymiociny, popłuczyny z żołądka	100 g	plastikowy jałowy kubeczek lub słoik, schłodzony	metale, pestycydy, antykoagulanty, mykotoksyny, rośliny toksyczne
Mleko	30 ml	plastikowy jałowy kubeczek lub słoik, schłodzony	antybiotyki, pestycydy, polichlorowane bifenyle
Włosy, sierść	5–10 g	papierowe opakowania, przechowywać w suchym miejscu	metale, pestycydy, przewlekła selenoza
Próbki pobierane pośmiertnie			
Mocz, krew, surowica, inne płyny ustrojowe	1–50 ml	zasady takie same jak przy próbkach od zwierząt żywych	jak przy próbkach od zwierząt żywych
Wątroba	100–250 g	worek strunowy lub czysty pojemnik	metale, pestycydy, alkaloidy, antykoagulanty, aflatoksyny, toksyna botulinowa
Nerki	100–250 g	worek strunowy	metale, związki fenolowe, szczawiany, witamina D3 (rodentycyd), glikol etylenowy
Mózg	połowa	połowa do worka strunowego, druga połowa do badania histopatologicznego	związki lotne, insektycydy, fosforoorganiczne, alkaloidy, barbiturany, tał, rtęć oraz trucizny wykazujące powinowactwo do tkanki nerwowej oraz tłuszczowej
Tłuszcz	100 g	worek strunowy	pestycydy, dioksyny
Płuca	100 g	worek strunowy	parakwat
Trzustka	100 g	worek strunowy	metale (cynk)
Treść przewodu pokarmowego	100 g	czysty pojemnik szklany lub plastikowy	metale, antykoagulanty, pestycydy
Kości	100 g, najlepiej jedna kość długa	worek strunowy lub innego rodzaju worek plastikowy	fluor
Próbki środowiskowe			
Pasza	2 kg	sucha: opakowania papierowe mokra: opakowania plastikowe – zamrozić	metale, pestycydy, jonofory, antybiotyki, witaminy, stymulatory wzrostu, toksyny roślinne, sól NaCl, mykotoksyny, toksyna botulinowa
Przynęty, trutki	200 ml lub g	płynne: pojemnik szklany stałe: opakowanie plastikowe	niezidentyfikowane chemikalia
Rośliny	całe rośliny	świeże lub sprasowane	identyfikacja roślin
Woda	1 l	pojemniki szklane	azotany (III), azotyny (V), pestycydy, metale [1], sól NaCl, toksyny sinicowe, siarczyny
Gleba	1 kg	pojemniki szklane	pestycydy, metale ciężkie [5]
Owady, pancerze owadów	3–5 g (~100 okazów)	żywe lub martwe pojemniki szklane	identyfikacja owadów, toksyny organiczne, metale ciężkie, farmaceutyki

itp.), data i godzina pobrania materiału/wykonania sekcji, opis zmian anatomopatologicznych;
3) informacje na temat pacjenta: czas i miejsce wystąpienia objawów/padnięcia, dokładny opis objawów klinicznych, okres trwania choroby, stosowane leki, sposób żywienia, warunki środowiskowe, informacje nt. innych zwierząt w gospodarstwie i ich stanu zdrowia.

Należy zwrócić uwagę, aby opis i numeracja przesyłanych próbek zgadzały się z ich wykazem umieszczonym w piśmie przewodnim. W piśmie można również umieścić podejrzenie lub rozpoznanie zatrucia oraz sugestię odnośnie kierunku badania laboratoryjnego. Dokument powinien także zawierać dane wypełniającego go lekarza (podpis, pieczęć, adres, telefon).

Wybrane metody diagnostyki laboratoryjnej stosowane w toksykologii weterynaryjnej

Chromatografia

Chromatografia jest metodą rozdzielania składników jednorodnych mieszanin w wyniku różnego ich podziału między fazę ruchomą i nieruchomą układu chromatograficznego (6). Fazą ruchomą może być gaz, ciecz lub fluid nadkrytyczny, a fazą nieruchomą (stacjonarną) ciało stałe lub ciecz. Cząsteczki obu składników dzielą się między obie fazy w różnych stosunkach, charakterystycznych dla tych składników. Dzięki odmiennym właściwościom fizykochemicznym substancji możliwa jest ich późniejsza identyfikacja.

Chromatografia cienkowarstwowa (thin-layer chromatography, TLC)

Jest rodzajem chromatografii cieczowej. Ze względu na swoją niską cenę, prostotę i możliwość identyfikacji zarówno związków polarnych, jak i niepolarnych, metoda TLC jest chętnie używana w weterynarii (7). Niestety, cechuje się dużo niższą swoistością niż inne dostępne metody (8). TLC znajduje często zastosowanie w badaniach przesiewowych. Czułość metody wynosi 10^{-5} – 10^{-7} g (1).

Materiał do badań stanowić może krew, mocz, żółć, zawartość żołądka, ślina, kał, płyn mózgowo-rdzeniowy (4). W większości przypadków materiał biologiczny jest mieszaniną złożoną, dlatego też próbki wymagają odpowiedniego przygotowania – oczyszczenia oraz osiągnięcia odpowiedniego stężenia do przeprowadzenia procesu chromatografii cienkowarstwowej. Najczęściej używaną metodą jest ekstrakcja w układzie chloroform–metanol (2:1) poprzedzona przemywaniem fazy organicznej 0,88% roztworem KCl (metoda Folcha).

Chromatografia cienkowarstwowa często wykorzystywana jest do wykrywania takich związków, jak: leki – np. NLPZ, barbiturany, benzodiazepiny (8), tetracykliny (10), pestycydy – np. insektycydy fosforoorganiczne (11), narkotyki – np. amfetamina (8), kannabinoidy (8), mykotoksyny: aflatoksyny (7), DON (12), toksyny penicylin (12). Warunkiem analizowania związków za pomocą chromatografii cieczowej jest ich rozpuszczalność w fazie ruchomej.

Chromatografia gazowa (gas chromatography, GC)

Jest jedną z niewielu technik pozwalających na równoczesne rozdzielanie, zidentyfikowanie oraz ilościowe oznaczenie składników złożonych mieszanin, mogących zawierać nawet kilkaset komponentów. Jest to jedna z najpowszechniejszych metod stosowanych w analizie chemicznej (6, 13, 14). Wyróżnia się dwa rodzaje chromatografii gazowej: adsorpcyjną chromatografię gazową – w układzie gaz–ciało stałe (gas–solid chromatography, GSC) i podziałową chromatografię gazową – w układzie gaz–ciecz (gas–liquid chromatography, GLC; 13, 14). Chromatografia gazowa pozwala na analizowanie substancji gazowych, ciekłych i stałych, których temperatura wrzenia lub

sublimacji nie przekracza 350–400°C i w warunkach chromatografowania występują pod postacią gazów lub par (6, 13, 14).

Chromatografia gazowa pozwala na analizę jakościową, czyli identyfikację badanych substancji. Bardzo często do celów analizy toksykologicznej łączy się metodę chromatografii gazowej z technikami spektroskopowymi (m.in. MS, IR, AAS, AES) – spektrometry pełni wówczas funkcje detektorów jakościowych i umożliwiają szybszą, dokładniejszą i mniej pracochłonną analizę jakościową badanych substancji (6, 14). Najczęściej stosuje się sprzężenie chromatografii gazowej ze spektrometrią masową (GC-MS), która daje możliwość komputerowego przeszukiwania baz danych bibliotek widm masowych zawierających widma ponad 40 000 związków (1, 14, 7). Połączenie to stanowi jedną z najsukuteczniejszych technik pozwalających na identyfikację i ilościowe oznaczenie nieznanymi substancji będących składnikami skomplikowanych mieszanin związków organicznych i jest uważane za „złoty standard” w analizie chemicznej. Obok chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią masową (LC-MS), GC-MS jest najszerzej stosowaną metodologią w analizie toksykologicznej i obie te metody są ogólnie akceptowane jako jednoznaczna identyfikacja ksenobiotyków (5, 6, 13, 15). Głównymi wadami techniki GC-MS są: droga aparatura, skomplikowane procedury ekstrakcji i oczyszczania próbek przed ich analizą oraz brak możliwości badania substancji, których nie można wprowadzić do chromatografu w postaci gazowej – przykładami takich związków są metale, sole, liczne antybiotyki i antykoagulanty, mykotoksyny, toksyny bakteryjne, jady i toksyny grzybów (13).

Inną, przydatną metodą specjalną stosowaną w połączeniu z chromatografią gazową jest technika „headspace”. Polega ona na analizie fazy gazowej będącej w równowadze termodynamicznej nad trudno lotną cieczą lub ciałem stałym. Połączenie tych metod jest przydatne w badaniu lotnych trucizn, np. alkoholi, aldehydów, tlenku węgla (II), węglowodorów, siarkowodoru, cyjanowodoru m.in. w próbkach krwi, środkach spożywczych i wodzie (1, 14).

Chromatografia gazowa pozwala na oznaczanie jedynie tych substancji, które są co najmniej w pewnym stopniu lotne, stabilne termicznie i nie są silnie polarne. Związki takie jak chlorowane pestycydy, pestycydy fosforoorganiczne, polichlorowane bifenyle, benzyna, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, niektóre alkaloidy roślinne, rozpuszczalniki i leki oraz wiele innych mogą być z powodzeniem analizowane tą techniką. Do substancji, które są zbyt polarne, aby zastosować w ich analizie chromatografię gazową, należą m.in. związki z kwasem karboksylowym, pierwszorzędową aminą lub wieloma grupami karboksylowymi, jednakże można je analizować za pomocą specjalistycznych kolumn lub innych specjalistycznych technik. Ponadto substancje nielotne, do których należą m.in. steroidy, aminokwasy, wyższe kwasy tłuszczowe, cukry można poddać tzw. derivatyzacji, czyli modyfikacji chemicznej, w wyniku której otrzymuje się pochodną o zwiększonej lotności (13, 14, 16).

Materiał pobierany do analizy za pomocą chromatografii gazowej, to m.in. próbki osocza, surowicy, krwi, moczu, kału, tkanek, śliny, potu, włosów, błon płodowych, wymiocin, treści przewodu pokarmowego, paszy (7, 12, 17, 18, 19, 20). Przykładowe toksyny istotne w diagnostyce weterynaryjnej, które można wykrywać z zastosowaniem chromatografii gazowej, podano w tabeli 2. Chromatografia gazowa umożliwia rozdział, identyfikację i ilościowe oznaczenie składników złożonych mieszanin, jednak jej użyteczność w diagnostyce toksykologicznej jest ograniczona przez długi czas analizy (wyniki zwykle nie są dostępne przez kilka dni). Metoda ta nie sprawdza się w przypadku zatruc ostrych, kiedy trucizna musi

zostać zidentyfikowana w jak najkrótszym czasie, aby jak najszybciej rozpocząć ukierunkowane leczenie. Jednakże jest bardzo użyteczna do identyfikacji toksyn w badaniach pośmiertnych oraz do potwierdzenia oznaczenia trucizn innymi metodami (12, 17, 19).

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (high performance liquid chromatography, HPLC)

Jest to rodzaj chromatografii kolumnowej. Analizę przeprowadza się przy użyciu chromatografu cieczowego (6). Analiza jakościowa polega na identyfikacji pików odpowiadających poszczególnym składnikom badanej próbki. Porównuje się czas retencji pików

Tabela 2. Przykładowe substancje toksyczne oznaczane za pomocą technik chromatografii gazowej w toksykologii weterynaryjnej

Substancja toksyczna	Zalecany materiał	Zalecana technika
Glikol etylenowy	krew, mocz	GC-MS
Metanol	krew	
Etanol	krew	GC + „headspace”
Glikol propylenowy	surowica, mocz, inne płyny ustrojowe	GC-FID
Strychnina	wymiociny, krew, osocze, mocz, popłuczyny żołądkowe, narządy trzewne (wątroba, nerki)	GC-MS, GC-FID
Fosforek cynku (rodentycyd i insektycyd)	wymiociny, treść żołądka, wątroba, nerki	
Gaz musztardowy i jego metabolity	mocz	GC-MS
THC	krew, osocze	GC-MS
Kokaina	Mocz, osocze, treść żołądka	GC-MS
Amfetamina	mocz, osocze	GC-MS
Barbiturany	mocz, krew, tkanki	GC-MS
Amitraza	osocze	GC-NPD
Amitraza	mocz, kał, tkanki, treść żołądka	GC-MS
Brometalina (rodentycyd)	tkanki (wątroba, nerki, tkanka tłuszczowa, mózg)	GC-ECD
Ropa naftowa	krew, mocz	
Kantarydyna (toksyna chrząszcza przyszczela lekarskiego)	mocz, krew, tkanki (nerki), treść przewodu pokarmowego	GC-MS
Alkaloidy cisu (alkaloidy taksynowe)	treść przewodu pokarmowego (zwłaszcza żołądka/żwacza)	GC-MS
Toksyny cyjanobakterii [19]	próbki wody	GC-MS
Jonofory (antybiotyki jonoforowe z polieteryowymi kwasami)	pasza, tkanki	
Olejki eteryczne	mocz	GC-MS
Salbutamol	osocze	
Cykutotoksyna	treść przewodu pokarmowego	
Amoniak	pasza, mleko, surowica	GC-MS
Naftalen	mocz	GC-MS
Fenole	mocz	GC-MS
Terpentyna	surowica	
Insektycydy chloroorganiczne	krew, wątroba, mózg (zatrucia ostre), tłuszcz mleczny, tkanka tłuszczowa (zatrucia przewlekłe)	
Metaldehyd	wymiociny, treść żołądka	GC-MS
Metyloksantyny	wymiociny, treść żołądka	GC-MS
Mykotoksyny tremorgeniczne (rokwefortyna, penitrem A)	wymiociny, treść żołądka	GC-MS
Opioidy	mocz, osocze	GC-MS

Objaśnienia: GC – chromatografia gazowa, MS – spektrometria mas, FID – detektor płomieniowo-jonizacyjny, NPD – detektor azotowo-fosforowy, ECD – detektor wychwytu elektronów.

wzorca z pikiem identyfikowanej substancji. Ilością zawartość składników w próbce oblicza się, wykorzystując fakt, że ilość tych składników jest proporcjonalna do powierzchni lub wysokości ich pików.

Stosując chromatografię cieczową, można analizować znacznie więcej związków niż za pomocą chromatografii gazowej. Rozdzielczość składników mieszanin złożonych jest jednak zwykle gorsza, a czas analizy dłuższy niż w chromatografii gazowej. Możliwe jest rozdzielanie szerokiego wachlarza farmaceutyków, które nie są możliwe do uzyskania w chromatografii gazowej (10). Czułość metody HPLC wynosi 10^{-7} – 10^{-8} g (1).

Materiał do badań stanowić może krew pełna (inhibitory AchE), surowica, osocze (np. acetaminofen; 4), tkanki (rodentycydy; 11), przynęty (rodentycydy; 11), mocznik (rodentycydy; 11), pożywienie (rodentycydy; 21), nawóz (21), gleba (21), osad morski (21), woda (21), świńska gnojowica (altrenogest, ksylazyna; 21), a także inny materiał biologiczny, wspomniany chociażby przy metodzie TLC.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa wykorzystywana jest do wykrywania takich substancji, jak: antybiotyki (makrolidy; 21), fluorochinolony (22), NLPZ (4), benzodiazepiny (9), iwermektyna (23), amitraza (4), salbutamol (4), antykoagulanty (warfaryna, strychnina; 11), narkotyki (amfetamina; 9), kokaina (9), LSD (9), kanabinoidy (9), opioidy (9), mykotoksyny (aflatoksyny; 23), toksyny sinic (23), toksyny chrząszczy (kantarydyna; 23), toksyny roślin trujących (kostrzewa; 23), pestycydy (insektycydy fosforoorganiczne; 11), karbaminiany (4), alkaloidy (4), glikol etylenowy (4). HPLC znajduje także zastosowanie w monitorowaniu terapii (9).

Spektrofotometria

Metoda ta wykorzystuje zjawisko absorpcji promieniowania elektromagnetycznego przez analizowane substancje. Metody spektrofotometryczne mające zastosowanie w analizie toksykologicznej to spektrofotometria UV-Vis oraz spektrofotometria w podczerwieni (IR).

Spektrofotometria UV-Vis wykorzystuje promieniowanie w zakresie nadfioletu (180–400 nm) oraz światła widzialnego (400–800 nm) i stanowi jedną z najstarszych metod instrumentalnych używanych do identyfikacji substancji toksycznych (1, 13, 14). Polega na pomiarze stosunku natężeń dwóch wiązek promieniowania elektromagnetycznego – wiązki padającej na badaną próbkę i wiązki odniesienia – bądź funkcji tego stosunku przy odpowiedniej długości fali (24). Spektrofotometrię UV-Vis najczęściej stosuje się w analizie ilościowej, mającej na celu oznaczenie stężenia badanej substancji. Jednak ze względu na obecność wysokiego podobieństwa widm elektronowych w określonych grupach związków ma ona ograniczone zastosowanie w analizie jakościowej, dlatego stosowana jest głównie jako metoda wstępna lub uzupełniająca identyfikację jakościową związków, zwłaszcza organicznych, oraz w połączeniu z innymi metodami analitycznymi, m.in. spektroskopią IR czy spektrometrią mas (14).

Spektrofotometria UV-Vis pozwala na oznaczenie związków zawierających grupy chromoforowe, absorbujących promieniowanie elektromagnetyczne w różnym stopniu i przy różnych długościach fali (13, 14, 24). W praktyce spektrofotometrię UV-Vis w analizie toksykologicznej wykorzystuje się m.in. do pomiaru aktywności enzymów, np. enzymu acetylocholinoesterazy (AChE), której aktywność zostaje obniżona w wyniku narażenia na m.in. karbaminiany i pestycydy fosforoorganiczne w próbkach krwi lub mózgu według tzw. metody Ellmana (16) czy pomiaru aktywności hamującej alfamannozydazy w przypadku zatrucia alkaloidami indolizydynowymi (18), a także do oznaczania w płynach ustrojowych i tkankach stężenia niektórych substancji toksycznych, m.in. cyjanków (16), parakwatu (herbicydu dipirydiolowego; 12), niektórych środków zwiotczających mięśnie szkieletowe oraz metabolitów alkaloidów pirolizydyny (18).

Spektrofotometria IR wykorzystuje zjawisko absorpcji promieniowania w zakresie światła podczerwonego (800–105 nm) oraz fakt, że każdy związek chemiczny ma charakterystyczne widmo IR, co pozwala na jego identyfikację tą metodą (13, 14). Otrzymane informacje na temat częstotliwości, natężenia i kształtu pasm absorpcyjnych i ich długości fal pozwalają na interpretację jakościową badanych substancji. Analiza ilościowa w spektrofotometrii IR, tak samo jak w spektrofotometrii UV-Vis, opiera się na zależności absorbancji badanej próbki od jej stężenia. Pomiary w spektrofotometrii IR można prowadzić metodą transmisyjną pozwalającą na badanie próbek ciekłych, gazowych i stałych (próbki stałe muszą być w formie roztworów, zawiesin olejowych lub pastylek) lub odbiciową (refleksyjną), którą można badać cieczę i ciała stałe (m.in. tkanki; 14, 24). Spektrofotometria IR znalazła zastosowanie m.in. w alkometrach mierzących zawartość alkoholu etylowego w powietrzu wydychanym w obrębie charakterystycznego dla etanolu pasma absorpcji (13). Bardziej zaawansowaną techniką jest spektrofotometria IR z transformacją Fouriera (FT-IR), która posiada wyższą czułość, lepszą zdolność rozdzielczą oraz pozwala na krótszy czas analizy niż klasyczna spektrofotometria IR. FT-IR pozwala m.in. na oznaczanie nieznanych substancji w minimalnych ilościach badanej próbki, co ma zastosowanie m.in. w toksykologicznej analizie kryminalistycznej. Spektrofotometrię IR oraz FT-IR są również używane w połączeniu z chromatografem gazowym. Połączenie to, dzięki wysokiej czułości analizy, stosuje się m.in. w oznaczaniu ksenobiotyków w próbkach biologicznych na poziomie ppb (13, 14).

Spektrofluorymetria nie należy co prawda do metod spektrofotometrycznych, ale zasada jej działania jest bardzo podobna. Pozwala na pomiar natężenia promieniowania fluorescencyjnego emitowanego przez analizowaną substancję po jej wzbudzeniu przez promieniowanie o odpowiedniej długości fali. Spektrofluorymetria czułością znacznie przewyższa spektrofotometrię UV-Vis i IR (13, 24). Metoda ta jednak nadaje się jedynie do oznaczania niewielkich ilości substancji i najlepiej sprawdza się przy oznaczaniu

związków planarnych zawierających układ aromatyczny, w tym salicylanów i barbituranów, niektórych alkaloidów (m.in. chininy) oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Ponadto spektrofotometryria może być również wykorzystana do oznaczania stężenia ozonu w powietrzu oraz herbicydów dipirydiolowych (m.in. parakwatu) w próbkach gleby i wody (13).

Szybkie metody identyfikacji i oznaczania leków i narkotyków

Szybka diagnoza i wdrożenie leczenia często są kluczowe dla przeżycia pacjenta. W takich sytuacjach przydatne mogą okazać się szybkie metody identyfikujące substancje toksyczne. Jednakże dokładność takich testów jest dyskusyjna (25). Szybkie testy identyfikujące substancje toksyczne to testy immunoenzymatyczne, wykorzystujące przeciwciała do identyfikacji i pomiaru ilości danych substancji chemicznych. Testy te opierają się na metodzie chromatografii adsorpcyjnej (26). Odczyt wyniku możliwy jest dzięki zmianie koloru, który wskazuje na obecność lub nieobecność poszczególnych składników.

Szybkie testy są często używane w badaniach przesiewowych w medycynie ludzi. Pomimo dużej wrażliwości testy te mogą mieć niską specyficzność, co skutkuje otrzymywaniem fałszywie dodatnich wyników poprzez reakcje krzyżowe z innymi substancjami. Dlatego też otrzymane wyniki dodatnie powinny być dodatkowo potwierdzone przy pomocy innych metod, np. chromatografii gazowej (GC/MS), która jednak jest techniką dużo bardziej pracochłonną i przede wszystkim droższą (5).

Na rynku weterynaryjnym dostępne są szybkie testy na obecność glikolu etylenowego (popularnego składnika samochodowego płynu chłodniczego) we krwi. Materiał do badań, w zależności od testu, stanowi surowica lub osocze (25). Niestety, testy te często dają wyniki fałszywie dodatnie, chociażby po spożyciu przez zwierzę glikolu propylenowego lub gliceryny. Zbyt wczesne lub zbyt późne wykonanie testu z kolei może prowadzić do otrzymania wyników fałszywie ujemnych (testy nie wykrywają metabolitów).

Dostępne na rynku amerykańskim testy dla ludzi są w stanie wykrywać substancje, takie jak: barbiturany, benzodiazepiny, opiaty, metadon, amfetaminę, metamfetaminę, kokainę, THC i fencyklidynę (26). Materiałem diagnostycznym wykorzystywanym do testów jest mocz, którego niewielką ilość należy nakropić na wyznaczone przez producenta miejsce. Badania przeprowadzone na grupie psów wykazały, że testy te są skuteczne w przypadku identyfikacji barbituranów, opiatów, benzodiazepin, amfetaminy i metamfetaminy w moczu psów. Testy nie okazały się skuteczne w przypadku identyfikacji THC i metadonu. W przypadku kokainy i fencyklidyny nie dysponowano odpowiednią liczbą prób, by potwierdzić lub zaprzeczyć skuteczności testów.

Na polskim rynku dostępne są szybkie testy potwierdzające obecność narkotyków i leków w moczu. Są to testy stosowane w toksykologii ludzi

o niepotwierdzonej do tej pory skuteczności w przypadku badań weterynaryjnych. Istnieją jednak przesłanki, że również te testy mogą okazać się skuteczne w przypadku zwierząt.

Absorpcyjna spektrometria atomowa (atomic absorption spectrometry; AAS)

Jest jedną z podstawowych metod stosowanych do oznaczania w analizowanych próbkach zawartości metali. Pozwala na oznaczanie ok. 70 pierwiastków (13, 14). Wykorzystuje zjawisko absorpcji promieniowania elektromagnetycznego o charakterystycznej długości fali przez wolne atomy, które przechodzą ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego. Pozwala na ilościową analizę oznaczanego pierwiastka w badanym materiale. Przed analizą badana próbka musi zostać poddana odparowaniu, atomizacji i wzbudzeniu. W tym celu stosuje się dwie główne techniki: płomieniową (flame atomic absorption spectrometry; F-AAS), oraz bezpłomieniową (electrothermal atomic absorption spectrometry; ET-AAS lub graphite furnace atomic absorption spectrometry; GFAAS). W metodzie płomieniowej próbka musi być w postaci roztworu, natomiast metoda bezpłomieniowa pozwala na analizowanie substancji ciekłych i w niektórych przypadkach stałych oraz oznaczanie bardzo niskich stężeń takich pierwiastków, jak glin, chrom, kobalt, mangan, nikiel, wanał, molibden (13, 14). Ponadto bezpłomieniowa absorpcyjna spektrometria atomowa pozwala na oznaczanie pierwiastków w próbkach o bardzo niskiej objętości (od 5 µl), co jest przydatne w przypadku pacjentów o niewielkich rozmiarach ciała, takich jak ptaki albo małe zwierzęta egzotyczne, od których można pobrać bardzo ograniczoną ilość krwi (7, 13). Oprócz wymienionych wyżej dwóch podstawowych metod atomizacji stosuje się też technikę zimnych par do oznaczania rtęci, technikę wodorkową oraz technikę wykorzystującą atomizery dla substancji stałych, w której atomizacja zachodzi w płazmie laserowej (14, 27).

Absorpcyjna spektrometria atomowa pozwala na badanie, najlepiej w postaci roztworu, próbek krwi, surowicy, moczu, innych płynów ustrojowych, kału, tkanek, kości, włosów, zębów (13, 17). Jest szeroko stosowana do oznaczania stężenia pierwiastków toksycznych w materiale biologicznym, m.in. ołowiu (12, 18, 28, 29, 30, 31), cynku (12), glinu (18), kadmu (28, 29), rtęci (32, 33), wapnia (34, 35), magnezu (35). Metoda ta jest bardzo przydatna do oznaczania akumulacji metali toksycznych w tkankach i z powodzeniem jest używana w monitoringu skażenia środowiska (13, 28, 29, 32, 33). Głównymi zaletami absorpcyjnej spektrometrii atomowej są bardzo wysoka czułość, niska granica wykrywalności pozwalająca na oznaczanie składników śladowych, wysoka selektywność, odtwarzalność oznaczeń, szybkość analizy, prostota obsługi, uniwersalność oraz niedroga aparatura (13, 14, 16). Z kolei podstawową wadą jest konieczność wymiany lampy będącej źródłem promieniowania, za każdym razem kiedy oznacza się inny pierwiastek, oraz możliwość oznaczenia tylko jednego pierwiastka w jednym cyklu pomiarowym (13, 16).

Właściwe pobranie materiału, zabezpieczenie próbek i przesłanie jej do laboratorium to czynności, których jakość wykonania decyduje w dużym stopniu o późniejszych możliwościach identyfikacji trucizny, a także o wiarygodności uzyskanych wyników. Zwłaszcza że mogą być one dowodami w późniejszej ewentualnej sprawie sądowej. Na decyzję dotyczącą wyboru metody oznaczania laboratoryjnego ma wpływ wiele czynników. Oprócz tych związanych z samą trucizną należy również wziąć pod uwagę dostępność sprzętu i wykwalifikowanego personelu, a co za tym idzie czas oczekiwania na wynik oraz ponoszone przez właściciela koszty. Odnosząc się natomiast do samego postępowania z zatrutym pacjentem w kontekście pobierania próbek do badań toksykologicznych i oczekiwania na ich wynik, mamy w głowie stare powiedzenie: *Lecz pacjenta, nie truciznę*, bo choć identyfikacja substancji, która spowodowała zatrucie, jest niezwykle ważna, to absolutny prymat w podejmowanych czynnościach powinno mieć zawsze ratowanie życia i zapobieganie pogarszaniu się stanu zdrowia pacjenta.

Piśmiennictwo

- Barski D., Spodniewska A.: *Toksykologia weterynaryjna. Wybrane zagadnienia*. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Olsztyn 2014.
- Giergiel M., Sell B., Cybulski W., Posyniak A.: Współczesne wyzwania diagnostyki toksykologicznej – postępowanie w przypadkach podejrzeń o zatrucia zwierząt. *Życie Wet.* 2017, **92**, 876–880.
- Volmer P.A., Meerdink G.L.: Diagnostic toxicology for the small animal practitioner. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.* 2002, **32**, 357–363.
- Sherma J., Fried B.: Thin Layer Chromatographic Analysis of Biological Samples. A Review. *J. Liq. Chromatogr R T* 2005, **28**, 2297–2314.
- Gwaltney-Brant S.M.: Veterinary forensic toxicology. *Sage Journals.* 2016, **53**, 1067–1077.
- Witkiewicz Z.: *Podstawy chromatografii*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2005.
- Poppenga R.H., Braselton W.E.: Effective Use of Analytical Laboratories for the Diagnosis of Toxicologic Problems in Small Animal Practice. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.* 1990, **20**, 293–306.
- Wilard M.D., Tvedten H.: *Small animal. Clinical diagnosis by laboratory methods*. Elsevier Saunders. 2012.
- Barile F.: *Clinical Toxicology. Principles and Mechanisms*. CRC Press. 2004.
- Babić S., Ašperger D., Mutavdžić D., Horvat A., Kaštelan-Macan M.: Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta*, 2006, **70**, 732–738.
- Covey T., Henion J.: High Performance Liquid Chromatography in Veterinary Toxicology. *J. Liq. Chromatogr R T* 1984, **7** (S-2), 205–315.
- Peterson M. E., Talcott P.A.: *Small Animal Toxicology*. Elsevier Saunders. 2006.
- Brandys J.: *Toksykologia - wybrane zagadnienia*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego. 1999.
- Szczepaniak W.: *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa. 1996.
- Gupta P.K.: *Concepts and Applications in Veterinary Toxicology: An Interactive Guide*. Springer Nature Switzerland AG, 2019.
- Filigenzi, M.: Analytical Toxicology and Sample Submission Requirements. W: *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. 3rd ed., 2018, 1119–1137.
- Gupta R.C.: *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. 3rd ed., Academic Press, 2018.
- Plumlee K. H.: *Clinical Veterinary Toxicology*. Mosby Inc., 2004.
- Osweiler G.D., Hovda L.R., Brutlag A.G., Lee J.A.: *Small Animal Toxicology*. W: *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion*. Blackwell Publishing Ltd., 2011.
- Krzyżewska I., Kozarska A.: Zastosowanie chromatografii gazowej do detekcji narkotyków w technice kryminalistycznej. *LAB Laboratoria, Aparatura. Badania* 2016, **21**, nr 2, 12–20.
- Srinivasan P.I., Sarmah A.K., Manley-Harris M., Wilkins A.L.: Development of an HPLC method to analyze four veterinary antibiotics in soils and aqueous media and validation through fate studies. *J. Environ. Sci. Health. Part A.* 2012, **47**, 2120–2132.
- Oliveira K.R.W., Sversut R.A., Singh A.K., Amaral M.S., Kassab N.M.: Development and validation of HPLC assay method for marbofloxacin determination in veterinary chewable tablets. *Acta Chromatogr.* 2019, **31**, 291–293.
- Roder J.D.: *Veterinary Toxicology (Practical veterinarian)*. Butterworth-Heinemann. 2001.
- Cygański A.: *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*. Wydanie trzecie zmienione. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne. Warszawa 2002.
- Polak K., Kommedal A.T.: *Field Manual for Small Animal Medicine*. Wiley-Blackwell, 2018.
- Teitler J.B.: Evaluation of a Human On-site Urine Multidrug Test for Emergency Use With Dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2009, **45**, 59–66.
- Farmakopea polska*. Wydanie VIII, tom 1. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych. Warszawa 2008.
- Krupa J., Kogut B.: Zawartość kadmu i ołowiu w mięśniach, wątrobie i nerkach kóz i owiec z okolic Rzeszowa. *Żywność*. 2000 **1**(22), 109–116.
- Szkoda J., Żmudzki J.: Determination of lead and cadmium in biological material by graphite furnace atomic absorption spectrometry method. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2005, **49**, 89–92.
- Selander S., Crami K.: Determination of Lead in Blood by Atomic Absorption Spectrophotometry. *Brit. J. Industr. Med.*, 1968, **25**, 209–213.
- Selander S., Crami K.: Determination of Lead in Urine by Atomic Absorption Spectrophotometry. *Brit. J. Industr. Med.* 1968, **25**, 139–143.
- Szkoda J., Żmudzki J., Grzebalska A.: Determination of total mercury in biological material by atomic absorption spectrometry method. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2006, **50**, 363–366.
- Hansen J.C., Danscher C.: Quantitative and Qualitative Distribution of Mercury in Organs from Arctic Sledge dogs An Atomic Absorption Spectrophotometric and Histochemical Study of Tissue Samples from Natural Long-Termed High Dietary Organic Mercury-Exposed Dogs from Thule, Greenland. *Pharmacol. Toxicol.* 1995, **77**, 189–195.
- Saur P.M.M., Zielmann S., Roth A., Frank L., Warneke G., Ensinkl F.-B.M., Radke A.: Comparison of the Determination of Magnesium by Methylthymol Blue Spectrophotometry and Atomic Absorption Spectrophotometry. *Eur. J. Clin. Chcm. Clin. Biochem.* 1994, **32**, 539–542.
- Thin C.G., Thomson P.A.: Estimation of calcium and magnesium in serum and urine by atomic absorption spectrophotometry. *J. Clin. Path.* 1967, **20**, 280–282.
- Galey F.D.: Diagnostic Toxicology for the food animal practitioner. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.* 2000, **16**, 409–421.
- Tiwari R.M., Sinha M.: *Veterinary toxicology*. Oxford Book Company, 2010.

Lek. wet. Eliza Anna Niemczycka,
e-mail: eliza.niemczycka@uj.edu.pl