

KAZUISTIKA

Využití kapilární elektroforézy pro stanovení kyseliny mravenčí v séru po intoxikaci metanolem – kazuistika

Bocek Robert¹, Kubáň Petr², Foret František², Gabzdyllová Miroslava³

¹Anesteziologicko-resuscitační oddělení, Nemocnice s poliklinikou Havířov

²Skupina bioanalytické instrumentace, Středoevropský technologický institut – Masarykova univerzita, Brno

³Oddělení klinické biochemie, Nemocnice s poliklinikou Havířov

Anest. intenziv. Med., 24, 2013, č. 5, s. 326–331

SOUHRN

Intoxikace metanolem může způsobit diagnostické potíže, pokud neexistuje údaj o požití závažné látky. V úvodu epidemie metanolových otrav v ČR v roce 2012 jsme se s negativní anamnézou konzumace alkoholu potýkali hned několikrát. Hladiny metanolu byly u těchto několika pacientů stopové, někdy dokonce nulové. Pacienti trpěli četnými přidruženými nemocemi, někteří z nich museli být během přijetí resuscitováni. Jednoduchá metoda stanovení hladiny kyseliny mravenčí nebyla v prvních dnech vlny otrav běžně dostupná. Intoxikace metanolem byla definitivně potvrzena v těchto případech až dodatečným vyšetřením

kyseliny mravenčí v séru ve specializované laboratoři s odstupem několika dalších dnů. Tyto skutečnosti nás vedly k ověření možnosti detekce nadlimitní koncentrace formátu v séru rychlým screeningovým vyšetřením. Analýza vzorků krevního séra, odebraných během léčby intoxikace metanolem, kapilární elektroforézou ukázala, že lze dobře monitorovat hladinu formátu v séru jak před zahájením terapie, tak během ní.

KLÍČOVÁ SLOVA

metanol – kyselina mravenčí – acidóza – kapilární elektroforéza – hemodialýza

ABSTRACT

Capillary electrophoretic method for formic acid measurement after methanol poisoning – case report

Methanol intoxication can be difficult to diagnose, especially if there is no supporting evidence of ingestion of the toxic compound. At the beginning of the methanol intoxication epidemic in the Czech Republic (2012) we faced a negative anamnesis of alcohol consumption several times. The measured levels of methanol in these patients were very low, sometimes methanol was even not detected. The patients were suffering from concomitant illnesses and some of them had to be resuscitated during admission. Simple screening methods able to detect formic acid were not available at the beginning

of the epidemic. Eventually, methanol intoxication was confirmed a few days later in a specialized toxicological laboratory. Therefore, we tested a novel capillary electrophoretic method for the rapid screening of concentration of formic acid in the serum above its normal physiological range. Analysis of the serum of the patients intoxicated with methanol proved that monitoring of formate concentration in the serum with the newly developed method before and during the medical management is possible.

KEYWORDS

methanol – formic acid – acidosis – capillary electrophoresis – haemodialysis

ÚVOD

Intoxikace metanolem patří ke vzácným, ale velmi nebezpečným otravám. Vyskytnout se může nahodile, případně v lokálních epidemiích. Pacienti se do zdravotnických zařízení dostanou v různých fázích otravy, mnohdy až za několik dnů po vypití závažného alkoholu. Toxicita samotného metanolu je minimální, ale jeho metabolity, zejména kyselina mravenčí (formiát) patří k extrémně jedovatým látkám.

KLINICKÝ OBRAZ A DIAGNOSTIKA

Samotná diagnostika této otravy bývá obtížná, pokud neexistuje údaj o požití závažné látky ať už z důvodu poruchy vědomí, nebo požití alkoholu postižený popře. Stanovení diagnózy je rovněž složitější u izolovaných otrav než v době probíhající epidemie intoxikací [1].

Původně nevýrazný klinický nález metanolové otravy se dramaticky mění během oxidace metanolu alkoholdehydrogenázou na formaldehyd a toho pak aldehyddehydrogenázou na kyselinu mravenčí. Tento proces nastává odloženě v případě současné konzumace etanolu, typicky v rozmezí 12–24 hodin od požití závažného alkoholu [2, 3]. Formiát vede k metabolické acidóze, inhibuje mitochondriální respiraci, čehož následkem je tkáňová hypoxie s kumulací laktátu a dalším prohlubováním acidózy [4]. Známa je toxicita formiátu vůči zrakovému nervu a CNS, zejména bazálním gangliím [1] – obr. 1. a 2.

V popředí klinického obrazu je postižení GIT. Projevuje se jako abdominální bolesti, nauzea, zvracení [1, 5], hemoragická gastritida [2]. Dochází

k významné hyperventilaci (Kussmaulovo dýchání), často se vyskytuje dušnost. V závažných případech se mohou přidružit generalizované křeče, krvácení do CNS a bezvědomí [1, 6]. Typickým příznakem bývají poruchy vidění, kdy postižení udávají výpadky zorného pole nebo obraz sněhové bouře [2, 6]. V případě delší expozice organismu kyselině mravenčí může dojít ke kompletní trvalé ztrátě zraku. Nedojde-li k včasnému terapeutickému zásahu, může akumulace formiátu vést až ke smrti organismu.

V laboratorních výsledcích dominuje těžká metabolická acidóza (MAC) s pH často nižším než 7,0, významný aniontový gap (AG) (> 16 mmol/l) a osmolální gap (OG) (> 10 mosm/kg). V závažných případech jsou rovněž vysoké hladiny laktátu a hyperkalémie [7]. Hladina kyseliny mravenčí v séru se u zdravých jedinců pohybuje v rozmezí 0,02–0,25 mmol/l [8], podle některých autorů až 1,2 mmol/l [9]. Během závažné intoxikace metanolem může být tato hladina zvýšená až stonásobně. Jako kritická koncentrace byla několika výzkumy stanovena hladina 0,5g/l, což odpovídá přibližně 10 mmol/l kyseliny mravenčí v séru [10, 11]. Po jejím překročení se můžeme obávat závažných následků.

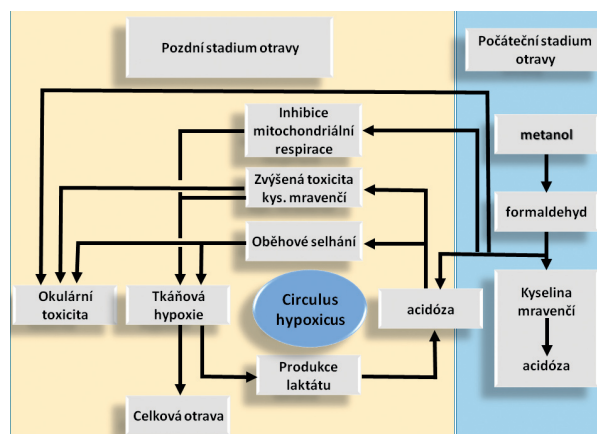
TERAPIE

Terapie je bohužel velmi často zahájena opožděně vzhledem k odloženému nástupu symptomů intoxikace [2]. Nezbytná je rychlá úprava acidózy s aniontovým oknem pomocí hydrogenuhličitanu sodného. Zastavení přeměny metanolu na formaldehyd a kyselinu mravenčí musíme provést okamžitě podáním inhibitoru alkoholdehydrogenázy fomepizolu (4-methylpyrazolu) nebo při jeho nedostupnosti etanolu [3, 5].

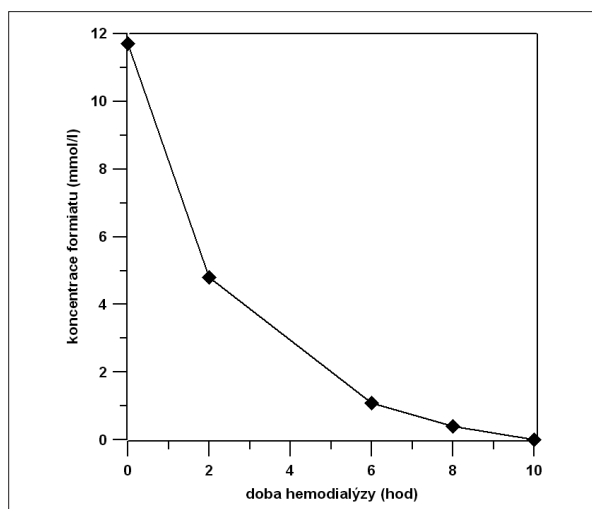
Fomepizol nezpůsobuje útlum CNS, nevyžaduje monitorování plasmatické koncentrace a jeho podání je jednodušší. Nevýhodou je vysoká cena a omezená dostupnost.



Obr. 2 Postižení bazálních ganglií u pacienta intoxikovaného metanolem (archiv RTG odd. NsP Havířov, p. o., zveřejněno se souhlasem pacienta)



Obr. 1 Schéma intoxikace metanolem Upraveno podle [4]



Graf 1 Závislost koncentrace formiátu v krevním séru na době trvání hemodialýzy
Vzorky krevního séra byly odebrány v časovém intervalu 0, 2, 6, 8 a 10 h od zahájení hemodialýzy a byly analyzovány kapilárně elektroforetickou metodou s využitím fumarátu jako vnitřního standardu.

Etanol působí na principu aplikace alternativního substrátu, který je enzymem metabolizován přednostně (afinita etanolu k alkoholdehydrogenáze je asi 15krát vyšší než afinita metanolu k tomuto enzymu). Je snadno dostupný, podává se enterálně nebo parenterálně. Dostatečně účinná hladina etanolu v séru je kolem 1–1,5 g/l.

Eliminace již přítomné kyseliny mravenčí je nejefektivnější pomocí hemodialýzy (HD). Degradaci kyseliny mravenčí lze podpořit podáním kyseliny listové.

Přesný terapeutický postup je stanoven odborným doporučením pro intoxikaci metanolem, které bylo vypracováno např. Toxikologickým informačním střediskem (TIS) VFN v Praze [12].

Prognóza otravy metanolem je dobrá, pokud postižený brzy vyhledá lékařskou péči a léčba je zahájena okamžitě.

STANOVENÍ KONCENTRACE FORMIÁTU VE VZORCÍCH SÉRA PACIENTKY INTOKOVANÉ METANOLEM

Metoda stanovení formiátu v krevním séru pomocí kapilární elektroforézy byla použita při analýze krve pacientky přijaté k hospitalizaci na anesteziologicko-resuscitační oddělení po požití alkoholického nápoje obsahujícího metanol. Kapilárně elektroforetická metoda s bezkontaktní konduktometrickou detekcí, založená na selektivní separaci formiátu v separačním elektrolytu slož-

ném z 10 mmol/l L-histidinu, 15 mmol/l kyseliny glutamové a 30 μ mol/l cetyltrimethylammonium bromidu, je popsána autory příspěvku [13]. Nově vyvinutá metoda je schopná poskytnout orientační výsledek hladiny nejen kyseliny mravenčí, ale i dalších kyselin přibližně do 1–2 minut. Nejednalo se o plánovanou studii, pouze jsme využili nahodilé příležitosti akutní hospitalizace intoxikovaného pacienta metanolem a vzorky krve odebírané k běžným laboratorním vyšetřením, byly použity k paralelní analýze kapilární elektroforézou další den po odběru v laboratořích Středoevropského technologického institutu (CEITEC). Jelikož byla metoda použita za mimořádných okolností a v relativní časové tísní, nebyla provedena její řádná validace. Tato analýza neměla žádný vliv na diagnostický či léčebný postup, ani na konečný léčebný výsledek. Z těchto a zároveň i časových důvodů jsme nežádali etickou komisi o souhlas s provedením analýzy. Opatrovník, který byl přidělený soudem pacientce z důvodu rozvoje těžkého psychoorganického syndromu po intoxikaci metanolem, udělil souhlas s anonymním zveřejněním získaných dat.

POPIS PŘÍPADU

Žena středního věku byla nalezena v bytě druhem, stěžovala si na dušnost, potíže s chůzí, bolesti břicha, zvracení, poruchy vidění. Druh požití alkoholu vylučoval, nebyl však celé odpoledne doma. V bytě nebyla nalezena žádná láhev s alkoholem. Při příjezdu RLP pacientka již nebyla kontaktní, hlasitě sténala, na trupu a končetinách měla výraznou „mramoráž“. Další anamnestické údaje již nebylo možné přesně zjistit. Na urgentním příjmu došlo k prohloubení bezvědomí (GCS 1-1-1), v objektivním nálezu byla nápadná mydriáza s nulovou fotoreakcí, zvracení a výrazná hyperventilace. Na plicích bylo oboustranně slyšitelné sklípkové dýchání, bez vedlejších poslechových fenoménů. Oběhově byla pacientka stabilní, TK 160/80 mm Hg, P 84/min. Byla provedena orotracheální intubace, napojení na umělou plicní ventilaci (UPV).

Při přijetí měla pacientka pH (6,659), BE -35,7, AG 43,7 mmol/l, OG 82,4 mmol/kg, pCO_2 3,21 kPa. Přehled dalších laboratorních výsledků při přijetí a následně během terapie je uveden v tabulce 1. Klinický obraz a laboratorní hodnoty na pozadí aktuální epidemiologické situace vlny metanolových otrav byly silně indikativní pro akutní intoxikaci závažným alkoholem.

Okamžitě byla podána antidota, etanol v 10% roztoku 200 ml bolusově v rychlé infuzi během 10 minut a dále 500 ml/hod. během první hodiny (celková nasycovací dávka byla 700 ml 10% roztoku etanolu při hmotnosti pacientky 90 kg), $NaHCO_3$ 8,4% 400 ml, kalcium folinát 50 mg každé

4 hodiny. Dosažená hladina etanolu v séru byla 1,8 g/l. Asi po 2 hodinách byl z centra dovezen Fomepizol, který byl podán po konzultaci s TIS v dávce 1 g a zároveň byla infuze etanolu zastavena. Pacientka byla napojena na kontinuální venovenózní hemodialýzu (CVVHD), která trvala 21 hodin, byl použit dialyzátor s polysulfonovou membránou o povrchu 1,8m². Průtok krve byl 150 ml/min., průtok dialyzačního roztoku byl 3 000 ml/hod. Koncentrace draslíku v dialyzačním roztoku byla 2 mmol/l, koncentrace bikarbonátu 20 mmol/l, koncentrace glukózy byla 1 g/l. Byla použita regionální citrátová antikoagulace. Další dávka Fomepizolu již nebyla k dispozici, proto po 5 hodinách byl znovu podán bolus 300 ml 10% etanolu s následnou udržovací dávkou 250 ml/hod. Diagnóza byla potvrzena asi po 2 hodinách pozitivním toxikologickým vyšetřením. V tomto případě byla naměřena hladina metanolu v séru 1,87 g/l pomocí plynové chromatografie v ústavu soudního lékařství. Koncentrace formiátu byla plynovou chromatografií stanovena jako vyšší než 6 mmol/l (0,3g/l), přesnější kvantifikace touto metodou již dál podle sdělení laboranta nebyla možná. Kapilární elektroforéza provedená ze stejného vzorku další den stanovila koncentraci 11,3 mmol/l. Vzorky krve odebírané postupně od přijetí a během HD ve dvouhodinových intervalech byly následně analyzovány kapilárně elektroforetickou metodou. Výsledky kvantitativní analýzy za použití fumarátu jako vnitřního standardu jsou shrnuty v grafu 1 a v tabulce 1. Je patrné, že hodnoty formiátu těsně po zahájení HD byly cca 10krát vyšší, než je horní mez fyziologické koncentrace formiátu v krevním séru. Mírný vzestup hladiny kyseliny mravenčí u druhého vzorku je dán krátkým časovým intervalem mezi prvním odběrem a podáním první infuze antidota (etanolu). Po napojení na CVVHD je již patrný výrazný pokles hladiny kyseliny mravenčí.

Během prvních 6 hodin se opakovaně objevily fascikulace v obličeji, jednou tonicko-klonické křeče, které ustoupily po podání diazepamu. Asi po 6 hodinách hemodialyzační léčby začala pacientka reagovat na algické podněty a zhruba po 20 hodinách reagovala i na oslovení.

Na CT mozku byly patrné známky výrazného edému, zejména v oblasti bazálních ganglií, který se zmenšil po antiedematózní léčbě. UPV trvala celkem 12 dnů a 6 hodin, 17. den hospitalizace byla pacientka přeložena na JIP interního oddělení. Oftalmologické vyšetření prokázalo dekoloraci papily, suspektní ischemii retiny a velmi pravděpodobné poškození zraku. Pro přetrvávající psychoorganický syndrom a spastickou kvadruparézu byla pacientka po 31 dnech přeložena do další péče v LDN.

Tab. 1 Hodnoty některých stanovených parametrů krevního séra pacientky při přijetí a následně během hemodialýzy

Čas od přijetí [hod]	CVVHD Cl Ca	Hladina metanolu [g/l]	Hladina formiátu [mmol/l]	Hladina etanolu [g/l]	Osmolal gap [mmol/kg]	Anion gap [mmol/l]	Osmol [mmol/kg]	pH	pCO ₂ [kPa]	st. Bic	BE	K ⁺ [mmol/l]	Glykémie [mmol/l]	Laktát [mmol/l]
0		1,87	11,3	0	82,4	43,2	376	6,659	3,21	3,6	-35,7	6,7	15	9,5
2	zahájení		11,7	1,8				7,155	8,95	19	-6,6			
4			4,8	0,9		36,1		7,149	4,54	12,1	-16,4	3,5	14,5	6,2
8			1,1	0,78		18,4	344	7,433	5,21	25,9	1,9	3,1	7,8	2,3
10		0,64	0,4											
11								7,433	5,19	26,9	2,9			
12			0,0											
14			0,0			14,9	342	7,403	5,96	26,7	2,7	3,3	7	2,0
18		stopové množství		1,3										
21	ukončení													

DISKUSE

U našich prvních pacientů v pozdním stadiu etanolové otravy se ve třech případech vyskytlo intracerebrální krvácení, proto jsme volili eliminační metodu s regionální citrátovou antikoagulací. Na našem oddělení máme tuto eliminační metodu pouze v režimu CVVHD. Intermitentní HD z technických důvodů nebyla dostupná. Nicméně intermitentní HD je považována za nejúčinnější při eliminaci toxických metabolitů závažných alkoholů, je v této indikaci upřednostňována před kontinuálními technikami [3, 14], a to bez použití heparinu vzhledem k riziku závažného krvácení [3]. Použití kontinuálních technik při intoxikaci metanolem je vhodné v případě nedostupnosti intermitentní HD nebo u oběhově nestabilních pacientů [14]. Někteří autoři doporučují při intoxikaci alkoholy použít high-flux membránu, jelikož umožňuje odstranit větší množství toxických metabolitů za hod. HD [15].

Pokud se pacienti dostanou do nemocnice v pozdních fázích otravy, bývají hladiny metanolu v krvi již velmi nízké, v některých případech dokonce pouze stopové či nulové. V těchto stádiích totiž velká část metanolu již bývá konvertována na formiát. Je to jeden z důvodů, proč se ukazuje stanovení koncentrace kyseliny mravenčí v séru během otravy jako spolehlivější metoda než stanovení hladiny metanolu. První intoxikovaní pacienti na začátku epidemie s negativní anamnézou požití alkoholu, kteří měli negativní toxikologické vyšetření při přijetí a četná přidružená onemocnění, byli důkazem možných značných potíží v diferenciální diagnostice metanolové otravy. Výše popsáný případ byl sedmý v řadě na našem pracovišti. Pacientka byla tedy přijata v době, kdy jsme již měli zkušenosti s touto raritní intoxikací.

Stanovení hladiny formiátu v krvi je možné pomocí několika analytických metod. Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem [16] nebo hmotnostně spektrometrickým detektorem [17] patří mezi nejvíce používané metody. Bohužel stanovení kyseliny mravenčí touto metodou je dostupné pouze ve vybraných toxikologických laboratořích, většinou ve fakultních nemocnicích. Transport vzorků krve a samotná doba vyšetření vždy znamená určitou časovou prodlevu.

Enzymatické metody založené na oxidaci formiátu formátdehydrogenázou až na konečný produkt, CO₂, a nepřímém spektrofotometrickém stanovení představují jednodušší a dostupnější alternativu, kterou lze použít i na pracovištích, která nedisponují plynovým chromatografem. Nutností je vybavení pracoviště automatickým analyzátozem [18]. Pokud je požití metanolu vysoce

pravděpodobné, nemůže čekání na výsledek toxikologického vyšetření znamenat odklad zahájení léčby intoxikace. Na druhou stranu rychlý, dostupný screening zvýšené hladiny formiátu v séru by výrazně usnadnil objasnění příčiny suspektní otravy.

ZÁVĚR

Po vypití závažného alkoholu se postižení dostávají do nemocnic v různých fázích intoxikace. Klíčem k jejímu úspěšnému zvládnutí je vedle adekvátní terapie včasná diagnostika otravy. Prognóza závisí jednak na množství požití škodliviny, ale zejména na době, která uplyne od konzumace závažného alkoholu do stanovení diagnózy a zahájení účinné léčby.

Kapilární elektroforéza představuje alternativu orientačního, rychlého a dostupného stanovení kyseliny mravenčí v séru. Výsledky jsou k dispozici během několika minut, což může představovat významnou pomoc v případě diagnostických potíží, které mohou v nejasných případech otravy metanolem nastat.

Část experimentálních výsledků byla realizována ve Středoevropském technologickém institutu (CEITEC) za pomoci infrastruktury podporované projektem č. CZ.1.05/1.1.00/02.0068 financovaným EU fondem pro místní rozvoj.

LITERATURA

1. Becker, C. E. Methanol poisoning. *The Journal of Emergency Medicine*, 1983, 1, p. 51–58.
2. Kruse, J. A. Methanol poisoning. *Intensive Care Med.*, 1992, 18, p. 391–397.
3. Kute, V. B., Godara, S. M., Shah, P. R., Gumber, M. R., Gopani, K. R., Vanika, A. V., Munjappa, B. C., Patel, H. V., Trivedi, H. L. Hemodialysis for methyl alcohol poisoning: A single-center experience. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*. 2012, 23, p. 37–43.
4. Jacobsen, D., Hovda, K. E. Methanol, ethylene glycol, and other toxic alcohols. In: Shannon, M. W., Borron, S. W., Burns, M. J. eds. Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose. 4th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007, p. 605–611.
5. Barceloux, D. G., Bond, G. R., Krenzelok, E. P., Cooper, H., Vale, J. A. American Academy of Clinical Toxicology Practice Guidelines on the Treatment of Methanol Poisoning. *J. Clin. Toxicol.*, 2002, 40, p. 415–446.
6. Ševela, K., Ševčík, P., Kraus, R. *Akutní intoxikace v intenzivní medicíně*, Praha: Grada Publishing, 2002, 248 s. ISBN 80-7169-843-1.
7. Verhelst, D., Moulin, P., Haufroid, V., Wittebole, X., Jadoul, M., Hantson, P. Acute renal injury following methanol poisoning: analysis of a case series. *Int. J. Toxicol.*, 2004, 23, 4, p. 267–273.
8. Hanzlik, R. P., Fowler, S. C., Eells, J. T. Absorption and eli-

mination of formate following oral administration of calcium formate in female human subjects. *Drug Metab. Dispos.* 2005, 33, p. 282–286.

9. Westphal, F., Rochholz, G., Ritz-Timme, S., Bilzer, N., Schutz, H. W., Kattsch, H. Fatal intoxication with a decalcifying agent containing formic acid. *Int. J. Legal Med.*, 2001, 114, 3, p. 181–185.

10. Mahieu, P., Hassoun, A., Lauwerys, R. Predictors of Methanol Intoxication with Unfavourable Outcome. *Hum. Toxicol.*, 1989, 8, p. 135–137.

11. Tanaka, E., Honda, K., Horiguchi, H., Misawa, S. Postmortem determination of the biological distribution of formic acid in methanol intoxication. *J. Forensic Sci.*, 1991, 36, 3, p. 936–938.

12. www.tis-cz.cz

13. Kubáň, P., Foret, F., Bocek, R. Capillary electrophoresis with contactless conductometric detection for rapid screening of formate in blood serum after methanol intoxication. *J. Chromatogr. A.*, 2013, 1281, p. 142–147.

14. Dostál, P. Léčba intoxikací kontinuálními eliminačními metodami. In Novák, I., Matějovič, M., Černý, V. et al. *Akutní selhání ledvin*. Praha: Maxdorf, 2008, p. 123–128.

15. Peces, R., González, E., Olivas, E., Reniel, F., Costero, O., Montero, A., Salgas, R., Fernández, R., Jiménez, M., Peces, C. Effectiveness of pre-emptive hemodialysis with high-flux membranes for the treatment of life-threatening alcohol poisoning. *Nefrología*, 2008, 28, 4, p. 413–418.

16. Wallage, H. R., Watterson, J. H. Formic acid and methanol concentrations in death investigations. *J. Anal. Toxicol.*, 2008, 32, 3, p. 241–247.

17. Rasanen, I., Viinamaki, J., Vuori, E., Ojanpera, I. Headspace In-Tube Extraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Analysis of Hydroxylic Methyl-Derivatized and Volatile Organic Compounds in Blood and Urine. *J. Anal. Toxicol.*, 2010, 34, p. 113–121.

18. http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/0113/kyselina_mravenci_FNBno_LA01-2013.pdf

Do redakce došlo dne 25. 1. 2013.

Do tisku přijato dne 18. 7. 2013.

Adresa pro korespondenci:

MUDr. Robert Bocek

ARO NsP Havířov, p. o.

Dělnická 24

735 35 Havířov-Město

e-mail: robert.bocek@nspshav.cz

Česká společnost anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny

Platinový partner:

B | BRAUN
SHARING EXPERTISE

**FRESENIUS
KABI**

abbvie

Zlatý partner:

MSD

COVIDIEN
positive results for life

Stříbrný partner:

Teleflex®

WWW.CSARIM.CZ