

Inovativne analitičke metode za otkrivanje krivotvorenih antimalarika

Tenčić, Lena

Professional thesis / Završni specijalistički

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:387488>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Lena Tenčić

**INOVATIVNE ANALITIČKE METODE ZA
OTKRIVANJE KRIVOTVORENIH ANTIMALARIKA**

Specijalistički rad

Zagreb, 2020.

Poslijediplomski specijalistički studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof. dr. sc. Biljana Nigović

Specijalistički rad obranjen je dana 28. rujna 2020. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Miranda Sertić

2. prof. dr. sc. Biljana Nigović

3. dr.sc. Maja Lusina Kregar, znanstvena suradnica

Rad sadrži 81 list.

PREDGOVOR

Ovaj specijalistički rad izrađen je u sklopu Poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Biljane Nigović.

Iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na stručnoj podršci i konstruktivnim savjetima tijekom izrade ovog specijalističkog rada.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je na osnovi pregleda dostupne literature opisati globalni problem krivotvorenih lijekova i lijekova koji ne zadovoljavaju standarde kakvoće (eng. *substandard/falsified medical products*), s posebnim naglaskom na antimalarike koji su osobito podložni krivotvorenju. Analiziraju se uzroci i posljedice i opisuju naponi koji se ulažu u suzbijanje tog problema. Opisuje se pojavnost, etiologija, epidemiologija, patogeneza i klinička slika malarije. Navode se smjernice za prevenciju i liječenje malarije, uključujući glavne skupine antimalarika na svjetskom tržištu. Pregledno se navode analitičke metode za otkrivanje krivotvorenih antimalarika i istražuju mogućnosti primjene dvije inovativne analitičke metode temeljene na Ramanovoj hiperspektralnoj analizi i ELISA imunoenzimatskim testovima, koje bi u budućnosti mogle postati značajan alat u borbi protiv krivotvorenja lijekova.

Materijal i metode

Istraživanja u okviru ovog specijalističkog rada teorijskog su karaktera. Literatura je pretraživana prema temi i predmetu istraživanja, autorima i časopisima. Pretraga je obuhvaćala stručne i znanstvene članke, relevantne farmakopeje, važeće smjernice i izvještaje Svjetske zdravstvene organizacije i regulatornih tijela, kao i razne elektroničke izvore. Na temelju proučavanja navedene literature izvedena su vlastita razmatranja predmetne problematike.

Pri pretraživanju literature korištene su baze podataka: PubMed, Medline, Science Direct, ResearchGate, Scopus, Embase, Web of Science.

Rezultati

Do danas je razvijen velik broj inovativnih metoda za otkrivanje krivotvorenih antimalarika, temeljenih na različitim tehnikama. Metoda temeljena na Ramanovoj spektroskopiji opisana u ovom radu je jednostavna, jeftina i brza te bi se u budućnosti mogla koristiti za određivanje sadržaja djelatnih tvari i raspodjelu djelatnih tvari unutar tableta antimalarika Riameta®. Metoda temeljena na ELISA imunoenzimatskim testovima opisana u ovom radu razvijena je u obliku testnog štapića, kojim se semikvantitativno može odrediti sadržaj dihidroartemisinina u različitim antimalaricima na temelju prisutnosti ili odsutnosti testne linije. Metoda je jednostavna, jeftina, ne zahtijeva kompleksnu obradu uzoraka. Obje metode mogle bi se u budućnosti koristiti za preliminarno ispitivanje suspektih antimalarika.

Zaključak

Krivotvorenje lijekova je globalni javnozdravstveni, socijalni i ekonomski problem s izraženim trendom rasta u posljednjem desetljeću. Antimalarici su grupa lijekova osobito podložna krivotvorenju. Jedna od specifičnih mjera koje se poduzimaju u cilju suzbijanja problema krivotvorenja lijekova je poticanje razvoja novih tehnologija i inovativnih analitičkih metoda za detektiranje i kvantificiranje djelatnih tvari u krivotvorenim lijekovima. Metode koje se temelje na Ramanovoj hiperspektralnoj analizi te na ELISA imunoenzimatskim testovima već su se pokazale uspješnim u otkrivanju krivotvorenih antimalarika na bazi artemisinina. Komparativne prednosti ovih metoda u odnosu na ostale analitičke metode, kao npr. brzina dobivanja rezultata, fleksibilnost, jednostavnost, efikasnost, neinvazivnost, cjenovna i ekološka prihvatljivost i slično, otvaraju prostor za uvođenje ovih inovativnih metoda u postupke preliminarnog detektiranja suspektog lijeka direktno na mjestu pronalaska, odnosno uz minimalnu laboratorijsku obradu.

SUMMARY

Objectives

This specialist thesis aims to describe the global problem of falsified and substandard medical products by using a systematic review of available literature, with special emphasis on antimalarials that are particularly susceptible to counterfeiting. Firstly, the thesis explains causes and impacts, as well as the efforts taken to combat this problem. The prevalence, etiology, pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of malaria are described. Guidelines for the prevention and treatment of malaria are given, including the main groups of antimalarials on the world market. The thesis gives an overview of analytical methods for the detection of falsified/substandard antimalarials. Finally, implementation possibilities of two innovative analytical methods are analyzed, one of which is based on Raman hyperspectral analysis and the other on the monoclonal antibody-based immunoassays (ELISA), which could be used as a significant tool in confronting this phenomenon in the future.

Material and Methods

Research within this thesis is theoretical. Literature was searched by the topic, subject of the research, authors and journals. The literature search included a wide range of specialized and scientific articles, current versions of pharmacopeias and currently valid guidelines and reports issued by the World Health Organization and regulatory bodies, as well as various electronic sources. The author's reflections derive from the study of the mentioned literature.

In the literature search, databases were used: PubMed, Medline, Science Direct, ResearchGate, Scopus, Embase, Web of Science.

Results

To the date, a large number of innovative methods have been developed for the detection of falsified antimalarials, based on various analytical techniques. The method based on Raman spectroscopy described in this thesis is simple, inexpensive and fast, and could be used in the future for the determination of the content of active substances and the spatial concentration distribution of active substances within Riamet® antimalarial tablets. The method based on ELISA immunoassays described in this thesis has been developed in the form of dipstick, and can be used for semiquantitative determination of the content of dihydroartemisinin in different antimalarials, based on the presence or absence of the test line. The method is simple, inexpensive and does not require complex sample processing. Both methods could be used in the future for preliminary testing of suspicious antimalarials.

Conclusion

The counterfeiting of medical products is a global public health, social and economic problem with a pronounced growth rate in the last decade. Antimalarials fall into a group of drugs particularly susceptible to counterfeiting. One of the specific measures for combating the growing problem of drugs counterfeiting is to encourage the development of innovative technologies and innovative analytical methods for the detection and quantification of active pharmaceutical ingredients in counterfeit drugs. The methods which are based on Raman hyperspectral analysis and the monoclonal antibody-based immunoassays (ELISA) have been already successful in detecting counterfeit artemisinin-based antimalarials. Comparative advantages of these methods in contrast to other analytical methods, such as speed of results, flexibility, simplicity, efficiency, non-invasiveness, cost and environmental acceptability etc., open the door to the introduction of these innovative methods in the procedures of preliminary detection of suspicious drugs directly at the site of discovery, ie with minimal laboratory processing.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	3
3. MATERIJAL I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI	4
3.1. Definicije ključnih pojmova	4
3.2. Globalni problem krivotvorenja lijekova	5
3.2.1. Krivotvorenje antimalarika	6
3.2.2. Uzroci krivotvorenja lijekova	8
3.2.3. Posljedice krivotvorenja lijekova	12
3.3. Načini rješavanja problema krivotvorenja lijekova	15
3.3.1. Aktivnosti na globalnoj razini	16
3.3.1.1. Globalni sustav za nadzor i praćenje krivotvorenih lijekova (GSMS)	16
3.3.1.2. Ostale aktivnosti na globalnoj razini.....	18
3.3.2. Aktivnosti na regionalnim i nacionalnim razinama	18
3.4. Malaria.....	20
3.4.1. Općenito o malariji	20
3.4.2. Suzbijanje i iskorjenjivanje malarije	23
3.4.2.1. Globalna borba protiv malarije od 1955. do 2030.	24
3.4.2.2. Načini prevencije i suzbijanja malarije	25
3.4.3. Terapija malarije	27
3.4.3.1. Lijekovi protiv malarije	27
3.5. Analitičke metode za otkrivanje krivotvorenih antimalarika	29
3.5.1. Općenito o analitičkim metodama za otkrivanje krivotvorenih antimalarika.....	29
3.5.2. Standardne analitičke metode	30
3.5.3. Inovativne analitičke metode	33
3.5.4. Ramanova hiperspektralna multikomponentna analiza za otkrivanje krivotvorenih tableta antimalarika Riameta®	42

3.5.4.1. Osnovno o tehnici Ramanove spektroskopije	42
3.5.4.2. Osnovne značajke Ramanove hiperspektralne multikomponentne analize za otkrivanje krivotvorenih tableta antimalarika Riameta®	44
3.5.4.3. Razvoj metode Ramanove hiperspektralne multikomponentne analize za otkrivanje krivotvorenih tableta antimalarika Riameta®	45
3.5.5. Imunoenzimatski testovi temeljeni na monoklonskim protutijelima za provjeru sadržaja dihidroartemisinina u antimalaricima	52
3.5.5.1. Osnovno o imunoenzimatskim testovima (ELISA tehnici).....	52
3.5.5.2. Osnovno o LFIA tehnologiji (Lateral flow immunoassay)	54
3.5.5.3. Osnovne značajke imunoenzimatskih testova temeljenih na monoklonskim protutijelima za provjeru sadržaja dihidroartemisinina u antimalaricima.....	55
3.5.5.4. Razvoj imunoenzimatskih testova temeljenih na monoklonskim protutijelima za provjeru sadržaja dihidroartemisinina u antimalaricima	56
3.5.5.5. Razvoj testnih štapića za provjeru sadržaja dihidroartemisinina u antimalaricima.....	59
4. RASPRAVA	63
5. ZAKLJUČAK.....	69
6. LITERATURA.....	71
7. ŽIVOTOPIS.....	80

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Problem krivotvorenja lijekova, njegovi uzroci i posljedice, kao i mjere koje se poduzimaju kako bi se zaustavila takva praksa, opisani su u izvješću Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) (1) i dokumentima brojnih svjetskih i nacionalnih institucija koje se bave svim aspektima te problematike, kao i u brojnim preglednim i znanstvenim radovima. U prethodno navedenom izvješću detaljno je obrađen i problem krivotvorenja antimalarika, kao jedne od skupina lijekova najizloženijih krivotvorenju, prvenstveno u kontekstu svjetskih napora koji se ulažu u borbu protiv suzbijanja te bolesti kao i u kontekstu pojavnosti rezistencije na antimalarike. Zaštitne mjere koje se poduzimaju u cilju rješavanja tog problema ugrađene su u regulatorne zahtjeve raznih država, između ostalog i u regulativu Europske Unije (2).

Pojavnost, etiologija, epidemiologija, patogeneza i klinička slika malarije te naponi koji se čine kako bi se malarija suzbila opisani su u raznoj literaturi, uključujući i *Informativni list Svjetske zdravstvene organizacije o osnovnim činjenicama o malariji* (3). Skupine lijekova koje se koriste za liječenje malarije te smjernice u kojim se slučajevima i za koju vrstu malarije oni koriste, propisane su od strane Svjetske zdravstvene organizacije (4). U tim je smjernicama navedeno u kojim se slučajevima koriste lijekovi koji u svom sastavu sadrže derivate artemisinina - posljednjeg globalno učinkovitog antimalarika.

Uz opće mjere za borbu protiv krivotvorenih antimalarika, kao što su primjerice globalne strategije motrenja i izvještavanja o problemu, globalne baze za razmjenu podataka, implementacija nacionalnih programa, provjera kakvoće iz prometa, osiguranje dostupnosti kvalitetnih i jeftinih lijekova, jedan od važnih alata borbe protiv krivotvorenja lijekova je i razvoj inovativnih analitičkih metoda za otkrivanje krivotvorenih antimalarika (5).

Standardne analitičke metode za provjeru kakvoće gotovih oblika antimalarika i djelatnih tvari koje se nalaze u antimalaricima opisane su u važećim izdanjima Internacionalne farmakopeje (6), Američke farmakopeje USP/NF (7), Europske farmakopeje Ph. Eur. (8) i Britanske farmakopeje BP (9). Međutim, navedene metode su skupe, kompleksne za izvedbu, zahtijevaju educirano osoblje i

opremljene laboratorije. Stoga, kako bi opće mjere i preventivni programi mogli biti uspješni, važan je razvoj brzih, efikasnih, jeftinih i jednostavnih analitičkih metoda za otkrivanje krivotvorina, koje su istovremeno i usporedivo selektivne, specifične, točne, precizne i izdržljive u odnosu prema standardnim analitičkim metodama. U tom kontekstu Američka agencija za hranu i lijekove (*eng. Food and Drug Administration, FDA*) poduprla je razvoj jednostavnih uređaja za otkrivanje krivotvorenih lijekova (CD-3), čiji se princip rada temelji na snimanju kamerama s korištenjem LED izvora (1,5).

Inovativne metode za otkrivanje krivotvorenih antimalarika opisane su u brojnim recentnim znanstvenim radovima, a u ovom specijalističkom radu detaljno su opisane metode koje se temelje na Ramanovoj hiperspektralnoj analizi (10) i ELISA imunoenzimatskim testovima (11), te su predstavljene mogućnosti njihove primjene u detektiranju krivotvorenih lijekova. Navedene metode trenutno nisu u rutinskoj uporabi, međutim u budućnosti bi mogle postati značajan alat u borbi protiv suzbijanja globalnog problema krivotvorenja antimalarika.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je opisati globalni problem krivotvorenja lijekova te istražiti mogućnosti primjene dvije inovativne analitičke metode za otkrivanje krivotvorenih antimalarika koje bi se u budućnosti mogle koristiti za detektiranje suspektnih proizvoda na licu mjesta, odnosno uz minimalnu laboratorijsku obradu.

Specifični ciljevi su:

- opisati globalni problem krivotvorenja lijekova, precizirati uzroke i posljedice tog problema te opisati napore koji se ulažu kako bi se taj problem suzbio, s posebnim naglaskom na krivotvorenje antimalarika;
- opisati pojavnost, etiologiju, patogenezu, epidemiologiju i kliničku sliku malarije te navesti smjernice za prevenciju i liječenje malarije, uključujući i glavne skupine antimalarika na svjetskom tržištu;
- objasniti razloge zbog kojih krivotvorenje antimalarika otežava svjetske napore suzbijanja malarije u pogođenim područjima te nužnost razvoja brze i cjenovno prihvatljive analitičke metode za otkrivanje krivotvorina;
- izraditi pregled dosad korištenih analitičkih metoda za otkrivanje krivotvorenih antimalarika;
- opisati dvije inovativne analitičke metode za otkrivanje krivotvorenih antimalarika temeljene na Ramanovoj hiperspektralnoj analizi i ELISA imunoenzimatskim testovima te istražiti mogućnosti njihove primjene u konkretnom kontekstu rastućeg problema krivotvorenja lijekova.

3. MATERIJAL I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

3.1. Definicije ključnih pojmova

Na 70. skupštini Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization, WHO*), potvrđene su definicije „*Substandard and falsified (SF) medical products*“ iz dokumenta *Appendix 3 to Annex, World Health Assembly document A70/23, 2017*. (12) izrađenog od strane radne skupine članica Svjetske zdravstvene organizacije *Member State Mechanism*:

- 1) **Lijek / proizvod nezadovoljavajuće kakvoće** (eng. „*Substandard Medical Product*“, „*Out-of-Specification*“) - predstavlja lijek / medicinski proizvod koji ne odgovara propisanim zahtjevima kakvoće i/ili specifikacijama proizvoda.
- 2) **Neregistrirani lijek / proizvod** (eng. „*Unregistered*“/ „*Unlicensed Medical Product*“) - predstavlja lijek / medicinski proizvod koji nije prošao evaluaciju i zakonske procedure davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet od strane nacionalnih i regionalnih regulatornih tijela onih tržišta na kojima je prisutan.
- 3) **Krivotvoreni lijek / proizvod** (eng. „*Falsified medical product*“) - predstavlja lijek / medicinski proizvod čiji je identitet, sastav ili podrijetlo lažno predstavljeno (1).

U čl. 3 Općih odredbi hrvatskog Zakona o lijekovima (NN 76/2013, NN 90/14, NN 100/18) pojam „**krivotvoreni lijek**“ definiran je na sljedeći način:

Krivotvoreni lijek je lijek koji je neistinito predstavljen s namjerom prijevare, s obzirom na:

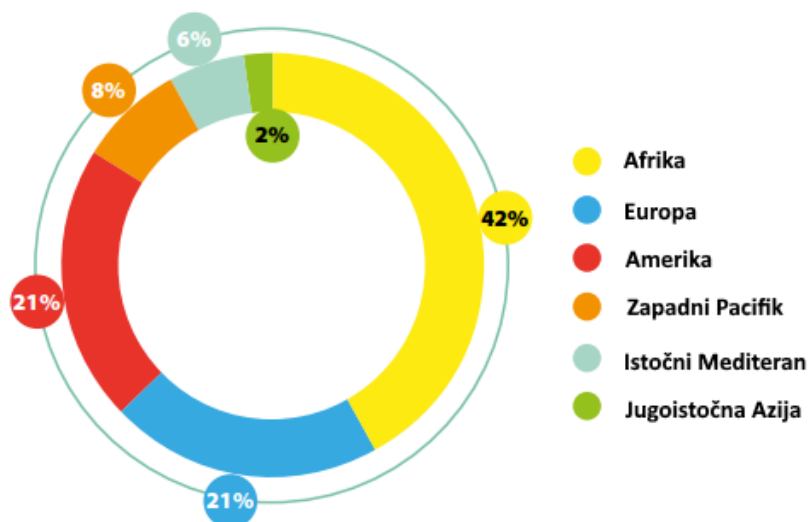
- a) identitet, uključujući pakiranje i označavanje lijeka, naziv ili sastav lijeka u pogledu bilo kojeg sastojka lijeka uključujući pomoćne tvari i jačinu lijeka;
- b) podrijetlo, uključujući proizvođača, državu proizvodnje i državu podrijetla lijeka ili nositelja odobrenja za stavljanje lijeka u promet;
- c) sljedivost, uključujući zapise i dokumente koji se odnose na promet lijeka.

Definicija se ne odnosi na lijek s nenamjernim nedostacima u kakvoći i ne odnosi se na pitanja o kršenju prava intelektualnog vlasništva (13).

3.2. Globalni problem krivotvorenja lijekova

Unatoč sve većoj dostupnosti jeftinih i kvalitetnih lijekova za suzbijanje brojnih bolesti, u posljednjih desetak godina trend krivotvorenja lijekova i pojavnosti lijekova nezadovoljavajuće kakvoće u stalnom je porastu na tržištima svih regija svijeta.

Stvarni opseg ovog problema ne može se precizno odrediti, i to zbog brojnih čimbenika koji na njega utječu, kao i zbog ograničenih izvora informacija i nedostatka svjesnosti o težini problema, no jasno je da se radi o globalnom problemu, što dokazuje i **Slika 1** iz koje je vidljiv postotak prijava krivotvorenih lijekova Globalnom sustavu nadzora i praćenja krivotvorenih lijekova (eng. *WHO Global Surveillance and Monitoring System for substandard and falsified medical products, GSMS*) u razdoblju od 2013. do 2017. godine.



Slika 1 – Postotak prijava krivotvorenih lijekova GSMS-u od 2013. do 2017. godine
(preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 1)

Proizvodnja i trgovina krivotvorenih lijekova odvija se pretežno u Africi i Aziji. Pretpostavlja se da je u zemljama s niskim i srednjim bruto domaćim proizvodom 10,5% lijekova na tržištu ili krivotvoreno ili nezadovoljavajuće kakvoće, odnosno ekonomski gledano obim ilegalne trgovine lijekovima u tim zemljama procjenjuje se na 30,5 milijardi dolara (1). U razvijenim zemljama gotovo da i nema krivotvorina u ovlaštenim lancima opskrbe, odnosno unutar legalnog distribucijskog lanca, ali zato posebnu opasnost predstavlja kupnja lijekova i medicinskih proizvoda preko interneta (1).

Krivotvorenju su podložne sve vrste lijekova, izvorni (originalni) i istovrsni (generički) lijekovi. U zemljama u razvoju najčešće se krivotvore lijekovi za liječenje po život opasnih bolesti iz skupina antibiotika, onkoloških i kardiovaskularnih lijekova, antivirusika i antimalarika, dok se u razvijenim zemljama najviše krivotvore lijekovi za poboljšanje stila života (eng. *lifestyle products*), među kojima lijekovi protiv pretilosti, lijekovi za liječenje erektilne disfunkcije, intelektualni stimulansi i lijekovi i sredstva za jačanje mišićne mase (anabolici, hormoni) (1).

S obzirom na kvalitetu krivotvorenih proizvoda, prema podacima SZO-a najveći broj krivotvorina odnosi se na lijekove bez djelatne tvari (oko 30%), zatim slijede lijekovi s neodgovarajućim sadržajem djelatne tvari (oko 20%) i lijekovi koji sadrže nedeklarirane sastojke (oko 20%) (10). Vrlo često na tržištu se detektiraju i prepakirani lijekovi kojima je istekao rok valjanosti ili lažno označeni proizvodi. Krivotvoreni lijekovi i lijekovi nezadovoljavajuće kakvoće nisu sigurni za uporabu, budući da mogu imati utjecaja na zdravlje onih koji ih uzimaju, a posredno mogu imati široke javnozdravstvene, ekonomske i socioekonomske posljedice.

Iz svega navedenog jasno proizlazi da se radi o velikom problemu globalnih razmjera. Za suzbijanje ovog problema nužno je sustavnim pristupom odrediti i provoditi mjere prevencije od pojavnosti, razviti načine otkrivanja problema i implementirati načine brzog i efikasnog odgovora u slučaju otkrivanja krivotvorenih lijekova i lijekova nezadovoljavajuće kakvoće na tržištu. U tu borbu uključene su brojne međunarodne institucije, kao i regionalna i lokalna regulatorna tijela nadležna za promet lijekovima i medicinskim proizvodima, policija, carina, inspeksijske službe, pravosudna tijela i sama farmaceutska industrija u pojedinim zemljama (1, 14).

3.2.1. Krivotvorenje antimalarika

Antimalarici su skupina lijekova koja je osobito podložna krivotvorenju, i to najčešće u nerazvijenim zemljama jugoistočne Azije i subsaharske Afrike.

U različitim istraživanjima dobiveni su različiti podaci o pojavnosti krivotvorenih antimalarika na svjetskom tržištu. Zbog razlika u metodologijama i definiciji problema, nedostatka podataka iz pojedinih geografskih područja, zbog razlika u pristupu problemu te razlika u vrstama nesukladnosti u

odnosu na deklarirano, opseg krivotvorenja antimalarika moguće je odrediti samo aproksimativno, no sigurno je da su antimalarici među najpogođenijim lijekovima po pitanju krivotvorenja (1,14).

U razdoblju od 2013. do 2017. godine sukladno podacima GSMS-sustava gotovo 20% prijava o krivotvorenju lijekova, odnosno o pojavnosti lijekova nezadovoljavajuće kakvoće odnosilo se na antimalarike (1), što je vidljivo iz **Tablice 1**.

Tablica 1 - Slučajevi krivotvorenih lijekova prijavljeni u GSMS-sustav (SZO) između 2013. i 2017. godine (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 1*)

Skupine lijekova	Broj zemalja u kojima su zabilježena krivotvorenja	Ukupni broj prijava	Udio u ukupnom broju prijava (%)
Anestetiци i analgetici	29	126	8,5
Antibiotici	46	244	16,9
Onkološki lijekovi	19	100	6,8
Kontraceptivi i liječenje neplodnosti	19	29	2,0
Antidijabetici	7	11	0,8
Kardiovaskularni lijekovi	22	75	5,1
Lijekovi protiv HIV-a / hepatitisa	9	43	2,9
Lijekovi životnog stila	37	124	8,5
Antimalarici	26	286	19,6
Lijekovi za mentalno zdravlje	19	45	3,1
Cjepiva	11	29	2,0

U jednom istraživanju temeljenom na pregledu 251 studije unutar baze podataka WWARN (eng. *The Worldwide Antimalarial Resistance Network*), provedene između 1946. i 2013. godine, navodi se slijedeći podatak: 30,1% testiranih antimalarika nije zadovoljilo standarde kakvoće (u pogledu sastava ili pakiranja), te je od toga 39,3% klasificirano kao krivotvoreni lijek, 2,3% kao lijek nezadovoljavajuće kakvoće, a 58,3% nije klasificirano (15).

Nadalje, na osnovu istraživanja koje je na zahtjev SZO-a provela Londonska škola za higijenu i tropsku medicinu (eng. *London School of Hygiene and Tropical Medicine, LSHTM*), a temeljenom na pregledu studija provedenih u subsaharskoj Africi između 2001. i 2016. godine koje opisuju slučajeve krivotvorenja s pronađenim sadržajem djelatnih tvari manjim od 85%, procjenjuje se da je od 2,1% do 4,9% smrti povezanih s malarijom uzrokovano korištenjem krivotvorenih lijekova i lijekova nezadovoljavajuće kakvoće. Ukoliko se postotak računa uzimajući u obzir slučajeve malarije koji su

bili liječeni, on iznosi između 3,8% i 8,9% smrti. Unatoč ograničenjima studije, pokazano je da se radi o značajnom javnozdravstvenom i socioekonomskom problemu, s obzirom da se troškovi potrebnog dodatnog liječenja procjenjuju na između 12,1 i 44,7 milijuna američkih dolara (14).

Neke nedavne studije također pokazuju da u posljednje vrijeme u područjima jugoistočne Azije i Afrike često dolazi do krivotvorenja antimalarika baziranih na kombiniranoj terapiji artemisininom (ACT terapija), na način da se u takvim lijekovima nalazi samo artesunat, i to zbog razloga što je kombinirana terapija dvostruko skuplja u odnosu na onu koja je bazirana samo na artemisininu. Prema procjenama SZO-a u subsaharskom području Afrike samo zbog uzimanja lažnih lijekova protiv malarije godišnje umire 72 do 267 tisuća osoba (14).

Navedeno može dovesti do toga da uzročnici malarije s vremenom postanu rezistentni na lijek pa tako lažni lijekovi pomažu širenju zaraze (više u poglavlju 3.2.3.).

3.2.2. Uzroci krivotvorenja lijekova

Pojava krivotvorenih lijekova i lijekova nezadovoljavajuće kakvoće na tržištu najčešće je rezultat djelovanja organiziranog kriminala koji u svrhu nelegalnog stvaranja dobiti na tržište plasira lažne lijekove i medicinske proizvode. Imajući na umu veličinu globalnog tržišta lijekovima, veliku potražnju za njima s jedne strane i kompleksnost proizvodnje i distribucijskih lanaca s druge strane, jasno je da kriminalne organizacije na tom području vide priliku za lakom zaradom, ne vodeći pri tom računa o kvaliteti lijekova odnosno posljedicama njihovog korištenja za potrošače. Problem zahvaća jednako originalne (inovativne) kao i istovrsne (generičke) lijekove, skupe kao i jeftine lijekove. Osim želje za profitom, kao glavnim motivom za krivotvorenje lijekova, postoji čitav niz kompleksnih čimbenika koji potiču ilegalnu proizvodnju krivotvorenih lijekova i lijekova nezadovoljavajuće kakvoće te njihovu distribuciju i prodaju. Neki od najvažnijih su:

- (1) nedostupnost kvalitetnih, sigurnih i djelotvornih lijekova,
- (2) neodgovarajući nadzor nad proizvodnjom, provjerom kakvoće i distribucijom lijekova,
- (3) slabi tehnički uvjeti za provođenje dobrih proizvođačkih i distribucijskih praksi,
- (4) slaba educiranost i niski etički kodeks djelatnika u svim elementima sustava.

(1) Nedostupnost kvalitetnih, sigurnih, djelotvornih i cjenovno pristupačnih lijekova

Unatoč činjenici što je globalno tržište lijekovima u proteklom desetljeću značajno povećano, mnogi lijekovi su za milijune ljudi diljem svijeta i dalje nedostupni. Nedostupnost legalnih lijekova jedan je od glavnih čimbenika za ulazak krivotvorenih lijekova na tržište. Krivotvoreni lijekovi javljaju se u slučajevima nestašica uslijed neadekvatnog planiranja proizvodnje ili neplaniranih događaja kao što su epidemije, ratovi, prirodne katastrofe, političke nestabilnosti te u slučajevima kulturoloških restrikcija (npr. kontraceptivi). U slabo razvijenim zemljama zdravstveni sustavi ne mogu uvijek osigurati skupe kvalitetne lijekove pa se u takvim slučajevima lijekovi često nabavljaju iz nepouzdanih izvora, a sami pacijenti često kupuju jeftinije lijekove preko interneta ili čak od uličnih prodavača, što prikazuje

Slika 2.



Slika 2 – Prodaja lijekova na ulici u zapadnoj Africi (*preuzeto iz literaturnog navoda 1*)

(2) Neodgovarajući nadzor nad provođenjem dobre proizvođačke prakse, provjere kakvoće, distribucije i prodaje lijekova

Na pojavu krivotvorenih lijekova utječe nedostatak visokih standarda za nadzor nad provođenjem dobre proizvođačke i distribucijske prakse te kontrole kakvoće proizvoda. Mehanizmi za provođenje inspeksijskih kontrola na carinama, u uvoznim lukama i drugim točkama unutar distribucijskog lanca su nedjelotvorni. Farmakovigilancijski sustav praćenja (otkrivanja sumnji na krivotvorenje u slučaju neučinkovitosti i nuspojava lijeka) ne postoji ili je nedjelotvoran. Krivotvorenja su česta i u slučajevima gdje postoji visok stupanj kompleksnosti proizvodnje i distribucijskog lanca, te prilikom

uvoza i izvoza, gdje između država uvoznica i izvoznica nisu jasno definirane ugovorne odredbe o praćenju sljedivosti, regulatorni zahtjevi su neusklađeni, a provjere su manjkave.

Krivotvorenja su česta i u državama gdje sustav kažnjavanja i procesuiranja počinitelja nije dovoljno snažan i transparentan, zbog čega proizvođači i dobavljači radi ostvarivanja ušteda često namjerno propuštaju pojedine postupke i kontrole tijekom proizvodnje i distribucije.

(3) Slabi tehnički uvjeti za provođenje dobrih proizvođačkih i distribucijskih praksi

Krivotvoreni lijekovi i lijekovi lošije kvalitete ulaze na tržište tamo gdje ne postoje jasne procedure za provođenje dobre proizvođačke i distribucijske prakse, npr. ako se ne mogu osigurati vozila s adekvatnim transportnim uvjetima, ako nema dovoljno pretovarnih skladišta u kojima se vrši nadzor temperaturnih i drugih mikroklimatskih uvjeta, ako je sveopća infrastruktura loša, ako nema dovoljno akreditiranih i tehnički opremljenih laboratorija za provjeru kakvoće lijekova, a osoblje koje provodi te postupke nije dovoljno educirano.

Primjer je kad je 2011. godine jedan lijek u Pakistanu, čije su deklarirane indikacije bile u kardiološkom području, uzrokovao više od 200 smrti i značajan broj hospitalizacija. Istragom je utvrđeno da je zbog nepridržavanja smjernica dobre proizvođačke prakse (GMP), tijekom proizvodnih faza u formulaciju slučajno dodana letalna doza antimalarika, vjerujući da se radi o inertnoj pomoćnoj tvari (1).

(4) Slaba educiranost i niski etički kodeks djelatnika u sustavu

Zdravstveni djelatnici, kao i djelatnici regulatornih tijela, carine, policije, sudstva i sveopća javnost u pojedinim državama često nisu dovoljno educirani o problemu i nisu svjesni obima, opasnosti i posljedica tog problema. Ilegalna trgovina lijekovima često se ne percipira jednako opasnom, pa čak i opasnijom od ilegalne trgovine drogom.

Zbog siromaštva i sklonosti korupciji u javnom i privatnom sektoru dolazi do provođenja neetičkih praksi u zdravstvenim ustanovama, veleprodajama i ljekarnama, kao što su npr. naručivanje lijekova od jeftinijih, ali neprovjerenih izvora, namjerno preporučivanje i propisivanje krivotvorenih lijekova te

neprijavljivanje pronalaska krivotvorenog lijeka od strane zdravstvenog djelatnika, legalnog proizvođača i distributera, sve zbog želje za ostvarivanjem financijske dobiti ili zbog straha od osvete. Globalni programi financiranja koji se provode s ciljem sprečavanja i suzbijanja neke bolesti, npr. malarije, nažalost mogu postati mamac za kriminalne aktivnosti s obzirom na veliki volumen lijekova ili cjepiva koji se u tu svrhu stavlja na tržište, a čije je korištenje promovirano od strane svjetskih i nacionalnih institucija. Krivotvoritelji lijekova u takvim slučajevima nalaze svoju priliku za ubacivanje krivotvorenih lijekova u distribucijski lanac.

Primjer ovakvog slučaja je kad su carinici u Angoli 2012. godine prilikom pregleda pošiljke razne robe iz južne Kine unutar zvučnika pronašli 33 milijuna doza antimalarika *Coartema*® koji je na pakiranju nosio obilježje kvalitete „*Green Leaf*“ (logo kojim se obilježavaju lijekovi čiju distribuciju subvencionira *Globalna zaklada za borbu protiv HIV-a, tuberkuloze i malarije* i *Gavi, Savez za cjepiva*). U ovom slučaju analizom je potvrđeno da lijek nije sadržavao djelatnu tvar, te nije bio distribuiran od strane gore navedenih institucija, nego su krivotvoritelji iskoristili brend „*Coartem*“ švicarske tvrtke Novartis i logo „*Green Leaf*“ za lažno predstavljanje. Na **Slici 3** usporedno je prikazano krivotvoreno i originalno pakiranje lijeka *Coartema*.



Slika 3 – Legalno i krivotvoreno pakiranje *Coartema*

(izvor: <https://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/sf-med-products/en/index7.html>)

Unatoč opsežnoj akciji, nadležni ipak nisu uspjeli povući s tržišta sve krivotvorene lijekove, pa je tako godinu dana nakon opisanog događaja krivotvorenje lijekova na bazi artemetera i lumefantrina pod brendom *Coartem*® tvrtke Novartis i drugim brendovima prijavljeno u 18 afričkih zemalja (1).

3.2.3. Posljedice krivotvorenja lijekova

Posljedice krivotvorenja lijekova mogu biti zdravstvene, ekonomske i socioekonomske. U **Tablici 2** prikazane su najvažnije posljedice po skupinama.

Tablica 2 - Posljedice krivotvorenja lijekova – (prilagođeno prema literaturnom navodu 1)

Zdravstvene posljedice
<ul style="list-style-type: none">• nuspojave i štetni događaji uključujući toksičnost i nedjelotvornost zbog toga što lijekovi ne sadrže deklariranu djelatnu tvar ili su kontaminirani• neuspjelo liječenje ili prevencija bolesti, potreba za dodatnim liječenjem, povećane stope mortaliteta i morbiditeta, visoka prevalencija bolesti• razvoj antimikrobne rezistencije i širenje infekcija otpornih na lijekove• gubitak povjerenja u zdravstveni sustav pri čemu pacijenti odbijaju liječenje, odbijaju cijepljenje i okreću se neprovjerenim izvorima liječenja
Ekonomске posljedice
<ul style="list-style-type: none">• povećana izvanredna direktna izdavanja za zdravstvo (tzv. „out-of-pocket“ troškovi) i povezani troškovi (npr. troškovi transporta)• financijski gubici za pacijente i gubici u zdravstvenom sustavu jer se zbog nedjelotvornosti krivotvorine i pojave nuspojava i rezistencije na lijekove troškovi liječenja povećavaju• nepotrebni utrošci resursa (ljudskih, financijskih i tehničkih) u zdravstvenom, regulatornom, carinskom i represivnom sustavu• financijska šteta i gubitak ugleda za legalne proizvođače lijekova
Socioekonomske posljedice
<ul style="list-style-type: none">• gubitak produktivnosti pacijenata zbog produljenog liječenja, hospitalizacije, invalidnosti, neproduktivnosti za rad ili smrti• smanjeni bruto domaći proizvod zbog gubitka produktivnosti i gubitka prihoda• produbljenje siromaštva

(1) Zdravstvene posljedice uporabe krivotvorenih antimalarika

Osim posljedica po zdravlje ljudi, kao što su nedjelotvornost lijeka, nuspojave, neuspjelo liječenje, pa čak i smrt, jedna od posljedica uporabe krivotvorenih antimalarika je i problem **antimikrobne rezistencije** koji se javlja u ciklusima i koji može umanjiti postignute napretke u suzbijanju malarije na pogođenim područjima.

Antimikrobna rezistencija često se javlja kod uporabe subterapijskih doza lijeka. Takve doze obično su dovoljno visoke da unište standardni soj patogena, ali pritom daju reproduktivnu prednost mutantnim sojevima, protiv kojih nemaju učinka, te se mutantni sojevi počinju širiti među populacijom.

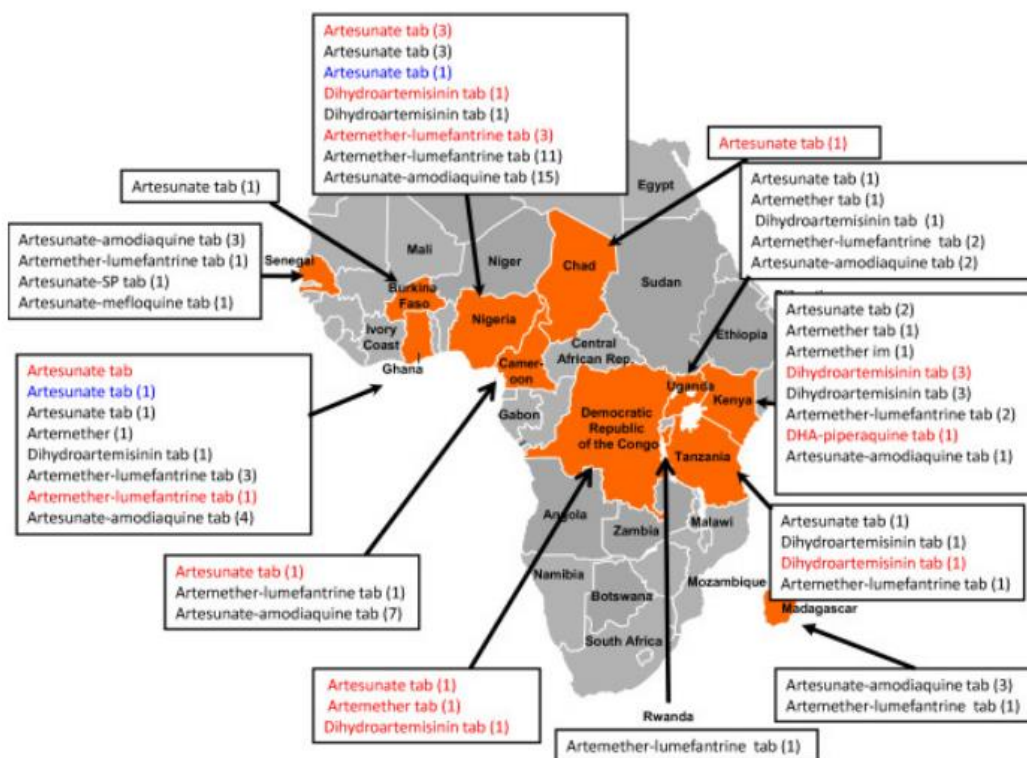
Koncentracije djelatne tvari koje mogu dovesti do antimikrobne rezistencije ovise o vrsti djelatne tvari, patogenu i individualnom pacijentu.

Tijekom 50-ih i 60-ih godina prošlog stoljeća primijećena je rezistencija na antimalarike starijih generacija, kao što su klorokin i sulfadoksin-pirimetamin, što je rezultiralo smanjenim postotkom preživljavanja djece u državama pogođenim malarijom u odnosu na prethodne godine. Tijekom 2006. i 2007. godine SZO po prvi je put upozorila svjetsku javnost o pojavnosti rezistencije na antimalarik artemisinin, i to na granici Kambodže i Tajlanda. Poduzete su brojne mjere kako bi se spriječila pojava takvih rezistentnih sojeva. Međutim, unatoč svim implementiranim mjerama, rezistencija na artemisinin uočena je i u drugim geografskim područjima regije jugoistočne Azije uz rijeku Mekong, kao i rezistencija na neke druge lijekove koji se koriste u kombinaciji s artemisininom. Stoga je 2015. godine SZO izdala dokument **Strategija za suzbijanje malarije u subregiji Mekong** (eng. *Strategy for malaria elimination in the Greater Mekong subregion (2015-2030)*). Dokument uključuje smjernice i ciljeve koji su postavljeni kako bi se malarija eliminirala kroz više etapa, počevši od područja gdje je rezistencija najučestalija. Također, osim regionalnog programa i podrške od strane Svjetske zdravstvene organizacije, zemlje subregije su implementirale i nacionalne programe (16).

Rezultati provođenja navedene strategije su optimistični. Naime, prema posljednjim informacijama objavljenim u 8. Biltenu Programa, od 2012. do 2018. godine pojavnost slučajeva malarije u subregiji oko rijeke Mekong pala je za 74%, dok je broj smrti pao za 95%. U prvoj polovici 2019. godine broj slučajeva *P. falciparum* malarije pao je za 65%, što je najveći ikad zabilježeni pad slučajeva (17).

Rezistentni sojevi prisutni su i u Africi, gdje su do 2011. godine bili prijavljeni brojni slučajevi krivotvorenja derivata artemisinina i kombinirane terapije koja uključuje artemisinin. Naime, većina afričkih zemalja potiče korištenje kombinirane terapije temeljene na artemisininu, odnosno zamjenu monoterapije s kombiniranom terapijom, kako bi se spriječila rezistencija na lijekove (18).

Slika 4 prikazuje u kojim su državama zabilježene te prijave i koje lijekove obuhvaćaju.



crveno krivotvoreni plavo lijekovi nezadovoljavajuće kakvoće crno nejasno da li su krivotvoreni ili nezadovoljavajuće kakvoće

Slika 4 - Prijave krivotvorenih lijekova i/ili lijekova nezadovoljavajuće kakvoće na bazi derivata artemisinina ili ACT terapije do listopada 2011. (preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 18)

Primjer jednog takvog događaja jest kad je jedan ljekarnik u zapadnoj Africi 2013. godine otkrio vreću punu djelomično opremljenih antimalarika, koji su distribuirani besplatno u jeku javnozdravstvene kampanje. Na blisterima je bilo otisnuto ime jedne francuske grupacije. Preko sustava GSMS obaviješteno je francusko regulatorno tijelo koje je pokrenulo istragu u kojoj je utvrđeno da je navedena grupacija imala dozvolu samo za proizvodnju biljnih proizvoda. Lijekovi nisu zadovoljavali standarde kakvoće te nisu imali deklarirani sadržaj djelatne tvari. Dodatno je ustanovljeno da je tijekom 2012. godine više od 8 milijuna doza tog antimalarika distribuirano u subsaharskoj Africi. Od istog dobavljača tijekom 2013. i 2014. distribuirano je i 6000 doza brzog dijagnostičkog testa za malariju, koji nije zadovoljavao standarde kakvoće i za kojega proizvođač nije imao odobrenje za proizvodnju ni odobrenje za stavljanje u promet. Visoki sud u Parizu izrekao je novčane i zatvorske kazne uključenima u proizvodnju i distribuciju, međutim one su bile znatno manje u odnosu na one izrečene za ilegalnu trgovinu drogom. Važno je napomenuti da je u presudi bilo navedeno da takvi

krivotvoreni antimalarici ugrožavaju zdravlje pojedinaca te predstavljaju prijetnju javnom zdravlju zbog mogućeg razvoja antimikrobne rezistencije (1).

Kombinirana terapija na bazi artemisinina još je uvijek djelotvorna terapija koja spašava mnoge živote u endemskim područjima. Međutim, u slučaju pojavnosti rezistencije na tu terapiju, ne postoji alternativna terapija koja bi ju mogla zamijeniti. Veza između krivotvorenja antimalarika i pojave antimikrobne rezistencije istraživana je u brojnim studijama, među ostalim i u **Studiji o zdravstvenim i ekonomskim posljedicama rezistencije na artemisinin** iz 2014. godine (19). Studija predviđa model u kojem bi uspješnost liječenja kombiniranom terapijom koja uključuje artemisinin koja se koristi kao prva linija obrane protiv *P. falciparum* malarije u endemskim područjima bila smanjena na 30% te bi se liječenje težih oblika malarije vratilo na terapiju kininom. Podaci su uspoređeni s modelom gdje je artemisinin kombinirana terapija visoko djelotvorna (95%), a teška malarija se liječi artesunatom. Prema procjeni, u slučaju da se razvije i raširi antimikrobna rezistencija na kombiniranu terapiju koja uključuje artemisinin, u pogođenim područjima dešavalo bi se 116.000 smrti godišnje, troškovi dodatnog liječenja zbog nedjelotvornosti primarnog liječenja i posljedica teške malarije iznosili bi 32 milijuna USD godišnje, a troškovi zbog gubitka produktivnosti iznosili bi 385 milijuna USD (19).

Također, neke studije su pokazale da su pacijenti koji su liječeni antimalaricima nezadovoljavajuće kakvoće imali povećan broj gametocita (spolnog stadija parazita koji se može ponovno prenijeti s ljudskog domaćina nazad na komarca) u odnosu na osobe liječene kvalitetnim lijekovima, što povećava kruženje opasnog parazita otpornog na lijekove među populacijom (20).

3.3. Načini rješavanja problema krivotvorenja lijekova

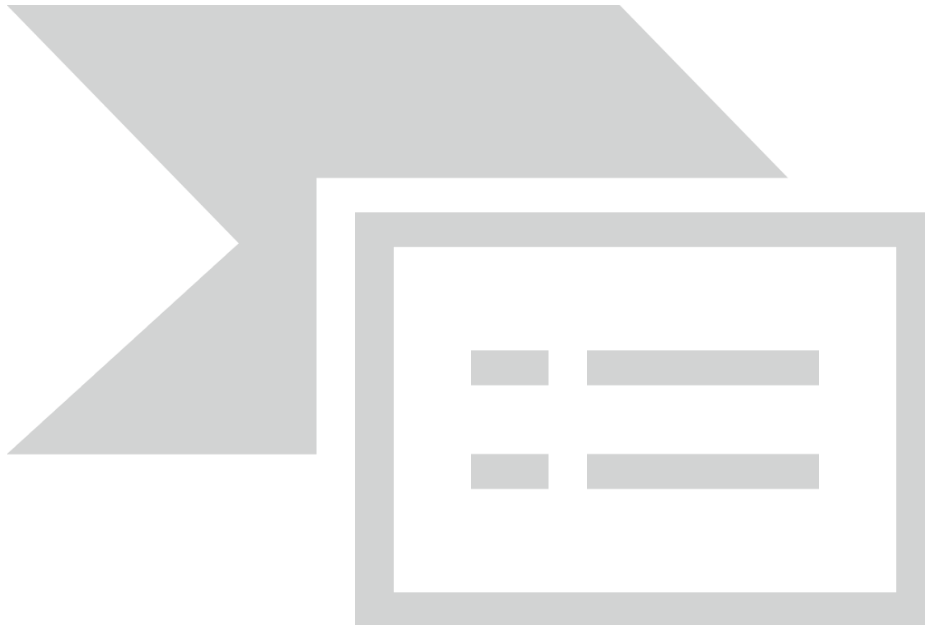
Kako bi borba protiv krivotvorenja lijekova bila djelotvorna, nužna je suradnja i koordinacija širokog kruga dionika sustava kao što su nadležna tijela u zdravstvu, regulatorne agencije, carina, sudstvo, zdravstveni radnici, znanstvena zajednica, neprofitne organizacije i slično, i to na nacionalnoj, regionalnoj i globalnoj razini.

3.3.1. Aktivnosti na globalnoj razini

3.3.1.1. Globalni sustav za nadzor i praćenje krivotvorenih lijekova (GSMS)

Svjetska zdravstvena organizacija je u srpnju 2013. godine pokrenula Globalni sustav za nadzor i praćenje krivotvorenih lijekova (eng. *The Global Surveillance and Monitoring System for SF medical products, GSMS*) koji povezuje više zemalja s ciljem postizanja bolje razmjene informacija, održavanja baze podataka o krivotvorenju lijekova i edukacije djelatnika nacionalnih regulatornih tijela u žarišnim područjima o načinima otkrivanja, prijave i postupanja u slučaju pojavnosti krivotvorenih lijekova ili lijekova nezadovoljavajuće kakvoće, prvenstveno u smislu izdavanja hitnog upozorenja mogućim interesnim skupinama. Sustav objedinjuje tri međusobno povezana pristupa kako prikazuje **Slika 5**:

- (1) Prevencija prodaje krivotvorenih lijekova
- (2) Otkrivanje krivotvorenih lijekova koji su već prisutni u distribuciji ili na tržištu
- (3) Brzi odgovor nadležnih tijela u slučaju otkrivanja krivotvorenih lijekova na tržištu (1).



Slika 5 – GSMS Sustav – „Prevencija, otkrivanje, reakcija“ (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 1*)

Aktivnosti koje se poduzimanju u cilju implementacije sustava „Prevenција, otkrivanje, reakcija“ prikazane su u **Tablici 3**.

Tablica 3 – Primjeri aktivnosti za implementaciju sustava „Prevenција, otkrivanje, reakcija“
(preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 1)

(1) PREVENCIJA	
Edukacija i svjesnost o problemu	Provođenje edukacije za nezdravstvene stručnjake i opću javnost, najčešće putem medija Uvrštenje takvih edukacija u obvezni kurikulum za zdravstveno osoblje
Adekvatni zakonski okviri	Postojanje zakonskih odredbi za omogućavanje zapljene sumnjivih lijekova, stavljanje u karantenu, uzorkovanje, analizu, povlačenje i uništavanje krivotvorenih lijekova Provođenje inspekcija, istraga, ovrha i sankcioniranja dionika uključenih u proizvodnju, distribuciju, skladištenje i prodaju krivotvorenih lijekova Postojanje pisane strategije koja obrazlaže postupke i mjere prevencije, načine otkrivanja i postupanja u slučaju otkrivanja krivotvorenih lijekova i lijekova nezadovoljavajuće kakvoće
Suradnja različitih interesnih skupina	Redovita komunikacija između regulatornih tijela, policije, carine, civilnih udruga, zdravstvenih djelatnika, farmaceutske industrije, dobavljača, prijevoznika i drugih sudionika Postojanje procedura kojima se propisuje redoviti angažman nacionalnih centara za farmakovigilanciju, nacionalnih centara za otrove i nacionalnih laboratorija za kontrolu kakvoće
Integritet lanca opskrbe	Postojanje „ <i>track-and-trace</i> “ sustava za identifikaciju izvora lijeka i njegovog puta od proizvodnje preko distribucijskog lanca do kupca Mapiranje distribucijskih lanaca od točke proizvodnje ili uvoza do maloprodajnih jedinica
(2) OTKRIVANJE	
Pogranične kontrole	Postojanje luka određenih za uvoz i izvoz medicinskih proizvoda i prisustvo regulatornih tijela u tim lukama Postojanje procedura koje omogućavaju razmjenu informacija vezanih uz sumnju na krivotvorenje lijekova između carine, policije i regulatornih agencija
Sustav prijavljivanja	Postojanje efikasnog sustava javnog prijavljivanja sumnje na kakvoću lijeka, prijavljivanja nuspojava nacionalnim regulatornim tijelima i obrade takvih informacija
Nadzor i inspekcije temeljeni na procjeni rizika	Postojanje strategije regulatornog nadzora i provođenje redovitih i izvanrednih inspeksijskih nadzora nad proizvođačima, uvoznicima i lancem opskrbe Postojanje programa inspeksijskog nadzora proizvođača (uključujući faze pakiranja), uvoznika, distributera i ljekarni
Pristup laboratorijima i tehnologijama za otkrivanje krivotvorenih lijekova	Korištenje akreditiranih laboratorija za kontrolu kakvoće, koji postupaju sukladno propisanim procedurama za provođenje analize, obradu rezultata i izvještavanje u slučaju sumnje na krivotvorenje lijeka Postojanje pouzdanih i cjenovno prihvatljivih tehnologija za otkrivanje krivotvorenih lijekova na licu mjesta.
(3) BRZI ODGOVOR (REAKCIJA)	
Sustav brzog alarmiranja i povlačenja	Postojanje procedure za brzo alarmiranje (eng. <i>rapid alerts</i>) i zaprimanje upozorenja i postupanje u slučaju otkrivanja krivotvorenih lijekova Određivanje osoba/odjela unutar nacionalnog regulatornog tijela koji će imati pristup bazi GSMS-a i koji će zaprimati i upućivati upozorenja o pojavi krivotvorenih lijekova na tržištu
Uloga regulatornih tijela	Postojanje procedura za postupanje u slučaju pojavnosti krivotvorenih lijekova te provođenje edukacija za djelatnike koji se time bave Provođenje prevencije, ustrajnost u otkrivanju i uklanjanju krivotvorenih lijekova s tržišta je jedna od osnovnih odgovornosti regulatornih tijela prema kojoj se procjenjuje njihova učinkovitost.
Transparentni pravni sustav	Postojanje transparentnog pravnog sustava za sankcioniranje počinitelja i propisivanje sankcija na način da su one proporcionalne kaznenom dijelu, opravdane i konzistentne
Procedure i strategije temeljene na dokazima	Korištenje podataka iz raznih izvora kod izrade strategija i procedura za borbu protiv krivotvorenja lijekova Obrada tih podataka s ciljem implementiranja promjena koje će dovesti do povećanja sigurnosti lijekova za pacijente.

3.3.1.2. Ostale aktivnosti na globalnoj razini

Na globalnoj razini postoje brojne organizacije, radne grupe, programi, akcije, zaklade, inicijative i slično koje se bave ovom problematikom, a neke od njih prikazane su u **Tablici 4**.

Tablica 4 - Globalne inicijative za borbu protiv krivotvorenja lijekova

NAZIV	PODRUČJE DJELOVANJA
Member State Mechanism Svjetske zdravstvene organizacije	Mehanizam SZO-a koji okuplja neke države članice s ciljem prevencije i nadzora nad globalnim problemom krivotvorenja lijekova i pružanja tehničke i ekspertne pomoći u rješavanju istog.
Uppsala Monitoring Center	Zaklada koja se bavi praćenjem sigurnosnih informacija vezanih uz lijekove i koja održava baze podataka o prijavljenim nuspojavama, nedjelotvornosti lijekova i drugim događajima. Obradom takvih podataka može se doći do saznanja o pojavnosti krivotvorenih lijekova.
International Medical Product Anti-Counterfeiting Task Force, IMPAKT	Akcijska skupina SZO za borbu protiv krivotvorenih lijekova i lijekova nezadovoljavajuće kakvoće.
PANGEA	Međunarodna operacija koju vodi Interpol, a koja se bori protiv ilegalne online trgovine lijekovima.
Worldwide Antimalarial Resistance Network, WWARN	Svjetska mreža za borbu protiv rezistencije na antimalariku koja održava bazu podataka o kvaliteti antimalarika.
ACT Consortium	Organizacija koja provodi razna istraživanja s ciljem osiguranja dostupnosti kombinirane terapije temeljene na artemisininu (ACT terapija).
The Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria	Internacionalna organizacija/ partnerstvo za suzbijanje HIV-a, tuberkuloze i malarije koja investira u različite programe za borbu protiv ovih bolesti.

3.3.2. Aktivnosti na regionalnim i nacionalnim razinama

Na regionalnim i nacionalnim razinama također je važno djelovati u smislu usklađivanja zakonodavstva, razmjene informacija, zajedničke koordinacije i izrade regionalnih planova (1).

U Europskoj Uniji postoje brojna tijela (Europska komisija i Vijeće Europe), agencije, organizacije i slično koje kroz usklađivanje zakonodavstva o krivotvorenim lijekovima nastoje povećati učinkovitost borbe protiv krivotvorenih lijekova, kao npr.:

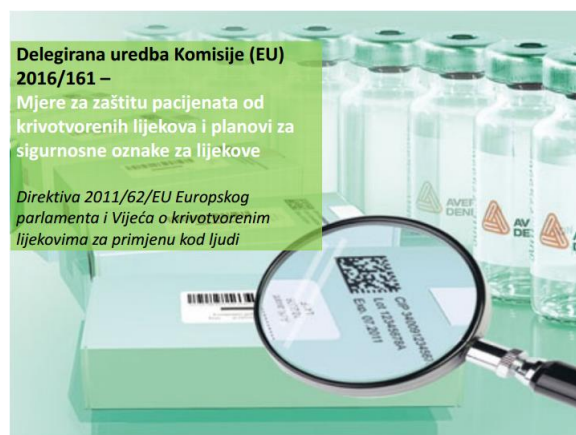
- Europska agencija za lijekove (*European Medicines Agency, EMA*)

- Europska organizacija za provjeru autentičnosti lijekova (*European Medicines Verification Organisation, EMVO*)
- Europsko ravnateljstvo za kvalitetu lijekova i zdravstvenu skrb (*European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, EDQM*) i slično.

Sve članice EU, pa tako i Hrvatska, u svoje su zakonodavstvo implementirale Direktivu 2011/62/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 8. lipnja 2011. o izmjeni Direktive 2001/83/EZ o zakoniku Zajednice koji se odnosi na lijekove za primjenu kod ljudi, u svrhu prevencije unosa krivotvorenih lijekova u legalni lanac opskrbe (2).

Republika Hrvatska je 3. rujna 2015. godine ratificirala MEDICRIME konvenciju Vijeća Europe (2010.) o krivotvorenju lijekova i farmaceutskih proizvoda i sličnim kažnjivim djelima koje uključuju prijetnje javnom zdravlju. „MEDICRIME“ konvencija prvi je međunarodni instrument kaznenog prava koji obvezuje države članice Vijeća Europe da inkriminiraju proizvodnju krivotvorenih lijekova i medicinskih proizvoda, opskrbu, ponudu i promet krivotvorenim lijekovima i medicinskim proizvodima te krivotvorenje dokumenata (21).

2. listopada 2015. na snagu je stupila Delegirana uredba Europske komisije 2016/161 o dopuni Direktive 2001/83/EZ Europskog parlamenta i Vijeća, s ciljem uvođenja novih sigurnosnih oznaka na pakiranja receptnih lijekova radi sprečavanja ulaska krivotvorenih lijekova u legalni lanac opskrbe što prikazuje **Slika 6**.



Slika 6 - Sigurnosne oznake za lijekove

(Izvor: hgk.hr/documents/hgk-gs1-serijalizacija-lijekova-anita-galic58d8bd1a27b8b.pdf)

Sukladno toj uredbi države članice bile su dužne izraditi nacionalni Plan provedbe za uvođenje sigurnosnih oznaka za lijekove, prema kojemu su svi nositelji odobrenja bili obavezni staviti sigurnosne oznake na pakiranja lijekova navedenih u Direktivi, a koji su pušteni u promet nakon 9. veljače 2019. (22).

3.4. Malaria

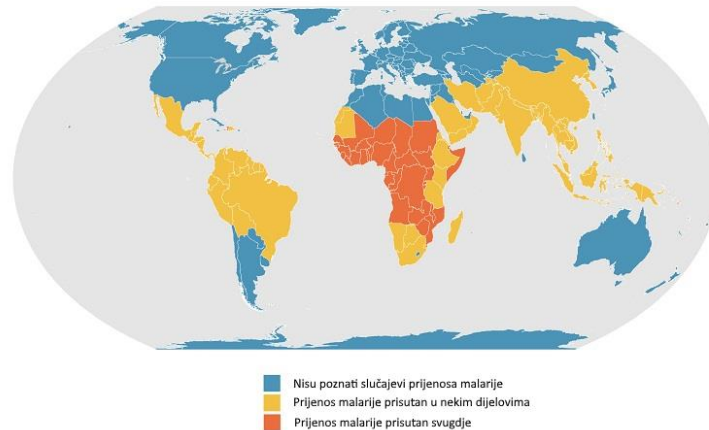
3.4.1. Općenito o malariji

Malaria je teška i po život opasna bolest koju uzrokuju paraziti iz roda *Plasmodium* i koja se na ljude prenosi ubodom inficirane ženke komarca *Anopheles*. Najčešće se javlja u tropskim i subtropskim područjima. To je bolest s najvećom prevalencijom na svijetu, budući da se godišnje zaraze milijuni ljudi, a gotovo polovica svjetske populacije izložena je riziku obolijevanja od malarije (3,26).

Pojavnost malarije - Postoje dokazi da je malaria egzistirala pred više desetaka tisuća godina, ali unatoč golemim naporima koji se ulažu u njezino suzbijanje, do danas nije savladana. Budući da je endemično prisutna u mnogim zemljama, malaria i dalje predstavlja veliki javnozdravstveni problem s tendencijom rasta zbog pogoršanja zdravstvenog sustava uslijed neke iznenadne krize (npr. aktualna pandemija COVID-19), sve veće otpornosti na lijekove i insekticide, klimatskih promjena, prirodnih katastrofa, oružanih sukoba i slično. Globalna stopa mortaliteta od malarije iznosi od 0,3% do 2,2%, a u slučajevima težih oblika tropske malarije 11% do 30% (24).

Osim Afrike i jugoistočne Azije ugrožene su i istočnomediteranska i zapadnopacifička regija, ali i sjeverni dio Južne Amerike. U svim tim regijama dominantan je oblik *P. falciparum* malarije, osim u američkoj regiji gdje prevladava *P. vivax* malaria (75%) (3).

Na ostalim kontinentima malaria se rjeđe javlja, a u razvijenom svijetu bilježe se uglavnom uvezeni slučajevi iz endemskih područja, do kojih dolazi zbog velike mobilnosti ljudi i rastućeg trenda turističkih putovanja u takva područja. U većini razvijenih zemalja malaria je iskorijenjena polovicom prošlog stoljeća (u Hrvatskoj 1964. godine). Prevalencija malarije u svijetu prikazana je na **Slici 7**.



Slika 7 - Prevalencija malarije u svijetu (*preuzeto i prilagođeno prema <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>*)

Etiologija, razvojni ciklus uzročnika malarije i patogeneza malarije

Uzročnici malarije su paraziti iz carstva Protista, podcarstvo Protozoae, red Haemosporidae, porodica *Plasmodidae*, rod *Plasmodium* (24). Postoji 130 vrsta *Plasmodiuma*, od kojih pet mogu zaraziti ljude: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* i *Plasmodium ovale* (2 vrste) (26).

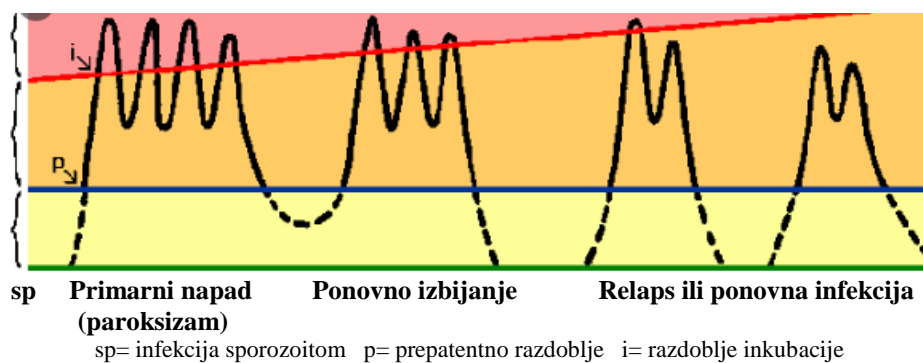
Uzročnici malarije su različito zemljopisno zastupljeni. Razlikuju se prema vremenu inkubacije, kliničkoj slici i ishodu bolesti. *Plasmodium falciparum* odgovoran je za preko 50% slučajeva malarije globalno te izaziva najteži oblik malarije - maligna malarija tercijana ili tropska malarija. Osnovno svojstvo uzročnika malarije je da se enormno brzo i učinkovito razmnožava u humanim stanicama, hepatocitima i eritrocitima (24). Razvojni ciklus plazmodija vrlo je složen, a uključuje jedan spolni ciklus u vektoru komarcu (sporogonija) i 2 nesporna u čovjeku (shizogonija). Kod čovjeka razlikujemo dvije faze razvoja plazmodija: jetrena faza (egzoeritrocitna shizogonija) i eritrocitna faza (eritrocitna shizogonija) (24).

Zavisno o vrsti uzročnika ciklus traje 24 sata (*P. knowlesi*), 48 sati (*P. falciparum*, *P. vivax* i *P. ovale*) ili 72 sata (*P. malariae*). Kada se ponovi nekoliko ciklusa nespornog razmnožavanja, što je 6-8 dana po izlasku merozoita iz jetre, količina parazita u krvi naraste na 50 uzročnika/ μ L ili oko 100 milijuna u krvotoku, što je uzrokom pojave simptoma bolesti, vrućice, groznice i jakog znojenja (24).

Simptomi i klinička slika malarije

Malarija je akutna febrilna bolest. Prvi simptomi obično se uočavaju 10-15 dana nakon ugriza komarca. Klasični malarijski paroksizam (rigor) podudara se s otpuštanjem merozoita iz uništenih eritrocita. Kao prvi simptomi javljaju se malaksalost, nagla tresavica i vrućica koja se penje i do 41°C s brzim i isprekidanim pulsom i poliurijom, jaka glavobolja i povraćanje. Nakon 2 – 6 sati vrućica pada, nakon čega u slijedeća 2 – 3 sata dolazi do obilnog preznojava i jakog umora (25).

Prepoznatljiv simptom je tipična rekurentna (povratna) groznica koja se može ponavljati svakih 48 – 72 sata, ovisno o vrsti uzročnika, a traje nekoliko sati. **Slika 8** prikazuje tijek infekcije malarijom.



Slika 8 - Tijek infekcije malarijom

(Preuzeto i prilagođeno prema: <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/malaria.html>)

Djeca s teškom malarijom obično razvijaju tešku anemiju, akutni respiratorni distress simptom kombiniran s metaboličkom acidozom ili cerebralnu malariju za koju je karakteristično krvarenje, poremećaj svijesti, koma i brza smrt. U odraslih često je i zatajenje vitalnih sustava u organizmu, a kod trudnica pobačaj ili prerani porođaj. Komplikacije su uglavnom karakteristične za zarazu *P. falciparum* (25).

Epidemiologija

Postoje tri načina prijenosa malarije s bolesne osobe ili kliconoše na zdravu osobu: 1. ubodom komarca *Anopheles*; 2. intrauterino, s oboljele majke na plod, preko posteljice ili tijekom porođaja; 3. transfuzijom krvi koja sadržava uzročnika, tijekom kirurških zahvata ili injekcijama kad se upotrebljavaju onečišćene igle.

(1) Prijenos malarije vektorima je najčešći oblik prijenosa bolesti. Vektori su komarci roda *Anopheles*. Transmisija ovisi o više faktora, kao što su vrsta parazita, vektor, domaćin i okolišni uvjeti (količina i frekvencija oborina, temperatura i vlaga).

Komarci roda *Anopheles* liježu jajašca u vodi. Tropska područja obiluju različitim ekosustavima, prvenstveno nakon sezone obilatih tropskih kiša, te se stoga malarija često javlja sezonski. Iz jajašca se liježe ličinka, iz koje nastaje odrasli komarac. Ženka komarca pri ugrizu ispušta nešto sline, a ako je prethodno ugrizla čovjeka zaraženog malarijom, prenijet će parazita čiji se spolni dio ciklusa odvijao u komarcu. Bolest se lakše prenosi u područjima gdje je životni vijek komaraca duži, uslijed čega parazit ima više vremena za razvoj te u područjima gdje je čovjek preferirana meta komaraca u odnosu na druge životinje.

Malarija se češće javlja u područjima gdje je kolektivni imunitet nizak, te su shodno tome u tim područjima sve dobne skupine rizične. U endemskim područjima, ljudi tijekom života često razvijaju djelomični imunitet na malariju, koji ne pruža potpunu zaštitu, međutim može smanjiti težinu infekcije.

Ostali načini prijenosa malarije su rijetki (3, 26).

3.4.2. Suzbijanje i iskorjenjivanje malarije

Suzbijanje (eliminacija) se definira kao zaustavljanje lokalnog prijenosa parazita u određenim područjima kao rezultat kontinuiranog nastojanja stručnjaka u smislu kontinuirane implementacije nužnih mjera kako bi se spriječio ponovni prijenos bolesti.

Iskorjenjivanje malarije (eradikacija) može se definirati kao trajni nestanak bolesti uzrokovanih plazmodijima, ali i nestanak patogena, kao rezultat kontinuiranih napora stručnjaka. Nakon što se to postigne, intervencijske mjere više neće biti potrebne (3, 26).

Globalno gledajući, broj država u kojima je malarija eliminirana se povećava. U 2018. godini 27 država izvijestilo je o manje od 100 autohtonih slučajeva malarije u odnosu na 2010. g. kad je o takvoj pojavnosti izvijestilo 17 država. Kada države dostignu cilj od barem 3 godine s 0 prijavljenih autohtonih slučajeva malarije SZO izdaje Certifikat o eliminaciji malarije. U posljednjih 10 godina, 10 država je certificirano, od kojih posljednji Alžir, 2019. godine (3).

Podaci o broju oboljelih - Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, broj oboljelih u 2016. godini procijenjen je na 216 milijuna, a u odnosu na 2015. g. povećao se za 5 milijuna oboljelih (23).

U 2018. godini, zabilježeno je 228 milijuna slučajeva malarije diljem svijeta, dok se broj smrti procjenjuje na 405.000. Od ukupnog broja smrti 67% smrtnih slučajeva (272 000 smrti) odnosilo se na djecu mlađu od 5 godina, koja su najranjivija skupina. U ranjive skupine spadaju i trudnice, pacijenti s HIV-om/AIDS-om i putnici iz neendemskih područja. Najugroženije područje na svijetu je subsaharska Afrika, u kojoj je najrasprostranjenija *P. falciparum* malarija. Tako se u 2018. godini 93% slučajeva malarije i 94% smrti od malarije odnosilo na Afriku. Najugroženija država na svijetu 2018. godine bila je Nigerija, na koju se odnosilo 25% slučajeva malarije (3).

U Europskoj Uniji prema podacima Europskog centra za sprečavanje i kontrolu bolesti (ECDC), godišnje se prijavi oko 11.000 slučajeva malarije (24).

3.4.2.1. Globalna borba protiv malarije od 1955. do 2030.

Globalna borba s malarijom započela je 1955. godine kada je SZO uz podršku SAD-a započela ambiciozni program eradikacije malarije *Global Malaria Eradication Campaign* (GMEC), koji se temeljio na eliminaciji vektora upotrebom insekticida, na liječenju antimalaricima i programima nadzora. Iako je u nekim državama taj plan doveo do značajnog smanjenja slučajeva, zbog pojave rezistencije na lijekove i insekticide, ratova, masovnih seoba stanovništva, nedovoljnih sredstava i manjka suradnje od strane lokalnih zajednica, pokazao se neodrživim te je obustavljen 1967. godine.

1993. godine je SZO započela s novim programom *Global Malaria Control Strategy* koji je za razliku od GMEC-a bio decentraliziran i usmjeren na lokalno jačanje primarne zdravstvene zaštite, na ranije dijagnosticiranje bolesti, pravovremenu terapiju kao i na prevenciju bolesti dostupnim sredstvima poput zaštitnih mreža tretiranih insekticidima, zaprašivanja domova, kemoprofilaksu putnika u endemska područja i trudnica i djece u endemskim područjima (24).

Danas se u cilju borbe protiv malarije uspostavljaju globalni, regionalni i nacionalni programi nadzora koji uključuju praćenje slučajeva bolesti, brzi odgovor temeljen na razvijenim strategijama, prikupljanje i obradu podataka u svrhu praćenja napretka ili uočavanja problema nedjelotvornosti lijekova, osiguranje dostupnosti lijekova protiv malarije i slično. Nažalost, mnoge države u kojima je

prevalencija malarije visoka nemaju razvijene sustave efikasnog nadzora bolesti, što dovodi do poteškoća u slučaju naglog razvoja epidemije u tim područjima i brzog odgovora na pojavu epidemije.

Najnovija strategija *Global Technical Strategy for malaria 2016 – 2030*, prihvaćena na Skupštini SZO-a u svibnju 2015., nudi tehnički okvir za endemijske zemlje. Strategija je osmišljena kao vodič i potpora regionalnim i nacionalnim programima koji žele suzbiti malariju. Cilj je ambiciozan, ali ostvariv: do 2020. godine prepoloviti broj smrti od malarije, a do 2030. smanjiti incidenciju malarije za barem 90%, smanjiti stopu smrtnosti od malarije za barem 90%, suzbiti malariju u barem 35 zemalja te spriječiti ponovnu pojavu bolesti u zemljama slobodnima od malarije (28, 29). **Slika 9** prikazuje usporedbu incidencije progresije malarije kroz tri moguća scenarija: nastavak trenutne putanje (plavo), ostvarenje zadanih ciljeva GTS-a (zeleno) i najgori mogući scenarij (crveno).



Slika 9 - Usporedba napretka incidencije slučajeva malarije do godine 2030. kroz tri scenarija (preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 28)

3.4.2.2. Načini prevencije i suzbijanja malarije

(1) **Kontrola komaraca vektora** je najefikasniji način smanjenja prijenosa malarije kojim je postignut najveći napredak u suzbijanju malarije u posljednjim godinama. Kontrola komaraca vektora postiže se na 2 načina:

- Korištenjem mreža tretiranih insekticidima (engl. *Insecticide-treated net ITN*) - pod kojima osobe u ugroženim područjima spavaju, čime su fizički i kemijski zaštićene od komaraca. U

2018. godini oko polovice ugroženih osoba bilo je opskrbljeno takvim mrežama u odnosu na 29% u 2010. godini.

- Uporabom insekticida u zatvorenim prostorima (eng. *Indoor spraying with residual insecticides IRS*), gdje se jednom do dvaput godišnje provodi prskanje insekticidima u kućanstvima u ugroženim područjima..

Problem vezan uz korištenje ovih metoda je rastuća rezistencija na insekticide. U posljednjem izvješću SZO-a o malariji (*World malaria report 2019.*) (29), navodi se da su između 2010. i 2018. godine 73 države prijavile rezistenciju komaraca na najmanje 1 od 4 najčešće korištenih insekticida, dok je 27 država prijavilo rezistenciju komaraca na sve glavne skupine insekticida (3). Iako za sada rezistencija na insekticide sukladno istraživanju SZO-a ne predstavlja značajniju prijetnju, SZO se zauzima za hitni pronalazak novih insekticida kao i implementaciju globalne strategiju za borbu protiv rezistencije na insekticide.

(2) Kemoprofilaksa - Malaria je danas globalni fenomen potenciran sve većom migracijom i pokretljivošću populacije. Kemoprofilaksa je obvezna za osobe iz neugroženih područja koje putuju u endemična područja. Daje se prema točno utvrđenoj shemi (prije, za vrijeme i nakon putovanja) u vidu lijekova koji suzbijaju stadij parazita u krvi. Trudnicama u srednje i visokougroženim područjima i djeci daje se u vidu kombinirane kemoprofilakse sulfadoksinom i pirimetaminom. U područjima subsaharske Afrike gdje je zabilježena sezonska transmisija bolesti, preporuča se uzimanje amodiakina i kombinirane terapije sulfadoksinom i pirimetaminom za djecu mlađu od 6 godina (4).

(3) Razvoj cjepiva protiv malarije RTS,S/AS01 (Mosquirix) je rekombinantno cjepivo s prederitrocitnim stadijima proteina. To je dosad prvo i jedino cjepivo koje je pokazalo da može značajno smanjiti pojavnost malarije u afričke djece, djelujući protiv *P. falciparum* malarije. Proizvođač cjepiva je tvrtka GSK. Cjepivo je u tri faze kliničkog ispitivanja (2009. -2014.) pokazalo dobre rezultate u prevenciji malarije. Europska agencija za lijekove (EMA) izdala je pozitivno stručno mišljenje za cjepivo 2015. godine, a SZO je također prepoznala javnozdravstveni potencijal ovog cjepiva te je pokrenula pilot projekte evaluacije cjepiva u odabranim državama subsaharske Afrike. Očekuje se da bi šira primjena ovog cjepiva mogla spasiti milijune ljudskih života (3,26).

3.4.3. Terapija malarije

Malarija je bolest koja se može prevenirati i izliječiti. Primarni cilj liječenja je osigurati brzo i potpuno uklanjanje plazmodija iz krvi pacijenta kako bi se spriječila progresija nekomplikirane malarije u teže oblike bolesti. S javnozdravstvenog gledišta cilj je smanjiti prijenos invazije na druge ljude smanjenjem rezervoara invazije te spriječiti otpornost na antimalarike (3, 25).

Malariju je važno dijagnosticirati u ranom stadiju bolesti. U pravilu dijagnosticira se nalazom parazita mikroskopskom pretragom krvi ili brzim dijagnostičkim testom. Liječenje koje se temelji samo na kliničkoj slici bolesti potrebno je izbjegavati (3).

3.4.3.1. Lijekovi protiv malarije

Malarija se liječi antimalaricima, a izbor lijeka ovisi o vrsti uzročnika, kliničkom statusu bolesti i procjeni infekcije rezistentnim uzročnikom prema mjestu zaraze. Antimalarike dijelimo s obzirom na stadij životnog ciklusa plazmodija na koji djeluju (**Tablica 5**), a prema porijeklu dijelimo ih na prirodne produkte i njihove polusintetske derivate te na sintetske lijekove. U terapiji malarije koriste se dva prirodna produkta porijeklom iz biljaka, kinin i artemisinin, polusintetski derivati artemisinina: dihidroartemisinin, artemeter i artesunat, ali i neki sintetski lijekovi, antibiotici te drugi prirodni produkti s antimalarijskim djelovanjem (27).

(1) Liječenje s obzirom na stadij životnog ciklusa plazmodija

Tablica 5 - Lijekovi s obzirom na stadij životnog ciklusa plazmodija na kojeg djeluju (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 24*)

Vrsta lijeka s obzirom na stadij parazita	Očekivani učinak	Naziv lijeka
Krvni šizontocidi	Djeluju na eritrocitne šizonte, zaustavljaju kliničku sliku bolesti	Klorokin, kinin, artemisinin, amodiakin, lumefantrin, atovakvon, sulfadoksin, klindamicin, progvanil
Tkivni (jetreni) šizontocidi	Djeluju na tkivne razvojne forme i sprečavaju ulazak parazita u krv	Primakin, pirimetamin, progvanil, tetraciklin
Gametocidi	Djeluju na gametocite i tako sprečavaju infekciju komaraca i zaustavljaju daljnji prijenos na ljude	Primakin, artemisinin, kinin (slabo)
Hipnozointocidi	Djeluju na <i>P. ovale</i> i <i>P. vivax</i> u jetri i sprečavaju reaktivaciju bolesti	Primakin, tafenokin
Sporontocidi	Djeluju na razvoj gametocita, tako da se ne mogu razvijati u komarcu	Primakin, progvanil, klorogvanil

(2) Liječenje s obzirom na porijeklo, vrstu uzročnika i klinički status bolesti

Jednostavna ili nekomplicirana malarija može se liječiti oralno. Artemisinin, kemijski spoj iz biljke *Artemisia annua L.*, u kombinaciji s drugim antimalaricima (amodiakin, lumefantrin, meflokin ili sulfadoksin/pirimetamin), poznat kao kombinirana terapija artemisininom (eng. *artemisinin combination therapy, ACT*), najučinkovitije je liječenje u slučaju invazija uzrokovanih vrstom *P. falciparum* jer smanjuje otpornost na pojedinačne komponente lijeka. ACT je 90% učinkovit kad se upotrebljava za liječenje nekomplicirane malarije. Druga je preporučena kombinacija dihidroartemisinina i piperakina. Za liječenje nekomplicirane malarije u trudnoći SZO preporučuje upotrebu kinina s klindamicinom u ranoj trudnoći i ACT u kasnijim mjesecima (26). Na **Slici 10** prikazane su kemijske strukture predstavnika pojedinih skupina antimalarika.



Slika 10 - Kemijske strukture najznačajnijih predstavnika pojedinih skupina antimalarika (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 4, 27*)

Invazija vrstama *P. vivax*, *P. ovale* ili *P. malariae* obično ne zahtijeva hospitalizaciju.

Malarija u ljudi uključuje asimptomatski stadij u jetri i simptomatski eritrocitni stadij. Malo je lijekova koji utječu na jetreni stadij bolesti. Najbolje poznat i učinkovit lijek jest primakin, jedini koji se upotrebljava i u liječenju hipnozoitnih oblika *Plasmodium vivax*. Međutim, problem je što primakin uzrokuje hemolitičku anemiju u osoba s manjkom glukoza-6-fosfata dehidrogenaze (G6PD), što je specifično upravo za stanovnike endemičnih područja u Africi, Južnoj Americi i Aziji.

Liječenje tafenokinom sprečava relapse nakon potvrde malarije uzrokovane vrstom *P. vivax*.

Invazije vrstom *P. falciparum* gotovo uvijek uzrokuju **tešku i kompliciranu malariju** koja može završiti smrću (10 do 50% slučajeva) (26). Za liječenje teškog oblika malarije preporuča se intravenska primjena antimalarika. Parenteralno primijenjen artesunat bolja je opcija od kinina kako u djece tako i u odraslih (4).

U liječenju je ključno da se pune doze antimalarika daju pravodobno, na samom početku liječenja – najprije parenteralno najmanje 24 sata, a nakon toga trebale bi uslijediti tri doze učinkovitog oralnog ACT-a. Dostupne su dvije vrste lijekova za parenteralno liječenje teške malarije: derivati artemisinina (artesunat ili artemeter) i alkaloidi kininovca (kinin i kinidin). Parenteralno dan artesunat (intravenski ili intramuskularno) je liječenje izbora za sve teške oblike malarije, budući da je sigurniji za upotrebu i ne povećava neurološke posljedice kod preživjelih koji su liječeni njime (4, 26).

3.5. Analitičke metode za otkrivanje krivotvorenih antimalarika

3.5.1. Općenito o analitičkim metodama za otkrivanje krivotvorenih antimalarika

Na području otkrivanja krivotvorenih antimalarika na tržištu danas postoji veliki broj analitičkih metoda, od kojih svaka ima svoje prednosti i nedostatke, no samo malobrojne se nalaze u redovnoj primjeni. Za analizu krivotvorenih lijekova koriste se slijedeće skupine metoda:

- 1) **Vizualne metode** koje uključuju vizualni pregled dozirnih jedinica i pakiranja golim okom;
- 2) **Kolorimetrijske tehnike** kojima se analizira boja koja se razvila u uzorku nakon aplikacije reagensa. Prisutnost/nepresutnost boje daje informaciju o tome da li je određena djelatna tvar prisutna u uzorku, a na temelju procjene intenziteta obojenja golim okom ili posebnim uređajima može se semikvantitativno odrediti sadržaj u uzorku;
- 3) **Kromatografske tehnike** kojima se različiti sastojci u smjesi razdvajaju na temelju njihove različite raspodjele između stacionarne i mobilne faze. Najčešće korištene kromatografske tehnike su tekućinska (uključujući tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti), plinska i tankoslojna kromatografija. Kromatografskim tehnikama moguće

je identificirati i odrediti sadržaj djelatne tvari u lijeku. Za analizu krivotvorina uspoređuje se kromatogram testnog uzorka s kromatogramom autentičnog lijeka.

- 4) **Spektroskopske tehnike** kojima se analiziraju spektri nastali kao odraz energijskih ili strukturnih promjena u atomima i molekulama tvari nakon njihova međudjelovanja s elektromagnetskim zračenjem ili sa subatomskim i drugim česticama. Pritom se obično mjeri intenzitet emitiranog, apsorbiranog ili raspršenog zračenja ovisno o njegovoj valnoj duljini, odnosno frekvenciji. Najčešće korištene spektroskopske tehnike su vibracijske tehnike kao što su NIR, MIR, Ramanova spektroskopija i UV/Vis spektroskopija.

U cilju otkrivanja krivotvorina kod vibracijskih tehnika uspoređuje se spektar uzorka sa spektrom autentičnog lijeka.

Kod UV-Vis spektroskopije principi fluorescencije i luminiscencije koriste se za određivanje sadržaja djelatne tvari.

- 5) **Tehnike razdvajanja temeljene na strukturi djelatne tvari** kojima se razdvajaju molekule različite mase i različitih naboja pod utjecajem vanjskog električnog polja, nakon čega se molekule detektiraju detektorom. U te tehnike spadaju: NMR, kristalografske tehnike, masena spektrometrija, spektrometrija ionske pokretljivosti i kapilarna elektroforeza. Za otkrivanje krivotvorina rezultati dobiveni analizom testiranog uzorka uspoređuju se s rezultatima analize autentičnog proizvoda, ukoliko su analize provedene pod jednakim uvjetima (6,30).

3.5.2. Standardne analitičke metode

Standardne metode koje se koriste za otkrivanje pojedinih krivotvorenih antimalarika opisane su u važećim izdanjima Internacionalne farmakopeje (6), Američke farmakopeje USP/NF (7), Europske farmakopeje Ph. Eur. (8) i Britanske farmakopeje BP (9).

Općenite značajke tih metoda opisane su u općim poglavljima za pojedinu metodu i pojedini ljekoviti oblik i u posebnim monografijama za analizu pojedinačnog lijeka, gdje je to primjenjivo. Kako bi se potvrdilo da lijek nije krivotvoren ili nezadovoljavajuće kakvoće, moraju se ispitati svi parametri te

provesti sve analize navedene u pojedinačnim monografijama i općim poglavljima, a svi rezultati moraju zadovoljiti navedene kriterije prihvatljivosti.

U nastavku slijedi predstavljanje standardnih metoda za kontrolu kakvoće predloženih od strane Svjetske zdravstvene organizacije kroz **Internacionalnu farmakopeju** (6) za analizu gotovog lijeka artemeter i lumefantrin tablete, za koji se opisuje i inovativna metoda. Propisani postupci bazirani su na sadržaju djelatne tvari: 20 mg artemetera i 120 mg lumefantrina. Parametri, zahtjevi, korištene metode i reference u kojima su opisani postupci navedeni su u **Tablici 6**.

Tablica 6 - Parametri, zahtjevi i korištene metode za analizu artemeter i lumefantrin tableta (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 6*)

Parametar	Zahtjev	Korištena metoda	Referenca
Vizualni pregled	<p>Izgled tableta općenito odgovara specifikaciji proizvođača.</p> <p>Tablete moraju biti neoštećene, glatke i ujednačeno obojene.</p> <p>Ne smije biti tragova kristala, praška ili komadića tableta na dnu pakiranja.</p> <p>Površina mora biti bez pukotina, ulegnuća, strugotina, odlomljenih komadića. Tableta ne smije biti nabubrena, ne smije imati vidljive pjege ili tragove smanjene obojenosti, tablete se ne smiju lijepiti jedna uz drugu.</p>	Vizualni pregled sukladno specifikaciji proizvođača	Ph. Int. 6.2.1.7.
Ujednačenost mase <i>*u slučajevima gdje je sadržaj tvari manji od 5 mg, odnosno gdje je prisutno manje od 5% djelatne tvari, te u slučajevima specifičnih film obloga provodi se parametar ujednačenost sadržaja</i>	<p>Masa pojedinačne tablete ne smije se razlikovati od srednje mase za:</p> <p><u>Tablete srednje mase do 80 mg</u> ± 10 % najmanje 18 tableta ± 20.0% najviše 2 tablete</p> <p><u>Tablete srednje mase od 80 mg do 250 mg</u> ± 7.5 % najmanje 18 tableta ± 15.0% najviše 2 tablete</p> <p><u>Tablete srednje mase veće od 250 mg</u> ± 5.0 % najmanje 18 tableta ± 10.0% najviše 2 tablete</p>	<p>Provodi se vaganje 20 tableta i izračunava srednja masa 1 tablete. Zatim slijedi pojedinačno vaganje svake od 20 tableta.</p> <p>Ovisno o specificiranoj masi tablete od strane proizvođača, masa pojedinačne tablete ne smije prekoračiti granice navedene u zahtjevima.</p>	Ph. Int. 5.2.
Raspadljivost	Postignuto je raspadanje svih 6 dozirnih jedinica tijekom prvog testiranja ili ukoliko se 1 do 2 tablete nisu u potpunosti raspale, nakon ponavljanja testa u potpunosti se raspalo najmanje 16 od 18 dozirnih jedinica.	Koristi se aparatura za raspadljivost na principu košara. U svaku od 6 tuba unutar aparature stavljaju se dozirne jedinice. Kao medij koristi se voda, te se održava temperatura od 35-39 °C. Nakon određenog vremena (15 min za neobložene, a 30 min za obložene tablete) provjerava se jesu li se dozirne jedinice u potpunosti raspale.	Ph. Int. 5.3.
Označavanje	<p>Pakiranje lijeka mora sadržavati:</p> <ul style="list-style-type: none"> ime proizvoda i aktivnih sastojaka (INN ime) količinu aktivnih sastojaka 	Kontrola opremljenosti provodi se vizualno na osnovu podataka navedenih u dosjeu lijeka.	Ph. Int. 6.2.1.7.

	<ul style="list-style-type: none"> seriju i rok valjanosti, a gdje je primjenjivo i datum proizvodnje uvjete čuvanja upute za upotrebu i posebna upozorenja ime i adresu proizvođača, ili kontakt osobe koja je proizvod pustila na tržište. 		
Identifikacija djelatne tvari	Glavna mrlja na kromatogramu ispitne otopine odgovara izgledu, mjestu i veličini glavne mrlje na kromatogramu referentne otopine (za lumefantrin i artemeter).	Provođenje tankoslojne kromatografije (TLC) korištenjem R6 silikagela i mobilne faze sastava lagani petrolej, etil acetat, ledena octena kiselina (40:10:5 V/V/V). Nakon razvijanja kromatograma, detekcija se vrši uz pomoć UV lampe (254 nm) ili vizualno na danjem svjetlu nakon prskanja sa sulfatnom kiselinom/metanolom i zagrijavanjem na 140°C.	Monographs: Dosage forms: Specific monographs: Artemether and lumefantrine tablets (Artemetheri et lumefantrini compressi)
Artemeteru srodne tvari	Mrlje nakon razvijanja na kromatogramu zadovoljavaju slijedeće kriterije: - mrlja koja odgovara onečišćenju A (Rf vrijednost od 0.25) je manjeg intenziteta od glavne mrlje na kromatogramu dobivene s otopinom (7), što predstavlja koncentraciju od najviše 1.5% onečišćenja A - mrlja koja odgovara onečišćenju B- artemimolu (Rf vrijednost od 0.3) je manjeg intenziteta od glavne mrlje na kromatogramu dobivene s otopinom (6), što predstavlja koncentraciju od najviše 1.0 % onečišćenja B - mrlja koja odgovara onečišćenju C (Rf vrijednost od 0.35) je manjeg intenziteta od glavne mrlje na kromatogramu dobivene s otopinom (5), što predstavlja koncentraciju od najviše 0.5 % - mrlja koja odgovara onečišćenju D (Rf vrijednost od 0.4) je manjeg intenziteta od mrlje α -artemetera na kromatogramu dobivene s otopinom (4), što predstavlja koncentraciju od najviše 0.3 % - bilo koja druga mrlja nije intenzivnija od glavne mrlje na kromatogramu dobivene s otopinom (3), što predstavlja koncentraciju od najviše 0.2 %	Provođenje tankoslojne kromatografije (TLC) korištenjem R5 silikagela i mobilne faze sastava lagani petrolej, etil acetat, ledena octena kiselina (40:10:5 V/V/V). Slijedi priprema otopina za usporedbu sukladno uputama u monografiji, apliciranje otopina na ploču, uranjanje ploče u vanilin/sulfatnu kiselinu TS2 i zagrijavanje na 140 °C. Usporedba mrlja se provodi na dnevnom svjetlu.	Monographs: Dosage forms: Specific monographs: Artemether and lumefantrine tablets (Artemetheri et lumefantrini compressi)
Sadržaj	Izračunate vrijednosti sadržaja artemetera (vrijeme zadržavanja na 19 minuta) i lumefantrina (vrijeme zadržavanja na 34 minuta) moraju biti u granicama od 90.0% - 110.0% deklarirane količine.	Provodi se HPLC metoda na koloni od nehrđajućeg čelika napunjenoj česticama silikagela, koje su kemijski modificirane oktadecilsilil skupinama (5 μ m). Koristi se gradijentno eluiranje mobilnim fazama: A) reagens ionskog para (koji se dobiva otapanjem natrij heksansulfonata i natrij dihidrogenfosfata): acetonitril R= 700:300 V/V B) reagens ionskog para: acetonitril R= 300:700 V/V Za detekciju koristi se UV spektrofotometar na valnoj duljini od 210 nm za prvih 28 minuta, a zatim na 380 nm.	Monographs: Dosage forms: Specific monographs: Artemether and lumefantrine tablets (Artemetheri et lumefantrini compressi)

Iako za lijek dihidroartemisinin i piperakin fosfat tablete u Internacionalnoj farmakopeji za sada ne postoji specifična monografija, sukladno radnom planu SZO-a iz 2011. godine (31) pozvani su svi proizvođači koji proizvode taj lijek i sve ostale zainteresirane strane da dostave prijedloge specifikacija i analitičkih metoda/postupaka za analizu tog lijeka. Na temelju dostavljenih prijedloga, monografija tog lijeka u budućnosti će biti uključena u Internacionalnu farmakopeju.

3.5.3. Inovativne analitičke metode

Farmakopejske metode za identifikaciju i određivanje sadržaja djelatne tvari u antimalaricima najčešće su vrlo kompleksne, zahtijevaju mnogo vremena za provođenje analize, kao i dobro opremljene laboratorije, složenu opremu, educirano osoblje, skupe reagense i tehničke uvjete koje je potrebno zadovoljiti za provedbu istih. Osim farmakopejskih metoda za identifikaciju i određivanje sadržaja djelatne tvari razvijene su i druge kompleksnije metode kojima se pouzdano mogu identificirati krivotvoreni lijekovi, kao što su rendgenska kristalografija i NMR tehnike (32) te mikrotomografske tehnike (33). Tehnikama protočne citometrije mogu se posredno otkriti krivotvoreni antimalarici na temelju dokazivanja rezistentnosti uzročnika malarije na te lijekove (34, 35).

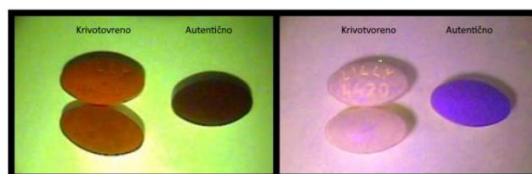
Međutim, u područjima u kojima je malarija endemična, često ne postoji mogućnost provođenja takvih metoda, te stoga regulatorna tijela koja su odgovorna za nadzor nad kvalitetom lijekova u tim područjima, carinski službenici, uvoznici i drugi dionici često pribjegavaju korištenju nevalidiranih *in-house* metoda ili slanju uzorka u udaljene laboratorije, što odgađa potvrdu nezadovoljavajuće kakvoće proizvoda, uzrokujući dodatnu štetu. Upravo iz tog razloga ulažu se veliki naponi u razvijanje jednostavnih, brzih i jeftinih metoda koje se mogu primjenjivati na licu mjesta, ili u laboratorijima, ali uz minimalnu obradu uzoraka. Kao zlatni standard za ocjenjivanje performansi i značajki inovativnih metoda služe farmakopejske metode.

Neke od dosad literaturno opisanih jednostavnih inovativnih tehnika za otkrivanje krivotvorenih antimalarika na terenu jesu:

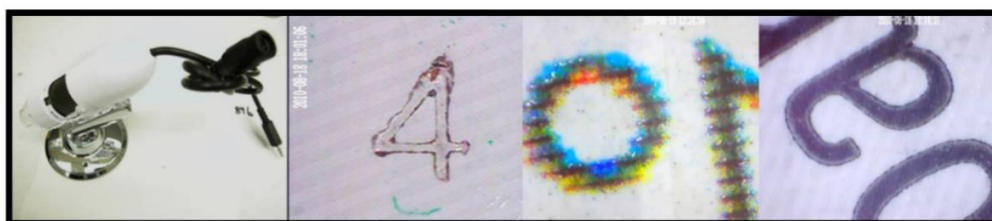
1) **Metode bazirane na snimanju kamerama s LED izvorima** – primjer je ručni uređaj *CD3+* (*Counterfeit Detection Device*) koji je razvijen od strane Agencije za hranu i lijekove SAD-a (FDA). Uređaj se koristi u lukama, carinskim ispostavama i od strane regulatornih tijela za preliminarnu provjeru velike količine pakiranja i dozirnih oblika bez prethodne obrade. Uređaj koristi LED tehnologiju za generiranje širokog raspona frekvencija od UV-Vis do IR valnih duljina svjetla i kamere koje bilježe fluorescenciju i apsorpciju svjetla suspektog lijeka. Uređaj pritom vrši direktnu usporedbu slika suspektog lijeka snimljenih kamerom s pohranjenim slikama autentičnog lijeka. Za pregledavanje pakirnog materijala koristi se digitalni ručni optički mikroskop, na način da se pakirni materijal pod mikroskopom uspoređuje s mikroskopskim slikama odobrenih *artworka* pakirnog materijala. *CD3+* uređaj trenutno se koristi u velikom broju poštanskih ureda i carinskim ispostavama od strane FDA stručnjaka i stručnjaka ostalih regulatornih agencija. Njegova je prednost što se njime istovremeno može pregledavati autentičnost pakiranja i same dozirne jedinice. Jednostavan je za upotrebu i rukovanje, za što nije potrebna značajnija edukacija. Nedostatak je što rezultati nisu jednoznačni, već njihova interpretacija ovisi o ispitivaču (30, 36, 37). **Slika 11** prikazuje uređaj *CD3+*, usporedne fotografije krivotvorenog i autentičnog lijeka dobivene uređajem *CD3+*, kao i primjer korištenja digitalnog mikroskopa ugrađenog u *CD3+* uređaj za pregled pakirnog materijala suspektog lijeka.



A



B



C

Slika 11 - CD3+ uređaj i primjeri rezultata analize potencijalnih krivotvorina

A= Izgled CD3+ uređaja, B= usporedne fotografije krivotvorenog i autentičnog lijeka dobivenog uređajem CD3+, C= primjer korištenja digitalnog mikroskopa u sklopu CD3+ uređaja za pregled pakirnog materijala suspektnog lijeka. (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 36*).

- 2) **Metode bazirane na tankoslojnoj kromatografiji** – primjer je *Global Pharma Health Fund (GPHF) Minilab* - prijenosni laboratorij u kovčegu opremljen staklenim laboratorijskim priborom za ekstrakciju, pripremu uzoraka, pipetiranje i nanošenje uzoraka, kromatografskim pločama, komorama za razvijanje kromatograma, električnom prijenosnom vagom, UV lampama s različitim valnim duljinama, grijačima, mikrometrima za mjerenje debljine, uputstvima za upotrebu s vrlo jednostavno opisanim uputama te zbirkom referentnih uzoraka i jednostavnih kemikalija, koji služi za provođenje analize bilo gdje u svijetu. Osim na tankoslojnoj kromatografiji, analize se temelje i na kolorimetriji i ispitivanju raspadljivosti.

Analize se vrše u 4 koraka:

- vizualni pregled dozirnih jedinica i pakirnog materijala za rano otkrivanje krivotvorina,
- brzi pregled ukupne mase i mase dozirnog oblika kao rani indikator u detekciji krivotvorina,
- jednostavni test raspadljivosti ako se radi o dozirnim oblicima s produljenim otpuštanjem ili dozirnim oblicima sa specifičnim oblaganjem,
- tankoslojna kromatografija za identifikaciju i semikvantitativno određivanje sadržaja tvari na temelju usporedbe retencijskih faktora (vremena zadržavanja), veličine i intenziteta mrlja autentičnog lijeka i krivotvorenog lijeka.

Metoda je u širokoj upotrebi diljem svijeta i može se koristiti za širok raspon djelatnih tvari, vrlo je specifična s obzirom na razlikovanje autentičnih od krivotvorenih proizvoda. Međutim, rezultati u nekoj mjeri mogu ovisiti o osobi koja provodi analizu. Za provođenje analize potrebna je jednostavna edukacija i posjedovanje određenih laboratorijskih vještina (30, 37, 38). Na **Slici 12** prikazan je izgled *GPHF Minilaba*.



Slika 12 - Izgled GPHF Minilaba (preuzeto iz literaturnog navoda 36)

3) **Metode bazirane na Ramanovoj spektroskopiji** - npr. *TruScan™ Portable Raman spectrometer* (Termo Fischer Scientific), *CBEx*, uređaji proizvođača *Rigaku Raman Technologies*, *Ahura Scientific, Inc.* i *B&W Tek, Inc.* koji se koriste za usporedbu Ramanovog spektra uzorka i Ramanovog spektra autentičnog lijeka. Analize *Truscan* uređajima mogu se vršiti kroz pakiranje, imaju značajku robusnosti, a korisnik koji provodi testiranje nema utjecaja na rezultat analize. Analize provedene takvim uređajima vrlo su osjetljive i specifične s obzirom na identifikaciju djelatne tvari, no njima je moguće sadržaj odrediti semikvantitativno pa tako nisu uvijek prikladne za otkrivanje krivotvorenih lijekova s manjim sadržajem djelatne tvari.

Duljina edukacije za korištenje uređaja temeljenih na Ramanovoj spektroskopiji varira od uređaja do uređaja, no najčešće ne traje dulje od 2 tjedna.

Kod nekih uređaja baziranih na Ramanovoj tehnologiji, npr. *CBEx*, postoji problem da neke djelatne tvari ne doprinose ukupnom spektru (npr. artemeter u dozirnom obliku koji sadrži artemeter i lumefantrin), često zbog preklapanja vrpci s drugim djelatnim tvarima ili pomoćnim tvarima. Takvi problemi mogu se prevladati računskim analizama podataka, odnosno primjenom matematičkih modela obrade podataka, kao što je detaljno opisano u poglavlju 3.5.4.

Također, postoji i SORS Ramanova spektroskopija (*Spatially offset Raman spectroscopy*), koja se temelji na supresiji signala obojenog površinskog filma tablete i kapsule, čime se omogućava identifikacija djelatne tvari unutar farmaceutskog oblika. Valne duljine koje se koriste za ekscitaciju u SORS Ramanovoj spektroskopiji bliske su NIR području valnih duljina (824 nm).

Nedavno je opisana i uporaba „*line scanning*“ Raman spektroskopije koja se koristi u svrhu kvantifikacije djelatnih tvari na valnim duljinama ekscitacije od 785 nm. Spektar se kreira na način da se dodaje linija po linija (10, 30, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45).

Slika 13 prikazuje provjeru suspektnog lijeka *TruScan* uređajem.



Slika 13 - Provjera suspektnog lijeka *TruScan* uređajem (*preuzeto iz literaturnog navoda 40*)

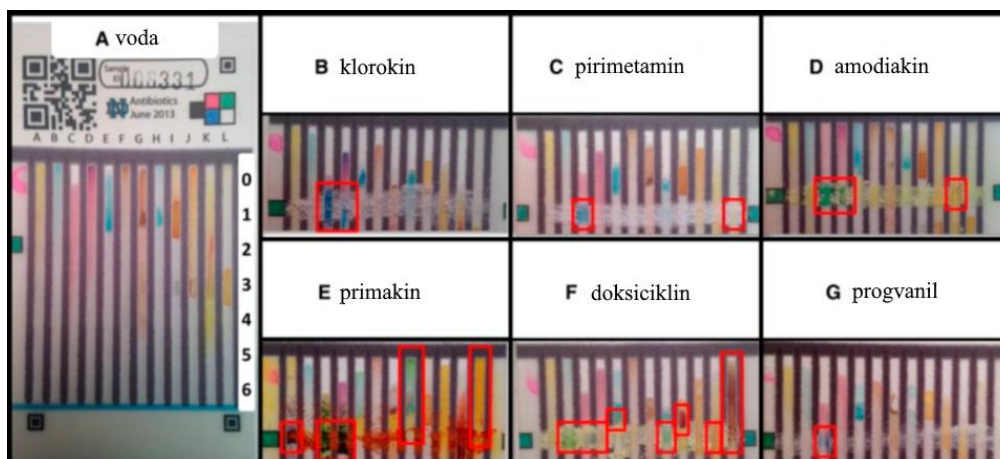
- 4) **Metode bazirane na NIR, MIR tehnicima ili kombinaciji MIR/NIR tehnika** - npr. *SCiO* uređaji bazirani na NIR tehnicima koji mogu s velikom točnošću odrediti je li neki antimalarik krivotvoren ili nije na osnovu usporedbe spektra uzorka sa spektralnom knjižnicom (npr. za artemeter i lumefantrin). Za neke antimalarike kao što je amodiakin, uređaj nije u mogućnosti odrediti sadržaj djelatne tvari, a time ni odrediti je li neki lijek krivotvoren ili nije, ukoliko se radi o razlici u sadržaju. Trenutno se istražuje mogućnost korištenja šireg raspona valnih

duljina u NIR identifikaciji, što može potencijalno poboljšati mogućnost kvantifikacije tvari (30, 46).

5) **Metode bazirane na ELISA imunotestovima korištenjem monoklonskih protutijela** – npr. *jednostavni jednokratni testni štapići* (eng. *lateral flow dipstick immunoassay*) - već su razvijeni u smislu kvalitativne i kvantitativne analize raznih antimalarika baziranih na artemisininu i pokazuju obećavajuće rezultate, no još uvijek nisu prisutni na tržištu. Za navedene metode provedeno je testiranje na terenu, no rezultati nisu uspoređeni s referentnim tehnikama. Testnim štapićima vrlo se jednostavno rukuje. Jedna od takvih metoda detaljno je opisana u poglavlju 3.5.5. (11, 47, 48, 49).

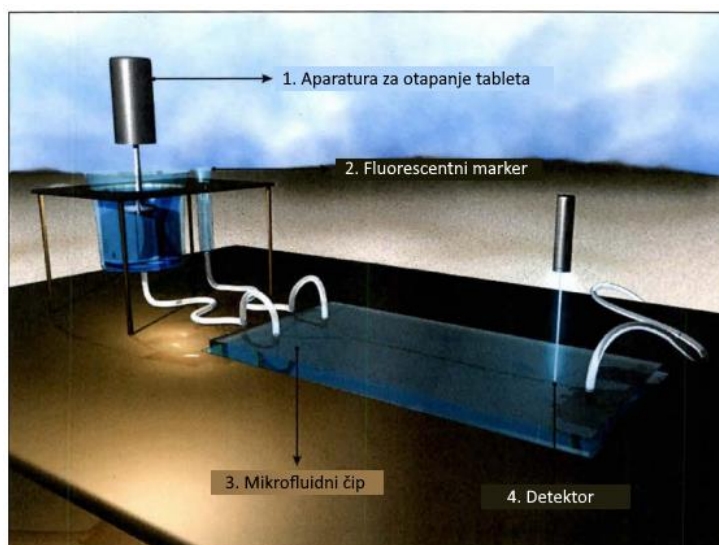
6) **Metode bazirane na kolorimetriji** - npr. *papirne kartonske kartice za jednokratnu upotrebu* koje su dizajnirane na način da različite trakice na kartici sadrže različite reagense za različite kolorimetrijske reakcije te se na taj način u slučaju stavljanja uzorka dozirnog oblika na karticu i otapanja u vodi za djelatne tvari u lijeku dobiva „bar kod boje“ koji se uspoređuje s referentnom knjižnicom „standardnih bar kodova boja“. Na papirnim karticama se donekle mogu razlikovati i vrlo niske koncentracije djelatnih tvari od deklariranih koncentracija (mogu se odrediti semikvantitativno). Prednosti takvih kartica su da su jednostavne za upotrebu, jeftine, ne zahtijevaju predobradu uzoraka, a analiza se brzo provodi. Nedostaci su slijedeći: neke tvari ne daju kolorimetrijske reakcije, pomoćne tvari često utječu na boju razvijenu reakcijom, potrebna je usporedba boja s autentičnim proizvodom ili referentnim knjižnicama te nije moguće provesti potpunu kvantifikaciju tvari. Zbog svega navedenog, takve kartice imaju potencijal u provođenju preliminarnih analiza, no njihovi se rezultati trebaju potvrditi drugim pouzdanijim metodama. Papirne kartice za sada još nisu prisutne na tržištu. (30, 50)

Na **Slici 14** prikazani su rezultati analize papirnom kartonskom karticom za neke antimalarike.



Slika 14 - Rezultati analize papirnom kartonskom karticom za neke antimalarike (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 50*)

- 7) **Metode bazirane na refleksiji** - npr. ručni uređaj *Gloss meter/ mjerac sjaja* koji se temelji na usporedbi magnituda spekularnog sjaja površine krivotvorenih i autentičnih lijekova. Spekularni sjaj ovisi o grubosti i refraktivnom indeksu površine. Ovakve analize (na primjeru artemetera i lumefantrina) dale su rezultate koji su usporedivi s rezultatima kompleksnijih uređaja temeljenih na tehnologijama koje istražuju površine te bi se mogle koristiti za preliminarnu provjeru krivotvorenih proizvoda na terenu. Ova tehnologija još uvijek nije prisutna na tržištu (30, 51).
- 8) **Metode bazirane na principu mikrofluida s luminiscentnom detekcijom** - npr. uređaj *PharmaChK* - minijaturni čip manji od kreditne kartice na kojemu se provode kompleksne analize u vrlo malom volumenu tekućine. *PharmaChK* sastoji se od 4 dijela koji omogućavaju kvantifikaciju djelatne tvari (npr. derivata artemisinina). Prvi dio služi za otapanje lijeka uz pomoć mikromiješalice. Drugi dio sadrži fluorescentni marker ili otopinu molekule „reportera“. Treći dio sadrži mikrofluidni čip u čije se mikrofluidne kanale upumpavaju otopina tablete i fluorescentni marker. Četvrti dio je detektor. Tehnologija je vrlo jednostavna, jeftina, prenosiva i daje brze rezultate, ali za sada još uvijek nije prisutna na tržištu (30, 52). Na **Slici 15** prikazan je princip rada *PharmaChK* mikročipa.



Slika 15 - Princip rada *PharmaChK* mikročipa (prilagođeno prema literaturnom navodu 52)

9) **Metode bazirane na masenoj spektrometriji** - npr. prenosivi uređaj *QDa single quadrupole* koji za detekciju koristi kvadrupolni analizator mase, nakon čega se sirovi podaci ubacuju u softver za procesuiranje podataka. Metoda se temelji na usporedbi podataka uzorka i autentičnog lijeka (iz baze podataka ili provođenjem usporedne analize). Uređaj se pokazao uspješnim za analizu djelatnih tvari sadržanih u ACT kombiniranoj terapiji (kombiniranoj terapiji koja uključuje artemisinin). Prednosti u odnosu na stolne masene spektrometre su u jednostavnosti pripreme uzorka i brzini provođenja analize. Nedostaci su da uređaj ne može točno identificirati nove spojeve i mora koristiti izvor električne energije. Prije uvođenja u redovnu upotrebu tehnologiju je potrebno dodatno poboljšati na način da se omogući odgovarajuće sučelje za obradu podataka, kojim bi se omogućilo provođenje analize i bez značajnijeg iskustva u procesuiranju podataka (30, 53).

10) **Metode bazirane na laserskoj apsorpciji i fluorescenciji** - npr. ručni uređaj *Counterfeiting Drug Indicator CoDI* koji se temelji na mjerenju laserske svjetlosti koja prolazi ili se raspršuje kroz tabletu, nakon izlaganja tablete laserskoj svjetlosti valne duljine 405 nm. Ovisno o sastavu tablete, korištenje lasera može rezultirati promjenom boje propuštenog i raspršenog svjetla. Promjene u emitiranoj valnoj duljini (fluorescenciji) karakteristike su pojedinog

brenda lijeka, te se na taj način mogu razlikovati krivotvorene tablete od onih autentičnih. Digitalne fotografije emitiranih boja suspektnog lijeka i autentičnog lijeka analiziraju se uz pomoć različitih softvera ili uz pomoć smartphone aplikacija i međusobno uspoređuju, što omogućuje brzu i jednostavnu analizu. Uređaj se pokazao uspješnim za otkrivanje krivotvorina koje sadrže artemeter i lumefantrin, no još uvijek nije prisutan na tržištu (30, 54).

Na **Slici 16** prikazane su digitalne fotografije različitih brendova antimalarika dobivene korištenjem CoDI uređaja.



Slika 16 - Digitalne fotografije brendova antimalarika dobivene korištenjem CoDI uređaja
(preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 54)

11) **Metode bazirane na refraktometriji** - npr. ručni uređaj *AR200 digital refractometer (Leica Microsystems)* koji za analizu koristi principe refraktometrije. Tim uređajem može se kvantitativno odrediti sadržaj djelatne tvari u otopini uspoređujući izmjerenu koncentraciju s koncentracijskom krivuljom otopina standarda. Na taj način određuje se je li koncentracija djelatne tvari unutar dozvoljenog raspona od 80-120% deklarirane koncentracije, ili unutar specifikacijom određenog raspona. Uređaj se pokazao uspješnim za provođenje analize na 5 različitih antimalarika (tableta i injekcija), uključujući i derivate artemisinina. Uređaj je dostupan na tržištu (30, 55).

12) **Metode bazirane na kapilarnoj elektroforezi** - npr. uređaj *ECB2* koji kombinira zonsku kapilarnu elektroforezu s UV detektorom koji koristi LED tehnologiju. Za kinin analiza je provedena u kiselom mediju, te su rezultati uspoređeni sa standardnim metodama. Tehnika pokazuje potencijal za korištenje u analizi krivotvorina u endemskim područjima, jer je jednostavna, jeftina i robusna, te daje pouzdane rezultate (56).

13) **Pojednostavljene HPLC tehnike** - npr. HPLC tehnike koje koriste samo C18 kolone, metanol i jednostavne fosfatne pufere. Te metode vrlo su robusne i u slučaju izmjene brojnih parametara, što je uobičajeno u endemskom okruženju. Tim se metodama preliminarno može dokazati krivotvorenje, može se otkriti postojanje onečišćenja u lijeku te odrediti sadržaj djelatne tvari. Metode su testirane na više antimalarika, među ostalim i na artemeteru i lumefantrinu, te pokazuju potencijal za provođenje preliminarnih analiza u endemskim područjima (57).

U daljnjem tekstu detaljno su obrađene dvije inovativne analitičke metode: Ramanova hiperspektralna multikomponentna analiza za otkrivanje krivotvorenih tableta antimalarika Riameta® i imunoenzimatski testovi temeljeni na monoklonskim protutijelima za provjeru sadržaja dihidroartemisinina u antimalaricima.

3.5.4. Ramanova hiperspektralna multikomponentna analiza za otkrivanje krivotvorenih tableta antimalarika Riameta®

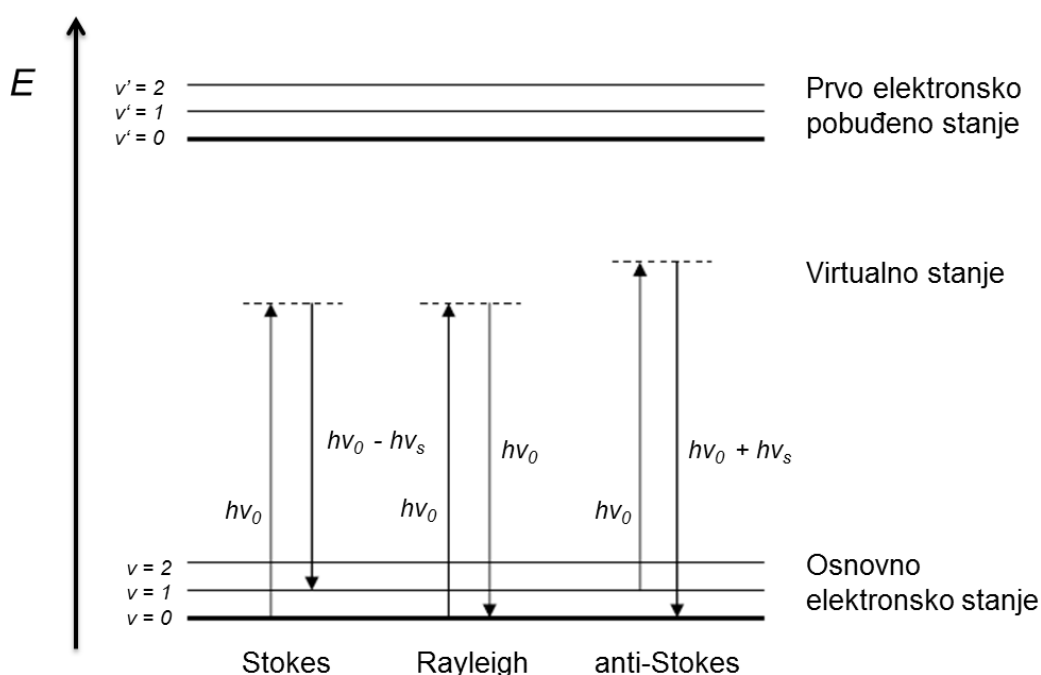
3.5.4.1. Osnovno o tehnici Ramanove spektroskopije

Ramanova spektroskopija je vibracijska spektroskopska tehnika koja se temelji na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja uslijed interakcije s tvarima u uzorku. Naime, interakcije elektromagnetskog vala s molekulom mogu uzrokovati distorziju elektronskog oblaka oko jezgre, pri čemu elektroni prelaze u više energijsko stanje koje je nestabilno i vrlo brzo se otpušta u obliku raspršenog zračenja. Raspršeno zračenje dijeli se u: **Rayleighovo** (elastično) i **Ramanovo** (neelastično) raspršenje. Rayleighovo raspršenje je najčešće. Ono predstavlja raspršenje pri kojem ne dolazi do

promjene energije, tj. valne duljine pobudnog i raspršenog zračenja se ne razlikuju. Ramanovo raspršenje se dešava vrlo rijetko, obično na samo jednom od 10^6 - 10^8 upadnih fotona. Ovisno o tome događa li se interakcija zračenja i molekule u trenutku kad se ona nalazi u osnovnom ili pobuđenom vibracijskom stanju, razlikujemo dvije vrste Ramanovog raspršenja:

- **Stokesovo raspršenje** - događa se ukoliko su molekule u trenutku interakcije s elektromagnetskim zračenjem bile u osnovnom vibracijskom stanju, a nakon interakcije su se vratile u pobuđeno vibracijsko stanje. Emitirani foton tada je manje frekvencije od pobudnog.
- **Anti-Stokesovo raspršenje** - događa se ukoliko su molekule u trenutku interakcije s elektromagnetskim zračenjem bile u pobuđenom vibracijskom stanju, a nakon interakcije su se vratile u osnovno vibracijsko stanje. Emitirani foton tada je veće frekvencije od pobudnog.

S obzirom da se većina molekula pri sobnoj temperaturi nalazi u osnovnom vibracijskom stanju, Stokesovo zračenje je češće od anti-Stokesovog te se stoga Stokesov spektar najčešće obrađuje. Anti-Stokesov spektar obrađuje se u slučajevima kad je Stokesovo raspršenje zasjenjeno fluorescencijom, kao načinom deaktivacije molekula iz pobuđenog u osnovno stanje. **Slika 17** prikazuje mehanizme različitih procesa raspršenja svjetla.



Slika 17 - Mehanizmi različitih procesa raspršenja svjetla (preuzeto iz literaturnog navoda 60)

Molekulske vibracije koje se bilježe u Ramanovom spektru jesu one pri kojima se mijenja polarizabilnost molekule. Najveće raspršenje zračenja uzrokuju simetrične vibracije funkcionalnih skupina bogatih elektronima, a vrpce koje im odgovaraju najintenzivnije su u spektru.

S obzirom da se temelji na intrinzičnim molekulskim vibracijama, spektar Ramanovog zračenja karakterističan je za pojedinu molekulu. Tehniku je moguće provesti direktno kroz pakiranje, neinvazivna je i nije potrebna priprema uzoraka. Također, moguće je provođenje analize putem ručnih uređaja na licu mjesta. Stoga je Ramanova spektroskopija već višestruko primjenjivana u analizi krivotvorina kao što je opisano u poglavlju 3.5.3. Glavni nedostaci metode su da je ona kompleksna za razvoj i prilagodbu, često je niske osjetljivosti (zbog male pojavnosti Ramanovog zračenja unutar ukupnog raspršenog zračenja i fluorescencije koja često zasjenjuje Stokesovo raspršenje) (10, 58, 59, 60, 61).

3.5.4.2. Osnovne značajke Ramanove hiperspektralne multikomponentne analize za otkrivanje krivotvorenih tableta antimalarika Riameta®

Analitička metoda razvijena je od strane autora u cilju otkrivanja jednostavne i jeftine tehnike kojom se može odrediti sadržaj i raspodjela djelatnih tvari u antimalaricima na tržištu i time odrediti jesu li autentični ili krivotvoreni (10). Za snimanje spektra i prijenos zračenja korištena su optička vlakna. Lasersko zračenje koje se koristilo za ekscitaciju je u vidljivom području (532 nm), jer je u usporedbi s ekscitacijskim valnim duljinama u NIR području intenzitet raspršenog zračenja intenzivniji, sukladno jednadžbi:

$$I_{\text{STOKES}} \propto N \cdot I_0 \cdot (\nu_0 - \nu_r)^4 \cdot |\alpha|^2$$

gdje je N broj raspršivača, I_0 intenzitet lasera, ν_0 frekvencija ekscitacije lasera, ν_r frekvencija vibracijskog stanja molekule, α polarizabilnost molekule.

Za kvantifikaciju djelatnih tvari lumefantrina i artemetera i asigniranje spektralnih vrpci koristila se metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) i teorija funkcionala gustoće (10).

3.5.4.3. Razvoj metode Ramanove hiperspektralne multikomponentne analize za otkrivanje krivotvorenih tableta antimalarika Riameta®

Metoda nije zahtijevala prethodnu obradu uzoraka, već su se rezultati dobili direktno snimanjem različitih dijelova tablete. Koristeći 8X8 snop optičkih vlakana, mogla su se snimiti 64 spektra u isto vrijeme, što je omogućilo da se u kratkom vremenskom razdoblju obuhvate razna područja tablete.

Međutim, bilo je potrebno provesti inicijalne pripreme: snimanje Ramanovih spektara čistih djelatnih tvari u lijeku (lumefantrina i artemetera), kao i pomoćne tvari hipromeloze (10). Dobiveni spektri prikazani su na **Slici 18**.



Slika 18 - Ramanovi spektri djelatnih tvari lumefantrina (**A**) i artemetera (**B**) i pomoćne tvari hipromeloze (**C**) na ekscitacijskoj valnoj duljini od $\lambda = 532$ nm (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 10*)

Asignacija vrpci u spektru bazirana je na DFT kalkulaciji (teoriji funkcionala gustoće). Provedena je usporedba računski dobivenih Ramanovih spektara s eksperimentalno dobivenim FT-Ramanovim spektrima, čime je potvrđena vrlo visoka korelacija između njih. Navedeni eksperimentalni podaci prikazani su u **Tablici 7**.

Tablica 7. Asignacija vrpce u Raman spektru lumefantrina i artemetera (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 10*)

Lumefantrin					Artemeter				
Identifikacija	Pozicija pika / cm^{-1}			Asignacija Vrpce	Identifikacija	Pozicija pika / cm^{-1}			Asignacija Vrpce
	Izmjereno 532 nm	Izmjereno FT-Raman	Izračunato			Izmjereno 532 nm	Izmjereno FT-Raman	Izračunato	
L1	865	876	875	$\delta\text{CH} + \omega\text{CH}$	A1	1442	1454	1455	$\delta_s\text{CH}_3$
L2	1180	1172	1170	δCH	A2	2872	2873	2874	$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2 (+ \nu\text{CH})$
L3	1580	1589	1587	$\nu\text{b} + \delta\text{CH}$	A3	2940	2937	2937	$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$
L4	1623	1635	1640	$\nu\text{C}=\text{C} + \delta\text{CH}$					

ν_s : simetrična vibracija istezanja; ν_{as} : asimetrična vibracija istezanja; δ : ravninska strižna vibracija svijanja; δ_{as} : neravninska uvojna vibracija svijanja; δ_s : simetrična rastezna vibracija; ω : vibracija svijanja; ν_b : vibracija istezanja benzenskog prstena

Pojedine vrpce u spektru artemetera poklapale su se s vrpcama u spektru hipromeloze, što je predstavljalo izazov u kvantifikaciji artemetera. Stoga su se za dokazivanje i određivanje sadržaja djelatnih tvari u lijeku koristili principi multivarijantne analize podataka, odnosno metode parcijalnih najmanjih kvadrata (PLSR).

Razvoj računske metode parcijalnih najmanjih kvadrata započeo je prethodnim procesuiranjem spektara, na način da se smanji utjecaj šuma u odnosu na signal. Navedeno je uključivalo korekcije intenziteta optičkih vlakana te korekciju varijacija u intenzitetima Ramanovog zračenja koje nastaju zbog različitih tehničkih uzroka kao što su duljina optičkih vodova, varijacije u gustoći uzoraka, varijacije u veličini čestica i drugih uzroka. Nakon provedenih korekcija uslijedilo je Savitzky- Golay filtriranje.

PLSR računska metoda kombinira faktorijalnu analizu i regresijske metode. Za razvoj te računske metode izrađeni su kalibracijski model i validacijski model, koji su primijenjeni na odgovarajućim setovima podataka, uključujući i dobivene hiperspektralne snimke modelnih tableta. S obzirom da je sadržaj stvarnih tableta najčešće heterogen te činjenicu da prostorne varijacije koncentracija unutar tableta ne odgovaraju referentnim vrijednostima za razvoj modela, pojedinačne hiperspektralne snimke reducirane su sumiranjem na prosječni spektar. Također, primijenjeni su i različiti algoritmi da se uklone tzv. „ekstremni uzorci“. Nakon primjene svega navedenog, dobiveni su kalibracijski i validacijski PLSR modeli koji su pokazivali dobru korelaciju između referentnih i modelom izračunatih/ predviđenih podataka (10). Zatim je računski model primijenjen na 30 hiperspektralnih

snimki tableta modela i tableta Riameta®. Računski dobivene koncentracije i odgovarajući rasponi pogreške prikazani su u **Tablici 8**.

Tablica 8 - Računski dobivene koncentracije (PLSR metodom) lumefantrina i artemetera u modelnim tabletama i autentičnim tabletama: Lu100Ar100 (100% nominalne koncentracije lumefantrina i 100% nominalne koncentracije artemetera, što odgovara 60% lumefantrina i 10% artemetera u tableti), Lu50Ar100 (50% nominalne koncentracije lumefantrina i 100% nominalne koncentracija artemetera, što odgovara 30% lumefantrina i 10% artemetera u tableti), Lu100Ar0 (100% nominalne koncentracije lumefantrina i 0% nominalne koncentracije artemetera), Lu0Ar100 (0% nominalne koncentracije lumefantrina i 100% nominalne koncentracije artemetera) (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 10*)



U slučaju lumefantrina vidljive su određene razlike u odnosu na očekivane vrijednosti (npr. kod Lu50Ar100 i Riameta®), dok su u slučaju artemetera izračunate i očekivane koncentracije usporedive. Sukladno zahtjevima Američke farmakopeje USP/NF (7), za testove ujednačenosti sadržaja potrebno je ispitati barem 30 uzoraka, te je dozvoljeno najviše 25% odstupanja od referentne vrijednosti (izračunate vrijednosti) za jednu dozirnu jedinicu. Prikazana odstupanja ulaze u taj raspon. Dobivene razlike mogu se pripisati nehomogenim efektima raspršenja površine u kombinaciji s ograničenjima u mogućnosti izračunavanja signal/šum omjera i nesigurnosti regresijskog modela. Očekivane vrijednosti definirane su na osnovu nominalnih količina sastojaka, a poznato je i da lumefantrin jače raspršuje Ramanovo zračenje od artemetera, što također može dovesti do navedenih razlika (10).

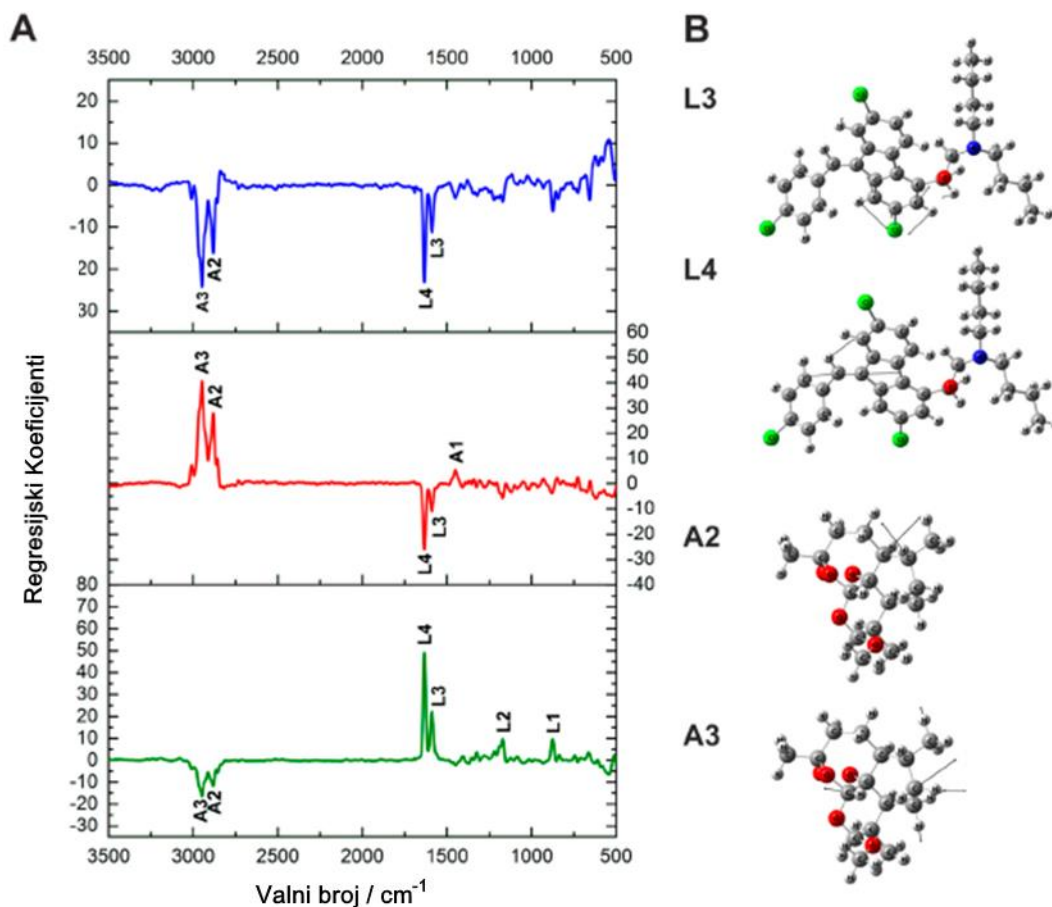
Kako bi se postigla veća točnost računski dobivenih koncentracija, razmišljalo se o izradi modelnih tableta s više različitih vrsta pomoćnih tvari, s obzirom da je u prvim modelima korištena samo hipromeloza. Ostali sastojci prisutni u stvarnoj tableti nisu korišteni zbog toga što njihove stvarne količine nisu poznate. Međutim, usporedba Ramanovog spektra modelne tablete Lu100Ar100, koja sadrži cjelokupni sadržaj djelatnih tvari kao i u stvarnim tabletama, sa spektrom stvarne Riamet®

tablete pokazuje visok stupanj sličnosti (visok stupanj korelacije na reprezentativnim vrpčama), te stoga daljnje prilagodbe modela nisu bile potrebne. Navedeno je prikazano na **Slici 19**.



Slika 19 - Usporedba Ramanovog spektra tableta Riameta® (A) i modelnih tableta Lu100Ar100 sa 100% nominalnim sadržajem djelatnih tvari (B) (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 10*)

U predikcijskim računskim modelima, određene su vrpce/pikovi koje imaju najveći utjecaj na cjelokupni Ramanov signal molekule. I za artemeter i za lumefantrin pojedinačne reprezentativne vrpce koreliraju s visokim regresijskim koeficijentima s vlastitim predikcijskim faktorima u računalnom modelu, što potvrđuje prikladnost modela za razlikovanje djelatnih tvari lumefantrina i artemetera nakon obrade dobivenih spektralnih informacija. Navedeno je prikazano na **Slici 20**.



Slika 20. Regresijski koeficijenti za predviđanje djelatnih i pomoćnih tvari i asignacija vrpce

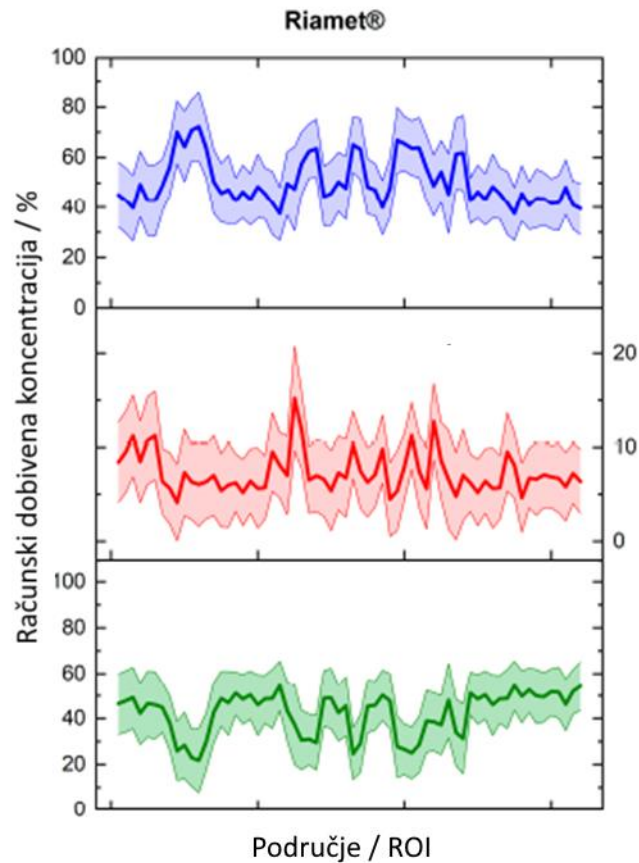
A - regresijski koeficijenti za predviđanje *lumefantrina* (zeleno, donji dio), *artemetera* (crveno, srednji dio) i *hipromeloze* (plavo, gornji dio)

B - vibracijska asignacija pikova koji najviše doprinose PLSR modelu (L3, L4, A2 i A3). L3 je kombinacija istežanja benzenskog prstena i CH ravninske strižne vibracije svijanja *lumefantrina*. L4 je C=C vibracija istežanja kombinirana s CH ravninskom strižnom vibracijom svijanja *lumefantrina*. A2 je asimetrična vibracija istežanja CH₂ veze, kombinirana s manjim doprinosom CH istežanja *artemetera*. A3 predstavlja asimetrično CH₂ istežanje *artemetera* (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 10*).

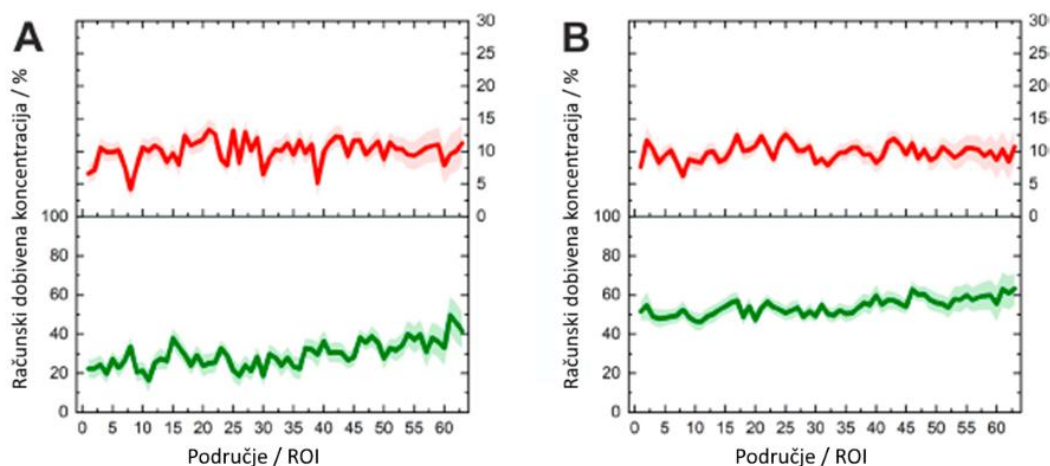
Na temelju navedenog prikaza vidljivo je da unatoč činjenici da hipromeloza i artemeter imaju vrpce u istim spektralnim regijama (između 2800 i 3000 cm⁻¹), te se neke vrpce preklapaju, razvijeni model dopušta kvantifikaciju artemetera u prisutnosti hipromeloze. Navedeno je potkrijepljeno visoko negativnim koeficijentima predikcije dobivenim u slučaju hipromeloze na pozicijama A2 i A3 (10).

Snimanjem različitih regija tablete Riamet®, uočene su razlike u distribuciji sadržaja odnosno koncentracije djelatnih tvari u različitim područjima tablete. Za lumefantrin su koncentracije lokalno

varirale od 21,8 do 54,5% m/m, a za artemeter od 4,1 do 15,2% m/m. Na temelju navedenog zaključeno je da su tablete Riameta® uglavnom nehomogene, dok su djelatne tvari u modelnim tabletama distribuirane homogenije te je njihov sadržaj ujednačeniji. Navedena raspodjela prikazana je na **Slici 21** i **Slici 22**.



Slika 21 - Računski dobivene koncentracije za 64 slučajno odabrane točke unutar 30 različitih područja tablete (dobivene na osnovu 30 hiperspektralnih snimki) za 3 sastojka Riameta®: lumefantrin (zelene linije, niži graf), artemeter (crvene linije, srednji graf) i hipromeloza (plave linije, najviši graf), te prikaz raspona greški u predikciji. Područje (ROI) označava snimku dobivenu jednim vlaknom unutar snopa vlakana (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 10*)



Slika 22- Računski dobivene koncentracije lumefantrina (zeleno, donja linija) i artemetera (crveno, gornja linija) na slučajno odabranim točkama unutar modelnih tableta. Regija (ROI) označava snimku dobivenu jednim vlaknom unutar snopa vlakana.

- A. **Lu50Ar100-** model koji sadrži 50%-tnu nominalnu koncentraciju lumefantrina i 100%-tnu nominalnu koncentraciju artemetera, što odgovara 30% lumefantrina i 10% artemetera u tableti
- B. **Lu100Ar100-** model koji sadrži 100%-tnu nominalnu koncentraciju lumefantrina i artemetera, što odgovara 60% lumefantrina i 10% artemetera u tableti (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 10*)

Iz navedenih prikaza vidljivo je da je moguće lako razlikovati modelne tablete koje sadrže 50% nominalne koncentracije lumefantrina i 100% nominalne koncentracije artemetera u odnosu na modelne tablete koje sadrže potpuni nominalni sadržaj djelatnih tvari te se stoga metoda može smatrati prikladnom za detekciju krivotvorenih antimalarika. Analiza se može provesti vrlo brzo (snimanjem 64 snimki u isto vrijeme), te nije potrebna prethodna obrada uzorka, zbog čega se metoda može smatrati jednostavnom i ekološki prihvatljivom. Posebna prednost ove metode je što omogućuje pregled raspodjele djelatnih tvari unutar tablete, na način da se njome može provesti istovremeno snimanje više različitih područja (regija) tablete. To je njezino svojstvo vrlo korisno, jer tablete često nisu homogene. Metoda je robusna i izdržljiva, postavke metode mogu se po potrebi lako mijenjati, a broj simultanih snimki može se dalje povećati koristeći različite tehnike. Ova metoda u budućnosti ima potencijal za korištenje u svrhu preliminarnog dokazivanja krivotvorina prije provođenja analiza kompleksnijim i skupljim tehnikama, kojima se daje konačna potvrda o tome je li neki lijek krivotvoren ili nije (10).

3.5.5. Imunoenzimatski testovi temeljeni na monoklonskim protutijelima za provjeru sadržaja dihidroartemisinina u antimalaricima

3.5.5.1. Osnovno o imunoenzimatskim testovima (ELISA tehnici)

ELISA (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) jest imunoenzimatska tehnika koja se temelji na konceptu reakcije antigena i protutijela, a koja funkcionira na istom principu kao i kod humoralnog imunološkog odgovora gdje B limfociti nakon uočavanja antigena počinju stvarati protutijela.

Za provođenje imunotestova antigen se imobilizira za čvrstu mikrotitarsku pločicu, najčešće od polistirena, polivinil klorida i polipropilena. Protutijelo u otopini reagira s antigenom, što se detektira sekundarnim protutijelom obilježenim enzimom koji je sparen s kromogenim supstratom. Od enzima za obilježavanje najčešće se koriste alkalna fosfataza (ALP), peroksidaza hrena (HRP) i β -galaktozidaza. Promjena boje označava prisutnost analita u otopini. Pri tom se mjeri apsorbancija, fluorescencija i/ili luminiscencija u svrhu kvantitativnog određivanja analita, ili se vrši vizualna usporedba za semikvantitativno određivanje analita.

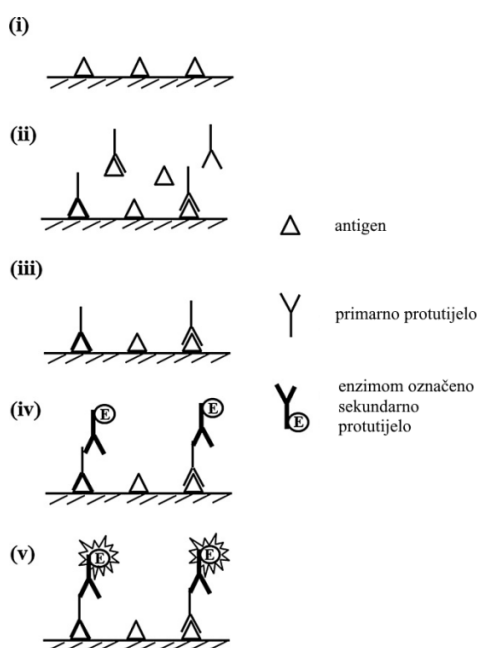
ELISA tehnika ima svojstva visoke osjetljivosti i specifičnosti, uzorci se pripremaju na jednostavan način, a sama tehnika nije kompleksna za provođenje, ekološki je prihvatljiva i relativno jeftina. Nedostaci su da metoda relativno često daje lažno pozitivne/negativne rezultate, te potreba čuvanja uzoraka i reagensa prema posebnim uvjetima čuvanja (čuvanje na hladnom ili zamrzavanje). Također, teško je pripremiti specifična protutijela za pojedini analit, potrebne su sofisticirane tehnike za pripremu kulture stanica za proizvodnju protutijela, a protutijela su relativno nestabilna.

Postoji više različitih vrsta ELISA tehnike, među kojima su najznačajnije *direktna* ELISA, *kompetitivna* ELISA, *indirektna* ELISA, *indirektna kompetitivna* ELISA, „*sandwich*“ ELISA te „*open sandwich*“ ELISA (62).

U ovom se poglavlju opisuje jedna metoda bazirana na **indirektnoj kompetitivnoj ELISA** tehnici koja je razvijena od strane autora u svrhu otkrivanja krivotvorenih antimalarika na osnovu semikvantitativnog određivanja dihidroartemisinina (11).

Indirektna kompetitivna ELISA (icELISA) je tehnika koja kombinira principe indirektna i kompetitivne ELISA tehnike. Ciljni antigen se imobilizira na mikrotitarsku pločicu. Zatim se inkubiraju slobodni antigen (uzorak) i protutijelo, a dobiveni kompleks se nanosi na mikrotitarsku pločicu. Pri tom se protutijela djelomično vežu za imobilizirane antigene, a djelomično za slobodne antigene prisutne u otopini. Primarno protutijelo koje se vezalo za imobilizirani antigen se detektira uz pomoć enzimom označenog sekundarnog protutijela. Kad se u reakcijsku smjesu doda supstrat, enzim katalizira reakciju, što dovodi do pojave obojenja. Ukoliko je koncentracija antigena u uzorku visoka, više protutijela će se vezati za antigen u otopini, što rezultira s manje protutijela koja su slobodna za vezivanje za imobilizirani antigen. Rezultat toga je da je obojenje otopine vrlo slabo ili se ne uočava.

Indirektna kompetitivna ELISA je u odnosu na direktnu ELISA tehniku specifičnija i prilagodljivija. Kao najvažniji nedostatak indirektna kompetitivne ELISA tehnike smatra se česta pojavnost unakrsne reaktivnosti sekundarnog protutijela (62). Na **Slici 23** prikazani su osnovni principi indirektna kompetitivne ELISA tehnike.



Slika 23 - Principi indirektna kompetitivne ELISA tehnike. (i) Imobilizacija antigena na čvrstu podlogu. (ii) Inkubacija slobodnog ciljnog antigena s primarnim protutijelom. (iii) Ispiranje nevezanog slobodnog ciljnog antigena i primarnog protutijela s pločice. (iv) Inkubacija s enzimom označenim sekundarnim protutijelom. (v) Razvijanje boje reakcijom sa supstratom (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 62*)

3.5.5.2. Osnovno o LFIA tehnologiji (Lateral flow immunoassay)

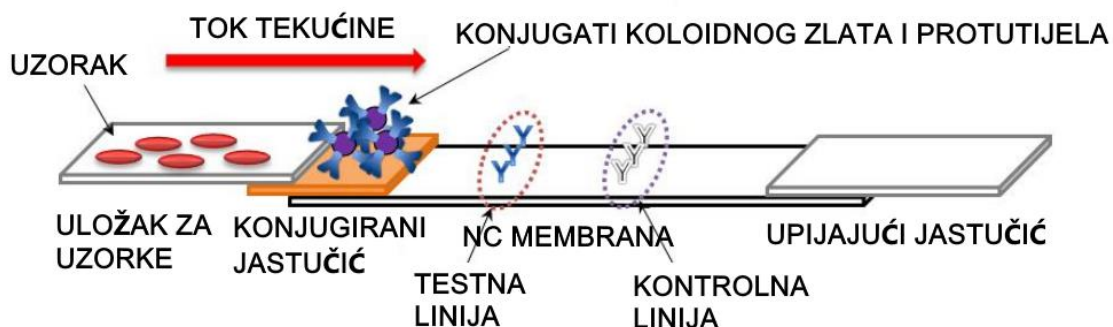
Lateral flow immunoassay tehnologija (LFIA), ili kako se još naziva *Lateral flow test (LFT)*, *Lateral flow device (LFD)*, *Lateral flow assay (LFA)*, *Lateral flow immunochromatographic assays*, *Dipstick*, *Rapid test*, *Test strip*, *Quick test* je jeftina i jednostavna tehnologija koja ima vrlo široku primjenu u zdravstvu, agronomiji, ekologiji, prehrambenoj industriji i drugim područjima. Na toj tehnologiji temelje se npr. i testovi za trudnoću, testovi ovulacije, testovi za detekciju infektivnih bolesti, testovi za detekciju narkotika u bioloških uzorcima, testovi prisutnosti onečišćenja u vodi, testovi za kontrolu kvalitete prehrambenih artikala i sl. Zbog jednostavnosti njihove primjene, sve se više razmatra njihova primjena u detekciji krivotvorenih lijekova.

Tehnologija se temelji na imunokromatografiji koja se provodi na testnim štapićima koji se uranjaju u različite uzorke (prethodno obrađene ili neobrađene). Tehnika je osjetljiva i specifična za pojedini analit, te se njome može provoditi kvalitativna i semikvantitativna analiza.

Testni štapić temeljen na LFIA tehnologiji sastoji se od slijedećih dijelova:

- 1) **Uložak za uzorke** - koji primarno upija višak tekućine i osigurava kontrolirano kretanje uzoraka niz štapić.
- 2) **Konjugirani jastučić** - na kojemu se nalaze konjugirani marker (često koloidno zlato) i protutijelo za oblaganje u dehidriranom stanju. Kad se testna traka uroni u uzorak, vezivo se trenutno otapa i protutijelo se kreće prema nitroceluloznoj membrani. U slučaju da štapić funkcionira na icELISA principu, formira se kompleks protutijela s antigenom u otopini uzorka, čime je manje protutijela slobodno za vezanje s imobiliziranim antigenom na testnoj liniji nitrocelulozne membrane.
- 3) **Nitrocelulozna membrana** - na kojoj su imobilizirani reagensi testne i kontrolne linije. Na području testne linije, ovisno o odabranom ELISA principu, u prisustvu ciljne molekule dolazi do prisustva odnosno odsustva signala analita. Dodatno protutijelo specifično za protutijelo za oblaganje upotrebljava se za proizvodnju kontrolnog signala.
- 4) **Upijajući jastučić** - koji osigurava jednolično kapilarno kretanje, upija višak uzoraka i prevenira kretanje unazad (63, 64).

Na **Slici 24** prikazani su standardni dijelovi testnih štapića koji se temelje na LFIA tehnologiji.



Slika 24 - Standardni dijelovi testnih štapića (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 63*)

3.5.5.3. Osnovne značajke imunoenzimatskih testova temeljenih na monoklonskim protutijelima za provjeru sadržaja dihidroartemisinina u antimalaricima

Analitička metoda razvijena je od strane autora u cilju otkrivanja jednostavnog i jeftinog testa kojim bi se mogao odrediti sadržaj dihidroartemisinina u antimalaricima, a time i odrediti jesu li oni autentični ili krivotvoreni (11). Za detekciju krivotvorenih antimalarika na bazi artemisinina već su razvijene različite metode temeljene na imunoenzimatskim testovima, odnosno ELISA tehnologiji (47, 48, 49, 65, 66, 67), koje potencijalno mogu služiti u detekciji krivotvorina, kao i za praćenje pacijenata tijekom terapije. Izazov u razvijanju imunotestova za analizu krivotvorenih antimalarika je u tome što su dihidroartemisinin (DHA), artesunat i artemeter vrlo slični po kemijskoj strukturi, odnosno razlikuju se samo po poziciji 12 kemijske strukture, te je teško naći specifično monoklonsko protutijelo kojim se dihidroartemisinin (DHA) može identificirati i odrediti, ukoliko su uz njega prisutni i drugi derivati artemisinina. Također, u prethodno razvijenim metodama, pozicija 12 kemijske strukture artemisininskih haptena često nije bila eksponirana prema monoklonskim protutijelima korištenim za prepoznavanje, zbog toga što je korištena za konjugiranje (vezivanje) s proteinskim nosačima (11).

Metoda razvijena od strane autora (11) temelji se na imunoenzimatskoj (ELISA) tehnologiji. Kao haptenu za dihidroartemisinin korišten je 9-O-sukcinildihidroartemisinin. Haptenu su male molekule,

nepotpuni antigeni, koji sami po sebi nisu imunogeni, međutim postaju imunogeni vezivanjem za protein nosač. Hapten se u ovom slučaju koristio za proizvodnju specifičnih monoklonskih protutijela imunizacijom miševa tehnikom hibridoma imortaliziranih staničnih linija koje nastaju fuzijom besmrtnih mijeloma stanica i B-limfocita sa sposobnošću proizvodnje protutijela za određeni antigen (68, 69). Za određivanje sadržaja dihidroartemisinina korišteno je monoklonsko protutijelo 2G1G4, koje je identificirano pretraživanjem knjižnice hibridomskih staničnih linija. Navedeno monoklonsko protutijelo pokazuje 52,3% unakrsnu reaktivnost na artemisinin, a nisku unakrsnu reaktivnost na artesunat, artemeter i ostale djelatne tvari sastavnice lijekova koji u svom sastavu sadrže artemisinin (ACT terapija).

Na navedenim principima razvijen je i testni štapić temeljen na LFIA (*Lateral flow immunoassay*) tehnologiji za brzo semikvantitativno određivanje sadržaja dihidroartemisinina u antimalaricima (11).

3.5.5.4. Razvoj imunoenzimatskih testova temeljenih na monoklonskim protutijelima za provjeru sadržaja dihidroartemisinina u antimalaricima

Kako bi se razvila metoda temeljena na ELISA imunotestovima, koja će na jednostavan i jeftin način moći selektivno odrediti sadržaj dihidroartemisinina u lijeku, bilo je nužno dobiti specifična monoklonska protutijela za dihidroartemisinin. To se učinilo na način da je mikrobiološkom fermentacijom i kemijskom modifikacijom proizveden novi imunogen s eksponiranom pozicijom 12 koja je važna za razlikovanje dihidroartemisinina od ostalih derivata artemisinina. Priprema haptena (9-O-sukcinildihidroartemisinina) izvršena je u slijedećim koracima:

- 1) Artemisinin je preveden u 9-hidroksiartemisinin mikrobiološkom fermentacijom u *Cunninghamella elegans* (ATCC 9245) kulturi;
- 2) 9-hidroksiartemisinin uz pomoć anhidrida sukcijske kiseline preveden je u 9-O-sukcinilartemisinin;
- 3) 9-O-sukcinilartemisinin reduciran je u 9-O-sukcinildihidroartemisinin (DHA hapten) uz pomoć natrijevog borohidrida i kalcijevog klorida u metanolu na 5 °C.

Nakon završetka reakcije i uklanjanja viška natrijevog borohidrida, dobiveni haptent pročišćen je taloženjem i filtracijom te je njegova čistoća dokazana HPLC analizom (11).

Haptent (9-O-sukcinildihidroartemisinin) je konjugiran s goveđim serumskim albuminom (BSA) kao proteinom nosačem, kako bi tvorio kompleks imunogena za imunizaciju miševa, te s ovalbuminom (OVA) kako bi tvorio imobilizirani antigen kompleks za provođenje ELISA metode.

Kako bi se dobila monoklonska protutijela za određivanje dihidroartemisinina (DHA), imunizirani su Balb/c miševi sa 100 µg imunogena (koji se sastoji od 9-O-sukcinildihidroartemisinina konjugiranog s BSA) uz dodatak potpunog Freundovog adjuvansa, a zatim 2 puta sa 100 µg imunogena uz dodatak nepotpunog Freundovog adjuvansa. Tri dana nakon provedene imunizacije izuzet je uzorak krvi svih miševa koji su sudjelovali u pokusu, te je titar protutijela određen icELISA tehnikom. Odabrani su miševi s najvećim titrom protutijela i dodatno imunizirani sa 100 µg imunogena. Tri dana nakon aplikacije završne doze imunogena, izuzete su stanice slezene tih miševa koje su služile za proizvodnju hibridoma stanica. Hibridoma stanice dobivene su stapanjem stanica slezene imuniziranih miševa i stanica mišje mijelomske linije SP2/0. Uslijedilo je pretraživanje hibridomskih knjižnica, čime je identificirano 10 hibridoma klonova koji su pokazivali pozitivnu reakciju na dihidroartemisinin. Stanice su potom razdvojene i ispitane na proizvodnju željenih monoklonskih protutijela. Jedan od tih klonova, 2G₁1G₄ pokazao je 52,3%-tnu unakrsnu reaktivnost na artemisinin i vrlo nisku unakrsnu reaktivnost na artesunat (1,6%) i artemeter (< 0,02%), kao i na ostale djelatne tvari koje se nalaze u lijekovima ACT terapije (lumefantrin, piperakin, klorokin, amodiakin). Unakrsna reaktivnost na sve te djelatne tvari iznosila je < 0,02%. Dokazano je da odabrano monoklonsko protutijelo pokazuje 52,3%-tnu unakrsnu reaktivnost na artemisinin zbog činjenice što su artemisinin i dihidroartemisinin vrlo slični na poziciji 12, koja je i prethodno bila poznata kao ključna pozicija za razlikovanje derivata artemisinina. Unatoč tome, odabrano monoklonsko protutijelo pokazalo je zadovoljavajuću specifičnost za dihidroartemisinin u slučajevima kad su uz njega istovremeno prisutni i artemeter i artesunat.

Izdvojeni klon je još dvaput kloniran, a zatim su stanice uzgajane u odgovarajućem mediju kako bi proizvele veće količine protutijela. Dobivena protutijela su zatim pročišćena (11).

Priprema uzorka lijekova uključivala je usitnjavanje, otapanje u acetonitrilu, ultrazvučnu ekstrakciju, centrifugiranje, razrjeđivanje, filtriranje i čuvanje obrađenog uzorka na -20 °C. Nad uzorcima je usporedno provedena i HPLC analiza. Kao mobilna faza kod HPLC analize korišten je 60%-tni acetonitril u vodi, a detekcija je vršena UV detektorom na 216 nm (11).

Kako bi se odredili optimalni uvjeti za provođenje metode provedeno je testiranje na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica od kojih je svaka bila obložena imobiliziranim antigenom. Potom su dodavane standardne otopine lijeka i otopine uzorka u zadanim koncentracijama/razrjeđenjima te otopine protutijela. Nakon perioda inkubacije pločica je isprana kozjim antimišjim IgG-HRP (peroksidaza hrena) konjugatima te je ponovno inkubirana. Nakon ispiranja, dodana je otopina supstrata te je mjerena optička gustoća čitačem mikrotitarskih pločica.

Dobiveni su slijedeći rezultati:

- Optimalna razrjeđenja pri koncentraciji od 1mg/mL iznosila su 3000 za 9-O-sukcinildihidroartemisinin-OVA konjugat, 1000 za *DHA* protutijelo i 1000 za kozji antimišji IgG-HRP konjugat.
- Metodom je utvrđeno da koncentracija dihidroartemisinina koja uzrokuje 50%-tnu inhibiciju (IC_{50}) iznosi 1,16 ng/mL.
- Radno područje metode je od 0,26-4,87 ng/mL, što se poklapa s rasponom u kojem *DHA* uzrokuje 20-80%-tnu inhibiciju signala (IC_{20} - IC_{80}).
- Granica dokazivanja je 0,18 ng/mL, što se poklapa s koncentracijom dihidroartemisinina koja uzrokuje 15%-tnu inhibiciju signala (IC_{15}).

Time je dokazano da je razvijena ELISA metoda vrlo osjetljiva, a njena je osjetljivost usporediva s HPLC metodom. Također, tom metodom može se točno odrediti koncentracija djelatne tvari u lijeku i u bioloških uzorcima, što je kasnije i dokazano provedbom validacije metode u *in vitro* kulturi stanica malarije (u kulturi *Plasmodium falciparum* parazita) (11).

3.5.5.5. Razvoj testnih štapića za provjeru sadržaja dihidroartemisinina u antimalaricima

Testni štapići temeljeni na LFIA i ELISA tehnologijama za određivanje djelatnih tvari derivata artemisinina u ACT lijekovima već su prethodno razvijani. Studije provedene na terenu u Mianmaru pokazale su da su takvi testovi korisni u detekciji krivotvorenih antimalarika „na licu mjesta“ u endemskim područjima, no usporedno nije provedeno testiranje uzoraka HPLC metodom kao zlatnim standardnom (30, 47).

Testni štapić za određivanje sadržaja dihidroartemisinina u antimalaricima izrađen je prema slijedećim koracima:

- Anti-DHA monoklonsko protutijelo (protutijelo za oblaganje) obilježeno je nanočesticama koloidnog zlata (30nm) uz dodatak BSA.
- Provedeno je pročišćavanje dobivenog konjugata.
- Konjugacijski jastučić zasićen je dobivenim konjugatom i osušen na sobnoj temperaturi.
- Za površinu nitrocelulozne membrane (NC membrane) u području testne linije fiksirano je protutijelo za hvatanje (9-O-sukcinildihidroartemisinin-BSA konjugat).
- U području kontrolne linije imobilizirano je protutijelo specifično za protutijelo za oblaganje za proizvodnju kontrolnog signala (kozji anti-mišji IgG). Razlika između kontrolne i testne linije je 5 mm.
- Zatim je testna membrana postavljena na sredinu PVC kućišta. Konjugacijski jastučić zalijepljen je za kućište na način da se preklapa s NC membranom.
- Apsorpcijski (upijajući) jastučić smješten je na suprotnoj strani da se inducira kapilarnošću koja omogućava povlačenje imunološkog kompleksa na fiksno protutijelo.
- Uložak za uzorke smješten je na način da se preklapa s konjugacijskim jastučićem.
- Izrađene testne trakice zatvorene su u PVC kućištu uz dodatak desikanta (11).

Osjetljivost testnog štapića ovisi o koncentraciji 9-O-sukcinildihidroartemisinin-BSA konjugata na membrani i koncentraciji konjugata koloidno zlato-monoklonsko protutijelo. Kako bi se odredili optimalni uvjeti za provedbu metode, izvršene su probne analize na mikrotitarskim pločicama.

Određene su slijedeće optimalne koncentracije: 1 mg/mL za 9-O-sukcinildihidroartemisinin-BSA, 0,4 mg/mL za protutijelo kozji antimišji IgG i 30 µg/mL za konjugat koloidno zlato-monoklonsko protutijelo.

Intenzitet obojenja testne linije ovisi o koncentraciji DHA u testnoj otopini. U svrhu testiranja osjetljivosti, provedeno je niz testiranja sa serijom razrijeđenih otopina DHA standarda (0, 6,25, 12,5, 25, 50 i 100 ng/mL). Najniža koncentracija DHA na kojoj je dobiven željeni rezultat, a to je da testna linija nije vidljiva, procijenjena je na 50-100 ng/mL. Rezultati testiranja osjetljivosti prikazani su na **Slici 25 A**.

Nedostatak metode jest da procjena rezultata može blago varirati s obzirom da se vrši golim okom. Stoga ta metoda može služiti samo za grubu procjenu je li neki lijek krivotvoren. Također, u slučaju sumnji u rezultat testiranja, preporuča se testiranje na više različitih koncentracija (11).

U svrhu testiranja specifičnosti/selektivnosti, provedeno je unakrsno testiranje s drugim derivatima artemisinina. Nakon aplikacije DHA u koncentraciji 100 ng/mL testna linija nije bila vidljiva, dok je nakon aplikacije artemetera, artesunata i artemisinina u istim koncentracijama testna linija pokazala obojenje, što je i očekivani rezultat. Na 500 ng/mL, artesunat i artemisinin pokazuju djelomičnu inhibiciju, dok artemeter ni pri toj koncentraciji ne pokazuje inhibiciju. Rezultati testiranja specifičnosti/selektivnosti prikazani su na **Slici 25 B**.



Slika 25. Rezultati testiranja osjetljivosti i specifičnosti/selektivnosti A - rezultati testiranja osjetljivosti, na vrhu je naznačena testirana koncentracija; B - rezultati testiranja specifičnosti/selektivnosti, na vrhu je naznačena testirana djelatna tvar (*prilagođeno prema literaturnom navodu 11*)

Također, provedeno je testiranje na 4 komercijalna lijeka, iz kojih su izolirani DHA, artemeter odnosno artemisinin pri koncentracijama od 50-100 ng/mL. Rezultati testiranja usporedivi su s rezultatima otopina standarda. Na osnovu navedenoga, zaključeno je da su u indikatorskom području (50-100 ng/mL) testni štapići specifični za DHA u odnosu na druge derivate artemisinina (11).

Kako bi se potvrdilo da je metoda prikladna za semikvantitativno određivanje sadržaja DHA, provedeno je testiranje na 15 različitih komercijalnih ACT lijekova. Sadržaj DHA u tim lijekovima najprije je određen HPLC metodom, kako bi se rezultati mogli usporediti s rezultatima dobivenim testnim štapićima. Za analizu testnim štapićima izvorna (*stock*) otopina razrijeđena je na 100 ng/mL, te je aplicirana na testne štapiće.

Pozitivnim rezultatom testa smatrao se rezultat gdje testna linija nije vidljiva. U slučaju da je testna linija bila svijetla ili tamna smatralo se da sadržaj lijeka nije u skladu s deklaracijom.

Analize su pokazale da su sadržaji 5 ispitivanih lijekova bili u skladu s deklaracijom (testni štapić nije pokazao liniju), dok su sadržaji preostalih 10 ispitivanih lijekova kojima je istekao rok valjanosti bili u rasponu od 70-90% od deklariranog (testni štapić je pokazivao linije različitih intenziteta) (11).

U slučajevima gdje je koncentracija bila 70% od deklarirane, jasno se uočavala testna linija. U slučajevima gdje je koncentracija bila od 80% do 100% deklarirane vrijednosti, testna linija je bila vrlo svijetla ili skoro nevidljiva golim okom. Dobiveni rezultati bili su usporedivi s rezultatima dobivenim HPLC metodom. Također, nakon što su na testni štapić aplicirane 10 puta veće koncentracije lijeka, testne linije se nisu pojavile, čime je metoda dodatno verificirana. Rezultati testiranja komercijalnih lijekova prikazani su u **Tablici 9**.

Tablica 9. Rezultati testiranja odabranih komercijalnih lijekova testnim štapićem i usporedba s rezultatima HPLC analize (preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 11)

Naziv lijeka	Proizvođač/Distributer	Broj serije	Regija	Rezultati analize testnim štapićem	Očekivani sadržaj DHA (mg/mL)	HPLC rezultati (mg/mL)
Ridmal	Nepoznat	nepoznat	Afrika	pozitivan	2	2,16±0,02
P-Alaxin	Bliss GVS Pharma Ltd	1040	Afrika	pozitivan	2	1,93±0,03
Darte-Q Cap./Dtq Cap.	The Power of God International	nepoznat	Afrika	pozitivan	2	2,03±0,01
D-Artepp	Guilin Pharmaceutical Co., Ltd, China	SQ130401	Bamaw	pozitivan	2	1,85±0,08
		SQ160101	Afrika	pozitivan	2	2,03±0,04
		SQ130801	Singu	negativan	2	1,73±0,05
		SQ140102	Moemauk	negativan	2	1,74±0,09
Duo-Cotecxin	Zhejiang Holley Nanhu Pharmaceutical Co., Ltd., China	130635	Mandalay	negativan	2	1,49±0,01
		141117	Shwebo	negativan	2	1,76±0,04
		130421	Nepoznata	negativan	2	1,62±0,03
		13072010	Nepoznata	pozitivan	2	1,89±0,02
		140329	Pha-Kant	negativan	2	1,76±0,02
		130635	Moenyin	negativan	2	1,76±0,02
		Nepoznata	Afrika	pozitivan	2	2,03±0,04
DARPLEX	Kunming Pharmaceutical Co., China	12EA	Pathein	negativan	2	1,44±0,01

Iz svega navedenoga može se zaključiti da bi se opisana metoda u budućnosti mogla koristiti za kvalitativnu i semikvantitativnu analizu lijekova koji u svom sastavu imaju dihidroartemisinin, a time i za otkrivanje krivotvorenih antimalarika u endemskim područjima. Međutim, prije uvođenja u redovitu upotrebu potrebne su dodatne provjere, primjerice provođenje studije stabilnosti navedenih antimalarika u tropskim područjima i provjera može li se sadržaj dihidroartemisinina točno odrediti i u prisustvu razgradnih produkata nastalih tijekom roka valjanosti. Također, s obzirom da derivati artemisinina nisu topljivi u vodi, potrebno je provesti dodatna testiranja s otapalima koja bi se potencijalno mogla koristiti za provedbu metode, a dostupnija su, jeftinija i ekološki prihvatljivija od prvotno predloženog acetonitrila.

4. RASPRAVA

Krivotvoreni lijekovi i lijekovi koji ne zadovoljavaju standarde kakvoće (eng. „*substandard and falsified medical products*“) ozbiljna su prijetnja za javno zdravlje i sigurnost ljudi.

Ne postoje precizni podaci o količini krivotvorenih lijekova na tržištu, ali procjenjuje se da oko 1% ukupnoga prometa u razvijenim zemljama do više od 10,5% u zemljama u razvoju, odnosno oko 10% ukupnoga svjetskoga prometa lijekova otpada na krivotvorene lijekove (70).

S obzirom na kvalitetu krivotvorenih proizvoda, prema podacima SZO-a najveći broj krivotvorina odnosi se na lijekove bez djelatne tvari (oko 30%), zatim slijede lijekovi s neodgovarajućim sadržajem djelatne tvari (oko 20%) i lijekovi koji sadrže nedeklarirane sastojke (oko 20%), a ponekad čak i toksične tvari (10). Vrlo često na tržištu se detektiraju i prepakirani lijekovi kojima je istekao rok valjanosti ili lažno označeni proizvodi.

U razvijenim zemljama, u Europi, SAD-u, Australiji, Japanu, Kanadi itd., pojavnost krivotvorenih lijekova unutar legalnog distribucijskog lanca nije učestala, međutim, u zadnjih nekoliko godina sve veći problem predstavlja ilegalna prodaja lijekova preko interneta. Prema istraživanjima SZO-a oko 50% online kupljenih lijekova su krivotvorine. Preko interneta se najčešće kupuju lijekovi za poboljšanje životnog stila. Kupnja preko interneta, osim što je cjenovno povoljnija, pruža i određenu privatnost, osobito u slučaju kupovine lijekova za erektilnu disfunkciju (71).

U zemljama u razvoju, osobito u Africi, dijelovima Azije i Južne Amerike, najčešće se krivotvore lijekovi za liječenje po život opasnih bolesti iz skupina antibiotika, onkoloških i kardiovaskularnih lijekova, antivirotika i antimalarika, kao i cjepiva, a udio krivotvorenih lijekova na tim tržištima kreće se u ovisnosti od područja u rasponu od 10 do 30% (70).

Antimalarici su skupina lijekova koja je osobito podložna krivotvorenju. U razdoblju od 2013. do 2017. godine sukladno podacima sustava GSMS gotovo 20% prijava o krivotvorenju lijekova, odnosno o pojavnosti lijekova nezadovoljavajuće kakvoće odnosilo se na antimalarike (1).

Posljedice krivotvorenja lijekova po zdravlje ljudi vrlo su ozbiljne. Uporaba krivotvorenih lijekova i lijekova nezadovoljavajuće kakvoće može dovesti do izostanka terapijskog učinka ili štetnih nuspojava, do stvaranja rezistencije na lijek, a u nekim slučajevima može uzrokovati i smrt.

U posljednje vrijeme često dolazi do krivotvorenja antimalarika baziranih na kombiniranoj terapiji artemisininom (ACT terapija), i to zbog razloga što je kombinirana terapija dvostruko skuplja u odnosu na onu koja je bazirana samo na artemisininu. Prema procjenama SZO-a u subsaharskom području Afrike samo zbog uzimanja lažnih lijekova protiv malarije godišnje umire 72.000 do 267.000 osoba (14). Najnovije upozorenje SZO-a je da bi se broj umrlih od malarije u subsaharskoj Africi ove godine (2020.) mogao čak i udvostručiti jer će zbog pandemije novog koronavirusa pristup kvalitetnim i učinkovitim antimalaricima biti smanjen (72).

Krivotvoreni lijekovi i lijekovi nezadovoljavajuće kakvoće najčešće su rezultat djelovanja organiziranog kriminala koji u svrhu nelegalnog stvaranja dobiti na tržište plasira lažne lijekove i medicinske proizvode. Čimbenici koji omogućavaju i olakšavaju krivotvorenje lijekova su neodgovarajući nadzor nad proizvodnjom, provjerom kakvoće i distribucijom lijekova, slabi tehnički uvjeti za provođenje dobre proizvođačke i distribucijske prakse te slaba educiranost i niski etički kodeks djelatnika u svim elementima sustava. Koristeći navedene slabosti sustava, kriminalne organizacije često koriste i javnozdravstvene kampanje i globalne programe financiranja koji se provode s ciljem sprečavanja i suzbijanja neke bolesti, npr. malarije, na način da umjesto lijekova ili cjepiva čije je korištenje promovirano od strane svjetskih i nacionalnih institucija, u distribucijski lanac ubacuju krivotvorene lijekove. Kao posljedica ovakvog nelegalnog djelovanja, osim štetnih učinaka na zdravlje ljudi i javnozdravstvene sustave, nastaje i financijska šteta za legalnog proizvođača i narušavanje njegovog ugleda zbog korištenja njegovog imena za krivotvoreni lijek.

Prema izvješću Ureda EU-a za intelektualno vlasništvo (EUIPO) i Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj (OECD) iz 2020. god. trgovanje krivotvorenim farmaceutskim proizvodima u svijetu 'teško' je gotovo 4 milijarde eura. Za potrebe ovog izvješća analizirani su podaci Sustava za bilježenje slučajeva krivotvorenja Instituta za sigurnost farmaceutskih proizvoda (PSI) te istraživanja Svjetske zdravstvene organizacije, kao i podaci o carinskim zapljenama za razdoblje od 2014. do 2016. (73)

U cilju suzbijanja krivotvorenja lijekova Svjetska zdravstvena organizacija te brojne druge institucije na međunarodnoj i regionalnoj razini (npr. Vijeće Europe) kontinuirano rade na stvaranju okvira za međunarodnu suradnju s ciljem prevencije, razvijanja načina otkrivanja i koordiniranog djelovanja u slučaju otkrivanja krivotvorenih lijekova. U tu borbu moraju biti uključeni svi dionici u procesu na nacionalnim razinama, od nadležnih tijela za promet lijekovima i medicinskim proizvodima na lokalnim razinama, do farmaceutske industrije, zdravstvenih djelatnika, udruga pacijenata i kompletne javnosti.

Kako bi opće mjere i preventivni programi mogli biti uspješni, jedna od specifičnih mjera je razvijanje različitih tehnologija za otkrivanje krivotvorenih lijekova. Za krivotvorene antimalarike nužno je pored standardnih razvijati i inovativne metode koje će biti selektivne za pojedine djelatne tvari, koje će biti u mogućnosti kvantificirati pojedine djelatne tvari u prisutnosti drugih tvari, a u isto vrijeme biti brze, jednostavne za primjenu i jeftine. Naime, u područjima u kojima je malarija endemična, često ne postoji mogućnost primjene standardnih metoda zbog njihove kompleksnosti, nedovoljne opremljenosti laboratorija, nedovoljne educiranosti osoblja i zbog toga što je primjena takvih metoda cjenovno neprihvatljiva.

Također, s obzirom da se posljednjih godina koriste sve sofisticiranije metode krivotvorenja, potrebno je razvijati i sofisticirane tehnologije kojima se takve krivotvorine mogu otkriti, primjerice za detekciju anomalija na pakiranjima koje se golim okom ne mogu primijetiti.

Kako bi se što više krivotvorenih lijekova na tržištu uspjelo detektirati, najvažnije je da su metode koje se koriste na terenu visoko osjetljive. Visoka selektivnost takvih metoda nešto je manje bitna, iako ne i nebitna (30).

Postoji veliki broj inovativnih metoda koje su već opisane u literaturi, a koje se temelje na različitim tehnikama, kao što su snimanje kamerama s LED izvorima, tankoslojna kromatografija, Ramanova spektroskopija, NIR, MIR i HPLC tehnike, ELISA imunotestovi, kolorimetrija, refleksija, masena spektrometrija, laserska apsorpcija i fluorescencija, refraktometrija, kapilarna elektroforeza, tehnike bazirane na principu mikrofluida s luminiscentnom detekcijom i druge. Takve metode često uključuju

korištenje ručnih uređaja, testnih štapića ili jednostavnog laboratorijskog pribora te obično ne zahtijevaju obradu uzoraka ili je potrebna obrada minimalna.

Neke od već razvijenih metoda mogu se koristiti u evaluaciji abnormalnosti na pakiranjima (npr. uređaji CD3), a neke se koriste prvenstveno za kvalitativnu analizu (npr. papirne kartonske kartice za jednokratnu upotrebu te pojedini LFIA imunotestovi). Vrlo mali broj već razvijenih metoda može se koristiti za semikvantitativnu i kvantitativnu analizu (npr. neki LFIA imunotestovi, GPHF- Minilab, PharmaChk, TruScan, SCiO i drugi). Metode kojima se vrši kvantitativna analiza obično zahtijevaju destrukciju uzoraka, osim u slučaju korištenja uređaja koji se temelje na spektroskopskim metodama. Međutim, uređaji koji se temelje na spektroskopskim metodama često ne obrađuju podatke na automatizirani način, odnosno nemaju integrirano jednostavno intuitivno softversko sučelje, pa stoga zahtijevaju određenu razinu educiranosti o obradi podataka od strane operatera koji te metode provode. Primjena takvih metoda također zahtijeva dodatne troškove i napore, budući da za usporedbu rezultata analize suspektnih lijekova treba dodatno osigurati i autentične lijekove i provesti njihovu analizu. Stoga bi u budućnosti bilo korisno razviti tzv. „spektralne knjižnice“ za usporedbu spektara, koje bi bile integrirane u uređaje. Međutim, takve „spektralne knjižnice“ bilo bi potrebno često obnavljati, s obzirom da postoji mogućnost izmjene proizvodnog procesa kod pojedinog proizvođača te bi formate spektara trebalo standardizirati i omogućiti da se mogu distribuirati između različitih vrsta uređaja. Također, zbog utjecaja različitih djelatnih i pomoćnih tvari na spektre, bilo bi potrebno izraditi spektar za svaki pojedinačni brend lijeka koji bi se kasnije ubacio u „spektralnu knjižnicu“ (30).

Za sada u literaturi ne postoji puno inovativnih metoda kojima bi se analiziralo oslobađanje djelatne tvari u lijeku, kao ni onih za određivanje prisutnosti onečišćenja i za određivanje sterilnosti. Uključivanje testiranja tih parametara u osnovnu evaluaciju lijekova na terenu također bi bilo korisno za detektiranje krivotvorenih lijekova, odnosno lijekova nezadovoljavajuće kakvoće (30).

Neke od inovativnih metoda u širokoj su upotrebi na tržištu, te za njih postoje brojni podaci o provedenim istraživanjima na terenu (pr. GPHF-Minilab), dok neke još uvijek nisu prisutne na tržištu (pr. LFIA imunotestovi) (30).

Općenito, za inovativne metode za otkrivanje krivotvorenih lijekova u literaturi nedostaju brojni podaci, npr. često nije moguće pronaći podatke o provedbi neovisne evaluacije metode na terenu, a osim toga metode se često testiraju samo na ograničenom broju djelatnih tvari. Naime, pojedine kemijske strukture teško se mogu ili se uopće ne mogu identificirati i odrediti pojedinim tehnologijama (npr. derivati artemisininina pokazuju jaku fluorescenciju, a slabo Ramanovo raspršenje pri 785 nm, što otežava provođenje takvih analiza i obradu rezultata dobivenih tim analizama).

Nadalje, postoji vrlo malo podataka o provedbi testiranja kroz pakiranje bez uništavanja uzoraka. U literaturi se također rijetko spominje činjenica da metode temeljene na Ramanovoj i IR spektroskopiji nemaju mogućnost testiranja kroz kapsulu bez rastvaranje iste. Naime, u slučajevima gdje je količina uzorka mala i u slučajevima gdje se uzorci koriste u istragama pravnih subjekata, vrlo je važno testirati uzorak kroz pakiranje. Važnost testiranja kroz pakiranje, kojim bi se preliminarno mogli razdvojiti potencijalno krivotvoreni od autentičnih lijekova u svim segmentima unutar distribucijskog lanca, istaknuta je i od strane regulatornih tijela 10 ekonomski i geografski različitih država (iz Azije, Amerike i Afrike) u studiji o provođenju tzv. *screeninga* lijekova na terenu (74). U literaturi obično nije detaljno obrađeno kako pakirni materijal, npr. staklo i plastični materijali, utječu na točnost rezultata dobivenih pojedinim inovativnim metodama, ukoliko je testiranje provedeno kroz pakiranje (30).

Gotovo da i nema podataka o testiranju inovativnih metoda na tekućim i parenteralnim farmaceutskim oblicima, kao ni na farmaceutskim oblicima za lokalnu primjenu. Također ne postoje studije kojima bi se evaluirala mogućnost razlikovanja kiralnih enantiomera primjenom inovativnih metoda, kao ni studije o utjecaju sredstva za oblaganje tableta na rezultate dobivene pojedinim metodama (30).

Često ne postoje ni informacije o omjeru uspješnosti u otkrivanju krivotvorina i cjelokupnog troška metode, koji bi osim troškova provođenja i razvoja metode uključivao i troškove održavanja/kalibriranja uređaja. U budućnosti bi bilo korisno provesti usporedbu omjera uspješnosti u otkrivanju krivotvorenih lijekova i troška različitih strategija borbe protiv krivotvorenja lijekova, npr. različitih javnozdravstvenih kampanja i općenitih metoda za suzbijanje krivotvorenja s omjerom uspješnosti u otkrivanju krivotvorenih lijekova i troška razvoja i provođenja inovativnih metoda (30).

Nadalje, u literaturi nema dovoljno podataka o tome u kojem dijelu farmaceutskog lanca bi bilo najbolje upotrijebiti koju metodu i na koji način, uzimajući u obzir različitu educiranost različitih dionika distribucijskog lanca, a nedostaju i studije kojima bi se evaluirali načini provođenja edukacija djelatnika koji provode te metode (30).

Za sada nema ni regulatornih smjernica koje bi opisivale načine evaluacije performansi inovativnih metoda za analizu krivotvorina i usporedbe njihovih značajki. Potreba za takvim smjericama adresirana je u članku organizacije *US Pharmacopoeial Convention* (75), koja izdaje i Američku farmakopeju.

U otkrivanju krivotvorenih lijekova preporuča se korištenje kombinacije više metoda, zbog toga što jedna metoda nadopunjuje nedostatke druge i obrnuto. Često se npr. koristi kombinacija Ramanove spektroskopije i IR spektroskopije za lijekove s malim sadržajem djelatne tvari te kombinacija spektroskopskih tehnika s tehnikama vizualnog prepoznavanja. Također, preporuča se da se prilikom korištenja inovativnih metoda za analizu istovremeno pametnim telefonima pregledavaju informacije o lijeku, primjerice o pakiranju, seriji i roku valjanosti, upozorenjima s tržišta i slično (30).

Dvije inovativne metode, temeljene na Ramanovoj hiperspektralnoj analizi i ELISA imunotestovima, koje su detaljno predstavljene u ovom radu, brze su, jednostavne i jeftine, te bi u budućnosti mogle biti značajan alat u suzbijanju krivotvorenja lijekova, na način da se koriste samostalno ili u raznim kombinacijama s drugim metodama. Međutim kao i druge gore spomenute metode, ove dvije metode imaju svoje prednosti i nedostatke, te bi ih prije uvođenja u redovitu upotrebu trebalo dodatno optimirati. Također, bilo bi nužno provesti detaljniju evaluaciju performansi tih metoda uspoređujući ih sa standardnim farmakopejskim metodama, uključujući evaluaciju provedbe tih metoda na terenu i to od strane neovisnih evaluatora.

Radi svega navedenog, nužno je i dalje razvijati učinkovite i pouzdane analitičke metode za otkrivanje krivotvorenih lijekova te osigurati sve nužne preduvjete za njihovo stavljanje u redovitu primjenu, budući da je dostupnost lijekova primjerene kakvoće, sigurnosti i djelotvornosti neophodna za postizanje jednakosti zdravstvene zaštite u cijelom svijetu.

5. ZAKLJUČAK

Krivotvorenje lijekova i proizvodnja i prodaja lijekova koji ne zadovoljavaju propisane zahtjeve kakvoće u posljednjih desetak godina postali su globalni problem, osobito prisutan u zemljama u razvoju, ali i u razvijenim zemljama kroz online prodaju lijekova.

Uporaba krivotvorenih lijekova i lijekova nezadovoljavajuće kakvoće ima direktan utjecaj na zdravlje ljudi na način da može dovesti do izostanka terapijskog učinka ili štetnih ili neželjenih nuspojava, do stvaranja rezistencije na lijek, a u nekim slučajevima može uzrokovati i smrt. Krivotvoreni antimalarici dodatno dovode do povećane transmisije bolesti, a time i do smanjene učinkovitosti globalne strategije borbe protiv te bolesti.

Kroz razne aktivnosti Svjetske zdravstvene organizacije i drugih institucija na globalnoj razini stvoren je okvir za međunarodnu suradnju u suzbijanju krivotvorenja lijekova s ciljem prevencije, razvijanja načina otkrivanja i koordiniranog djelovanja u slučaju otkrivanja krivotvorenih lijekova.

Jedna od preporučenih mjera je i razvoj novih tehnologija i inovativnih metoda za otkrivanje krivotvorenih lijekova i lijekova nezadovoljavajuće kakvoće. Analitičke metode temeljene na Ramanovim spektroskopskim tehnikama te na imunoenzimatskim tehnikama već su se pokazale uspješnima u otkrivanju krivotvorenih antimalarika. Dvije inovativne analitičke metode predstavljene u ovom radu temeljene na navedenim tehnikama iskazuju niz prednosti u odnosu prema standardnim analitičkim metodama. Međutim, one još uvijek nisu u redovnoj primjeni, budući da je nužno provesti dodatne validacije u konkretnom kontekstu, no moguće je da će u budućnosti postati značajan alat u borbi protiv krivotvorenja antimalarika.

Napredak tehnologije, olakšana komunikacija te učinkovita razmjena informacija i koordinacija na globalnoj razini omogućavaju sve učinkovitije otkrivanje krivotvorenih lijekova. Svaki otkriveni slučaj pomaže u razumijevanju obrazaca potencijalnih rizičnih situacija, čime se dodatno poboljšava sposobnost svih dionika za aktivno sprečavanje, otkrivanje i reagiranje na te rizike.

Ako nadležna regulatorna tijela na nacionalnim razinama kroz odgovarajuće zakonske okvire osiguraju učinkovito djelovanje svih resursa, bit će moguće spriječiti rastuću plimu krivotvorenja lijekova, povećati standarde kvalitete lijekova na globalnoj razini te osigurati da korisnici širom svijeta imaju pristup kvalitetnim, sigurnim i učinkovitim lijekovima.

6. LITERATURA

1. WHO: Global Surveillance and Monitoring System for substandard and falsified medical products (mrežne stranice). Geneva (CH): World Health Organization; 2017. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326708/9789241513425-eng.pdf?ua=1>.
Pristupljeno 02. svibnja 2020.
2. DIREKTIVA 2011/62/EU EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 8. lipnja 2011. o izmjeni Direktive 2001/83/EZ o zakoniku Zajednice koji se odnosi na lijekove za primjenu kod ljudi, u svrhu prevencije unosa krivotvorenih lijekova u legalni opskrbni lanac. Službeni list Europske unije. L174/74; 32011L0062; 13/Sv.064
3. WHO: Malaria Fact sheet (mrežne stranice). Geneva (CH): World Health Organization; 2020 Jan 14. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>.
Pristupljeno 02. svibnja 2020.
4. WHO: Guidelines for the treatment of malaria, 3rd ed (mrežne stranice). Geneva (CH): World Health Organization; 2015. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/162441>.
Pristupljeno 02. svibnja 2020.
5. Bassat Q, Tanner M, Guerin, PJ, Sticker K, Hamed K. Combating poor-quality anti-malarial medicines: a call to action. *Malar J.* 2016 Jun; 15:302.
6. WHO. The International Pharmacopoeia. 9. izd. Geneva: World Health Organization, Dept. of Essential Medicines and Pharmaceutical Policies; 2019.
7. US. The United States Pharmacopoeia and National Formulary 2019. 1. izd. Rockville, Md.: United States Pharmacopoeial Convention Inc.; 2019.
8. Council of Europe. European pharmacopoeia. 10. izd. Strasbourg: Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare; 2019.
9. MHRA. British pharmacopoeia (BP 2020). 1. izd. London: The British Pharmacopoeia Commission Secretariat of the Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, Stationery Office; 2019.

10. Frosch T, Wyrwich E, Yan D, Domes C, Domes R, Popp J, i sur. Counterfeit and Substandard Test of the Antimalarial Tablet Riamet by Means of Raman Hyperspectral Multicomponent Analysis. *Molecules*. 2019; 24(18):3229.
11. Ning X, Li W, Wang M, Guo S, Tan G, Wang B, i sur. Development of monoclonal antibody-based immunoassays for quantification and rapid assessment of dihydroartemisinin contents in antimalarial drugs. *J Pharm Biomed Anal*. 2018 Sep; 159:66–72.
12. WHO. Appendix 3 to Annex, 70th World Health Assembly document A70/23. 70th World Health Assembly; 2017 May 22-31; Geneva, Switzerland. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2017.
13. Zakon o lijekovima (Narodne novine, broj 76/13, 90/14 i 100/18)
14. WHO: A study on the public health and socioeconomic impact of substandard and falsified medical products (mrežne stranice). Geneva (CH): World Health Organization; 2017 February. Dostupno na: https://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/publications/SE-Study_EN_web.pdf?ua=1. Pristupljeno 03. svibnja 2020.
15. Taberner P, Fernández FM, Green M, Guerin PJ, Newton PN. Mind the gaps—the epidemiology of poor-quality anti-malarials in the malarious world—analysis of the Worldwide Antimalarial Resistance Network database. *Malar J*. 2014 Apr; 13:139.
16. WHO: Strategy for malaria elimination in the Greater Mekong Subregion (2015-2030) (mrežne stranice). Manila (PHL): World Health Organization. Regional Office for the Western Pacific; 2015. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/208203>. Pristupljeno 10. svibnja 2020.
17. WHO: Countries of the Greater Mekong zero in on falciparum malaria, Bulletin 8 of the Mekong Malaria Elimination programme (mrežne stranice). Geneva (CH): World Health Organization; 2019 Dec. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/who-htm-gmp-mme-2019-04>. Pristupljeno 10. svibnja 2020.
18. Newton PN, Green MD, Mildenhall DC, Plançon A, Nettey H, Nyadong L i sur. Poor quality vital anti-malarials in Africa - an urgent neglected public health priority. *Malar J*. 2011 Dec; 10:352.

19. Lubell Y, Dondorp A, Guérin PJ, Drake T, Meek S, Ashley E, i sur. Artemisinin resistance – modelling the potential human and economic costs. *Malaria J.* 2014 Nov; 13:452.
20. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, i sur. Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N Engl J Med.* 2014 Jul; 371:411-423.
21. Council of Europe: The Medicrime Convention (mrežne stranice). Strasbourg (FR): Council of Europe; 2011 Oct. Dostupno na: <https://www.coe.int/en/web/medicrime/the-medicrime-convention>. Pristupljeno 22. svibnja 2020.
22. DELEGIRANA UREDBA KOMISIJE (EU) 2016/161 o dopuni Direktive 2001/83/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 2. listopada 2015. Službeni list EU. 2016; L 32/1.
23. WHO: World malaria report 2017 (mrežne stranice). Geneva (CH): World Health Organization; 2017 Nov. Dostupno na: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/en/>. Pristupljeno 26. svibnja 2020.
24. Mihaljević I, Očić T. Preporuke za postupanje s davateljima krvi s rizikom od zaraze malarijom u transfuzijskoj djelatnosti RH. Zagreb: Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu; 2016.
25. MSD: Priručnik dijagnostike i terapije – Malarija (mrežne stranice). Zagreb (HR): Merck Sharp & Dohme; 2014. Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/izvancrijevniprotozoi/malarija>. Pristupljeno 20. lipnja 2020.
26. Miron L, Acatrinei D, Iacob O, Ivanescu L, Ciuca L, Roman C i sur. Malarija - Vodič kroz glavne invazijske bolesti koje se prenose sa životinja na ljude – malarija u ljudi i životinja. Iasi: University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine; 2019.
27. Marinović N, Poje G, Rajić Z: Prirodni produkti u terapiji malarije. *Farmaceutski glasnik* 75 (Zagreb) 2019 May; 371-382.
28. WHO: Global technical strategy for malaria 2016-2030 (mrežne stranice). Geneva (CH): World Health Organization; 2015 Jun. Dostupno na: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/en/>. Pristupljeno 20. lipnja 2020.
29. WHO: World malaria report 2019 (mrežne stranice). Geneva (CH): World Health Organization; 2019 Dec. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/world-malaria-report-2019>. Pristupljeno 15. lipnja 2020.

30. Vickers S, Bernier M, Zambrzycki S, Fernandez F, Newton P, Caillet C. Field detection devices for screening the quality of medicines: A systematic review. *BMJ Global Health*. 2018 Aug; 3(4):e000725.
31. WHO: CURRENT WORK PLAN New monographs for inclusion in The International Pharmacopoeia and revision of related monographs 2011 (mrežne stranice). Geneva (CH): World Health Organization; 2011. Dostupno na: <https://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/WorkPlanMonographs2011.pdf>. Pristupljeno 04. srpnja 2020.
32. Holzgrabe U, Malet-Martino M. Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification—The NMR approach. *J Pharm Biomed Anal*. 2011 Jun; 55(4):679-687.
33. Wilczyński S, Koprowski R, Stolecka-Warzecha A, Duda P, Deda A, Ivanova D i sur. The use of microtomographic imaging in the identification of counterfeit medicines. *Talanta*. 2019 Apr; 195:870-875.
34. Woodrow CJ, Wangsing C, Sriprawat K, Christensen PR, Nosten F, Rénia L i sur. Comparison between Flow Cytometry, Microscopy, and Lactate Dehydrogenase-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Plasmodium falciparum* Drug Susceptibility Testing under Field Conditions. *J Clin Microbiol*. 2015 Oct;53(10):3296-3303.
35. Rebelo M, Hänscheid T. Flow Cytometry for Antimalarial Drug Testing: More than Meets the Eye. *J Clin Microbiol*. 2016 Feb;54(3):817.
36. Platek SF, Ranieri N, Batson J. Applications of the FDA's Counterfeit Detection Device (CD3+) to the Examination of Suspect Counterfeit Pharmaceutical Tablets and Packaging. *Microscopy and Microanalysis*. 2016 Jul; 22(S3):1072-1073.
37. Batson JS, Bempong DK, Lukulay PH, Ranieri N, Satzger RD, Verbois L. Assessment of the effectiveness of the CD3+ tool to detect counterfeit and substandard anti-malarials. *Malar J*. 2016 Feb;15(119).
38. The GPHF-Minilab: Protection Against Counterfeit Medicines (mrežne stranice). Giessen (DE): Global Pharma Health Fund e.V.; 2006. Dostupno na: <https://www.gphf.org/en/minilab/index.htm>. Pristupljeno: 04. srpnja 2020.

39. USP: USP Technology Review: CBEx (mrežne stranice). Rockville, MD (US): U.S. Pharmacopeia - The Technology Review Program; 2017. Dostupno na: <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/global-public-health/tr-report-cbex.pdf>. Pristupljeno: 04. srpnja 2020.
40. Thermo Scientific: TruScan™ RM Handheld Raman Analyzer (mrežne stranice). Waltham, MA (US): Thermo Fisher Scientific; Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/TRUSCANRM#/TRUSCANRM>. Pristupljeno: 04. srpnja 2020.
41. Hajjou M, Lukulay P. Potential use of handheld Raman devices as tools for screening medicines for quality. *BioPharma Asia*. 2014 Jan; 2014:14-21.
42. Ricci C, Nyadong L, Yang F, Fernandez FM, Brown CD, Newton PN i sur. Assessment of hand-held Raman instrumentation for in situ screening for potentially counterfeit artesunate antimalarial tablets by FT-Raman spectroscopy and direct ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. 2008 Aug; 623(2):178–186.
43. Eliasson C, Matousek P. Noninvasive authentication of pharmaceutical products through packaging using spatially offset Raman spectroscopy. *Anal. Chem*. 2007 Mar; 79:1696–1701.
44. Visser BJ, de Vries SG, Bache EB, Meerveld-Gerrits J, Kroon D, Boersma J i sur. The diagnostic accuracy of the hand-held Raman spectrometer for the identification of anti-malarial drugs. *Malar. J*. 2016 Mar; 15:160.
45. Kandpal LM, Cho BK, Tewari J, Gopinathan N. Raman spectral imaging technique for API detection in pharmaceutical microtablets. *Sens. Actuators B Chem*. 2018 May; 260:213–222.
46. Wilson BK, Kaur H, Allan EL, Lozama A, Bell D. A New Handheld Device for the Detection of Falsified Medicines: Demonstration on Falsified Artemisinin-Based Therapies from the Field. *Am J Trop Med Hyg*. 2017 May; 96(5):1117-1123.
47. Guo S, He L, Tisch DJ, Kazura J, Mharakurwa S, Mahanta J i sur. Pilot testing of dipsticks as point-of-care assays for rapid diagnosis of poor-quality artemisinin drugs in endemic settings. *Trop Med Health*. 2016 May; 44:15.

48. He L, Nan T, Cui Y, Guo S, Zhang W, Zhang R i sur. Development of a colloidal gold-based lateral flow dipstick immunoassay for rapid qualitative and semi-quantitative analysis of artesunate and dihydroartemisinin. *Malar J.* 2014 Mar; 13:127.
49. Guo S, Zhang W, He L, Tan G, Min M, Kyaw MP i sur. Rapid evaluation of artesunate quality with a specific monoclonal antibody-based lateral flow dipstick. *Anal Bioanal Chem.* 2016 Sep; 408(22):6003-6008.
50. Weaver AA, Lieberman M. Paper test cards for presumptive testing of very low quality antimalarial medications. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Jun; 92(6 Suppl):17-23.
51. Bawuah P, Pääkkönen P, Peiponen K. Gloss measurement in detection of surface quality of pharmaceutical tablets: a case study of screening of genuine and counterfeit antimalaria tablets. *J. Eur. Opt. Soc.-Rapid Publ.* 2017 Jun;13(18).
52. Desai, D. *Pharmachk: robust device for counterfeit and substandard medicines screening on developing regions (disertacija).* Boston: Boston University, College of Engineering: 2014. 1-85 str.
53. Bernier MC, Li F, Musselman B, Newton PN, Fernández FM. Fingerprinting of falsified artemisinin combination therapies via direct analysis in real time coupled to a compact single quadrupole mass spectrometer. *Anal. Methods.* 2016 Jun;36(8): 6616-6624.
54. Green MD, Hostetler DM, Nettey H, Swamidoss I, Ranieri N, Newton PN. Integration of novel low-cost colorimetric, laser photometric, and visual fluorescent techniques for rapid identification of falsified medicines in resource-poor areas: application to artemether-lumefantrine. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Jun;92(6 Suppl): 8-16.
55. Green MD, Nettey H, Villalva Rojas O, Pamanivong C, Khounsaknalath L, Grande Ortiz M i sur. Use of refractometry and colorimetry as field methods to rapidly assess antimalarial drug quality. *J Pharm Biomed Anal.* 2007 Jan;43(1): 105-110.
56. Marinia RD, Rozet E, Aja L, Rohrbasserb C, Rohtb S, Rhèmeb D i sur. Reliable low-cost capillary electrophoresis device for drug quality control and counterfeit medicines. *J Pharm Biomed Anal.* 2010 Dec; 53(5):1278-1287.

57. Hoellein L, Holzgrabe U. Development of simplified HPLC methods for the detection of counterfeit antimalarials in resource-restraint environments. *J Pharm Biomed Anal.* 2014 Sep; 98: 434–445.
58. Ferraro JR, Nakamoto K, Brown CW. *Introductory Raman Spectroscopy.* 2 izd. Cambridge: Academic Press; 2003. 1-146 str.
59. Smith E, Dent G. *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach.* 1 izd. Chichester: John Wiley and Sons Ltd; 2004: 1-91 str.
60. Ratkaj M. Primjena spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja u istraživanju farmaceutski aktivnih tvari (disertacija). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet; 2013. 3-4 str.
61. Dijanošić A. Istraživanje interakcija malih molekula s polinukleotidima spektroskopijom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (disertacija). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet; 2013. 22-26 str.
62. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H i sur. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med.* 2018 Jan; 72(1): 32-42.
63. CD: LATERAL FLOW IMMUNOASSAY (mrežne stranice). Shirley, NY (US): Creative Diagnostics - Food & Feed Analysis; 2020. Dostupno na: <https://www.creative-diagnostics.com/food-analysis/tag-lateral-flow-immunoassay-30.htm>. Pristupljeno: 05. srpnja 2020.
64. Anfossi L, Di Nardo F, Cavalera S, Giovannoli C, Baggiani C. Multiplex Lateral Flow Immunoassay: An Overview of Strategies towards High-throughput Point-of-Need Testing. *Biosensors (Basel).* 2018 Dec; 9(1):2.
65. He SP, Tan GY, Li G, Tan WM, Nan TG, Wang BM i sur. Development of a sensitive monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the antimalaria active ingredient artemisinin in the Chinese herb *Artemisia annua* L. *Anal Bioanal Chem.* 2009 Feb; 393(4):1297-1303.

66. Eggelte TA, van Agtmael MA, Vuong TD, van Boxtel CJ. The development of an immunoassay for the detection of artemisinin compounds in urine. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Sep; 61(3):449-456.
67. Zehnacker L, Nevers MC, Sinou V, Parzy D, Créminon C, Azoulay S i sur. Development of sensitive direct chemiluminescent enzyme immunoassay for the determination of dihydroartemisinin in plasma. *Anal Bioanal Chem.* 2015 Oct; 407(25):7823-7830.
68. Barh D, Azevedo V. *Omics Technologies and Bio-Engineering: Towards Improving Quality of Life.* 1. izd. Cambridge: Academic Press; 2018: 449-469 str.
69. CD: Hapten (mrežne stranice). Shirley, NY (US): Creative Diagnostics - Food & Feed Analysis; 2020. Dostupno na: <https://www.creative-diagnostics.com/Hapten.htm>. Pristupljeno: 05. srpnja 2020.
70. Grdinić V, Huml D. Nova tehnološka rješenja u borbi protiv krivotvorenja lijekova. *Bilten Hrvatske liječničke komore.* 2011 Oct; 2010-2015.
71. WHO: Growing threat from counterfeit medicines (mrežne stranice). Geneva (CH): World Health Organization; 2010. Dostupno na: <https://www.who.int/bulletin/volumes/88/4/10-020410/en/>. Pristupljeno: 05. srpnja 2020.
72. WHO: WHO urges countries to move quickly to save lives from malaria in sub-Saharan Africa (mrežne stranice). Geneva (CH): World Health Organization; 2020 (citirano 05. srpnja 2020.) Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/detail/23-04-2020-who-urges-countries-to-move-quickly-to-save-lives-from-malaria-in-sub-saharan-africa> .
73. OECD/EUIPO: Trade in Counterfeit Pharmaceutical Products (mrežne stranice). Paris (FR): Illicit Trade, OECD Publishing; 2020. Dostupno na. <https://doi.org/10.1787/a7c7e054-en>. Pristupljeno: 05. srpnja 2020.
74. Roth L, Nalim A, Turesson B, Krech L. Global landscape assessment of screening technologies for medicine quality assurance: stakeholder perceptions and practices from ten countries. *Global Health.* 2018 Apr; 14(1):43.
75. USP-NF:General chapter prospectus: evaluation of screening technologies for assessing medicines quality (mrežne stranice). Rockville, MD (US): United States Pharmacopeia and the National

Formulary; 2017. Dostupno na: <https://www.uspnf.com/notices/evaluating-screening-technologies-for-assessing-medicine-quality>. Pristupljeno: 05. srpnja 2020.