

Výhody, nevýhody a úskalí imunochemických analytických metod v toxikologické praxi

HabrdoVá V., Voříšek V., Černíková B., Palička V.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové

SOUHRN

Imunochemické analytické metody jsou nenahraditelnou součástí toxikologie díky svému technickému provedení a rychlosti získání výsledku. Těchto výhod je využíváno převážně v klinické toxikologii, kdy je nutno rychle diagnostikovat, zda se jedná o intoxikaci a jaká noxa tuto intoxikaci způsobila. Široké používání imunoanalytických metod má i své nevýhody a úskalí. Nejobtížnější a zároveň nejproblematičtější je interpretace naměřených dat. Pomocí imunotechnik lze zachytit jen relativně úzké spektrum analytů. Pro hledání neznámé noxy v biologických materiálech je proto nutné použít i jiné analytické screeningové metody. Nálezy získané pomocí imunotechnik je vždy potřeba potvrdit jinou nezávislou metodou. Testy pro záchyt toxikologicky významných nox (drogy i léčiva) jsou zaměřeny na celou skupinu strukturálně podobných látek a nelze jednoznačně říci, která noxa otravu způsobila.

Klíčová slova: toxikologie, imunochemické analytické metody, výhody, nevýhody, úskalí.

SUMMARY

HabrdoVá V., Voříšek V., Černíková B., Palička V.: Advantages, disadvantages and limitations of immunochemical assays in analytical toxicology

Immunochemical analytical methods represent an irreplaceable part of the toxicology for their technical implementation and rapid outcome. These advantages are used predominantly in clinical toxicology for quick diagnose whether intoxication occurs and what has been the cause. A broad application of immunoassays has certain disadvantages and pitfalls too. The interpretation of measured data is the most difficult step and brings a lot of problems. The spectrum of drugs detected using immunoassays is relatively narrow. Therefore, the use of other analytical screening procedures is required for searching of unknown compounds in biological materials. Always, the results obtained by immunoassays need to be confirmed using another, independent method like chromatography coupled to mass spectrometry. The immunoassays used in toxicology or drug-abuse screening are designed to be broadly cross-reactive with a whole drug group. Therefore, it often impossible to conclude what drug has caused the poisoning.

Key words: toxicology, immunochemical analytical methods, advantages, disadvantages, limitations.

Úvod

Imunochemické metody zaujímají významné místo mezi rutinními toxikologickými metodami pro analýzu léčiv a drog v biologických vzorcích i jiných vhodných matricích. Tyto techniky představují vhodný nástroj pro rychlý screening exogenních nox v biologických vzorcích, převážně v moči a krevním séru. Pro testování léčiv a drog využívají imunochemické techniky nejčastěji princip kompetice o vazbu na protilátku (antibody, Ab) mezi antigenem, Ag (látkou, noxou, jejím metabolitem/metabolity) ve vzorku a fixním množstvím značeného antigenu přidaného jako součást testovacího systému. Značení tohoto přidaného antigenu nebo protilátky vhodným markerem a měření produkovaného signálu vhodným detektorem umožňuje, aby byly výsledky srovnávány s kalibrační závislostí připravenou měřením řady standardů o známé koncentraci sledované látky. Jinou možností je srovnání výsledku měření s hodnotou jednobodového „cut-off“ kalibrátoru. Takto lze při kvalitativní analýze eliminovat negativní výsledky (pod cut-off hodnotou) od pozitivních. V toxikologické analýze je nejpoužívanější značení enzymem (enzymová imunoanalýza, EIA, metody EMIT, CEDIA, ELISA) či chromogenem (fluorescenční imunoanalýza, FIA, metoda FPIA).

V imunoanalýze léčiv a drog pro účely klinické a forenzní toxikologie je nutno zmínit, že protilátky jsou sice vyvinuty proti konkrétní noxe (např. v EMIT testu na barbituráty je protilátka vyvinuta proti secobarbitalu a fenobarbitalu), ale zároveň s určitou mírou zkřížené reaguji (tzv. cross-reactivity) i s jinými strukturálně podobnými látkami, a to nejen ze skupiny barbiturátů. Z tohoto důvodu je nutné všechny pozitivní výsledky imunoanalýz konfirmovat jinou neimunochemickou, více specifickou metodou, která je schopna identifikovat, o jaký barbiturát či jinou látku se jedná. Mezi konfirmační metody uplatňované v toxikologické laboratoři patří kapalinová chromatografie s optickou detekcí (HPLC/UV), plynová chromatografie s plamenionizačním detektorem (GC/FID), plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu (GC/ECD) či detektorem citlivým na dusík a fosfor (GC/NPD) a hlavně plynová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem (GC/MS), která je stále vedena jako zlatý standard v klinické i forenzní toxikologické analýze. Pro analýzu polárních léčiv a termolabilních sloučenin je metodou volby kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem jednoduchého nebo dnes lépe tandemového typu LC/MS/MS (triplekvadrupol, kvantitativní analýza) nebo LC/MSⁿ (lineární iontová past, průkaz, strukturální analýza).

V příspěvku popisovanými imunochemickými technikami jsou myšleny komerčně dostupné testy provozované na automatických imunochemických analyzátořech.

Toxikologické laboratorní vyšetření

Toxikologické laboratorní vyšetření má za cíl prokázat či vyloučit přítomnost exogenních tox (léčiv, ilegálních drog, jiných škodlivin) v lidském organismu na základě zkoumání vhodných biologických vzorků pacienta (moč, krev, žaludeční výplach/zvratky) odebraných podle okolností v konkrétním případě. Analýzy jiných vzorků nalezených v okolí pacienta (podezřelé tekutiny, pokrmy, tablety, odhozené použité injekční stříkačky apod.) mohou napomoci k objasnění klinického či forenzního případu a při interpretaci nálezů. Na základě materiálu dodaného do toxikologické laboratoře a údajů na průvodním listě či získaných od ošetřujícího lékaře, eventuálně ze zdravotnické dokumentace či od orgánů činných v trestním řízení, lze rozdělovat používané analýzy na tzv. „general unknown screening“ (tj. systematické vyhledávání neznámé tox, kdy je snaha zachytit co nejširší spektrum tox na úkor citlivosti metody) nebo na cílené analýzy (potvrzení předem specifikované „terapeutické“ skupiny nebo screeningovou metodou zachycené tox, zde je použita pro danou toxu specifická izolace a konfirmační analytická metoda, čímž se stává analýza citlivější). U obou typů analýz je třeba mít alespoň základní znalosti o osudu látek v organismu (farmakokinetika) a jejich účincích (farmakodynamika) a zvážit volbu vhodného biologického materiálu a použité analytické techniky. V neposlední řadě je důležitá správná interpretace nálezů.

Screeningové metody slouží k systematickému vyhledávání neznámé tox či skupiny strukturně podobných látek, tedy k rozdělení vzorků na pozitivní a negativní. Za screeningové techniky lze považovat imunoanalýzu, tenkovrstvou chromatografii (TLC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s optickou detekcí (HPLC/UV) nebo

plynovou chromatografií s plamenionizačním detektorem (GC/FID). Ve screeningové analýze se významně uplatňují i techniky s hmotnostní detekcí, GC/MS či LC/MS. Bohužel, ne všechny tox mohou být odhaleny jedním typem screeningové metody, proto je vhodné kombinovat imunochemické, chromatografické a spektrální metody. Druhým nutným krokem je identifikace (potvrzení, konfirmace) pozitivního nálezu. Pro konfirmační analýzy je nutné vhodné vybavení laboratoře, zejména chromatografickými přístroji se specifickou detekcí, nejlépe s hmotnostním detektorem (GC/MS, LC/MS/MS).

Biologické materiály a detekční okno

Výběr vzorku/materiálu k analýze je často odvislý od případu, který je vyšetřován. Materiály zasílané k toxikologickému vyšetření jsou jak biologického původu (tělní tekutiny), tak i např. zbytky nápojů, potravy, léků nalezené v okolí pacienta. Nicméně nejběžnějšími materiály používanými pro screening exogenních tox jsou: moč (nejvhodnější pro kvalitativní toxikologickou analýzu), krevní sérum/plazma (vhodné také pro kvantitativní analýzu), eventuálně žaludeční obsah. Ve forenzní post-mortem analýze dále materiály získané při sekci (jaterní tkáň, ledvina, střevní obsah, žluč). Jedná-li se o analýzu neznámé tox, je vhodné dodat různé biologické i jiné vzorky. V akutní fázi intoxikace je vhodné analyzovat kromě krve (sérum) i výplach žaludku nebo zvratky. Při kontrole dodržování terapie pacientem a v TDM je materiálem volby krev (sérum nebo plazma). Naopak v eliminační fázi či v dopingové analýze je upřednostňována moč před krví. Chronický abúzus lze posoudit např. podle analýz tox v jednotlivých segmentech vzorku pramene vlasů. Na obrázku 1 je zobrazeno detekční okno po dávce, tj. doba, po kterou lze analyzovat toxu v daném biologickém materiálu, po její aplikaci. V tabulce 1 je přehled biologických materiálů nejčastěji analyzovaných v toxikologické laboratoři a jejich množství potřebné k analýze.

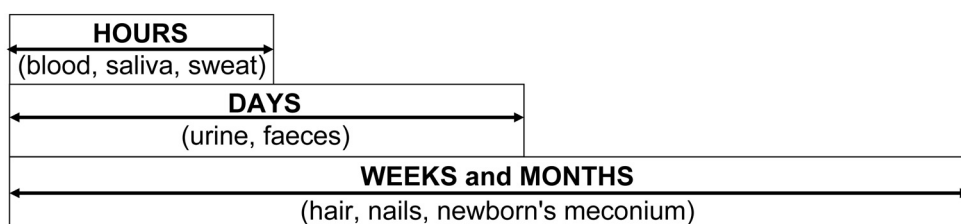


Fig. 1. Detection window [2, modified]

Table 1. Biological matrices used in toxicological analyses and sample volume required for various analytical techniques

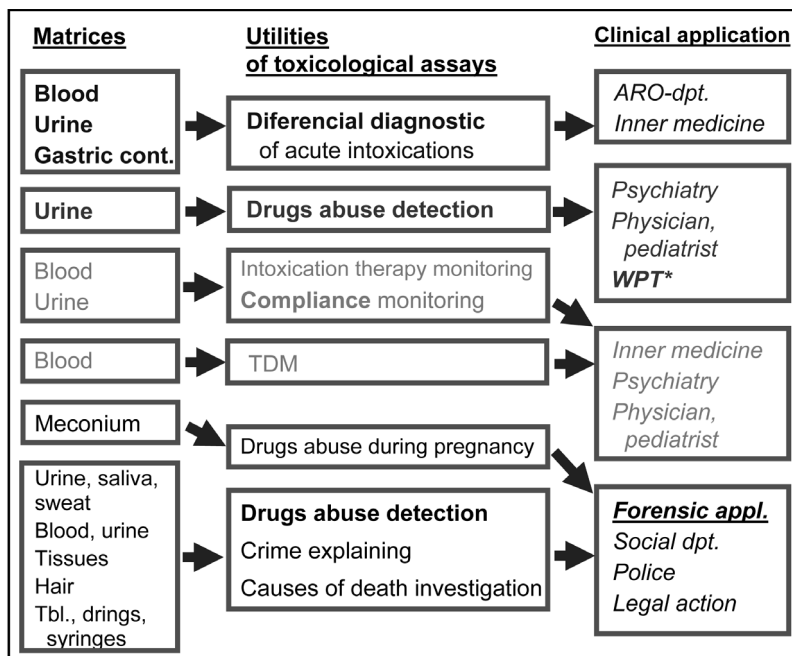
Material/Method	TLC	GC/MS (GC) LC/MS/MS (LC)	Immunoassays
Standard biological matrices			
Blood (serum, plasma)	–	0.1–2 ml	1–300 µl
Gastric content	50 ml	0.1–5 ml	*
Urine	50 ml	0.1–5 ml	1–300 µl
Post-mortem, materials from autopsies			
Bile	–	0.5–2 ml	*
Tissues	50 g	0.5–5 g	*
Alternative biological matrices			
Breast milk	–	0.1–5 ml	*
Hair	–	20–50 mg	*
Newborns' meconium	?	0.5–2 g	*
Saliva, sweat	–	0.1–1 ml	1–300 µl

*Microliter volumes of supernatant can be analyzed.

Kromě druhu a množství biologického materiálu potřebného k analýze je důležité brát ohled i na přístrojové vybavení laboratoře (obr. 2). Zatímco imunochemické metody pracují s mikrolitrovým množstvím vzorku a jejich citlivost se pohybuje řádově v jednotkách $\mu\text{g/l}$, pro analýzu neznámých tox pomocí TLC je zapotřebí minimálně 50 ml tělní tekutiny (tudíž lze analyzovat pouze moč) a limit detekce se pohybuje ve stovkách $\mu\text{g/l}$.

cován. Falešně pozitivní výsledky mohou poskytovat jak endogenní substance obsažené ve vzorku tak i látky exogenní.

Imunoanalýzy pro individuální látky jako pro metabolit kokainu benzoylkonin a kanabinoidy jsou více specifické oproti testům na skupinu strukturně podobných látek jako jsou amfetaminy, opiáty, benzodiazepiny, kde se s FP i FN výsledky setkáváme častěji [15].



* work-place testing (testing of employees, mainly drivers, machine operators)

Fig. 2. Utilities of toxicological assays, suitable matrices, and application of toxicological findings

Jaké látky je možné zachytit imunochemickými technikami?

V tabulce 2 je uveden soupis látek (drogy a léčiva vyskytující se v ČR), které je možné zachytit pomocí imunoanalýzy a které pomocí těchto technik detekovat nelze (testy nejsou komerčně dostupné).

Interference dávající falešně pozitivní odezvu enzymatických imunoanalýz v moči: ranitidin [9], metabolity chlorpromazinu, promethazinu [14] a bupropionu [11] interferují s EMIT II testem pro amfetaminy; oxaprozin s EMIT II testem pro benzodiazepiny; ofloxacin a levofloxacin interferují s EMIT II testem pro opiáty [9]. Vysoké koncentrace chlorpromazinu, cyklobenzaprinu, thioridazinu, difenhydraminu nebo cykloheptadinu mohou způsobit pozitivní výsledek EMIT II testu pro tricyklická antidepresiva v séru [12]. Chlorpromazin může dávat falešně pozitivní výsledky EMIT II testu pro LSD [12]. Fenofibrát je známý cross-reaktant CEDIA testu pro amfetaminy; ambroxol či fentanyl interferují s CEDIA imunoanalýzou pro LSD; metadon a jeho metabolit EDDP a oxazepam reagují s testem pro opiáty, pozitivní nález tímto CEDIA testem dává i antagonistu opiátů, syntetický opioid naloxon [15]. Seznam interferujících substancí, které vyvolávají falešně pozitivní nálezy, nebyl doposud nikým vypra-

Výhody, nevýhody a úskalí instrumentálních imunochemických metod

Imunochemické metody dovolují práci s velmi malým množstvím vzorku (několik mikrolitrů) bez nutné předchozí úpravy. Pro svou jednoduchou aplikaci je lze snadno automatizovat. Imunochemické analyzátoři produkují výsledky již za několik minut po aplikaci vzorku a spuštění analýzy. Rychlá odezva je důležitá hlavně v klinické toxikologii u akutních intoxikací, kde se od výsledku analýzy odvíjí další terapeutický postup. Neustále se zkvalitňuje specifita protilátek, čímž se zvyšuje citlivost cílených metod; jsou schopné zachytit množství řádově $\mu\text{g/l}$, ve speciálních případech i ng/l . Ve srovnání s chromatografickými metodami nabízejí imunologické techniky jednoduché zacházení, rychlou analýzu a ve většině případů i vyšší citlivost.

Některé imunoanalýzy používané v toxikologii jsou vhodné jak pro měření vzorků moče, tak i séra nebo plazmy. Ve zvláštních případech lze použít i jiný materiál: sliny, vhodně připravený žaludeční výplach, či rozpuštěné substance (léky, drogy) nalezené v okolí pacienta.

Výhody enzymatické imunoanalýzy v toxikologické praxi:

- Rychlost získání výsledku.
- U akutních otrav umožňují rychlý terapeutický zásah.
- Jednoduchost obsluhy, nenáročnost na kvalifikaci.
- Automatizace, sériová vyšetření.
- Malá množství vzorků (mikrolitry moče, séra, eventuálně slin, či jiných tekutin).
- Nevyžadují izolaci a zakoncentrování nox před analýzou.
- Vodítko pro optimální analytickou strategii (systematická toxikologická analýza, STA).
- Nové typy metod mají dobrou citlivost a specifitu.
- Pokračující vývoj instrumentálních i panelových (on-site) testů.

Nutno mít na zřeteli, že imunochemické metody jsou pouze orientační (nespecifické skupinové reakce; nerozliší jednotlivé noxy, např. test pro opiáty nerozliší, zda jde o kodein podávaný terapeuticky na tlumení kašle či o metabolity heroínu; nutno podotknout, že pozitivní výsledek dává test na opiáty i

po konzumaci většího množství pečiva s mákem), proto je nutné nálezy potvrdit a identifikovat noxu specifickou metodou (GC/MS, LC/MS). Dostupnost imunotechnik závisí na komerční nabídce firem a jejich provoz na kontinuálním přísunu firemních reagentů. K největším úskalím imunotechnik patří správná interpretace nálezů, která je ovlivněna různou zkříženou reaktivitou látek v „terapeutické“ skupině a interferencí jiných analytů nebo endogenních látek. Požití různých léků a drog značně ztěžuje interpretaci nálezů. Některé látky mohou díky různé zkřížené reaktivitě vyvolat falešně pozitivní odezvu na terapeutickou skupinu, kam nespádají, a tím zkomplikovat interpretaci a následný terapeutický zásah. Nutno brát v úvahu, že negativní imunochemický nálezy může být následkem především falešné negativity a také možné manipulace s analyzovaným materiálem, především s močí.

Hlavní nevýhodou imunotechnik je, že jsou schopny zachytit jen velmi omezené množství látek. Běžně dostupné imunoanalýzy nezachytí novější léčiva (neuroleptika, antidepresiva 2.–4. generace, hypnotika

Table 2. Drugs of abuse and medicaments detectable/undetectable by current enzymatic immunoassays (listed by frequency of findings in our toxicological laboratory)

Analyte, group of substances	Detectable by immunoassay	Undetectable by immunoassay
Cannabinoids	marihuana, hashish	Synthetic cannabinoids (Spice): CP-47,497, HU-210, JWH-018
Amphetamines	amphetamine, methamphetamine (pervitin); ecstasy (MDMA), MDA; interferences due biogenic amines	Designer drugs [#] : PMA, PMMA, 4-MTA, TMA-2; 2C-T-2, 2C-T-7, 2C-B, DOB; 5-MeO-DMT; mCPP
Benzodiazepines	diazepam, nordiazepam; frequent interferences [*] in urine	Alprazolam, flunitrazepam
Antidepressants	I. generation only (amitriptyline, nortriptyline, imipramine, desipramine, dosulepin)	Antidepressants of II. to IV. G: maprotiline, mianserin, ceterizine; SSRI: venlafaxine, citalopram, fluoxetine, sertraline, trazodone
Opiates	morphine, codeine; heroin, heroin metab. 6-MAM, „brown“, dihydrocodeine; ethylmorphine buprenorphine [6], methadone	Oxycodone, oxymorphone (very low cross-reactivity); tramadol , (su)fentanyl, synthetic opioids pethidine, naloxone
Cocaine	benzoylecgonine (cocaine metab.)	
LSD	LSD; frequent interferences [*]	
Barbiturates	low frequency of intoxication	
Abused natural and synthetic drugs not detectable by immunoassays		
Volatile substances		toluene, butane, org. solvents
Hallucinogenic plants and fungi		psilocybine, psilocin ; <i>Datura spp.</i> (atropine, L-hyoscyamine, hyoscyne), <i>Amanitas</i> (muscarine, ibogaine), mescaline (cacti),
Ketamine		ketamine
GHB		liquid ecstasy (GHB), GBL
Medicaments found often in intoxications – undetectable by immunoassays		
Hypnotics of 3rd gener.		zolpidem , zopiclone, zaleplon
Neuroleptics		all generations
Antihypertensive		all therapeutic groups
Cardiac drugs	digoxin	antiarrhythmic agent

Bold: mainly abused drugs. *Abbreviations for synthetic analogues of amphetamine (PMA, PMMA, 4-MTA, TMA-2, DOB), phenylethylamine (2C-T-2, 2C-T-7, 2C-B), tryptamine (5-MeO-DMT), piperazine (mCPP); DOB (2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine) – fatality in CR [3]; GHB (γ -hydroxybutyric acid, gamma-hydroxybutyrate); GBL (γ -butyrolactone)

3. generace) a nové syntetické či exotické přírodní drogy (2C-T-2, DOB, GHB, Spice, *Ayahuasca* aj.). Je proto vhodné mít v laboratoři i jiné techniky, alespoň HPLC s UV detekcí, a v případě nejasných či neodpovídajících nálezů vždy zaslat materiál (moč a oddělené sérum) k analýze na specializované pracoviště.

Nevýhody imunoanalýzy v toxikologii:

- Nespecifické.
- Zaměřeno na skupinu strukturně podobných látek.
- Různá zkřížená reaktivita (cross-reactivity) ve skupině podobných nox, jejich metabolitů a konjugátů (glukosiduronáty, sulfáty).

imunochemický screening nemusí zachytit všechny významné noxy ve vyšetřovaném případě (FN).

- Omezené množství dostupných testů: velké množství zneužívaných nox mimo oblast běžných imunochemických screeningových testů (FN, viz tab. 2).
- Mohou reagovat strukturně odlišné noxy a jejich metabolity nacházející se ve vzorku ve vysokých koncentracích (FP).

Úskalí screeningové imunoanalýzy:

- *Správná interpretace výsledků.*
- *Znalost principu metody.*
- *Směsná aplikace (multidrug abuse) ztěžuje interpretaci.*
- Variabilita v selektivitě metod.
- Záchyt drog a jejich metabolitů závisí na zkřížené reaktivitě ve specifikované skupině.
- Interferující absorbující látky – kyselina mléčná, biogenní aminy, hemolýza (falešně pozitivní, FP).
- Snadná manipulace se vzorkem moče: podání diuretik, ředění vzorku, přidání adulterantů (falešně negativní, FN).

Adulteranty (rušivé látky): glutaraldehyd, dimethyl sulfoxid, sulfonamidy, polyethylenglykol, kyseliny, baze, bělidla, peroxid vodíku, vitaminy B₁ a C.

- Správné nastavení cut-off hodnoty:
 - a) čím výše je hodnota cut-off, tím méně FP, ale více FN; vhodné pro diferenciální diagnostiku intoxikací;
 - b) čím níže je hodnota cut-off, tím více FP, ale méně FN; odhalování abúzu drog, sledování compliance s terapií.

V tabulce 3 jsou uvedeny výhody, nevýhody i limity použití imunoanalýzy v toxikologii.

Imunochemické metody mají v toxikologii své opodstatnělé místo, hlavně ve dvou směrech:

1. rychlá diagnostika otrav,
2. odhalování abúzu drog a monitorování abstinence léčených toxikomanů.

Při využívání imunochemických metod pro diferenciální diagnostiku akutních intoxikací je třeba mít na zřeteli, že v případě intoxikací psychofarmaky (nejčastější příčiny intoxikací, hlavně suicidálních) lze zachytit pouze již obsoletní tricyklická antidepresiva. V současnosti hojně předepisovaná antidepresiva citalopram, venlafaxin, trazodon, neuroleptika či anxiolytika, jako např. alprazolam a hypnotika 3. generace (zolpidem), jsou imunochemickými testy nezachytitelná. S úspěchem se rychlý imunochemický screening používá při sledování abúzu omamných a psychotropních látek. I zde však testy zachytí jen základní skupiny látek. Například letos byly během krátké doby v naší laboratoři zachyceny biologické vzorky obsahující ketamin. Z anamnestických údajů nebylo na tuto drogu podezření a imunochemický screening byl negativní, ale klinicky pacienti jeví známky intoxikace. Muselo se proto přistoupit ke screeningu pomocí GC/MS, resp. LC/MSⁿ. Z předchozího vyplývá nutnost nejen konfirmovat pozitivní imunochemické nálezy, nejlépe za využití GC/MS či LC/MS metod, ale také – je-li podezření na intoxikaci a imunochemické nálezy byly negativní – provést screeningové analýzy dodaných vzorků pomocí chromatografických metod (HPLC/UV, GC/FID či GC/MS, LC/MS). Nenahraditelné jsou imunoanalytické testy pro cílený záchyt a kvantifikaci paracetamolu a salicylátů. Předávkování těmito léčivými jsou velmi nebezpečná hlavně v dětském věku (hepatotoxicita; rodiče pod vlivem reklamy podají dítěti Panadol, Paracetamol i Coldrex či jiné přípravky obsahující až 500 mg paracetamolu současně, aniž by se informovali o složení přípravku, či se poradili s lékařem nebo lékárníkem).

Závěr

Přes výše zmíněná úskalí a nevýhody imunochemických metod používaných v toxikologické praxi lze konstatovat, že tato technika má své nezastupitelné místo v primární vyhledávací fázi pro rychlost získání výsledku a minimální spotřebu analyzovaného materiálu.

Table 3. Summary of advantages, disadvantages and limitations in use of immunoassays in toxicology

Advantages	Disadvantages	Limitations
Rapid response	Non-specific	Interpretation
Low sample volume, without sample preparation	Group reactions with various cross-reactivity of individual compounds	Knowledge of pharmacokinetic, suitable biological material
Easy to operate	Some analytes only detectable	Cross-reactivity, interferences
Guideline for STA*	Sample adulterations, interferences FN/FP findings	Cut-off value and FN/FP evaluations

*STA: systematic toxicological analysis

lu. Rychlá odezva analýzy je vítána hlavně v klinické toxikologii, kdy je lékaři poskytnut alespoň orientační výsledek, a tím je umožněn rychlý terapeutický zásah. Je však nutné mít na zřeteli, že imunochemické testy poskytují pouze orientační, nespecifické, výsledky. Aby bylo možné správně interpretovat tyto nálezy, je třeba použít specifičtější konfirmační metody, nejlépe chromatografické metody spojené s hmotnostní detekcí (GC/MS, LC/MS/MS). Pořízení těchto technik je finančně náročné a pro bezchybný chod i interpretaci naměřených spekter vyžadují zkušeného a specializovaného analytika. Je proto vhodné, a v příbalových informacích k testům výrobcí též doporučované, zasílat imunochemickým testem pozitivní vzorky ke konfirmaci na specializovaná pracoviště.

Literatura

1. **Armbruster, D. A., Hubster, E. C., Kaufman, M. S., Ramon, M. K.** Cloned Enzyme Donor Immunoassay (CEDIA) for Drugs-of-Abuse Screening. *Clin. Chem.*, 1995, 41, p. 92–98.
2. **Balíková, M.** Forezní a klinická toxikologie. Praha: Galén, 2004, 140 s. ISBN 80-7262-281-1.
3. **Balíková, M.** Nonfatal and fatal DOB (2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine) overdose. *Forensic Sci. Int.*, 2005, 153, 1, p. 85–91.
4. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Third edition. Edited by Moffat, A. C., Osselton, M. D. and Widdop, B. London: Pharmaceutical Press, 2004, 1935 p. ISBN 0-85369-473-7.
5. **Drummer, O. H.** Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. *J. Chromatogr. B.*, 1999, 733, p. 27–45.
6. **Habrdová, V., Balíková, M.** Development and validation of a GC/MS method for the simultaneous determination of buprenorphine, other opioids and their metabolites in human urine: application to the monitoring of buprenorphine use and abuse. *J. Chromatogr. B.*, 2009 (in process).
7. **Hammett-Stabler, C. A., Pesce, A. J., Cannon, D. J.** Urine drug screening in the medical setting. *Clin. Chim. Acta*, 2002, 315, p. 125–135.
8. **Henderson, D. R., Friedman, S. B., Harris, J. O., Manning, W. B., Zoccoli, M. A.** CEDIA™, a new homogeneous immunoassay system. *Clin. Chem.*, 1986, 32, p. 1637–1641.
9. **Melanson, S. E. F., Magnani, B.** False-positive urine drug screens: What clinicians should know and when the laboratory should be consulted. *News Path.* [online], 2006. Editor: DiFurio, M. J., [cit. 2009-04-16]. Dostupný na [www: http://www.cap.org/apps/docs/newspath/0601/0601_NewsPath-UDS_False_Positives.pdf](http://www.cap.org/apps/docs/newspath/0601/0601_NewsPath-UDS_False_Positives.pdf)
10. **McClatchey, K. D.** *Clinical laboratory medicine*. 2nd edition. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2002, 1936 p. ISBN 0-683-30751-7.
11. **Nixon, A. L., Long, W. H., Puopolo, P. R., Flood, J. G.** Bupropion metabolites produce false-positive urine amphetamine results. *Clin. Chem.*, 1995, 41, p. 955–956.
12. Product Information EMIT II Plus Assay. Siemens Healthcare Diagnostics (Dade Behring, Syva Company), 2008, Newark, USA.
13. Product Information CEDIA Assay. Thermo Fisher Scientific (Microgenics Corporation), 2008, Fremont, USA.
14. **Smith-Kielland, A., Olsen, K. M., Christopherson, A. S.** False-positive results with EMIT II amphetamine/methamphetamine assays in users of common psychotropic drugs. *Clin. Chem.*, 1995, 41, p. 951–952.
15. **Schwettmann, L., Külpmann, W. R., Vidal, C.** Drug screening in urine by cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA) and kinetic interaction of microparticles in solution (KIMS): a comparative study. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006, 44, p. 479–487.
16. **van der Slooten, E. P. J., van der Helm, H. J.** Comparison of the EMIT opiate assay and a GC-MS determination of morphine and codeine in urine. *Clin. Chem.*, 1976, 22, p. 1110–1111.
17. **Wu, A. H. B., McKay C., Broussard, L. A., Hoffman, R. S., Kwong, T. C., Moyer, T. P., Otten, E. M., Welch, S. L., Wax, P.** National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Recommendations for the use of laboratory tests to support poisoned patients who present to the emergency department. *Clin. Chem.*, 2003, 49, p. 357–379.

Poděkování: Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.

Do redakce došlo 27. 4. 2009.

Adresa pro korespondenci:
PharmDr. Vilma Habrdová, Ph.D.
Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN HK
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: vhabrdova@hotmail.com