

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Michal Šiller

SLINY JAKO ALTERNATIVNÍ ANALYTICKÝ MATERIÁL PŘI
PRŮKAZU ABÚSU OPIÁTŮ

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jaroslav Sochor, CSc.

Školitel- specialista: PharmDr. Viktor Voříšek

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.

Hradec Králové 2006

Děkuji především svému školiteli PharmDr. Viktoru Voříškovi za odborné vedení mé práce a cennou pomoc v průběhu celé studie. Také děkuji laborantkám z úseku toxikologie Ústavu klinické biochemie a diagnostiky ve FN v Hradci Králové za spolupráci při provádění kvalitativní analýzy vzorků slin.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	- 5 -
2.	CÍL PRÁCE.....	- 6 -
3.	TEORETICKÁ ČÁST.....	- 6 -
3.1	SLINY A SLINNÉ ŽLÁZY.....	- 6 -
3.1.1	<i>Definice slin a orální tekutiny a jejich funkce</i>	- 6 -
3.1.2	<i>Slinné žlázy</i>	- 7 -
3.1.2.1	Typy slinných žláz.....	- 7 -
3.1.2.2	Stavba slinných žláz.....	- 8 -
3.1.2.3	Cévní zásobení slinných žláz.....	- 8 -
3.1.3	<i>Tvorba a sekrece slin</i>	- 8 -
3.1.3.1	Typická produkce slin.....	- 8 -
3.1.3.2	Vliv vegetativního nervového systému na produkci a charakter slin.....	- 8 -
3.1.3.3	Tvorba slin.....	- 9 -
3.1.3.4	Faktory ovlivňující produkci slin.....	- 10 -
3.1.3.5	Složení slin.....	- 10 -
3.2	TRANSPORT LÁTEK DO SLIN.....	- 11 -
3.2.1	<i>Mechanismus transportu látek z plazmy do slin</i>	- 11 -
3.2.2	<i>Faktory ovlivňující transport INL z plazmy do slin</i>	- 11 -
3.2.2.1	Faktory související s biologickou membránou.....	- 11 -
3.2.2.3	Faktory související s vlastnostmi látky.....	- 12 -
3.2.2.4	Faktory související s farmakokinetikou látky.....	- 12 -
3.2.2.4.1	Vazebnost na proteiny plazmy.....	- 13 -
3.2.2.4.2	Dávka a clearance INL.....	- 13 -
3.2.2.4.3	Arteriovenózní diference.....	- 13 -
3.2.2.5	Faktory související s produkcí a složením slin.....	- 14 -
3.2.2.5.1	Vliv proteinů obsažených ve slinách.....	- 14 -
3.2.2.5.2	Vliv enzymů.....	- 14 -
3.2.2.5.3	Vliv pH slin a stimulace salivace.....	- 14 -
3.2.2.5.4	Vliv orálních depozit INL.....	- 16 -
3.3	TECHNIKY ODBĚRU SLIN RESPEKTIVE OT.....	- 17 -
3.4	ON-SITE TESTY.....	- 20 -
3.4.1	<i>Úvod</i>	- 20 -
3.4.2	<i>Princip on-site testů</i>	- 20 -
3.4.3	<i>Konfirmace výsledků získaných analýzou OT pomocí on-site testů</i>	- 22 -
3.5	OPIÁTY V OT.....	- 22 -
3.5.1	<i>Stručně pojednání o opiátech</i>	- 22 -
3.5.2	<i>Metabolismus opiátů</i>	- 23 -
3.5.3	<i>Přehled některých provedených analýz opiátů ve slinách/OT</i>	- 23 -
3.5.4	<i>Cut-off koncentrace ve slinách resp. OT pro opiáty při využití kvalitativních analytických testů, senzitivita a specifita</i>	- 25 -
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 28 -
4.1	PARAMETRY STUDIE.....	- 28 -
4.1.1	<i>Cílová skupina projektu</i>	- 28 -
4.1.2	<i>Nabídka on-site testů na našem trhu</i>	- 28 -
4.1.3	<i>Výběr vhodného souboru osob pro testování zakoupených souprav</i>	- 29 -
4.1.4	<i>Cílený odběr vzorků k analýze</i>	- 29 -
4.1.4.1	Odběr slin / OT.....	- 30 -
4.2	HODNOCENÍ IMUNOCHEMICKÝCH TESTOVACÍCH SOUPRAV.....	- 30 -
4.2.1	<i>Nabídka výrobků na českém trhu</i>	- 30 -
4.2.2	<i>Spektrum látek detekovatelných jednotlivými testovacími soupravami</i>	- 30 -
4.2.2.1	Souprava Syntron.....	- 30 -
4.2.2.2	Souprava Ultimed.....	- 31 -
4.2.3	<i>Testování a porovnání souprav Syntron a Ultimed na vybraných reálných pozitivních vzorcích, v celém rozsahu detekovatelných koncentrací (tj. od detekčního limitu referenční metody výše), slin a moče osob uvedených v kapitole 4.1.3.</i>	- 31 -

4.2.4	<i>Správnost analýzy pomocí zakoupených souprav</i>	- 32 -
4.2.5	<i>Určení specifity, senzitivity a účinnosti souprav bez vztahu k rozdílné farmakokinetice látek ve slinách/OT a v moči</i>	- 32 -
4.2.5.1	<i>Příprava vzorků se standardními přídávky analytů</i>	- 32 -
4.2.5.2	<i>Vzorky slin se standardními přídávky</i>	- 33 -
4.2.5.3	<i>Výpočet senzitivity,specifičnosti a účinnosti testovaných imunochemických souprav</i>	- 35 -
4.2.6	<i>Provedení kvalitativního imunochromatografického testu</i>	- 35 -
4.2.7	<i>Konfirmace výsledků imunochromatografického testu ve slinách</i>	- 36 -
4.2.8	<i>Konfirmační analýza opiátů, především morfinu a kodeinu, pomocí GC-MS v moči</i>	- 37 -
4.3	VÝSLEDKY HODNOCENÍ IMUNOCHEMICKÝCH TESTOVACÍCH SOUPRAV PŘI ANALÝZE OPIÁTŮ	- 38 -
4.3.1	<i>Monitorovací účinnost testovacích souprav na základě porovnání s výsledky referenční analýzy moči</i>	- 38 -
4.3.2	<i>Hodnocení správnosti analýzy pomocí imunochemických souprav</i>	- 39 -
4.3.3	<i>Specifičnost, senzitivita a účinnost testovaných analytických souprav</i>	- 39 -
4.3.4	<i>Deklarované hodnoty cut-off (ng/ml) od výrobce testovacích souprav pro opiáty</i>	- 40 -
5.	DISKUZE	- 42 -
6.	ZÁVĚR	- 51 -
7.	SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ	- 53 -
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	- 55 -
9.	LITERATURA A INTERNETOVÉ ZDROJE	- 56 -

1. ÚVOD

V USA a Velké Británii jsou sliny již několik let akceptovány jako alternativní analytický materiál pro průkaz a stanovení některých biologických analytů. Počátky využití slin jako analytického materiálu se datují již do doby před 150 lety. Ve 30. letech 20. stol. byla demonstrována určitá role liposolubility a míry ionizace solutů v transportu látek z plazmy do slin. V 70. letech 20. stol. se objevil první větší zájem o využití slin v terapeutickém drogovém monitoringu. Od této alternativy si toxikologové slibovali nižší invazivnost odběru oproti odběru krve a také se spekulovalo o lepší korelaci koncentrace INL ve slinách s farmakologickým účinkem INL, neboť sliny reprezentují volnou a tedy farmakologicky aktivní frakci INL, která může interagovat s receptory v cílové tkáni.

První test pro detekci INL opiátového typu v orální tekutině využívající imunotechniku byl vytvořen na počátku 70. let 20. stol. Leute et al. (1972) využili tento princip v paralelní analýze moči a slin pro důkaz morfinu.

Od té doby byl učiněn značný pokrok ve studiu farmakokinetiky opiátů ve slinách.

Na základě provedených výzkumů a rostoucího zájmu o detekci analytů v alternativních materiálech se na trhu počátkem 90. let začaly objevovat imunochromatografické testy, které umožňují rychlou detekci přítomnosti INL ve slinách. V dnešní době se lze setkat zejména na americkém a západoevropském trhu s řadou těchto testovacích souprav. Odborníci toxikologové se neustále intenzivně zabývají stanovováním senzitivity a specifity daných testovacích souprav, porovnáváním jejich účinnosti se standardními dostatečně senzitivními analytickými metodami a zjišťováním korelací mezi výsledky analýzy vzorků moči a vzorků slin. Ačkoliv v dnešní době nejsou zodpovězeny ještě všechny otázky týkající se vztahu INL-sliny, toxikologové akceptují sliny jako analytický materiál pro průkaz abúzu INL.

Světovým trendem několika málo posledních let je aplikace rychlých imunochromatografických testů pro detekci INL ve slinách v praxi, zejména při

silničních kontrolách, v detoxikačních centrech a popřípadě ve školských zařízeních.

2. CÍL PRÁCE

V rámci experimentální části mé diplomové práce jsem se zúčastnil projektu Ministerstva zdravotnictví České republiky : „ Analytická supervize rychlých orientačních průkazů ilegálních návykových látek.“ Studie byla prováděna na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice a lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Hlavním řešitelem byl PharmDr. Viktor Voříšek.

Cílem projektu/studie bylo zmapovat nabídku extralaboratorních imunochemických orientačních testů na českém trhu, dále zjištění monitorovací účinnosti nabízených testů a určení kvalitativních parametrů - senzitivity, specifity a analytické účinnosti testovacích souprav od jednotlivých firem v porovnání se standardními bioanalytickými metodami. Testování slin pomocí rychlých imunochemických testů bylo porovnáváno s průkazem přítomnosti drogy popř. jejího metabolitu v moči již zavedenými analytickými metodami, EMIT a GC-MS.

Dále jsem rešeršně zpracoval poznatky o analýze ilegálních návykových látek (INL) a především opiátů ve slinách.

Zaměřil se zejména na farmakokinetiku opiátů a jejich transport do slin a dále na kvalitativní testování slin na přítomnost opiátů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Sliny a slinné žlázy

3.1.1 Definice slin a orální tekutiny a jejich funkce

Sliny jsou sekrety produkované velkým množstvím slinných žláz (SZ), nacházejících se v horní části trávicího traktu s vyústěním do ústní dutiny. Tekutina, která je odebírána z ústní dutiny pro testování INL, obsahuje kromě směsi slin také zbytky potravy, odumřelé buňky sliznice a gingivální krevikulární tekutinu (Malamud et al., 1993). Proto v roce 1993 New York Academy Of Sciences definovala sliny jako materiál odebraný přímo z ústí SZ a orální tekutinu (OT) jako materiál získaný odkašláním nebo adsorpcí na příslušný odběrový materiál vložený do ústní dutiny. OT se podílí na zvlhčování a čištění sliznice horní části trávicího traktu, díky obsaženým imunoglobulinům (IgA zejména) a některým enzymům představuje i imunologickou bariéru vůči některým potenciálně patogenním mikroorganismům vstupujícím do organismu a dále se prostřednictvím trávicích enzymů také podílí na trávení některých složek potravy. U zdravých jedinců může gingivální krevikulární tekutina představovat až 0,5 % objemu orální tekutiny. Tento podíl může být značně zvýšen při gingivitidě (Cimasoni, 1974). Gingivální tekutina se svým složením podobá plazmě, a proto může představovat potenciální zdroj INL v OT.

3.1.2 Slinné žlázy

3.1.2.1 Typy slinných žláz

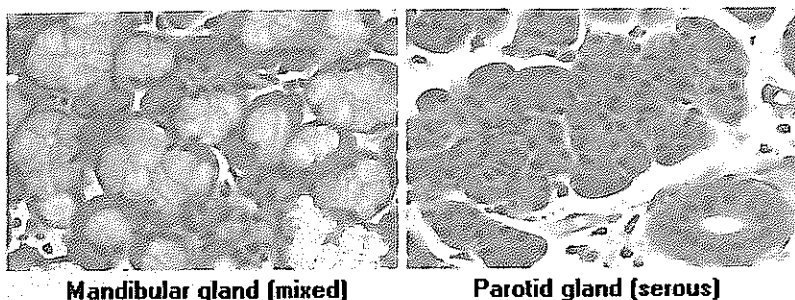
V ústní dutině se nachází 2 typy SZ. Podjazykové, příušní a podčelistní SZ se řadí k majoritním žlázám. Kromě těchto 3 párů SZ se ve sliznici ústní dutiny nachází velké množství minoritních SZ. Mezi minoritní SZ se řadí žlázy bukální, palatální a labiální.

70% slin je produkováno podčelistními žlázami, 25% příušními žlázami a zbytek slin je vylučováno žlázami podjazykovými a minoritními. Jednotlivé majoritní SZ produkují typický sekret. Příušní žlázy obsahují v acinech pouze serózní buňky, proto je pro ně typická produkce serózního sekretu. Podjazykové a podčelistní žlázy obsahují oba typy buněk. Pro ně je tedy typická tvorba smíšeného serózně-mucinózního sekretu. Podjazykové žlázy tvoří z velké části buňky mucinózní, a proto jsou jimi secernované sliny viskóznější (Vining a McGinley, 1985).

3.1.2.2 Stavba slinných žláz

Tkáň SZ je tvořena acinárními buňkami, které vykazují sekreční aktivitu. Seskupení těchto buněk se označuje jako lobulus, jehož lumen ústí do intralobulárního kanálku. Prostřednictvím intralobulárních kanálků jsou primární sliny transportovány do sekrečních kanálků, které ústí v orální dutině. Výstelka sekrečních kanálků se skládá z vrstvy endotelových buněk nepropustných pro vodu (Young a Van Lennep, 1978). Objem produkovaných slin je tak funkcí sekreční aktivity acinárních buněk (Young a Van Lennep, 1979).

Obr. č.1 Histologický preparát-aciny slinných žláz



3.1.2.3 Cévní zásobení slinných žláz

SZ jsou bohatě zásobeny arteriální krví (Haeckel, 1990). Externální karotidální arterie vstupují do slinných žláz a dělí se na kapilární větve, které zásobí jednotlivé acinární lobuli (Young a Van Lennep, 1978).

3.1.3 Tvorba a sekrece slin

3.1.3.1 Typická produkce slin

Denně vyprodukuje SZ 500 až 1500 ml slin. Typická produkce slin je 0,05 ml/min ve spánku, 0,5 ml/min při odhlehování a 1-3ml/min při žvýkání a kyselé stimulaci (Crouch et al.; 2004).

3.1.3.2 Vliv vegetativního nervového systému na produkci a charakter slin

SZ jsou inervovány parasympatickými i sympatickými nervy. Oba typy inervace působí stimulačně na sekreci slin, ale mají rozdílný vliv na objem, viskozitu slin a koncentraci proteinů ve slinách. Serózní a serózněmukózní žlázy jsou inervovány oběma typy nervových vláken (α , β -adrenergní stimulace i cholinergní stimulace), mukózní žlázy jsou stimulovány pouze prostřednictvím cholinergních vláken (Davenport et al., 1977; Carpenter et al., 2000). Rozdílná stimulace sekrece slin při různých fyziologických a patofyziologických stavech může vést někdy k obtížnému odběru vzorku.

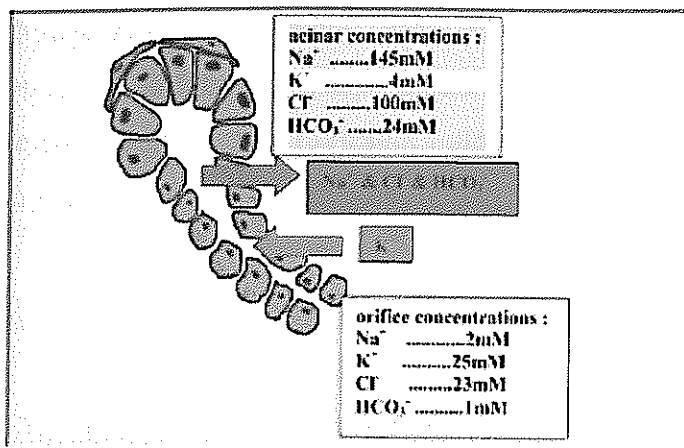
Tab. č. 1 Charakteristické rozdíly v produkci slin na základě různých nervových stimulů (Aps and Martens, 2004)

Parametr	Nervová stimulace		
	β -adrenergní	α -adrenergní	cholinergní
Objem	malý	malý	velký
Viskozita	vysoká	nízká	nízká
Proteinová koncentrace	vysoká	vysoká	nízká
Koncentrace mucinu	velmi vysoká	nízká	velmi nízká

3.1.3.3 Tvorba slin

Tvorba slin probíhá ve dvou stupních. Acinárními buňkami jsou secernovány ionty a proteiny. Voda prostupuje do lumen acinů na základě osmózy. V acinárním lumen se hromadí primární sliny, které jsou isotonické s plazmou a mají také podobné elektrolytové složení. Při průchodu primárních slin sekrečními kanálky dochází k aktivní reabsorpci sodíku a chloridů a k sekreci draslíku a bikarbonátů. Následně tak vznikají sekundární sliny, které jsou oproti plazmě hypotonické. Následkem je produkce sekundárních slin, které jsou oproti plazmě hypotonické (Aps and Martens, 2004).

Obr. č. 2 Sekrece a resorpce iontů ve slinných kanálcích (Aps and Martens, 2004)



3.1.3.4 Faktory ovlivňující produkci slin

Množství secernovaných slin a jejich elektrolytové složení podléhá cirkadiánnímu rytmu a závisí na různých stimulech, které působí zvýšenou nebo sníženou sekrecí. Čichové podněty, mechanická stimulace žvýkáním, bolest, hormonální změny související s těhotenstvím, agresivita, parasympatomimeticky a sympatomimeticky působící látky podporují sekreci slin.

Hormonální změny související s menopauzou, stres, antiadrenergní a anticholinergní látky působí naopak pokles sekreční aktivity SZ. Také pohlaví, věk, roční období, nutriční a emoční stav vyšetřované osoby mají vliv na produkci slin (Mandel, 1990). Některé patologické stavy mohou ovlivnit kvalitativně i kvantitativně produkci slin. Zejména se jedná o různá imunopatologická onemocnění, dysfunkce ledvin a jaterní onemocnění (Aps a Martens, 2004).

3.1.3.5 Složení slin

Znalost složení slinné tekutiny je důležitá z hlediska analytiky zejména při vývoji extrakčního postupu.

Sliny tvoří z 99,4 % voda, 0,3 % proteiny (převážně amylasa) a 0,3 % mucin. Sliny a tedy i OT obsahují elektrolyty plazmy jako jsou draslík, sodík, bikarbonáty a také obsahují řadu organických látek (Aps and Martens, 2004).

Mezi organické sloučeniny nacházející se ve slinách patří zejména glykoproteiny a proteiny produkované acinárními buňkami, mucin, enzymy lysozym, laktoferin, laktoperoxidasa s antibakteriálními a antifugálními účinky a enzymy podílející se na trávení složek potravy. K trávicím enzymům obsaženým ve slinách se řadí α -amylasa, lipasa, proteinasa, Dnasa, Rnasa.

3.2 Transport látek do slin

3.2.1 Mechanismus transportu látek z plazmy do slin

Aby mohla látka přestoupit z krve do slin, resp. do OT, musí být ze systémové cirkulace transportována přes endoteliální stěnu kapilár, bazální membránu a následně přes membránu epitelových buněk SZ do slinných acinů. Transport látky do acinů SZ má největší podíl na tom, jaký typ látky a v jaké kvantitě tento typ látky přestoupí do OT.

Do slin mohou být látky transportovány několika způsoby. Látky steroidní povahy, hormony jsou do slin transportovány na základě aktivního transportu proti koncentračnímu gradientu. Ultrafiltrací prostřednictvím membránových pórů přestupují do slin malé polární sloučeniny (Burgen, 1956; Vining et al., 1982). Pinocytóza má pro transport látek do slin menší význam. Většina INL, ke kterým se řadí i opiáty, je transportována do slin pasivní difúzí na základě koncentračního gradientu (Kidwell et al., 1998). Transport INL do slin resp. OT je ovlivněn řadou faktorů. Tyto faktory mají výrazný vliv na koncentraci INL popřípadě jejího metabolitu ve slinách resp. OT, a tak mohou ovlivnit její detekci pomocí rychlých orientačních imunotechnik (ROI). Na základě spolupůsobení několika faktorů nemusí koncentrace analyzované látky ve slinách resp. orální tekutině korelovat s plazmatickou koncentrací.

3.2.2 Faktory ovlivňující transport INL z plazmy do slin

3.2.2.1 Faktory související s biologickou membránou

Pasivní difúze je funkcí koncentračního gradientu na membráně, povrchu plochy, ze kterého probíhá difúze, tloušťky membrány a difúzní konstanty, která záleží na fyzikálně chemických vlastnostech každé látky (Paxton, 1979).

3.2.2.3 Faktory související s vlastnostmi látky

- acidobazické vlastnosti INL a pK_a
- liposolubilita
- náboj
- molekulová hmotnost
- prostorová konfigurace

INL, která je transportována pasivní difúzí do slin musí být dostatečně lipofilní, aby mohla difundovat přes lipidovou dvojvrstvu buněčné membrány, ale současně by měla být do určité míry hydrofilní charakter, aby se uchovala v orální tekutině. Je-li látka ionizována při fyziologickém pH, seskupují se na základě interakce ion-dipól kolem její molekuly molekuly vody. Toto seskupení snižuje lipofilitu INL a brání pasivní difúzi přes membránu. Ve slinách detekujeme především parentní látku a některé její dostatečně lipofilní metabolity. Glukuronidy kodeinu po jeho podání per os nebyly ve slinách detekovány díky kyselejšímu charakteru a vyšší hydrofilitě. Po orální administraci kodeinu nebo dihydrokodeinu nebyly ve slinách detekovány metabolity morfin a dihydromorfin díky jejich nízké koncentraci v plazmě a redukované lipofilitě (Cone et al, 1993).

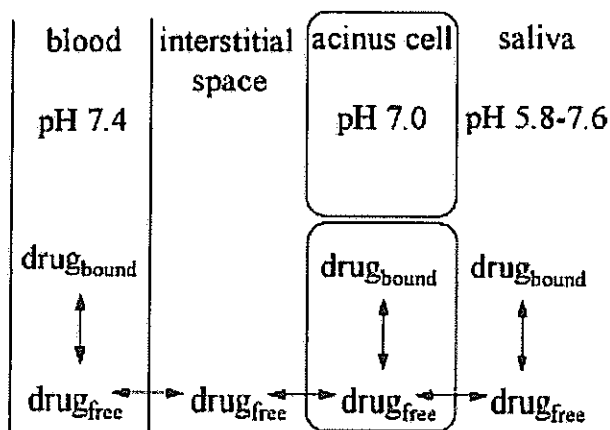
Molekulová hmotnost ovlivňuje difúzi látky přes semipermeabilní membránu. Vyslovena byla teorie přímé úměrnosti mezi permeabilitou membrány a poměrem $P/Mr^{1/2}$, kde P je rozdělovací koeficient oktanol:voda pro danou látku a $Mr^{1/2}$ je druhá odmocnina molekulové hmotnosti dané látky (Van Bree, 1990).

3.2.2.4 Faktory související s farmakokinetikou látky

3.2.2.4.1 Vazebnost na proteiny plazmy

Pouze volná frakce látky může být transportována do slin. Jednotlivé látky se liší svou schopností vázat se na proteiny plazmy. Na základě experimentálních měření bylo zjištěno, že volná frakce dihydrokodeinu v séru kolísá v rozmezí 57-88 % (Skopp et al., 1999). V plazmě se na vazbě léčiv a INL (opiátů) v největší míře podílí albumin a kyselý α -glykoprotein.

Obr. č. 3 Schéma transportu drogy z krevního oběhu do slin (Häckel a Hänecke, 1996)



3.2.2.4.2 Dávka a clearance INL

Koncentrace INL v OT závisí samozřejmě na aplikovaném množství dané látky, která je do slinných žláz transportována arteriální krví. Čím vyšší je koncentrace volné frakce látky v centrálním kompartmentu, tím vyšší je pravděpodobnost transportu většího množství látky do slin. Proto byly zjištěny rozdíly v detekci INL ve slinách po jednorázovém podání a při chronickém užívání (Skopp et al., 1999). Také vyšší rychlost eliminace mateřské INL a její rychlá transformace v méně lipofilní metabolity snižuje množství INL, která difunduje do slin. V konečném důsledku se snižuje doba, po kterou lze ve slinách resp. OT danou látku detekovat.

3.2.2.4.3 Arteriovenózní difference

SZ jsou hojně zásobeny arteriální krví a jsou považovány za centrální kompartment z hlediska farmakologie. Krev respektive plazma je odebírána ve farmakokinetických studiích především z kubitální žíly, která náleží k perifernímu kompartmentu. Pozitivní arteriovenózní diference pro danou látku by tak mohla mít vliv na výsledný koncentrační poměr dané INL mezi slinami a plazmou (S/P) (Häckel, 1990; Häckel a Hänecke, 1993).

3.2.2.5 Faktory související s produkcí a složením slin

- vazebná kapacita proteinů obsažených ve slinách
- enzymy případně metabolizující danou látku
- pH slin a stimulace salivace
- orální depozita INL

3.2.2.5.1 Vliv proteinů obsažených ve slinách

Ve slinách se nachází minimum proteinů, které mají vazebnou kapacitu pro INL. Můžeme tedy jejich vliv na koncentraci volné frakce INL ve slinách zanedbat (Kidwell et al., 1998).

3.2.2.5.2 Vliv enzymů

Po orální administraci dihydrokodeinu byl v OT detekován jeho N-demetylovaný metabolit. Jeho vznik je připisován lokální enzymatické demetylační aktivitě v ústní dutině. V bukální tkáni potkanů byla lokalizována monooxygenásová aktivita, která má vliv na metabolismus xenobiotik. Doposud nebyla uveřejněna práce, která by shrnovala informace o enzymové aktivitě lidské bukální sliznice zasahující do metabolismu návykových látek (Skopp et al., 1999).

3.2.2.5.3 Vliv pH slin a stimulace salivace

Na transport INL do slin resp. OT a na její koncentraci ve slinách resp. OT má vliv především pH v acinárním lumen a ve vývodných kanálcích SZ v momentu sekrece.

Matematický model popisující koncentrační poměr pro INL mezi slinami a plazmou vzhledem k acidobazickým vlastnostem INL, pH slin, pH plazmy a volné frakci INL ve slinách a plazmě (Matin et al., 1974).

Matematický model je odvozen od Henderson-Hasselbalchovy rovnice.

PRO LÁTKY KYSELÉ POVAHY PLATÍ:

$$S/P = \frac{1 + 10^{(pH_s - pK_a)} * f_p}{1 + 10^{(pH_p - pK_a)} * f_s} \quad (1)$$

PRO LÁTKY BAZICKÉ POVAHY PLATÍ:

$$S/P = \frac{1 + 10^{(pK_a - pH_s)} * f_p}{1 + 10^{(pK_a - pH_p)} * f_s} \quad (2)$$

Kde:

S...koncentrace INL ve slinách

P...koncentrace INL v plazmě

pK_a ... pK_a dané INL

pH_s ... pH slin

pH_p ... pH plazmy

f_s ...volná (nevázaná) frakce INL ve slinách

f_p ...volná (nevázaná) frakce INL v plazmě

V případě uvedených rovnic se považuje pH plazmy za konstantní o hodnotě 7,4. Vazebná kapacita proteinů ve slinách je zanedbatelná, jak už bylo uvedeno v kap. 3.2.2.5.1, a proto f_s je 1 (Hold et al., 1995). Z tohoto poznatku vyplývá, že na poměr S/P pro danou INL má značný vliv i malá změna pH slin. pH slin bez předchozí intenzivní stimulace se pohybuje v rozmezí 6,2-7,4. Za normální situace mají tedy sliny nižší pH než plazma, proto je koncentrační poměr pro kyselá látky menší než jedna. Naopak pro bazické látky je hodnota poměru S/P větší než jedna a lze tak předpokládat, že ve slinách resp. OT můžeme stanovit vyšší koncentraci INL (a tedy případně i opiátů) s bazickým charakterem.

V případě intenzivní stimulace salivace nastává jiná situace. pH slin je přímo úměrné rychlosti sekrece slin (Paxton, 1979). Při intenzivnější stimulaci salivace procházejí sliny rychleji distálním slinným kanálkem, což vyvolává změny v transportu elektrolytů. Ve slinách, které jsou secernovány do orální dutiny, je potom ve výsledku vyšší koncentrace sodných kationtů a zejména bikarbonátů. Právě bikarbonáty mají hlavní podíl na zvýšení pH slin. Při intenzivní stimulaci může hodnota pH slin vzrůst až na hodnotu 8,0 (Drobitch and Svensson, 1992).

Je-li pK_a bazické INL větší než 8,5 a kyselá INL menší než 5,5 nebo je-li droga neionizovaná, potom má pH slin pouze malý vliv na koncentraci INL ve slinách.

Pro látky s pK_a 5,5-8,5 se koncentrační poměr S/P může značně lišit, protože se zde uplatňuje efekt pH slin (Kidwell et al, 1998). Do této skupiny látek se řadí právě opiáty. V důsledku předpokládaného vlivu pH a stimulace salivace na koncentraci INL (opiátů) ve slinách bylo provedeno několik studií (O'Neal et al., 2000).

3.2.2.5.4 Vliv orálních depozit INL

Cone (1993) potvrdil na základě experimentů vliv orálních depozit parentní látky na koncentraci opiátů v orální tekutině. Koncentrace heroinu a jeho metabolitů, 6-acetylmorfinu a morfinu byly značně zvýšené v OT na rozdíl od koncentrací těchto látek v plazmě první hodinu po intranasální aplikaci

heroinu. Jenkins (1995) sledoval rozdílné koncentrace heroinu v OT po intravenózní aplikaci a kouření. Po kouření se koncentrace heroinu v OT pohybovaly v rozmezí 3534-20 580 ng/l. Po intravenózní administraci byl rozsah koncentrací heroinu pouze 6-30 ng/l. Autor připisuje rozdílné koncentrace heroinu v OT právě vlivu depozit této látky v ústní dutině. V klinické studii, která se zabývala detekcí kodeinu ve slinách po jeho perorálním podání, byla také pozorována kontaminace vzorků orálními depozity kodeinu. Koncentrační poměry S/P pro kodein u vzorků odebraných 1-2 hod po podání látky byly vysoké (O'Neal et al., 1999).

Tab. č. 2 Koncentrace kodeinu v plazmě a orální tekutině a poměr S/P-důkaz orální kontaminace (O'Neal et al., 2000)

Čas (h)	Koncentrace kodeinu v plazmě (ng/ml, průměrná hodnota)	Koncentrace kodeinu v orální tekutině (ng/ml, průměrná hodnota)	Koncentrační poměr pro kodein S/P (průměr)
0	0	0	0
0,25	12	4129*	345
0,5	38	1172*	31
1	37	480*	13
2	34	154*	4,5
4	18	60	3,3
8	5	19	3,8
10	4	11	2,8
12	2	7	3,5

* evidentní vliv orální kontaminace na koncentraci kodeinu v OT

3.3 Techniky odběru slin respektive OT

Obecně lze odběr slin resp. OT provést prostým odplivnutím do odběrové nádoby, volným odtokem slin/OT do odběrové nádoby, absorpcí slin/OT na odběrový materiál nebo odsátím slin/OT pomocí speciálního odběrového zařízení na principu vakuové pumpy.

Běžným a dost častým jevem, se kterým se potýkáme při odběru slin/OT, je získání malého objemu vzorku. Rychlost sekrece slin bez předchozí stimulace je totiž pouze cca 0,5 ml/ min. Častým problémem je i syndrom suchých úst „dry mouth“, který bývá vyvolán především sociálními zábranami testovaných osob. Tento jev snižuje salivaci, což ztěžuje odběr adekvátního množství vzorku (Samyn et al., 1999).

K dosažení adekvátního objemu slin/OT pro vlastní analýzu lze využít různé typy stimulace salivace. V první řadě lze využít mechanických stimulů. Žvýkání žvýkačky, použití parafinového vosku, parafilmu ©, gumových pásek nebo kousků teflonu může stimulovat slinné žlázy k sekreci 1-3 ml/min. Při použití těchto stimulačních technik je doporučováno akumulovat sliny/OT v ústní dutině až do doby, kdy se objeví potřeba polknutí. Tak lze snáze odebrat větší množství slin/OT do odběrové nádoby. Testovaná osoba by se měla vyhnout opakované expektoraci. Tím je zabráněno tvorbě bublin, které mají vliv na pH slin a případně by tak mohly negativně ovlivnit koncentrační poměr S/P pro hledanou INL (Mucklow, 1982).

Další možností efektivní stimulace salivace je použití chuťových stimulátorů. Nejvíce je využívána kyselina citrónová ve formě dropsů nebo krystalků. Použití chuťového stimulátoru může zvýšit rychlost produkce slin až na 5 – 10 ml/min (Vining a McGinley, 1985). Pro zvýšení sekrece slin po delší časovou periodu byl v některých experimentech použit parasymptomimeticky působící pilokarpin. V dávkách, ve kterých pilokarpin stimuluje salivaci, však působí řadu nežádoucích účinků, proto se s tímto typem stimulace v komerčních testovacích soupravách neseťkáme (Samyn et al., 1999).

Stimulace salivace ať chuťová nebo mechanická by neměla mít vliv na koncentraci INL ve slinách a stimulátory by měly být inertní vůči stanovované látce.

Při používání některých stimulačních technik a některých druhů stimulátorů v praxi byl však pozorován jejich negativní vliv na objem odebraného vzorku nebo na transport INL do slin (Chang, 1976; O'Neal, 1999).

Pro usnadnění odběru orální tekutiny byly vyvinuty některé techniky. Odběrová souprava Salivette (Sarsted, Germany) je tvořena bavlněným tampónem. Žvýkáním tampónu lze získat vzorek slin/OT o objemu 1 – 1,5 ml. Centrifugací tampónu v odběrové nádobce získáme vzorek slin/OT k následné

analýze (Haeckel et al., 1989). Bylo zjištěno, tento typ materiálu může adsorbovat molekuly analytu, nebo poskytovat složky interferující s immunoassays (Hold et al., 1995).

Jinou odběrovou pomůckou je Omni - Sal device (Saliva Diagnosis System), která je tvořena plastovou tyčinkou s absorpčním papírkem a patentovaným indikátorem signalizujícím adekvátní množství naabsorbovaného vzorku OT. Tyčinka je vložena pod jazyk a absorbovaný adekvátní objem vzorku je signalizován barevnou změnou indikátoru. Papírek se vzorkem je vložen do transportní zkumavky s puřem a odeslán k analýze (Samyn et al., 1999). Podobný systém využívá i testovací souprava Cozart Rapiscan System (Cozart Bioscience, V. Británie).

DrugWipe Saliva Test (Securitec, Mnichov, Německo) využívá odběrové stěrky „wiping pin“ k odběru vzorku slin/OT z povrchu jazyka. Odebrané sliny resp. OT je přenesena vymytím ze stěrky „wiping pin“ přímo na testovací stripy. Pomocí stěrky „wiping pin“ se odeberou nejvýše 2 μ l tekutiny a tento způsob odběru zaručuje velkou přesnost. Na druhou stranu ale tento způsob odběru vede k nedostatečnému množství vzorku pro spolehlivé výsledky (Pichini et al., 2002).

Schramm et al. (1990) vyvinul zařízení pro odběr OT, které pracuje na principu osmotické pumpy. Odběrová pomůcka je tvořena vakem ze semipermeabilní membrány, která nepropouští molekuly o vyšší molekulové hmotnosti. Uvnitř vaku se nachází osmoticky aktivní cukry. Po vložení vaku do úst dochází k ultrafiltraci OT. Výhodou této metody odběru je vyloučení mucinů a tím snížení viskozity odebraného vzorku OT a navíc je sníženo riziko kontaminace vzorku krví. Tím je vyloučena přítomnost proteinů plazmy schopných vázat stanovovaný analyt ve vzorku. Nevýhodou ultrafiltrace je fakt, že hustota odebrané tekutiny je velká díky přítomnosti cukrů, proto se pro určení aktuální koncentrace analytu ve vzorku používá korekční faktor odvozený od hustoty odebrané tekutiny. Odběr je také poměrně zdlouhavý ve srovnání s jinými odběrovými metodami.

Liang et al. (2000) vyvinul aspirátor, který odsává OT z ústní dutiny. Aspirátor je součástí Life Point Impact System, což je nový typ kvalitativního testu využívajícího ROI (tzv. *ON-SITE TEST*) pro průkaz INV ve slinách resp. OT (Foley et al., 2001).

3.4 On-site testy

3.4.1 Úvod

Pro průkaz INL a tedy i opiátů v OT lze využít ROI ve spojení s chromatografií-*ON-SITE testy*. Snadná proveditelnost testů a poměrně rychlý odečet výsledků (provedení testu trvá několik minut) předurčuje použití těchto testů při silničních kontrolách nebo v detoxikačních centrech. Tyto orientační kvalitativní testy pro průkaz INL ve slinách/OT nevyžadují speciální odběrové techniky.

V současné době se lze setkat na zahraničních trzích s řadou rychlých orientačních kvalitativních testů pro průkaz opiátů v orální tekutině. Jedná se o testovací soupravy především amerických, britských a německých výrobců. Mezi tyto testy patří například RapiScan Oral Fluid Drug Test (Cozart BioScience Ltd.), DrugWipe (Securetec), OralScreen (Avitar).

Testy dle použité technologie umožňují detekci jedné nebo několika různých skupin INL paralelně v jednom vzorku OT.

3.4.2 Princip on-site testů

Rychlé kvalitativní testy pro průkaz INL v OT jsou založeny na kombinaci imunotechniky a tenkovrstvé chromatografie (TLC). Přesněji se jedná o průtokové laterální chromatografické imunotesty.

Základem testů je reakce mezi antigenem (INL) a protilátkou proti chemické struktuře INL.



Testy od různých firem se liší typem provedení. Obecně se jedná o kompetici imobilizovaného konjugátu INL a INL přítomné ve vzorku o vazebné místo na protilátce. Protilátky navázané na mikročástice se buď přidávají k testovanému vzorku před nanesením na start testovací karty nebo, a to u

většiny testů převažuje, jsou protilátky nanášeny již na imunochromatografické vrstvě. Vzorek difunduje laterální imunochromatografickou vrstvou. V případě, kdy je ve vzorku přítomna INL v koncentraci vyšší než je detekční limit testu, dochází k vyvázání protilátek proti dané INL. V tomto případě nedochází ke zbarvení linie v testovací oblasti. Nepřítomnost barevného precipitátu v testovací linii poukazuje na přítomnost testované INL ve vzorku OT. Je-li ve vzorku koncentrace INL nižší než je detekční limit testu, dojde k vazbě protilátek na imobilizovaný konjugát INL v testovací linii. Následně vzniká barevný precipitát v testovací linii. Vzniklé zbarvení v testovací linii nemusí však signalizovat nepřítomnost INL ve vzorku OT (viz koncentrace INL ve vzorku pod detekčním limitem testu). Protilátky proti strukturám INL jsou většinou myší protilátky třídy IgG. Na testovací kartě je i kontrolní zóna. Vznik barevné linie v kontrolní zóně signalizuje kompletní laterální difúzi vzorku imunochromatografickou vrstvou. V případě, že barevná linie v kontrolní zóně chybí, je test považován za neplatný a je nutné ho zopakovat.

Cozart RapiScan Oral Fluid Drug testing System, OralScreen Systém (Avitar), DrugWipe a DrugRead (Securitec) využívají protilátky značené koloidním zlatem (Spiehler, 2001).

Niedbala et al., (2000) vyvinul ROI, která využívá jiné značení protilátek. Protilátky jsou značeny lanthanidovými částicemi, které absorbují infračervené záření a emitují záření ve viditelné oblasti spektra (Up-Link Rapid Detection System, OraSure Technologies, Inc., Bethlehem). Biologické matrice takto nefluoreskují. Protilátky značené mikročásticemi, obsahujícími fosforeskující látky, jsou ukotveny na chromatografické laterální membráně a jsou mobilizovány při difúzi tekuté směsi vzorku a pufru membránou. Vzárostající koncentrace INL ve vzorku snižuje koncentraci volných molekul protilátky, které v testovací zóně reagují s imobilizovaným konjugátem INL. K dispozici jsou různé typy fosforeskujících látek, které emitují viditelné světlo o vlnových délkách 475, 505, 550, a 720 nm. Tak lze označit současně více protilátek v jedné testovací kazetě, čímž je umožněna detekce několika typů INL najednou. Test simultánně detekuje amfetamin, metamfetamin, PCP a opiáty v OT.

On-site testy, které jsou využity k detekci INL ve slinách/OT, by měly detekovat přímo hledanou INL, nebo by měly mít významnou zkříženou reaktivitu s parentní látkou a jejími lipofilními metabolity.

3.4.3 Konfirmace výsledků získaných analýzou OT pomocí on-site testů

Pro nízkou senzitivitu testů a pro různou specifiku testů jsou při pozitivních výsledcích zbylé vzorky OT zasílány do toxikologické laboratoře ke konfirmaci senzitivnější analytickou metodou.

V některých zemích se vyžaduje kromě zbytku vzorku OT také vzorek moči případně krve pro paralelní analýzu.

Dostatečně senzitivní a hojně využívanou konfirmační metodu je plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). K dispozici jsou studie, kde bylo spojení GC-MS využito ke konfirmaci předepisovaných opiátů (Jones et al., 2002), opiátů a metadonu (Moore et al., 2001), heroinu (Jenkins et al., 1995). Výsledky testů jsou pouze orientační, nenaznačují nic o kvantitě INL ve vzorku a o způsobu jejího podání.

3.5 Opiáty v OT

3.5.1 Stručné pojednání o opiátech

Opium je sušená šťáva z nezralých makovic máku setého (*Papaver somniferum*). Mezi alkaloidy obsažené v opiu patří například morfin a kodein. Kromě přírodních alkaloidů existuje řada syntetických a polosyntetických derivátů morfinu, které vykazují podobnou farmakologickou aktivitu jako morfin. Tato širší skupina látek nese označení opioidy (opiáty).

Opiáty obecně působí výrazně analgeticky. Dalšími efekty na organismus jsou ospalost, mióza, nevolnost, snížení motility střev a ve vyšších dávkách i útlum dýchání (Samyn, 1999). Mezi oblíbené INL opiátového typu patří právě opium, heroin, morfin, kodein a další. Podání opiátů je možné převážně intravenózně, popř. kouřením, šňupáním nebo perorálně. V lékařské praxi se

opiáty aplikují převážně pro útlum bolesti u těžkých poranění a zejména potom při léčbě onkologických onemocnění.

Opiáty podléhají většinou rychlé metabolizaci a poskytují řadu společných metabolitů, které se liší svou liposolubilitou a tak schopností difundovat do slin.

3.5.2 Metabolismus opiátů

Některé opioidní metabolity jsou typické pro své parentní INL. Noroxykodon je typický metabolit oxykodonu a 6-monoacetylmorfin je typický metabolit heroínu. Některé další opiáty jako jsou morfin, oxymorfon a hydromorfon, mohou být ve vzorku OT přítomny jako parentní INL anebo jako metabolity parentních INL a to kodeinu, oxykodonu a hydrokodonu. Důležitý je také fakt, že heroin, kodein a morfin sdílejí společné metabolity, což ztěžuje interpretaci výsledků z analýzy OT. Tak například ve vzorku identifikovaný morfin může pocházet z různých zdrojů. Zdrojem morfinu může být abúzus heroínu, legální či nelegální aplikace kodeinu nebo požití semen máku setého. Heroin je metabolizován v prvním stupni na 6-monoacetylmorfin, který je následně ve druhém stupni deacetylován na morfin. Kodein je metabolizován na norkodein, ale přibližně z 10% podléhá hydrolyze na morfin. Semena máku setého obsahují malé množství kodeinu ale i morfinu. Tyto látky mohou být také potenciálně zachyceny při screeningu v OT.

Syntetické opioidy propoxyfen a meperidin formují demetylované metabolity norpropoxyfen a normeperidin. Norpropoxyfen vykazuje pouze 25% farmakologické aktivity parentního propoxyfenu. Normeperidin má přibližně 50% analgetický účinek oproti meperidinu, ale vykazuje navíc excitační účinek na CNS a může vyvolávat křeče (Fishman et al., 2000).

3.5.3 Přehled některých provedených analýz opiátů ve slinách/OT

Nejstarší imunotechnika v kombinaci s TLC pro průkaz opiátů ve slinách, resp. v OT byla použita již v 70. letech minulého století. Leute et al. (1972) stanovovali ve slinách koncentrace methadonu a morfinu a porovnávali je

s koncentracemi téže látek v moči. Koncentrace látek se v jednotlivých tekutinách lišily.

Morfin byl detekován ve slinách po aplikaci heroinu (Cone, 1993; Jenkins et al., 1994; Moore et al., 2001; Piekoszewski et al., 2001).

Hydromorfon byl konfirmován ve slinách pomocí GC-MS s využitím metoximinového derivátu (Jones et al., 2002).

Kodein byl detekován ve slinách s poměrem S/P= 3,3 (Kim et al., 2002).

O'Neal et al. (1999) informoval ve své studii o průměrném koncentračním poměru S/P (sliny/plazma) pro kodein, S/P=3,7+/-0,28. Koncentrace kodeinu byly stanoveny v rozmezí 2h až 12h po orální administraci 30mg kodeinu. O'Neal navrhl, že by koncentrace kodeinu ve slinách mohla být využita k odhadu plazmatických koncentrací kodeinu prostřednictvím poměru S/P.

O'Neal (2000) detekoval kodein v 15 z 22 vzorků 24h po orálním podání 30mg roztoku kodein fosfátu. Kodein byl detekován pouze v 20-40% vzorků OT odebrané pomocí absorpčních tampónů.

Jehanli et al. (2001) ve své zprávě uvádí, že s využitím odběrové a testovací soupravy Cozart RapiScan, byl ve slinách třech dobrovolníků z pěti detekován kodein 24h po orálním aplikaci 16mg kodeinu. Tyto pozitivní výsledky byly konfirmovány pomocí GC-MS, cut-off koncentrace byla 5 µg/l. Klinická senzitivita pro kodein byla 91% a klinická specifita pro kodein byla 98%.

V OT byly detekovány další opiáty a opioidy, vydávané na lékařský předpis. Detekovány byly například hydrokodon, oxykodon (Jones et al., 2002), dihydrokodein (Skopp et al., 2001) a fentanyl (Silverstein et al., 1993).

Fernandes, Moore, Jehanli a Sitaram (TIAFT, Prague 2001) testovali vzorky OT na přítomnost folkodinu, který byl testovaným osobám podáván per os v chronických dávkách. K testování byl použit laboratorní test na principu enzymoimunoanalýzy a dále Cozart Rapiscan Oral Fluid Opiate Test. Pomocí on-site testu Cozart Rapiscan Oral Fluid Opiate Test byl folkodin detekován ve vzorcích OT ještě 6 dní po dávkovací periodě, na rozdíl od detekce s použitím on-site testu byl folkodin detekován pomocí laboratorní enzymoimunoanalýzy ve vzorcích ještě 12 dní po dávkovací periodě.

Metadon vykazuje „morphine- like“ účinky a to i přes odlišnou strukturu ve srovnání s morfinem a bývá řazen mezi opiáty. Používá se při detoxikační terapii u závislých na heroinu pro zmírnění abstinenčních příznaků.

Wolf et al. (1991) na základě provedených experimentů navrhl, že by koncentrace metadonu ve slinách/OT mohla být využita k odhadu plazmatické koncentrace metadonu a tím k monitorování užívání metadonu například v odvykací terapii. Dobrovolníci z centra léčby drogové závislosti poskytli vzorek OT odplivnutím do plastové nádoby před aplikací denní dávky metadonu. Před odběrem vzorku byla stimulována salivace. Koncentrace metadonu v plazmě a slinách/OT byla stanovena pomocí HPLC. Při provedení lineární regrese byl zjištěn korelační koeficient 0,8. Koncentrační poměr pro metadon S/P byl 1,3. Bermejo et al. (2000) informoval o vlivu pH slin na S/P pro metadon. Při rozmezí pH slin 5,0-7,0 byl průměrný koncentrační poměr S/P pro metadon 3,7 (n=10). Moore et al. (2001) detekoval metadon ve slinách klientů detoxikačního centra pomocí Cozart RapiScan Saliva kvalitativního testu. Ke confirmaci bylo využito spojení GC-MS. GC-MS potvrdilo 37 pozitivních výsledků z 37 pozitivních výsledků zjištěných kvalitativním testem a 34 negativních výsledků z 34 negativních výsledků zjištěných kvalitativním testem.

3.5.4 Cut-off koncentrace ve slinách resp. OT pro opiáty při využití kvalitativních analytických testů, senzitivita a specifita

Protože koncentrace opiátů a jiných INL ve slinách resp. OT není stabilní a závisí na celé řadě faktorů, je doporučeno využívat cut-off koncentrace ve slinách/OT spíše než stanovovat absolutní koncentrace jednotlivých látek. Je-li výsledek kvalitativního orientačního testu pozitivní, lze usuzovat na přítomnost dané drogy nebo jejího lipofilního metabolitu ve vzorku. U některých ROI se lze setkat se zkříženou reaktivitou látek podobajících se svou strukturou testované INL. Zkřížená reaktivita snižuje specifitu testu pro danou látku a může vést k falešně pozitivním výsledkům na přítomnost dané látky.

Senzitivita testu= $\frac{\text{správně pozitivní } v}{(\text{správně pozitivní } v + \text{falešně negativní } v)}$

Specifita testu= $\frac{\text{správně negativní } v}{(\text{správně negativní } v + \text{falešně pozitivní } v)}$

v = výsledek

Centra pro drogově závislé v USA využívají při aplikaci ON-SITE cut-off koncentrace ve slinách pro ekvivalenty morfinu 40µg/l a při konfirmaci cut-off koncentrace pro morfin 40µg/l, pro kodein 40 µg/l a pro 6-monoacetylmorfin 4 µg/l (Substance Abuse and Mental Health Administration-SAMHSA, 2000).

United Kingdom využívá v případě konfirmace cut-off koncentrace pro opiáty 15 µg/l, při využití kvalitativního testu Cozart RapiScan Oral Fluid Test For Opiates je cut-off koncentrace pro opiáty 30 µg/l (Spiehler et al., 2001).

Laboratorní test na detekci opiátů v OT (Intercept, OraSure Technologies, Bethlehem, USA) používá cut-off koncentraci 10µg/l ve zředěné orální tekutině. Byla nalezena korelace s výsledky, které byly zjištěny při analýze moči u stejných uživatelů heroinu (Niedbala et al., 2001). 15min po požití 5,2-40g semen máku setého byly ve slinách detekovány opiáty, 1h po požití semen byly již výsledky negativní. 6-monoacetylmorfin nebyl detekován ve slinách.

On-site test UPLink System (OraSure Technologies, Inc.) byl testován pro zjištění specifity a senzitivity. Při cut-off koncentraci 40µg/l morfinových ekvivalentů byla senzitivita pro opiáty (porovnáno s výsledky z GC-MS analýzy) 62% a specifita 84% (Niedbala et al., 2001). U testu byla detekována zkřížená reaktivita 87% s 6-monoacetylmorfinem, 73,7% s diacetylmorfinem, 60% s kodeinem, hydrokodonem, hydromorfonem a 30-40% s oxykodonem, oxymorfonem a normorfinem.

Cut-off koncentrace u Cozart RapiScan Oral Fluid Drug Testing System (Cozart BioScience Ltd, Abingdon, UK) byla navržena 10 µg/l ekvivalentů morfinu ve zředěné orální tekutině a 30 µg/l ekvivalentů morfinu v neředěných slinách. Protilátka používaná v tomto testovacím systému zkříženě reaguje s morfinem, 6-monoacetylmorfinem, heroinem, dihydrokodeinem a kodeinem. Pozitivní výsledky na přítomnost opiátů ve slinách byly potvrzeny v 18 vzorcích z 22 pomocí GC-MS (Moore et al., 2001).

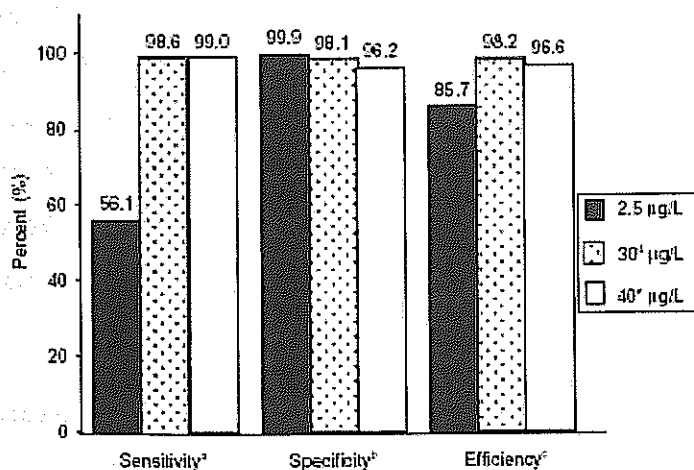
Cooper et al. (2004) detekovali opiáty ve slinách pomocí semikvantitativního testu Cozart Microplate EIA. Cílem studie bylo určit charakteristiky dané testovací soupravy a ohodnocení její vhodnosti k analýze

opiátů v OT. Vzorky OT byly odebrány pomocí odběrové soupravy Cozart RapiScan Collection System od 216 osob zařazených v detoxikačním programu. Tyto osoby podléhaly pravidelnému drogovému monitoringu.

Vzorky byly analyzovány pomocí enzymoimunoanalýzy a výsledky byly potvrzovány pomocí GC-MS. 109 vzorků z 216 celkových vykazovalo pozitivitu pro opiáty. V porovnání s GC-MS byla senzitivita testu Cozart Microplate EIA 99,1% a specifita 94,4%. Ve studii byly testovány také vzorky s potenciálními nežádoucími příměsi, které by mohly eventuálně interferovat s immunoassays nebo z různých příčin znemožnit provedení testu. Byl testován například hemoglobin, džus, zbytky potravy. Nebyly zjištěny významné změny ve výsledcích analýzy po přidavku příměsí. U testu byla také zjištěna přijatelná zkřížená reaktivita pro parentní drogy a jejich metabolity nalezené v OT.

Kacinko et al. (2004) porovnávali kvalitativní test RapiScan Oral Fluid Drug Test (Opiates CRS) se semikvantitativním testem Cozart Microplate EIA Opiate Oral Fluid Kit (Opiate ELISA) a s GC-MS. Po kontrolované chronické orální administraci kodeinu (60mg/70kg nebo 120mg/70kg) dobrovolníkům byla orální tekutina analyzována pro kodein a jeho metabolity norkodein, morfin a normorfin. Celkem bylo odebráno 1273 vzorků. Morfin a normorfin nebyly ve vzorcích detekovány. 26,5% vzorků bylo pozitivních pro kodein a 13,7% pozitivních pro norkodein.

Obr. č. 4 Senzitivita, specifita a efficiency Cozart RapiScan Oral Fluid Drug Testing System v porovnání s Cozart® Microplate EIA Opiate Oral Fluid Kit na různých hladinách cut-off koncentrací opiátů v orální tekutině (Kacinko et al., 2004)



(a) Senzitivita = true positive / (true positive + false negative)*100

(b) Specifita = true negative / (true negative + false positive)*100

- (c) Efficiency=účinnost = $(\text{true positive} + \text{true negative}) / (\text{true positive} + \text{true negative} + \text{false positive} + \text{false negative}) * 100$
- (d) Screening cut-offs ($\mu\text{g/l}$) běžně užívané ve Velké Británii pro testování opiátů v orálních tekutinách
- (e) Doporučená cut-off ($40 \mu\text{g/l}$) koncentrace pro screening opiátových metabolitů v orální tekutině v USA (Substance Abuse and Mental Health Services-SAMHSA)

Na základě výsledků analýzy byla porovnávána specifita, senzitivita a efficiency (účinnost) kvalitativního testu Opiate CRS ve srovnání s Opiates ELISA a GC-MS na různých hladinách cut-off koncentrací INL a jejich metabolitů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Parametry studie

4.1.1 Cílová skupina projektu

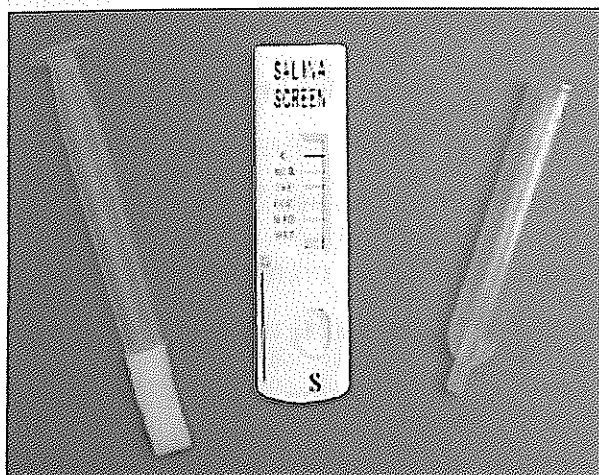
Problematika využití extralaboratorních testů kombinujících ROI s TLC se dotýká prakticky celé populace České republiky, zejména lidí ve věkovém rozmezí 14-60 let. V popředí zájmu se nachází monitoring markerů nejčastěji u nás se vyskytujících INL – opiáty, kannabinoidy, amfetaminy a méně často vyskytující se kokain. Využití on-site testů je spojeno zejména s problematikou týkající se screeningového testování abúzu INL při silničních kontrolách, na pracovištích, v monitoringu sociálně problémových občanů a také mládeže na školách.

4.1.2 Nabídka on-site testů na našem trhu

Na českém trhu byly k dispozici v době projektu pouze dva výrobky a to souprava SalivaScreen 5 Test SYNTRON BIORESEARCH (dále jen

SYNTRON) a Saliva Screen VI, ULTIMED (dále jen ULTIMED). Dodavatelem testerů SYNTRON je firma Dynex, s.r.o. Praha a značky ULTIMED je společnost JK-Trading, s.r.o. Karlovy Vary. V době programu se jiné soupravy na českém trhu nepodařilo zajistit.

Obr. č. 5 souprava SYNTRON



Převzato ze stránek firmy Dynex: <http://shop.dynex.cz>

Pro další fáze projektu bylo následně zakoupeno 100 kusů souprav od každého výrobce.

4.1.3 Výběr vhodného souboru osob pro testování zakoupených souprav

K testování analytické účinnosti zakoupených souprav byl vybrán statisticky reprezentativní vzorek cílové populace. Do projektu byly zahrnuti někteří klienti Detoxikačního centra, poraden pro toxikomanie a další pacienti, zejména z Onkologické kliniky.

4.1.4 Cílený odběr vzorků k analýze

Od vybraných skupin osob, viz předcházející odstavec, byly postupně odebrány dvojice vzorků slin a moči v průběhu měsíců leden - září 2004. Již od počátku probíhaly současně analýzy odebraných vzorků slin a moči pomocí instrumentálních screeningových metod EMIT (Enzyme Multiplied Immuno Technique) a konfirmace pomocí GC/MS (Gas Chromatography/ Mass

Spectrometry). Cílem této analýzy bylo zajistit výběr pozitivních vzorků v celé širší detekovatelného koncentračního rozmezí dle intralaboratorních detekčních limitů GC/MS metodik (Standardní operační postupy Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, k dispozici u Dr. Voříška). Konfirmované pozitivní vzorky slin byly zamrazeny na -70° C. Následně tyto vzorky byly použity k testování zakoupených imunochemických souprav.

4.1.4.1 Odběr slin / OT

- otevření zkumavky, která je opatřena uzávěrem, uvolnitelným kývavým pohybem, uvnitř zkumavky je váleček s uvolnitelným odběrovým tampónem
- vložení absorpčního tampónu do úst vyšetřované osoby, sycení tampónu slinami/OT po dobu jedné minuty (Inekousat)
- vyjmutí tampónu se vzorkem slin/OT a uložení do válečku a následně do zkumavky, uzavření zkumavky uzávěrem a následný transport k analýze

4.2 Hodnocení imunochemických testovacích souprav

4.2.1 Nabídka výrobků na českém trhu

viz kapitola 4.1.2

4.2.2 Spektrum látek detekovatelných jednotlivými testovacími soupravami

4.2.2.1 Souprava Syntron

Amfetaminy (AMP)

Cocaine (COC)

Marijuana (THC)

Opiates (OPI)

Phencyclidine (PCP)

4.2.2.2 Souprava Ultimed

Opiáty/ Morfin (OPI)

Marihuana (THC)

Cocain/Benzoylecgonine (COC)

Methadon (MAD)

Methamphetamin (MET)

Pozn. : Převzato z českého návodu přiloženého distributorem k soupravám

4.2.3 Testování a porovnání souprav Syntron a Ultimed na vybraných reálných pozitivních vzorcích, v celém rozsahu detekovatelných koncentrací (tj. od detekčního limitu referenční metody výše) , slin a moče osob uvedených v kapitole 4.1.3

Pro korelační (praktické) vyhodnocení monitorovací účinnosti souprav, tj. schopnosti testu prokázat abúzus INL, bylo shromážděno 62 vzorků slin, pozitivních na některou ze skupin návykových látek, a k nim odpovídající počet vzorků močí. Navíc bylo analyzováno 13 prokazatelně anamnesticky negativních dubletů vzorků slin a močí pro ověření specifity orientačních testů. Současná analýza obou tělních tekutin slouží ke zjištění analytické účinnosti kvalitativních testovacích souprav v praxi. Zde tento kvalitativní parametr nazýváme monitorovací účinnost souprav.

S ohledem na farmakokinetiku většiny testovaných INL a na již zavedené osvědčené bioanalytické metody je zde analýza močí referenční metodou a výsledky analýzy ve slinách jsou následně k té vztahovány.

Výsledky v této fázi studie jsou velmi důležité pro rozhodování o zavedení souprav v praxi.

→ Kalkulace parametru monitorovací účinnosti $E_{ff\ monitor}$:

$$E_{ff\ monitor} = (N_{ref}N_{sal} + P_{ref}P_{sal}) / (N_{ref}N_{sal} + P_{ref}P_{sal} + P_{ref}N_{sal} + N_{ref}P_{sal})$$

Kde:

$P_{ref}P_{sal}$ je shodný pozitivní výsledek v moči a slinách : PP

$N_{ref}N_{sal}$ je shodný negativní výsledek ve slinách a moči : NN

$P_{ref}N_{sal}$ negativní výsledek orientačního testu ve slinách, pozitivní výsledek v moči : PN

$N_{ref}P_{sal}$ je pozitivní výsledek rychlotestu ve slinách, negativní výsledek v moči : NP

4.2.4 Správnost analýzy pomocí zakoupených souprav

Zjišťovali jsme míru shody mezi referenční GC / MS ve slinách/OT s výsledky kvalitativních testů ve stejné tekutině.

4.2.5 Určení specifiity, senzitivity a účinnosti souprav bez vztahu k rozdílné farmakokinetice látek ve slinách/OT a v moči

Byly testovány analyticky přesně definované vzorky slin/OT s přesně přidaným množstvím analytů.

Celkový počet souprav k testování vzorků se standardními přípravky:

SYNTRON-25

ULTIMED-25

4.2.5.1 Příprava vzorků se standardními přídatky analytů

Standardní množství daného analytu bylo přidáno ke slinnému blanku. Materiálem pro přípravu vzorků v této části studie byly kontrolní a standardní materiály firem Alltech, Inc. a Varian.

4.2.5.2 Vzorky slin se standardními přídávky

Tab. č. 3 Vzorek 1 se standardním přídávkem

vzorek	1
analyt	<i>kodein</i>
Koncentrace analytu v ng/ml	390
Počet provedených testů	5
Diference od hodnoty cut-off (%)	+30

Tab. č. 4 Vzorek 2 se standardním přídávkem

vzorek	2
analyt	<i>kodein</i>
Koncentrace analytu v ng/ml	210
Počet provedených testů	5
Diference od hodnoty cut-off (%)	-30

Tab. č. 5 Vzorek 3 se standardním přídávkem

vzorek	3
analyt	<i>morfin</i> <i>amfetamin</i>
Koncentrace analytu v ng/ml	52 52
Počet provedených testů	5
Diference od hodnoty cut-off (%)	+30u +73s, +4u

Tab. č. 6 Vzorek 4 se standardním přídávkem

vzorek	4
--------	---

analyt	<i>morfin</i> <i>amfetamin</i>
Koncentrace analytu v ng/ml	28 28
Počet provedených testů	5
Diference od hodnoty cut-off (%)	-30, -7s -44u

Tab. č. 7 Vzorek 5 se standardním přídatkem

vzorek	5
analyt	<i>benzoylekgonin</i> <i>amfetamin</i>
Koncentrace analytu v ng/ml	26 26
Počet provedených testů	5
Diference od hodnoty cut-off (%)	+30u, -13s -48u

Tab. č. 8 Vzorek 6 se standardním přídatkem

vzorek	6
analyt	<i>benzoylekgonin</i> <i>amfetamin</i>
Koncentrace analytu v ng/ml	14 14
Počet provedených testů	5
Diference od hodnoty cut-off (%)	-30u, -53s -48u

Tab. č. 9 Vzorek 7 se standardním přidavkem

vzorek	7
analyt	<i>morfin</i> <i>benzoylekgonin</i> <i>amfetamin</i>
Koncentrace analytu v ng/ml	40 40 40
Počet provedených testů	5
Diference od hodnoty cut-off (%)	+33s, +33u +100u, +33s -28

Kde:

n je počet provedených testů

dif cut-off je kladná nebo záporná diference koncentrace analytu v procentech od prahové hodnoty

s je cut-off SYNTRON

u je cut-off ULTIMED

4.2.5.3 Výpočet senzitivity, specifčnosti a účinnosti testovaných imunochemických souprav

Výpočty byly prováděny dle v praxi používaných vztahů:

$$\text{Specifita} = (TN)/(TN+FP)$$

$$\text{Senzitivita} = (TP)/(TP+FN)$$

$$\text{Účinnost} = (TN+TP)/(TN+TP+FN+FP)$$

4.2.6 Provedení kvalitativního imunochromatografického testu

Postup dle návodu přiloženého k testovací kartě

- Aplikace slin do startovacího okénka pomocí jednorázové pipety (2-3 kapky)
- Průběh testu zpravidla 5-10 min
- Vizuální odečet výsledků

Přítomnost INL ve vzorku slin/OT je signalizována nepřítomností barevné precipitační linie v místech ukotveného konjugátu INL na testovací kartě. Test je neplatný v případě chybění barevné precipitační linie v kontrolní zóně!

- Konfirmace vzorků senzitivní analytickou metodu (GC-MS)

4.2.7 Konfirmace výsledků imunochromatografického testu ve slinách

Ke konfirmaci výsledků získaných kvalitativními testy jsme použili instrumentální metodu plynovou chromatografií ve spojení s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (GC-MS).

► Parametry GC-MS:

Systém GC-MS: Magnum Finnigan MAT (dnes firma ThermoElectron, Inc.)

Injektor: Lauber injektor

Autosampler: A200S, Finnigan MAT

Pumpa: turbopumpa PFEIFFER TP 4/4, 020-065, výkon 60 l/min

GC kolona: ZB1ms; délka 30m; síla vrstvy stacionární fáze 0,25 mm

Stacionární fáze: 100 % dimethylpolysiloxan

Teplotní program pro GC:

70 °C; 1 min

70 °C – 200 °C při 30 °C/min (teplotní gradient)

200 °C - 260 °C při 8 °C /min (teplotní gradient)

260 °C 28 min

Derivatizační činidlo pro opiáty: PFPA – pentafluorpropionylanhydrid, derivatizací vznikají pentafluorpropionylanhydrikové deriváty

Metoda ionizace: Elektron Impact – elektronová ionizace

Rychlost skenu: 5 μ Scans

Celková doba trvání analýzy: 35 min

Monitoring hmot:

morfin - 414, 119, 267, 268, 577, 578, 430

kodein – 282, 266, 267, 268

6-monoacetylmorfin - v důsledku rychlé metabolizace ve slinách prakticky není přítomen

4.2.8 Konfirmační analýza opiátů, především morfinu a kodeinu, pomocí GC-MS v moči

Zde byla provedena analýza vzorků moči, které byly odebrány spolu se vzorky slin/OT.

V moči detekujeme především metabolity opiátů.

► Dekonjugace:

Dekonjugace byla provedena pomocí enzymu beta-glukuronidázy (lyofilizát enzymu z plže *Patella vulgata*).

- Ke 2 ml vzorku moče přidáno 200 µl octanového pufru pH 3,8 a 1 ml enzymu
- Vzorek inkubován s enzymem při 60 °C po dobu 2 hod
- Po zchlazení ke směsi přidány 2 ml 0,1M fosfátového pufru pH 6
- Promíchání směsi ve Vortexu a centrifugace po dobu 5 min při 3000 ot./min
- Po skončení centrifugace upraveno pH směsi na 6

► Extrakce:

Vakuový extraktor firmy Supelco

SPE-extrakce na pevné fázi, kolonky MP3 - katexy s C18 (Varian, Inc.)

- Nejprve provedena kondicionace kolonky pomocí 200 µl metanolu
- Následné propláchnutí kolonky 200 µl fosfátového pufru 0,1M pH 6
- Na kolonku nanášeny 2 ml dekonjugovaného vzorku
- Kolonka proplachována 500 µl destilované vody, 500 µl 0,1M kyseliny octové a 500 µl metanolu

- Sušení kolonky při vakuu 10 -20 palců po dobu 7 min
- Odpojení vakua a výměna zkumavky
- Aplikace 2 ml elučního činidla (ethylacetát : metanol: amoniak v poměru 8:2:0,2) na kolonku
- Volné odkapání eluátu do nové zkumavky
- Odpaření eluátu při 45 °C v atmosféře dusíku
- Derivatizace pomocí 100 µl PFFA při 70 °C po dobu 45 min

4.3 Výsledky hodnocení imunochemických testovacích souprav při analýze opiátů

4.3.1 Monitorovací účinnost testovacích souprav na základě porovnání s výsledky referenční analýzy moči

V tabulkách 10 a 11 nalezneme přehled výchozích výsledků (absolutní čísla) porovnávání testovacích souprav s referenční GC / MS analýzou.

Data z tabulky slouží k následnému výpočtu monitorovací účinnosti imunochemických testovacích souprav, viz kap. 4.2.3.

Tab. č. 10 Výsledkové dublety pro soupravu SYNTRON

	PP	PN	NP	NN	INV
OPIÁTY	5	12	2	41	2

Tab. č. 11 Výsledkové dublety pro soupravu ULTIMED

	PP	PN	NP	NN	INV
OPIÁTY	10	9	3	40	0

Kde význam zkratk viz kap. 4.2.3 a INV = invalidní výsledek, tzn. nedošlo ke vzniku precipitátu v kontrolní zóně.

Tab. č. 12. Monitorovací analytická účinnost souprav (%)

	E_{ff} SYNTRON ^{monitor} (%)	E_{ff} ^{monitor} ULTIMED (%)
OPIÁTY	77	81

4.3.2 Hodnocení správnosti analýzy pomocí imunochemických souprav

Tab. č. 13 Míra shody (%) mezi referenční metodikou GC/MS a kvalitativními testy při detekci INL ve stejné tělní tekutině, tj. správnost analýzy pomocí rychlotestů

	SYNTRON	ULTIMED
OPIÁTY	96	96

4.3.3 Specifičnost, senzitivita a účinnost testovaných analytických souprav

Tab. č. 14 Souprava SYNTRON

Celkový počet testů	100
TP	28
TN	48
FP	12
FN	12
INV	0
SR	78
FR	24
specifita	80 %
senzitivita	70 %
účinnost	76 %

Tab. č. 15 Souprava ULTIMED

Celkový počet testů	125
---------------------	-----

TP	55
TN	70
FP	0
FN	0
INV	0
SR	100
FR	0
specifita	100 %
senzitivita	100 %
účinnost	100 %

Kde,

TN...správně negativní výsledek

TP...správně pozitivní výsledek

FP...falešně pozitivní výsledek

FN...falešně negativní výsledek

SR...celkový počet správných výsledků

FR...celkový počet nesprávných výsledků

INV...invalidní výsledek = neplatný (proužek v kontrolní zóně se neobjevil)

Výpočet senzitivity, specifity a účinnosti byl proveden dle vztahů uvedených v kapitole 4.2.5.3.

Absence testu na amfetamin u soupravy Syntron vedla k rozdílnému počtu výsledků. Souprava Ultimed umožňuje současně testovat přítomnost metamfetaminu a jeho metabolitu amfetaminu, ale přidávané směsné standardy obsahovaly pouze amfetamin. V době průběhu studie byl také nedostupný standard některého z metabolitů kannabisu.

4.3.4 Deklarované hodnoty cut-off (ng/ml) od výrobce testovacích souprav pro opiáty

Tab. č. 16 SYNTRON

látka	cut-off koncentrace (ng / ml)
-------	-------------------------------

morfin	30
--------	----

Tab. č. 17 ULTIMED

látka	cut-off koncentrace (ng/ml)
morfin	40

5. DISKUZE

Všech cílů, které byly stanoveny na počátku studie, bylo dosaženo. Zjistili jsme, že nabídka kvalitativních testů kombinujících ROI a TLC na území České republiky je v porovnání s jinými státy Evropské unie a Spojenými státy americkými nedostatečná (viz kap. 3.4.1 a 4.1.2). Na počátku 21. století bylo na světovém trhu k dispozici 12 testovacích souprav komerčních i prototypů a lze předpokládat další vývoj nejenom v kvantitě ale i kvalitě těchto testů pro detekci INL ve slinách resp. OT (Verstraete, 2005).

Na základě všeobecného zájmu o využití těchto diagnostických setů v praxi se dá předpokládat, že by se na českém trhu mohly do budoucna objevit i další testovací soupravy od různých firem.

Z hlediska hodnocení analytických parametrů dvou zakoupených souprav se podařilo zajistit statisticky významný soubor vzorků slin. Kvalita projektu byla jednoznačně dána množstvím testovaných jedinců a možností selektivního výběru pozitivních vzorků (viz kap.4.1.3 a 4.1.4). Na základě tohoto řízeného výběru vzorků jsme dosáhli objektivního hodnocení analytických parametrů. Byla také zkrácena doba projektu, protože testování konfirmačně pozitivních vzorků redukovalo v praxi velmi běžný jev, a to výrazně vyšší podíl negativních vzorků testovaných toxikologickou laboratoří.

Podíváme-li se na samotné výsledky testování, můžeme konstatovat, že v případě monitorovací účinnosti, tzn. schopnosti průkazu abúzu opiátů, vykazuje souprava Syntron horší výsledky než souprava Ultimed (viz Tab 13.). K nižším hodnotám monitorovací účinnosti u soupravy Syntron přispívá také při testování pozorovaný jev a to problematická absorpce vzorku slin na chromatografickou vrstvu. Snížená a nedostatečná absorpce vzorku slin/OT na chromatografickou vrstvu zvyšuje riziko neadekvátní reakce antigen-protilátka a tím může ovlivnit vznik precipitátu. V porovnání se soupravou Syntron disponuje souprava Ultimed lepší odběrovou částí.

Dále při testování senzitivity, specifity a analytické účinnosti souprav za použití slin se standardními přídávky, jejichž koncentrace ve vzorcích byla volena dle deklarovaných a obecně přijímaných cut-off hodnot, dosahují výsledky pro jednotlivé testované analyty sto procent v případě použití soupravy

Ultimed. Výsledky dosažené při testování analytické účinnosti, specifity a senzitivity souprav za použití standardních přísad jsou výrazně horší u soupravy Syntron (viz Tab. 15, Tab. 16).

Hlavní výhodou a předností detekce přítomnosti INL ve slinách je především neinvazivnost celého postupu při odběru slin/OT. Vyšetřovaná osoba může poskytnout vzorek slin resp. OT pod dozorem vyšetřovatele a tím je vyloučena možnost alterace testovaného vzorku. Vzorky v případě testování řidičů motorových vozidel mohou být odebrány krátce po incidentu (Verstraete et al., 2005). Koncentrace INL ve slinách koresponduje s koncentrací nevázané frakce INL v plazmě a odpovídá i farmakologickému účinku INL. Euforie po podání heroinu se objevuje rychle a odeznívá během hodiny od jeho aplikace. Euforie koresponduje s farmakokinetickým profilem heroinu v krvi a ve slinách. Mióza způsobená heroinem se objevuje 15 minut po kouření nebo jeho intravenózní a přetrvává až 4 hodiny. Koncentrační profil morfinu a 6-monoacetylmorfinu, které jsou metabolity heroinu, v krvi a ve slinách koresponduje s nástupem a trváním miózy (Jenkins et al., 1994).

Odběr slin/OT může být komplikován na základě typu převažujícího neurovegetativního vlivu v momentu provádění úkonu (viz kap. 3.1.3.2). Některé léky a patologické stavy mohou inhibovat sekreci slin, a proto je velmi obtížné získat dostatečné množství materiálu pro analýzu (viz kap. 3.1.3.4). Také prosté odplivnutí (odslinění) do odběrové nádoby může pro některé osoby představovat dyskomfort a určité sociální zábrany, které ve výsledku mohou vyústit ve sníženou sekreci slin a v pocit sucha v ústech.

Dalším faktem je, že koncentrace INL ve slinách/OT odpovídá koncentraci volné frakce INL v plazmě. INL mají často krátký biologický poločas v plazmě a jsou rychle metabolizovány a exkretovány z těla, a proto je lze ve slinách detekovat jen po relativně krátkou dobu. Oproti moči nebo potu mají plazma a sliny krátké detekční okno. Uvádí se, že doba, po kterou lze detekovat parentní látky a jejich metabolity ve slinách, je cca 12-24 hodin po aplikaci (Cone, 1993). INL nebo jejich metabolity v moči a potu jsou detekovatelné po dobu několika dní nebo i měsíců. Při průkazu INV nebo jejího metabolitu v moči lze soudit, že látka byla aplikována 2-3 dny před testováním (Wolf et al., 1999). Ve vlasech lze INL nebo jejich metabolity stanovit dokonce i několik let po aplikaci v závislosti na délce vlasů. Obecně se předpokládá, že INL lze

detekovat v plazmě a ve slinách od vstupu do krevního oběhu až do doby rovné přibližně čtyřem biologickým poločasům dané látky s ohledem na konkrétní detekční limit zvolené analytické metody.

Toennes et al. (2000) vyšetřovali řidiče podezřelé ze zneužití návykových látek. Subjektům byl odebrán vzorek krve, moči a OT. Sérum, OT a moč byly poté testovány na přítomnost INL. Analýza THC, amfetaminů a opiátů v moči byla prováděna prostřednictvím Mahsan Combi/DOAY-testu, v séru byly analyzovány látky pomocí immunoassays a sliny/OT byly analyzovány pomocí systému GC-MS. Accuracy (přesnost) v korelaci mezi detekcí INL v OT a v séru pro všechny substance byla větší než 90%, mezi detekcí INL v OT a v moči s výjimkou THC taktéž větší než 90 %. Bylo zjištěno, že stanovení koncentrace INL v OT je vhodnější než v moči na základě korelace se symptomy abúzu INL a s analytickými daty získanými v séru.

Bennett et al. (2002) porovnávali přesnost metod kvalitativního testování OT a moči při screeningu abúzu INL. Byla porovnáována senzitivita a specifita on-site testů pro testování vzorků OT a moči odebraných za stejných podmínek. On-site testy pro detekci INL v orální tekutině a v moči byly porovnávány s přesnější laboratorní analýzou moči stejných vzorků. Testování bylo prováděno u 157 drogově závislých osob, 89% závislých na opiátech, 73% mužů, 85% ve věku od 20 do 35 let. Jako on-site testy byly využity SYVA ETS test pro močovou analýzu a Cozart RapiScan Oral Fluid Drug Test System pro testování slin/OT. Komparativní laboratorní močová analýza byla prováděna pomocí techniky microplate enzyme-immunoassay. Senzitivita testování OT a močové analýzy byla pro opiáty 91% resp. 91% a pro metadon 91% resp. 94%. Specifita testování orální tekutiny a močové analýzy byla pro opiáty 78% resp. 67% a pro metadon 90% resp. 95%. Závěrem bylo potvrzeno, že testování OT je přesné jako močová analýza při detekci přítomnosti opiátů a při detekci absence metadonu.

Na základě znalostí distribuce INL ve slinách a moči a znalostí jejich degradace v organismu je třeba doporučit použití orientačních rychlých testů, kombinujících imunotechniku a tenkovrstvou chromatografii pro INL ve slinách resp. v OT zejména v případech posouzení aktuálního stavu testované osoby. Výjimky lze pozorovat u látek, léčiv, které testovaná osoba užívá chronicky ve vyšších dávkách jako například v případě chronické administrace

dihydrokodeinu (Skopp et al., 2001). Na základě znalosti farmakologických faktů by se měla osoba provádějící test vyvarovat zbytečného použití orientačního testu a případné chybné interpretace negativního výsledku testu.

Na množství INV, která difunduje z plazmy do slinných žláz, má vliv celá řada faktorů, které jsou uvedeny v kap. 3.2.2. Současným působením jednotlivých faktorů na transport INL do slin je ovlivněn koncentrační poměr S/P pro danou INL. Tento poměr se může díky působení mnoha různých faktorů lišit od teoretického poměru kalkulovaného dle upravené Henderson-Hasselbachovy rovnice.

O'Neal et al.(2000) sledovali rozdílné koncentrace kodeinu ve slinách při různých hodnotách pH a výsledné koncentrační poměry S/P (sliny/plasma) porovnával s teoretickými S/P pro kodein při stejných hodnotách pH. Vzorky slin byly odebírány do inertní polyetylenové zkumavky a u každého vzorku bylo zjištěno pH. Na základě měření koncentrací kodeinu v plazmě a ve slinách byl proveden výpočet S/P. Hodnoty koncentračních poměrů S/P při pH=6,0 nebyly tak velké, jak předpokládal matematický model. Teoretický poměr S/P pro kodein při pH slin=6,0 je 20, při pH slin=7,0 pouze 2,3. Experimentem zjištěné hodnoty koncentračního poměru S/P byly při pH=6,0 4,7; při pH=7,0 3,4 a při pH=8,0 pouze 1,8. Pokles hodnot S/P při změně pH nebyl tak dramatický, jak předpokládal matematický model, ale byl zde demonstrován současný vliv více faktorů na přestup analyzované látky z plazmy do slin.

Mezi jednotlivými testovacími soupravami jsou zřejmé rozdíly v technice odběru vzorku OT, které mohou mít také vliv na výslednou koncentraci testovaného analytu ve slinách, resp. OT. Někteří analytici se zabývali adsorpcí INL na odběrový materiál, jejich recovery a absorpcí OT na odběrový materiál a její výtěžnost (O'Neal et al., 2000; Crouch et al., 2004). Výtěžnost OT byla u některých odběrových souprav v rozmezí 50-90%.

Tab. č. 18 Objemy orální tekutiny získané různými odběrovými soupravami (Crouch et al., 2004)

<i>Parametr</i>	<i>Salivette</i>	<i>Intercept</i>	<i>Finger col.</i>	<i>ORALscreen</i>	<i>Hooded col.</i>
<i>Objem odebraný(ml)</i>	1,86	0,82	1,62	1,76	1,69

Objem navracený(ml)	1,48	0,64	1,34	0,58	0,30
% Výtěžnost	83	78	77	33	18

Kacinko et al. (2004) porovnávali senzitivitu, specifitu a efektivitu testu Cozart RapiScan při různých koncentracích analytu ve vzorku OT. Na základě experimentů bylo zjištěno, že s ředěním vzorku OT klesá senzitivita testu.

Techniky, se kterými se často setkáváme, umožňují odběr většího objemu vzorku. Zisk většího objemu vzorku je umožněn celou řadou různých stimulatorů (viz kap. 4). Jejich použití s sebou ovšem nese také jistá rizika. U parafilmu © byla zjištěna silná adsorpce vysoce lipofilních molekul (Chang, 1976). Největší vliv na koncentraci opiátů ve slinách/OT má však chemická stimulace za použití kyseliny citrónové (O'Neal et al., 2000). Kyselá chuť stimuluje tvorbu slin, a tak získáme adekvátní množství vzorku pro analýzu. Již v kap. 3.2.2.5.3 jsem uvedl, že na koncentrační poměr S/P pro látky s $pK_a = 5,5 - 8,5$ má velký vliv změna pH slin. Do této skupiny látek se řadí právě opiáty. Stimulace kyselinou citrónovou sice vede ke zvýšení rychlosti produkce slin, ale zároveň působí změny ve složení iontů v sekundárních slinách, které se dostávají do ústní dutiny. Zejména dochází ke zvýšené sekreci bikarbonátů, což vede ke zvýšení výsledného pH slin. Slabě bazické látky (opiáty) tak zůstávají ve slinných žlázách a neprechází ve větším množství do slin. Bikarbonáty fungují jako pufrý a korigují pH slin po přidání kyselých látek. Kyselina citrónová je slabá kyselina a její přítomnost ve slinách nevede k výraznějšímu snížení pH slin.

Sledování vlivu různých typů stimulace salivace před odběrem vzorků k analýze na koncentraci kodeinu ve slinách bylo součástí studie O'Neala (O'Neal, 2000). Salivace byla stimulována mechanicky, žvýkáním žvýkačky, a chuťově, pomocí kyseliny citrónové. Kontrolní vzorky byly odebírány pouhým odsliněním do polyetylenové zkumavky. Koncentrace kodeinu v nestimulovaných slinách byla vyšší než ve slinách, které byly odebírány po stimulaci. Na základě výsledků O'Neal rozhodl, že při kyselé stimulaci došlo k největší produkci slin (1-5 ml/min), ale zároveň byly ve slinách naměřeny

nejmenší koncentrace kodeinu. Kyselá stimulace tedy v největší míře negativně ovlivňuje detekci kodeinu.

Fernandes et al. (TIAFT 2002, Paris, Proceedings P18, August 2002) sledovali vliv různých typů odběrů slin a vliv kyselé stimulace na koncentraci kodeinu ve slinách a jeho detekci pomocí kvalitativního testu. Odběr byl proveden pomocí prostého odplivnutí slin do odběrové nádoby a také pomocí Cozart Rapiscan Oral Fluid Collection Device. Sliny byly analyzovány pomocí Cozart Rapiscan Oral Fluid Drug Testing System. Část vzorků slin byla analyzována po odběru urychleném stimulací salivace pomocí slabě kyselých tablet Salivex. Nebyl prokázán vliv stimulace salivace pomocí slabě kyselých tablet na detekci kodeinu ve slinách pomocí kvalitativního testu Cozart Rapiscan Oral Fluid Drug Testing System.

Všeobecně není doporučováno používat pro testování INL ve slinách testy s protilátkami vytvořenými speciálně pro detekci analytů v moči. Protilátky pro detekci INL resp. jejich metabolitů v moči reagují převážně s hydrofilnějšími metabolity mateřské látky. Do slin se ale transportují pouze parentní INL, případně jejich lipofilnější metabolity. Takové testy mají tedy nižší specifitu pro detekci INL ve slinách. Dalším faktem je to, že testy pro analýzu v moči jsou nastaveny na vyšší cut-off hladinu koncentrací testovaných látek, metabolitů, než jsou koncentrace látek ve slinách/OT. Zvyšuje se tak pravděpodobnost velkého počtu falešně negativních výsledků při analýze vzorků slin (Samyn et al., 1999).

Pro správný průběh imunochemické reakce na chromatografické vrstvě je nezbytné, aby byl aplikován dostatečný objem vzorku slin/OT na startovací linii. Při nižších objemech testovaného vzorku se zvyšuje riziko alterace precipitační reakce. V případě naší experimentální části byla souprava Syntron citlivá vůči objemu aplikovaného vzorku slin díky problematické absorpci na chromatografickou vrstvu. Osvědčila se nám technika, při níž byly testovací desky v mírně svislé poloze (startovací místo je výše než opačný konec testovací chromatografické vrstvy). Správný průběh testu indikuje vznik precipitační linie v kontrolní zóně. V této zóně jsou ukotveny protilátky proti některým třídám imunoglobulinů (IgG). V případě, kdy se neobjeví precipitát v kontrolní zóně, považujeme test za neplatný. Odečet vzniku precipitační linie vnáší do interpretace výsledků testu určitou nejistotu. Hodnocení zrakem je

velmi subjektivní, záleží na rozlišovací schopnosti jedince. V případech nižší koncentrace INL ve vzorku může být precipitační linie slabá a ne každý člověk, který test odečítá, ji okem zachytí. Tak existuje riziko odečtení falešně negativního výsledku.

Některé testovací soupravy jsou vybaveny odečítacím zařízením, které minimalizuje riziko chybné interpretace výsledku testu. Zařízení pracuje na principu reflektometrie (reflektance světla) a výsledky jsou převáděny do numerické podoby, čímž je hodnocení testu objektivizováno. První testovací soupravou, která disponuje zařízením na elektronický odečet výsledků, je Cozart Rapiscan System (De Giovanni et al., 2002).

Testovací souprava Life Point Impact System eliminuje negativní vlivy obecně používaných technik odběru na koncentraci INL v OT. Test se vyznačuje vyšší senzitivitou a přijatelnou zkříženou reaktivitou mezi podobnými chemickými strukturami. Sliny jsou odebírány pomocí patentované metody založené na principu aspiračního zařízení, které je používáno například dentisty. Sliny kontinuálně protékají do testovací cely. V cele se nacházejí jednotlivé testovací dráhy. V každé testovací dráze se nachází imobilizovaná protilátka proti chemické struktuře určité skupiny INL, která je asociovaná s fluorescenčně značeným analogem INL. Jsou-li ve slinách přítomny INL, dochází k vytěsnění značeného analoga INL z vazby na protilátku. Značený analog postupuje k laserovému detektoru. Intenzita fluorescenčního signálu odpovídá množství INL v odebraném vzorku slin (Foley et al., 2001).

Problém představuje různá senzitivita a specifita testů pro jednotlivé analyty. Protilátky používané při precipitačních reakcích jsou namířené proti určitým částem molekul, které jsou společné pro některou skupinu látek (pro parentní látku i její metabolity).

Zkřížená reaktivita mateřských látek a jejich metabolitů, řada interferujících vlivů, faktory ovlivňující transport drogy do slin a v neposlední řadě rozdíly v kvalitě mezi jednotlivými testovacími soupravami omezují použití těchto rychlých on-site testů pouze pro kvalitativní průkaz abúzu INL. Řada opiátů se v organismu přeměňuje na stejné metabolity (viz kap. 3.5.2). Pro kvalitativní průkaz opiátů ve slinách je tedy vhodná určitá zkřížená reaktivita lipofilních metabolitů. Na druhou stranu nemůžeme však v řadě případů jednoznačně konstatovat, jakou konkrétní látku opiátového typu si testovaná

osoba aplikovala. Pozitivní výsledky těchto kvalitativních testů je nutno konfirmovat ve specializovaných toxikologických laboratořích dostatečně citlivými a pro daný analyt specifickými analytickými metodami. Tak lze konfirmovat pozitivní nálezy INL ve slinách, popřípadě detekovat její metabolity v moči. Při konfirmaci výsledků orientačních testů se běžně používá plynová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (viz kap. 3.4.3).

Zavedení rychlých kvalitativních testů v praxi a podmínky jejich používání pro průkaz opiátů ale i jiných INL ve slinách by měly být patřičně ošetřeny legislativou. Zákon by měl definovat situace, za kterých mohou být testy oprávněně použity, postup provádění testu, následný postup při pozitivitě testu a samozřejmě by měla být definována osoba, která má oprávnění test provádět (Verstraete et al, 2005).

Nedávno Substance Abuse and Mental Health Service (SAMHSA) v USA publikovala ve federálním registru navržené předpisy/pravidla pro zahrnutí orální tekutiny do federálního Workplace Drug Testing programu (2004). Tyto předpisy/pravidla vznikly/a na základě několika ročních studií zaměřených na hodnocení přesnosti, vhodnosti a užitečnosti testování OT na přítomnost INL. Vydané předpisy specifikují postup provedení odběru a vlastního testu pro dosažení co nejpřesnějších výsledků. V roce 2001 spojené státy publikovaly Guidelines for Testing Drug Under International Control in hair, sweat and saliva. Tento dokument odráží toxikology akceptovanou hladinu přesnosti pro kvalitativní testy detekující INL v OT.

V dnešní době se zdá být největší uplatnění rychlých kvantitativních orientačních testů pro detekci opiátů a jiných INL ve slinách zejména v oblasti kontroly silničního provozu. Odběr slin je neinvazivní, výsledky testu lze odečíst za 10-12 min a vše lze provádět v přítomnosti testované osoby. Vedle běžného dechového testu, prověření fyzického a psychického stavu testované osoby by se mohly kvalitativní on-site testy stát běžnou součástí silničních kontrol.

Testy s technikou odběru bez použití stimulace kyselinou citrónovou, s hygienickým a komfortním odběrem orální tekutiny, minimalizací ředění vzorku OT a případně se zařízením umožňujícím digitální odečet výsledků by mohly být nejvhodnějším nástrojem při screeningu abúzu INL u řidičů při silničních kontrolách.

Na přelomu 20. a 21. století vznikl z podnětu EU program ROSITA study (Roadside Testing Assessment), jehož cílem bylo ohodnotit využití komerčně dostupných kvalitativních on-site testů anebo prototypů při silničních kontrolách v různých zemích EU (Verstraete, 2005). Při studii byly pozorovány rozdíly mezi kvalitami jednotlivých testovacích souprav (rozdíly v senzitivě a specifitě testů pro jednotlivé skupiny látek). V některých případech se nepodařilo odebrat dostatečné množství slin pro kvalitativní analýzu a případnou následnou confirmaci pozitivních výsledků.

V letech 2003 – 2005 probíhala další studie zabývající se ohodnocením využitelnosti kvalitativních on-site testů pro průkaz INL ve slinách při silničních kontrolách nebo na policejních stanicích (ROSITA 2). V šesti evropských zemích (Belgie, Francie, Finsko, Německo, Norsko a Španělsko) a pěti zemích USA byly testovány nové on-site testy a výsledky získané těmito testy byly následně porovnávány s výsledky, které byly získány analýzou slin, plazmy pomocí laboratorních ELISA testů a plynové chromatografie. V dnešní době ještě není k dispozici zpráva, která zahrnuje celkové výsledky ROSITA 2 studie. Předběžné závěry ale hovoří jasně o vhodnosti on-site testů pro průkaz opiátů ve slinách, resp. orální tekutině. U testu Toxiquick byla prokázána značná falešná pozitivita při detekci opiátů, odběr slin byl nehygienický a nedostatečný co se týče objemu vzorku a navíc bylo vizuální odečítání výsledků velmi problematické (Biermann et al., 2004).

Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, která slouží ke confirmaci vzorků slin resp. OT pozitivních na přítomnost některých INL, si vyžaduje odběr dostatečného množství vyšetřovaného materiálu. V mnoha studiích, které byly prováděny v předchozích letech, se vyskytl právě problém odběru nedostatečného množství OT. Nedávno vědečtí pracovníci vyvinuly confirmační metodu LC-MS/MS, kterou lze detekovat více než 20 různých typů INL v 250 µl OT. Touto metodou byly stanovovány i koncentrace opiátů v OT (Mortier et al., 2002).

6. ZÁVĚR

Na základě znalosti farmakokinetiky a transportu opiátů do slin, lze využít sliny jako alternativní materiál pro průkaz jejich abúzu.

Testování slin pro průkaz abúzu návykových látek je zatím rozšířeno převážně v západních zemích EU a USA. K analýze v terénu se využívají rychlé orientační imunochromatografické testy, tzv. ON-SITE testy. V naší zemi není zatím nabídka těchto kvalitativních testů široká. Momentálně je jistým problémem i poměrně vyšší cena testovacích souprav. On-site testy lze využít pro kvalitativní průkaz opiátů ve slinách.

Na koncentraci opiátů ve slinách, resp. v testovaném vzorku orální tekutiny mají vliv jednak vlastnosti testovacích souprav včetně technik odběrů a na druhé straně také faktory, které ovlivňují transport opiátů do slin. Jednotlivé testy se liší svou specifitou a senzitivitou. Senzitivitu testu často snižuje vizuální odečet výsledků. Je nutné, aby byly pozitivní výsledky potvrzeny specifickou analytickou metodou s dostatečně nízkým limitem detekce a případně i kvantifikace. Vhodné by bylo využívat například právě při silničních kontrolách testy, které disponují zařízením na digitální odečet výsledků.

Pro obhájení širšího využití tohoto druhu testů v praxi je potřeba provést více studií zaměřených na analýzu vzorků slin potencionálních uživatelů drog ve všech cílových oblastech (řízení pod vlivem návykové látky, monitoring compliance a abstinence u drogově závislých, epidemiologické studie, kontroly zaměstnanců, screening abúzu drog u školní mládeže). Tak zjistíme, zda testování slin pro průkaz abúzu návykové látky je pro praxi přínosem.

Do budoucna by bylo vhodné dále monitorovat nabídku rychlých orientačních testů na českém trhu, případně provést otestování analytických parametrů nově nabízených testovacích souprav.

Studie zaměřené na přípravu specifitějších imunoassays a vývoj kvalitnějších technik odběru slin by mohly být do budoucna přínosem pro zkvalitnění orientačního testování abúzu opiátů ve slinách.

V případě testů nabízených na území České republiky v době experimentu se na základě experimentu osvědčila souprava Ultimed jako vhodnější orientační imunochromatografický test pro průkaz opiátů ve slinách než souprava Syntron.

7. SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Tabulky

Tab. č.1 Charakteristické rozdíly v produkci slin na základě různých nervových stimulů

Tab. č.2 Koncentrace kodeinu v plazmě a OT a poměr S/P-důkaz orální kontaminace

Tab. č.3 Vzorek 1 se standardním přídávkem

Tab. č.4 Vzorek 2 se standardním přídávkem

Tab. č.5 Vzorek 3 se standardním přídávkem

Tab. č.6 Vzorek 4 se standardním přídávkem

Tab. č.7 Vzorek 5 se standardním přídávkem

Tab. č.8 Vzorek 6 se standardním přídávkem

Tab. č.9 Vzorek 7 se standardním přídávkem

Tab. č.10 Výsledkové dublety pro soupravu SYNTRON

Tab. č.11 Výsledkové dublety pro soupravu ULTIMED

Tab. č.12 Monitorovací analytická účinnost souprav (%)

Tab. č.13 Míra shody (%) mezi referenční metodikou GC/MS a kvalitativními testy při detekci INL ve stejné tělní tekutině, tj. správnost analýzy pomocí rychlotestů

Tab. č.14 Souprava SYNTRON

Tab. č.15 Souprava ULTIMED

Tab. č.16 SYNTRON

Tab. č.17 ULTIMED

Tab. č.18 Objemy orální tekutiny získané různými odběrovými soupravami

Obrázky

Obr. č. 1 Histologický preparát-aciny slinných žláz

Obr. č. 2 Sekrece a resorpce iontů ve slinných kanálcích

Obr. č. 3 Schéma transportu drogy z krevního oběhu do slin

Obr. č. 4 Senzitivita, specifita a efficiency Cozart RapiScan Oral Fluid Drug Testing System v porovnání s Cozart® Microplate EIA Opiate Oral Fluid Kit na různých hladinách cut-off koncentrací opiátů v OT

Obr. č. 5 souprava SYNTRON

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

INL..... ilegální návyková látka/y

OT..... orální tekutina

ROI..... rychlé orientační imunotechniky

TLC..... tenkovrstvá chromatografie

GC-MS.....plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

ON-SITE test...rychlý orientační kvalitativní test kombinující imunotechniku s tenkovrstvou chromatografií

9. LITERATURA A INTERNETOVÉ ZDROJE

Bennet G.A., Davies E., Thomas P., Is oral fluid analysis as accurate as urinalysis in detecting drug use in a treatment setting?, *Drug and Alcohol Dependence*, 2003, 72 : 265-269

Bermejo F.J., Saliva and plasma ratio of methadone and EDDP, *Journal of Analytical Toxicology*, 2000, 24:70-72

Biermann T., Schwarze B., Zeder B., Betz R., On-site testing of illicit drugs: the use of the drug-testing device Toxiquick, *Forensic Science International*, 2004, 143: 21-25

Burgen A. S. V., The secretion of non-electrolytes in the parotid saliva. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1956., 40:113-138.

Carpenter G.H., Proctor G.B., Anderson L.C., Zhang X.S., Garrett J.R., Immunoglobulin A secretion into saliva during dual sympathetic and parasympathetic nerve stimulation of rat submandibular glands, *Experimental Physiology*, 2000, 85:281-286

Cimasoni G., The crevicular fluid, in: G. Cimasoni (Ed.), *Monographs in Oral Science*, vol. 3, Karger, Basel, 1974

Cone E.J., Saliva testing for drug of abuse, *Annals of New York Academy of Science*, 1993, 694:91-127

Cone E.J., Holicky B.A., Grant T.M., Darwin W.D., Goldberger B.A., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intranasal "snorted" heroin, *Journal of Analytical Toxicology*, 1993, 17:327-337.

Cooper G., Wilson L., Reid C., Main L., Hand Ch., Evaluation of the Cozart1 RapiScan drug test system for opiates and cocaine in oral fluid, *Forensic Science International*, 2005, 150: 239–243

Crouch D. J., Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing, *Forensic Science International*, 2005, 150:165–173

Davenport H.W., Salivary secretion, *Physiology textbook series: Physiology of the digestive tract: an introductory text*, fourth Ed. Year Book Medical Publishers, Chicago, 1977, pp. 85–94

Dawes C., Macpherson L., Effects of 9 different chewing-gums and lozenges on salivary flow-rate and pH, *Caries Research*, 1992, 26: 176-182

De Giovanni N., Fucci N., Chiarroti M., Scarlata S., Cozart Rapiscan System: our experience with saliva tests, *Journal of Chromatography B*, 2002, 773 : 1-6

Drobitch R. K., Svensson C. K., Therapeutic drug monitoring in saliva. An update, *Clinical Pharmacokinetics.*, 1992, 23, 365-379

Fernandes V., Baldwin D., Jehanli A., Effect of oral fluid collection method on speed of salivation and drug recovery following codeine administration, *Proceedings, TIAFT Paris, August 2002*

Fernandes V., Sitaram A., Moore L., Jehanli A., Analysis, by rapid on-site test device, of saliva (oral fluid) pholcodine levels and windows of detection following oral single dose and multiple dosing, *Proceedings, TIAFT Prague, 2001*

Fishman S.M., Wilsey B., Yang J., Reisfield G.M., Bandman T.B., Borsook D., Adherence Monitoring and Drug Surveillance in Chronic Opioid Therapy, *Journal of Pain and Symptom Management*, 2000, 20:293–307

Foley T., Wang G., Nam D., Chang C., Avila A., Tusak A., Caro C., Shelton L., Westhout F., Liang G., A novel method for the detection of drugs of abuse in oral fluids, Proceedings, TIAFT 2001, Prague, August 2001

Haeckel R., The application of saliva in laboratory medicine; report on the workshop conference of the German Society for Clinical Chemistry, held under the auspices of the International Federation of Clinical Chemistry, in Bremen, March 3-4, 1988. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 1989, 27:221-252.

Haeckel R., Relationship between intraindividual variation of the saliva/plasma- and of the arteriovenous concentration ratio as demonstrated by the administration of caffeine. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 1990, 28: 279-284.

Haeckel R., Hanecke P., The application of saliva, sweat and tear fluid for diagnostic purposes, Annales de Biologie Clinique, 1993, 51: 903-910.

Haeckel R., Hänecke P., Application of saliva for drug monitoring: an in vivo model for transmembrane transport, Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 1996, 34 :171-191

Höld K.M., De Boer B., Zuidema J., Maes R. A. A. Saliva as an analytical tool in toxicology. <http://www.criminology.fsu.edu/journal/hold.html> , květen 2005

Hold K.M., Evaluation of the Salivette as sampling device for monitoring beta-adrenoreceptor blocking drugs in saliva, Journal of Chromatography B, 1995, 663:103-110

Chang K., Interactions between drugs and saliva-stimulating parafilm and their implications in measurements of saliva drug levels, Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 1976,13: 357-360

Jehanli A., Blind trials of an on site saliva drug test, *Journal of Forensic Science*, 2001, 46: 206-212

Jenkins A.J., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of smoked heroin, *Journal of Analytical Toxicology*, 1994, 18:317-330

Jenkins A.J., Comparison of heroin and cocaine concentration in saliva with concentrations in blood and plasma, *Journal of Analytical Toxicology*, 1995, 19: 359-374

Jones J., The simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, 6-acetylmorphine and oxycodone in hair and oral fluid, *Journal of Analytical Toxicology*, 2002, 26:171-175

Kacinko S.L., Barnes A.J., Kim I., Moolchan E.T., Wilson L., Cooper G.A., Reid C., Baldwin D., Hand Ch., Huestis M.A., Performance characteristics of the Cozart RapiScan Oral Fluid Drug Testing System for opiates in comparison to ELISA and GC/MS following controlled codeine administration, *Forensic Science International*, 2004, 141:41-48

Kadehjian L., Legal issues in oral fluid testing, *Forensic Science International*, 2005, 150: 151-160

Kidwell D.A., Holland J.C., Athanaselis S., Testing for drugs of abuse in saliva and sweat, *Journal of Chromatography B*, 1999, 713 :111-135

Kim I., Plasma and oral fluid pharmacokinetics and pharmacodynamics after oral codeine administration, *Clinical Chemistry*, 2002, 48: 1486-1496

www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorelPages/Oral/oral.htm

Leute R., Ullman E.F., Goldstein A., Spin immunoassay of

opiate narcotics in urine and saliva, The Journal of The American Medical Association, 1972, 221:1231-1234

Liang G., A rapid instrumented fluorescence immunoassay for the detection of tetrahydrocannabinols, Proceedings of the International Council on Alcohol, Drugs and Traffic Safety, Stockholm, May 22 - 26, 2000

Malamud D., Guidelines for saliva nomenclature and collection, Annals of New York Academy of Science, 1993, 694: xi-xii

Malamud D., Tabak L., Saliva as a diagnostic fluid, Annals of the New York Academy of Science, 1993, 694

Mandel I. D., The diagnostic uses of saliva, Journal of Oral Pathology & Medicine, 1990, 19:119-125

Matin S.B., Wan S.H., Karam J.H., Pharmacokinetic of tolbutamide: prediction by concentration in saliva, International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 1974, 16: 1052:1059

Moore L., Gas chromatography/mass spectrometry confirmation of Cozart Rapiscan saliva methadone and opiates tests, Journal of Analytical Toxicology, 2001, 25: 520-524

Mortier K.A., Maudens K.E., Lambert W.E., Clauwaert K.M., Van Bocxlaer J.F., Deforce D.L., Van Peteghem C.H., De Leenheer A.P., Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2002, 779:321-330

Mucklow J. C., Review: The use of saliva in therapeutic drug monitoring, Therapeutic Drug Monitoring, 1982, 4:229-247

Niedbala R.S., Feindt H., Kardos K., Vail T., Burton J., Bielska B., Shang Li, Milunic D., Bourdelle P., Vallejo R., Detection of Analytes by Immunoassay Using Up-Converting Phosphor Technology, *Analytical Biochemistry*, 2001, 293:22–30

Niedbala R.S., Laboratory analysis of remotely collected oral fluid specimen for opiates by immunoassay, *Journal of Analytical Toxicology*, 2001, 25: 310-315

O'Neal C.L., Crouch D.J., Rollins D.E., Fatah A.A., Cheever M.L., Correlation of saliva codeine concentrations with plasma concentrations after oral codeine administration, *Journal of Analytical Toxicology*, 1999, 23:452–459

O'Neal C.L., Crouch D.J., Rollins D.E., Fatah A.A., The effects of collection methods on oral fluid codeine concentrations, *Journal of Analytical Toxicology*, 2000, 24:536–542

Paxton J. W., Measurement of drugs in saliva: A review, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 1979, 1:11-21

Pichini S., On- site testing of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine in saliva with Drug Wipe and Drug read: a controlled study in recreational users, *Clinical Chemistry*, 2002, 48:174-176

Piekoszewski W., Determination of opiates in serum, saliva and hair of addicted persons, *Przegląd Lekarski*, 2001, 58: 287-289

Presley L., Lehrer M., Sester W., Hahn D., Rowland B., Smith M., Keith W. Kardos K.W., Fritch D., Salomone S., Niedbala R.S., Cone E.J., High prevalence of 6-acetylmorphine in morphine-positive oral fluid specimens, *Forensic Science International*, 2003, 133:22–25

Rosita Website, <http://www.rosita.org>, leden 2006

Samyn N., Verstraete A.G., Van Haeren C., Kintz P., Analysis of drugs of abuse in saliva, *Forensic Science*, 1999, 11:1-18

Silverstein J.H., An analysis of the duration of fentanyl and its metabolites in urine and saliva, *Anesthesia & Analgesia.*, 1993, 76: 618-621

Skopp G., Pötsch L., Perspiration versus saliva – basic aspects concerning their use in roadside drug testing, *International Journal of Legal Medicine*, 1999, 112 :213–221

Skopp G., Pötsch L., Klinder K., Richter B., Aderjan R., Mattern R., Saliva testing after single and chronic administration of dihydrocodeine, *International Journal of Legal Medicine*, 2001, 114:133-140

Speirs C. F., Oral absorption and secretion of drugs, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1977, 4: 97-100

Spiehler V.R., On-site saliva testing for drugs of abuse, in *On Site Testing for Drugs of Abuse*, A.Jenkins and B.Goldberger (Eds), Totowa, Humana Press, 2001, pp. 95-109

Substance Abuse and Mental Health Services. Notice of Proposed Revisions to the Mandatory Guidelines for Federal Workplace Testing Programs, (69 FR 16973), April 13, 2004.
<http://www.workplace.samhsa.gov>

Toennes S.W., Kauert G.F., Steinmeyer S., Moeller M.R. Driving under the influence of drugs — evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms, *Forensic Science International*, 2005;152 :149–155

Van Bree J. B., Drug transport across the blood-brain barrier, 1990, Unpublished Ph.D. Dissertation, State University Leiden, převzato z : Höld K.M., De Boer B., Zuidema J., Maes R. A. A. Saliva as an analytical tool in toxicology. <http://www.criminology.fsu.edu/journal/hold.html> , květen 2005

Verstraete A.G., Oral fluid testing for driving under the influence of drugs: history, recent progress and remaining challenges, *Forensic Science International*, 2005,150:143–150

Vining R. F., McGinley R. A., Transport of steroids from blood to saliva, *Proceedings of the ninth Tenovus workshop, Cardiff november 1982* (pp. 56-63). Cardiff: Alpha Omega Publishing Limited

Vining R. F., McGinley R. A., Hormones in saliva, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, 1985, 23: 95-146

Wolf K., Methadone in saliva, *Clinical Chemistry*, 1991, 37:1297-1298

Voříšek Viktor, PharmDr., Analytická supervize rychlých orientačních průkazů ilegálních návykových látek, prosinec 2004

Young J. A., Van Lennep E. W. (Eds). *The morphology of salivary glands*. London: Academic Press (1979)

Pozn. autora: Materiály- proceedings TIAFT jsou k dispozici k nahlédnutí na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, úseku toxikologie, FN v Hradci Králové u Dr. Voříška.