

**Benzodiazepiny II****Informace pro objednáni**

REF	CONTENT	Systémové ID	Analyzátoary, na kterých lze <b>cobas c</b> pack(y) použít
04939417 190	ONLINE DAT Benzodiazepines II (200 testů)	07 6997 5	Roche/Hitachi <b>cobas c</b> 311, <b>cobas c</b> 501/502
03304671 190	Kalibrátory Preciset DAT Plus I CAL 1-6 (6 x 5 mL)	Kódy 431-436	
03304680 190	Kalibrátory Preciset DAT Plus II CAL 1-6 (6 x 5 mL)	Kódy 437-442	
03304698 190	C.f.a.s. DAT Qualitative Plus (6 x 5 mL)		
04590856 190	C.f.a.s. DAT Qualitative Plus Clinical (3 x 5 mL)	Kód 699	
03312950 190	Control Set DAT I (pro stanovení s cut-off 300 ng/mL) PreciPos DAT Set I (2 x 10 mL) PreciNeg DAT Set I (2 x 10 mL)		
03312968 190	Control Set DAT II (pro stanovení 100 ng/mL) PreciPos DAT Set II (2 x 10 mL) PreciNeg DAT Set II (2 x 10 mL)		
04500873 190	Control Set DAT Clinical (pro stanovení s cut-off 100 ng/mL) PreciPos DAT Clinical (2 x 10 mL) PreciNeg DAT Clinical (2 x 10 mL)		
03312976 190	Control Set DAT III (pro stanovení s cut-off 200 ng/mL) PreciPos DAT Set III (2 x 10 mL) PreciNeg DAT Set III (2 x 10 mL)		

**Česky****Systémové informace**Pro analyzátoary **cobas c** 311/501:**BZ1Q2:** ACN 718 (moč): pro kvalitativní stanovení, 100 ng/mL**BZ2Q2:** ACN 719 (moč): pro kvalitativní stanovení, 200 ng/mL**BZ3Q2:** ACN 720 (moč): pro kvalitativní stanovení, 300 ng/mL**BZ1S2:** ACN 728 (moč): pro semikvantitativní stanovení, 100 ng/mL**BZ2S2:** ACN 729 (moč): pro semikvantitativní stanovení, 200 ng/mL**BZ3S2:** ACN 730 (moč): pro semikvantitativní stanovení, 300 ng/mL**BZQ1C:** ACN 727 (moč): pro kvalitativní stanovení, 100 ng/mL;  
použitím C.f.a.s. DAT Qualitative Plus ClinicalPro analyzátoary **cobas c** 502:**BZ1Q2:** ACN 8718 (moč): pro kvalitativní stanovení, 100 ng/mL**BZ2Q2:** ACN 8719 (moč): pro kvalitativní stanovení, 200 ng/mL**BZ3Q2:** ACN 8720 (moč): pro kvalitativní stanovení, 300 ng/mL**BZ1S2:** ACN 8728 (moč): pro semikvantitativní stanovení, 100 ng/mL**BZ2S2:** ACN 8729 (moč): pro semikvantitativní stanovení, 200 ng/mL**BZ3S2:** ACN 8730 (moč): pro semikvantitativní stanovení, 300 ng/mL**BZQ1C:** ACN 8727 (moč): pro kvalitativní stanovení, 100 ng/mL;  
použitím C.f.a.s. DAT Qualitative Plus Clinical**Použití**

Benzodiazepines II (BNZ2) je in vitro diagnostický test pro kvalitativní a semikvantitativní detekci benzodiazepinů v lidské moči na systémech Roche/Hitachi **cobas c** s hodnotou koncentrací cut-off 100 ng/mL, 200 ng/mL a 300 ng/mL.

Tímto stanovením lze získat i semikvantitativní výsledky testu, které umožňují laboratořím posoudit využití stanovení v programu kontroly kvality.

**Benzodiazepines II poskytuje pouze předběžný analytický výsledek. Na potvrzení analytického výsledku se musí použít více specifická alternativní chemická metoda. Preferovanou konfirmační metodou je plynová chromatografie/hmotnostní spektroskopie (GC-MS) nebo kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS).<sup>1,2</sup> Výsledky testů užívání drog, zvláště jsou-li používány předběžné pozitivní výsledky, je třeba hodnotit s klinickým zřetelem a s odborným úsudkem.**

**Souhrn**

Benzodiazepiny tvoří skupinu univerzálních a často předepisovaných léků, tlumících činnost centrální nervové soustavy (CNS) s lékářsky použitelným působením jako anxiolytikum, sedativum, hypnotikum, svalový relaxans a antikonvulzivum.<sup>1,2,3,4,5</sup> Nasákavost, distribuce, rychlost látkové výměny a vylučování se mezi deriváty benzodiazepanu výrazně liší. Kvantitativní rozdíly v jejich účinnosti, farmakodynamickém spektru a farmakokinetických vlastnostech vedly k různým léčebným použitím. Klinické rozdíly lze pozorovat mezi krátko- a dlouhotrvajícími benzodiazepiny v jejich účinnosti, vedlejších účincích, abstinenci a potenciál závislosti.<sup>3,6,7</sup> Rozsáhlé a účinné léčebné využití benzodiazepinů vedlo v posledních desetiletích nechtěně k jejich zneužívání. Předávkování benzodiazepiny je často spojeno s požitím léčiv jiných tříd.<sup>8,9</sup> Akutní nebo chronické požívání alkoholu ve spojení s aplikací benzodiazepinu může vést k různým závažným toxikologickým interakcím. Celkový efekt může být ovlivněn vnitřními, vnějšími a farmakokinetickými faktory. Užívání drog probíhá jak s relativně malými dávkami benzodiazepinu, tak i nadužíváním velkých dávek; z tohoto důvodu vyžaduje detekce léčiv/metabolitů v moči vhodný výběr cut-off, která vyhovuje potřebám programu testování na drogy.

Po požití jsou benzodiazepiny třídy se substitucí 1,4 (včetně triazolbenzodiazepinových derivátů) absorbovány, metabolizovány a vyloučeny močí různou rychlostí, stejně jako mnoho strukturálně příbuzných metabolitů. Rozličnost metabolitů odráží různost fyziologických vlastností a metabolických drah jednotlivých léčiv. Celkové metabolické podobnosti zahrnují odstranění substituentů z β kruhu 1,4-substituovaných benzodiazepinů, α-hydroxylaci triazolbenzodiazepinů, demethylaci, hydroxylaci třetího uhlíku β kruhu a konjugaci hydroxylovaných metabolitů a následně vyloučení především ve formě glukuronidů.<sup>1,2,3,4,5</sup> Enzymatická hydrolyza glukuronidových benzodiazepinů může zvýšit jejich křížovou reaktivitu s benzodiazepinovým imunostanovením.<sup>10,11,12,13,14</sup>

**Princip testu**

Toto stanovení je založeno na kinetické interakci mikročástic v roztoku (KIMS)<sup>11,15</sup>, která je měřena jako změna průchodu světla. V případě absence látky ve vzorku se volné protílátky váží na látku vázanou na mikročástici, a vytváří agregáty. Jak probíhá agregace ve vzorku, který neobsahuje drogu, absorbance roste.

Jestliže vzorek moči obsahuje dotyčnou drogu, proběhne kompetice drogy s částicemi s navázaným derivátem drogy o volné protílátky. Protílátka vázaná na drogu ve vzorku není již dostupná pro podporu agregace částic a následný vznik struktury částic je inhibován. Přítomnost drogy ve vzorku úměrně snižuje nárůst absorbance vůči koncentraci drogy ve vzorku. Obsah léčiva ve vzorku je určen poměrem ke známé hodnotě cut-off koncentrace léčiva.

**Benzodiazepiny II**

Přítomnost enzymu  $\beta$ -glukuronidázy zvyšuje křížovou reaktivitu stanovení Benzodiazepines II na některé glukuronidové metabolity.

**Reagencie - pracovní roztoky**

- R1** Protilátka proti benzodiazepinu (polyklonální ovčí); pufr; enzym  $\beta$ -glukuronidázy; hovězí sérový albumin (BSA); 0.09% azid sodný.
- R2** Mikročástice s konjugovaným derivátem benzodiazepinu; pufr; 0.09% azid sodný

R1 je v pozici A a R2 je v pozici B.

**Bezpečnostní opatření a varování**

Pro diagnostické použití in vitro.

Dodržujte běžná bezpečnostní opatření, nutná pro nakládání se všemi reagensy.

Reagencie různých šarží souprav nelze zaměňovat. Reagencie v rámci šarže souprav jsou nastaveny tak, aby bylo dosaženo optimálního využití. Likvidace všech odpadních materiálů musí probíhat v souladu s místními předpisy.

Bezpečnostní listy jsou pro odborné uživatele dostupné na vyžádání.

**Zacházení s reagensy**

Připravena k použití

Před použitím zásobník reagensů opatrně několikrát otočte, aby se složky reagensů promíchaly.

**Ukládání a stabilita**

Doba skladování při 2-8 °C:

Čtěte datum  
expirace na štítku  
balení **cobas c** pack

Na palubě při použití a v chlazeném prostoru  
analyzátoru:

12 týdnů

**Nemrazit.****Odběr vzorků a příprava**

Pouze níže uvedené vzorky byly testované a jsou přijatelné.

Moč: Vzorky moče odeberte do čistých skleněných či plastových nádobek. Vzorky čerstvé moče nepotřebují zvláštní předúpravu nebo zacházení, ale měly by být ochráněny před kontaminací při pipetování. Vzorky by měly být v běžném fyziologickém rozmezí pH 5-8. Nejsou potřeba žádná aditiva ani konzervans. Doporučujeme uchovávat vzorky při teplotě 2-8 °C a zpracovat je do 5 dnů od odběru.<sup>16</sup>

Při delším skladování doporučujeme vzorky zmrazit.

Velmi zakalené vzorky před analýzou zcentrifugujte.

Pro podrobnosti o možné interferenci čtěte část „Omezení a interference“.

Příměs či naředění vzorků může způsobit chybný výsledek. Při podezření, že byl vzorek znehodnocen, proveďte nový odběr. Testování validity vzorku se vyžaduje u vzorků odebíraných podle *Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs*.<sup>17</sup>

**VÝSTRAHA:** Ředění vzorků by se mělo používat pouze k interpretaci výsledku alarmů Calc.? a Samp.? nebo při odhadu koncentrace při přípravě pro GC-MS nebo LC-MS/MS. Výsledky získané po ředění vzorku nelze vydávat jako koncentraci naměřenou ve vzorku pacienta. Použijí-li se postupy s ředěním, měly by být validovány.

**Dodávaný materiál**

Reagencie jsou uvedeny v části "Reagencie - pracovní roztoky".

**Potřebný materiál (ale nedodávaný se soupravou)**

Viz část "Informace pro objednání"

Běžné vybavení laboratoře

**Stanovení**

Optimálního využití stanovení dosáhnete, budete-li dodržovat pokyny uvedené v dokumentaci pro příslušný analyzátor. Pokyny ke stanovení specifické pro analyzátor vyhledejte v příslušném návodu k použití.

Provádění aplikací, které nejsou schváleny Roche, je bez záruky a musí být definováno uživatelem.

**Aplikace pro moč**

V menu Utility, Application screen, Range tab zrušte pro tyto aplikace Automatic rerun.

**Definice testu cobas c 311**

	Semikvantitativní	Kvalitativní
Typ stanovení	2-Point End	2-Point End
Reakční čas / Body stanovení	10 / 10-31	10 / 10-31
Vlnová délka (sub/main)	- /546 nm	- /546 nm
Směr reakce	Nárůst	Nárůst
Jednotka	ng/mL	mAbs
Pipetování reagentů		Diluent (H <sub>2</sub> O)
R1	90 $\mu$ L	-
R2	40 $\mu$ L	-

Množství vzorku	Vzorek	Ředění vzorku	
		Vzorek	Diluent (NaCl)
<b>cut-off 100 a 200 ng/mL</b>			
Běžný	4.5 $\mu$ L	-	-
Snížený	4.5 $\mu$ L	-	-
Zvýšený	4.5 $\mu$ L	-	-
<b>300 ng/mL cut-off</b>			
Běžný	2.0 $\mu$ L	-	-
Snížený	2.0 $\mu$ L	-	-
Zvýšený	2.0 $\mu$ L	-	-

**Definice testu cobas c 501/502**

	Semikvantitativní	Kvalitativní
Typ stanovení	2-Point End	2-Point End
Reakční čas / Body stanovení	10 / 16-46	10 / 16-46
Vlnová délka (sub/main)	- /546 nm	- /546 nm
Směr reakce	Nárůst	Nárůst
Jednotka	ng/mL	mAbs
Pipetování reagentů		Diluent (H <sub>2</sub> O)
R1	90 $\mu$ L	-
R2	40 $\mu$ L	-

Množství vzorku	Vzorek	Ředění vzorku	
		Vzorek	Diluent (NaCl)
<b>cut-off 100 a 200 ng/mL</b>			
Běžný	4.5 $\mu$ L	-	-
Snížený	4.5 $\mu$ L	-	-
Zvýšený	4.5 $\mu$ L	-	-
<b>300 ng/mL cut-off</b>			
Běžný	2.0 $\mu$ L	-	-
Snížený	2.0 $\mu$ L	-	-
Zvýšený	2.0 $\mu$ L	-	-

**Kalibrace**

Kalibrátory	<i>Semikvantitativní aplikace stanovení cut-off 100 a 200 ng/mL</i>
	S1-6: Kalibrátory Preciset DAT Plus II, CAL 1-6
	0, 50, 100, 200, 400, 1000 ng/mL

**Stanovení s cut-off 300 ng/mL**

S1-6: Kalibrátory Preciset DAT Plus I, CAL 1-6

0, 150, 300, 600, 1000, 3000 ng/mL

**Kvalitativní aplikace****Stanovení s cut-off 100 ng/mL**

S1: Kalibrátor Preciset DAT Plus II - CAL 3 (Test BZ1Q2), 100 ng/mL, S1: C.f.a.s. DAT Qualitative Plus Clinical (Test BZQ1C), 100 ng/mL

**Stanovení s cut-off 200 ng/mL**

S1: Kalibrátor Preciset DAT Plus II - CAL 4, 200 ng/mL

**Stanovení s cut-off 300 ng/mL**

S1: C.f.a.s. Kalibrátor DAT Qualitative Plus nebo Preciset DAT Plus I - CAL 3, 300 ng/mL

Koncentrace látek kalibrátorů byly verifikované GC-MS.

Kalibrace K faktor Pro kvalitativní aplikace zadejte K faktor jako -1000 v nabídce "Kalibrace", obrazovka "Stav", okno "Výsledek kalibrace".

Mód kalibrace **Semikvantitativní aplikace**  
Result Calculation Mode (RCM - mód výpočtu výsledků)<sup>a)</sup>  
**Kvalitativní aplikace**  
Linear

Frekvence kalibrace Plná (semikvantitativní) nebo blank (kvalitativní) kalibrace  
• po změně šarže reagentů  
• jestliže to vyžaduje proces kontroly kvality

a) Čtete část Výsledky.

Kalibrační interval lze po přijatelné verifikaci kalibrace laboratoří prodloužit.

Návržnost: Tato metoda byla standardizovaná dle primární referenční metody (GC-MS).

**Kontrola kvality**

Ke kontrole kvality použijte kontrolní materiály uvedené v části "Informace pro objednání".

Navíc lze použít i jiný vhodný kontrolní materiál.

Koncentrace léčiva kontrol byly verifikovány GC-MS.

Kontrolní intervaly a meze by měly být uzpůsobeny pro každou laboratoř dle individuálních požadavků. Naměřené hodnoty by se měly pohybovat v definovaných mezích. Každá laboratoř by měla mít vypracovaná nápravná opatření pro případ, že hodnoty překročí definované meze.

Sledujte příslušná vládní nařízení a lokální směrnice kontroly kvality.

**Výsledky**

Pro kvalitativní stanovení se cut-off kalibrátor používá jako reference pro odlišení předběžně pozitivních a negativních vzorků. Vzorky s pozitivní nebo "0" hodnotou absorbance se považují za předběžně pozitivní. Předběžně pozitivní vzorky jsou označeny &gt;Test. Vzorky s negativní hodnotou absorbance se považují za negativní. Před výsledkem negativních vzorků je znaménko minus.

Pro semikvantitativní stanovení vytváří počítač analyzátoru kalibrační křivku na základě naměřených absorbancí standard pomocí 4parametrové logit-log funkce (RCM). Logit-log funkce proloží hladkou křivku jednotlivými body. Počítač analyzátoru interpolací naměřených absorbancí vzorků z logit-log funkce vypočítá koncentraci látky nebo jejich metabolitů.

**UPOZORNĚNÍ:** Je-li získán výsledek alarmu Calc.? nebo Samp.?, revidujte údaje Reaction Monitor pro vzorek a porovnejte je s údaji Reaction Monitor pro nejvyšší kalibrátor. Nejpravděpodobnější příčinou je vysoká koncentrace analytu ve vzorku, kdy bude hodnota absorbance pro vzorek menší než hodnota nejvyššího kalibrátoru. Vzorek naředte kalibrátorem s koncentrací 0 ng/mL v potřebném poměru a zopakujte stanovení.

Normální moč bez přítomnosti drog lze nahradit za 0 ng/mL kalibrátor, pokud byly moč a postup validovány laboratoří. Aby nedošlo k přehodnění, porovnejte výsledek naředěného vzorku před vynásobením faktorem ředění; výsledek musí být aspoň polovinou hodnoty cut-off analytu. Jestliže je ředěný výsledek menší než polovina cut-off, zopakujte stanovení s menším ředěním. Ředění, která mají výsledky v blízkosti cut-off, poskytují nejpřesnější stanovení. Chcete-li určit koncentraci předběžně pozitivního vzorku, vynásobte výsledek odpovídajícím faktorem ředění. Ředění by se mělo používat pouze k interpretaci výsledku alarmů Calc.? nebo Samp.? nebo při odhadu koncentrace při přípravě pro GC-MS nebo LC-MS/MS.

Při vydávání výsledků mějte na paměti, že na výsledek stanovený z moči má vliv množství faktorů, jako příjem tekutin a jiné biologické faktory.

Předběžně pozitivní výsledky potvrďte jinou metodou.

**Omezení - interference**

Informace o látkách testovaných tímto stanovením jsou uvedeny v kapitole "Specifické údaje o využití" tohoto dokumentu. Možné však je, že mohou interferovat i jiné komponenty nebo faktory, které mohou negativně ovlivnit výsledek (např. technická chyba nebo chyba postupu).

Předběžně pozitivní výsledek dosažený touto metodou indikuje přítomnost benzodiazepinů anebo jejich metabolitů v moči. Nevyjadřuje míru intoxikace.

Interferující látky byly přidány do moči obsahující nordiazepam při -25 % a +25 % hladiny cut-off při koncentraci uvedené níže. Vzorky byly testované a následující výsledky byly získané na analyzátoru Roche/Hitachi 917.

Semikvantitativní (ng/mL)	100 ng/mL cut-off	200 ng/mL cut-off		300 ng/mL cut-off			
		Neg hladi-na	Poz hladi-na	Neg hladi-na	Poz hladi-na	Neg hladi-na	Poz hladi-na
Aceton	1 %	77 (NEG)	134 (POZ)	157 (NEG)	260 (POZ)	231 (NEG)	402 (POZ)
Kys. askorbová	1.5 %	78 (NEG)	132 (POZ)	156 (NEG)	262 (POZ)	233 (NEG)	399 (POZ)
Konjugovaný bilirubin	0.25 mg/mL	82 (NEG)	129 (POZ)	156 (NEG)	247 (POZ)	229 (NEG)	392 (POZ)
Kreatinin	5 mg/mL	81 (NEG)	138 (POZ)	158 (NEG)	259 (POZ)	230 (NEG)	396 (POZ)
Etanol	1 %	78 (NEG)	136 (POZ)	151 (NEG)	261 (POZ)	228 (NEG)	395 (POZ)
Glukóza	20 mg/mL	81 (NEG)	138 (POZ)	158 (NEG)	262 (POZ)	236 (NEG)	403 (POZ)
Hemoglobin	1 mg/mL	76 (NEG)	139 (POZ)	159 (NEG)	261 (POZ)	228 (NEG)	398 (POZ)
Lidský sérový albumin	5 mg/mL	83 (NEG)	140 (POZ)	165 (NEG)	273 (POZ)	243 (NEG)	422 (POZ)
Kys. oxalová	2 mg/mL	74 (NEG)	128 (POZ)	151 (NEG)	254 (POZ)	226 (NEG)	388 (POZ)
Chlorid sodný	0.5 M	79 (NEG)	139 (POZ)	159 (NEG)	262 (POZ)	234 (NEG)	389 (POZ)
Močovina	6 %	80 (NEG)	138 (POZ)	157 (NEG)	261 (POZ)	233 (NEG)	405 (POZ)

Stejný experiment byl proveden v kvalitativním módu pro každou cut-off. Všechny negativní a pozitivní vzorky v přítomnosti interferující látky řádně zreperovaly.

Byl proveden dodatečný protokol, ve kterém byly testovány vzorky obsahující nordiazepam při hladinách kontroly ( $\pm 25$  % cut-off) s relativní hustotou v rozmezí 1.006 až 1.034. Jako i u ostatních interferencí, nedošlo ke cross-over kontroly u žádného ze 3 cut-off stanovení při extrémní hladině relativní hustoty.

Pro diagnostické účely je vždy nezbytné používat výsledky ve spojení s anamnestickými údaji pacienta, klinickým vyšetřením a jinými nálezy.

**POTŘEBNÝ KROK**

**Programování speciálního mytí:** Při zpracovávání určitých kombinací testů na systémech Roche/Hitachi **cobas c** je použití speciálních mycích cyklů povinné. Nejnovější verzi seznamu zamezení přenosu mezi vzorky (carry-over) lze rovněž nalézt v metodických listech NaOHD-SMS-SmpCln1+2-SCCS. Pro další pokyny čtěte uživatelskou příručku. Analyzátor **cobas c 502:** Veškeré programování speciálního mytí nezbytné pro zamezení carry-over je dostupné přes **cobas** link, ruční zadávání je potřebné v některých případech.

**Tam, kde se to vyžaduje, musí být před vykazováním výsledků provedeno programování speciálního mytí/zamezení přenosu mezi vzorky.**

**Očekávané hodnoty***Kvalitativní stanovení*

Výsledky tohoto stanovení rozlišují pouze předběžně pozitivní vzorky ( $\geq 100$  ng/mL,  $\geq 200$  ng/mL nebo  $\geq 300$  ng/mL v závislosti na cut-off) od negativních. Množství detekované látky v předběžně pozitivním vzorku nelze určit.

*Semikvantitativní stanovení*

Výsledky tohoto stanovení poskytují jen přibližné kumulativní koncentrace léčiva a jejich metabolitů (viz část "Analytická specifickáčnost").

**Specifické údaje o využití**

Údaje o využití, typické pro analyzátoři, jsou uvedeny níže. Výsledky získané v různých laboratořích se mohou lišit.

**Preciznost**

Roztok nordiazepamů byl přidán do 5 vzorků získaných z poolované lidské moči, aby byly dosaženy vysoké, nízké a přibližné pozitivní a negativní koncentrace kontrol látek. Tyto vzorky byly testovány na preciznost ve kvalitativních a semikvantitativních režimech. V souladu s protokolem pro preciznost CLSI (EP5-A2) byly vzorky testovány ve 2 opakováních na sérii, 2 sériích denně po dobu 10 dní, celkem  $n = 40$ . Následující výsledky byly získané analyzátořem Roche/Hitachi **cobas c 501**.

*Kvalitativní - 100 ng/mL cut-off*

Léčivo	Koncentrace vzorku, ng/mL	Počet měření	Výsledky # Neg / # Pos
Nordiazepam	57	40	40 Neg / 0 Pos
Nordiazepam	78	40	40 Neg / 0 Pos
Nordiazepam	124	40	0 Neg / 40 Pos
Nordiazepam	190	40	0 Neg / 40 Pos
Nordiazepam	414	40	0 Neg / 40 Pos

*Kvalitativní - 200 ng/mL cut-off*

Léčivo	Koncentrace vzorku, ng/mL	Počet měření	Výsledky # Neg / # Pos
Nordiazepam	102	40	40 Neg / 0 Pos
Nordiazepam	145	40	40 Neg / 0 Pos
Nordiazepam	241	40	0 Neg / 40 Pos
Nordiazepam	419	40	0 Neg / 40 Pos
Nordiazepam	842	40	0 Neg / 40 Pos

*Kvalitativní - 300 ng/mL cut-off*

Léčivo	Koncentrace vzorku, ng/mL	Počet měření	Výsledky # Neg / # Pos
Nordiazepam	148	40	40 Neg / 0 Pos
Nordiazepam	231	40	40 Neg / 0 Pos
Nordiazepam	364	40	0 Neg / 40 Pos
Nordiazepam	615	40	0 Neg / 40 Pos
Nordiazepam	1353	40	0 Neg / 40 Pos

*Semikvantitativní - 100 ng/mL cut-off*

Léčivo	Konc. vzorku, ng/mL	Výsledky # Neg / # Pos	Opakovatelnost		Mezilehlá preciznost	
			SD, ng/mL	VK, %	SD, ng/mL	VK, %
Nordiazepam	57	40 / 0	1.9	3.4	2.0	3.5
Nordiazepam	78	40 / 0	2.1	2.7	2.9	3.7
Nordiazepam	124	0 / 40	1.6	1.3	3.8	3.1
Nordiazepam	190	0 / 40	2.9	1.5	3.9	2.0
Nordiazepam	414	0 / 40	3.6	0.9	9.9	2.4

*Semikvantitativní - 200 ng/mL cut-off*

Léčivo	Konc. vzorku, ng/mL	Výsledky # Neg / # Pos	Opakovatelnost		Mezilehlá preciznost	
			SD, ng/mL	VK, %	SD, ng/mL	VK, %
Nordiazepam	102	40 / 0	2.5	2.4	3.9	3.8
Nordiazepam	145	40 / 0	1.8	1.3	5.4	3.7
Nordiazepam	241	0 / 40	2.1	0.9	7.5	3.1
Nordiazepam	419	0 / 40	6.6	1.6	12.2	2.9
Nordiazepam	842	0 / 40	8.6	1.0	20.0	2.4

*Semikvantitativní - 300 ng/mL cut-off*

Léčivo	Konc. vzorku, ng/mL	Výsledky # Neg / # Pos	Opakovatelnost		Mezilehlá preciznost	
			SD, ng/mL	VK, %	SD, ng/mL	VK, %
Nordiazepam	148	40 / 0	3.7	2.5	4.8	3.3
Nordiazepam	231	40 / 0	4.3	1.9	6.3	2.7
Nordiazepam	364	0 / 40	4.5	1.2	8.2	2.3
Nordiazepam	615	0 / 40	5.8	0.9	15.4	2.5
Nordiazepam	1353	0 / 40	21.4	1.6	35.9	2.7

**Správnost**

110 vzorků moči s negativním výsledkem získaným klinickou laboratoř v panelu testu drog bylo vyhodnoceno pomocí Benzodiazepines II. 100 % těchto normálních vzorků moči bylo negativních vůči cut-off 100 ng/mL, 200 ng/mL a 300 ng/mL.

55 vzorků, získaných klinickou laboratoř, které byly předběžně pozitivní komerčně dostupným imunostanovením a následně potvrzeny kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) bylo vyhodnoceno stanovením Benzodiazepines II. 100 % těchto vzorků bylo pozitivních vůči cut-off 100 ng/mL, 200 ng/mL a 300 ng/mL.

Seďm vzorků bylo dále naředěno na koncentraci benzodiazepinu cca 75-100 % koncentrace cut-off pro každé cut-off a 7 vzorků bylo naředěno na koncentraci benzodiazepinu cca 100-125 % koncentrace cut-off pro každé cut-off. Údaje ze studie správnosti popsané výše, blízké rozmezí hodnot cut-off, byly doplněny o údaje získané u řaděných pozitivních vzorků moči. Následující výsledky byly získané stanovením Benzodiazepines II na analyzátoři Roche/Hitachi 917 vůči hodnotám LC-MS/MS.

Benzodiazepines II klinická korelace (cut-off = 100 ng/mL)					
		Negativní vzorky	Hodnoty LC-MS/MS (ng/mL)		
			Blízké cut-off		623-1874
			75	124-126	
Roche/Hitachi	+	0	2	7	55
917 analyzátoři	-	110	5	0	0

Benzodiazepines II klinická korelace (cut-off = 200 ng/mL)					
		Negativní vzorky	Hodnoty LC-MS/MS (ng/mL)		
			Blízké cut-off		623-1874
			148-150	248-253	
Roche/Hitachi	+	0	1	7	55
917 analyzátor	-	110	6	0	0

Benzodiazepines II klinická korelace (cut-off = 300 ng/mL)					
		Negativní vzorky	Hodnoty LC-MS/MS (ng/mL)		
			Blízké cut-off		623-1874
			223-226	366-382	
Roche/Hitachi	+	0	1	7	55
917 analyzátor	-	110	6	0	0

Další klinické vzorky byly tímto stanovením vyhodnoceny na analyzátoru Roche/Hitachi **cobas c 501**. 105 vzorků moči s negativním výsledkem získaným klinickou laboratoří v panelu testu drog bylo vyhodnoceno stanovením Benzodiazepines II. 10 z těchto vzorků bylo referenční metodou potvrzeno jako negativní. 100 % těchto normálních vzorků moči bylo negativních vůči cut-off 100 ng/mL, 200 ng/mL a 300 ng/mL. 55 vzorků, získaných klinickou laboratoří, kde byly předběžně pozitivní komerčně dostupným imunostanovením a následně potvrzeny metodou LC-MS/MS, bylo vyhodnoceno stanovením Benzodiazepines II. 100 % vzorků bylo pozitivních vůči cut-off 100 ng/mL, 200 ng/mL a 300 ng/mL.

Benzodiazepines II korelace (cut-off = 100 ng/mL)			
		LC-MS/MS	
		+	-
Analyzátor <b>cobas c 501</b>	+	55	0
	-	0	10

Benzodiazepines II korelace (cut-off = 200 ng/mL)			
		LC-MS/MS	
		+	-
Analyzátor <b>cobas c 501</b>	+	55	0
	-	0	10

Benzodiazepines II korelace (cut-off = 300 ng/mL)			
		LC-MS/MS	
		+	-
Analyzátor <b>cobas c 501</b>	+	55	0
	-	0	10

**Analytická specifita**

Specifita stanovení Benzodiazepines II pro různé benzodiazepiny a metabolity benzodiazepinu byla měřena vytvořením inhibiční křivky pro každou uvedenou sloučeninu a měřením přibližného množství každé sloučeniny, která je ekvivalentní reaktivitě stanovení nordiazepamu při hodnotě cut-off 100, 200 a 300 ng/mL. Následující výsledky byly získané na analyzátoch Roche/Hitachi a **cobas c**.

**Sloučenina<sup>b)</sup>**

	ng/mL ekvivalent k 100 ng/mL nordiazepa- mu	Přibl. % křížové reakivity
Deschloroetizolam	80	125
Flubromazepam	94	107
3-OH-Flubromazepam	126	79

Clonazolam	96	104
Pyrazolam	105	95
Diclazepam	118	85
Flubromazolam	119	84
Etizolam	122	82
Meclonazepam	132	76
Nifoxipam	157	64
Bentazepam	173	58
Estazolam	93	107
Bromazepam	101	99
Nitrazepam	104	96
7-Aminonitrazepam	71	141
7-Acetamidonitrazepam	16909	0.59
Oxazepam	105	95
Oxazepam glukuronid	234	43
Fenazepam	112	89
Alprazolam	113	89
α-Hydroxyalprazolam	115	87
4-Hydroxyalprazolam	117	86
Demoxepam	114	88
Clorazepat	115	87
Clobazam	122	82
Diazepam	128	78
Nordiazepam	101	99
Delorazepam	131	76
Temazepam	133	75
Temazepam glukuronid	302	33
Triazolam	136	74
α-Hydroxytriazolam	145	69
Flunitrazepam	136	73
7-Aminoflunitrazepam	109	92
Desmetylfunitrazepam	114	88
Lormetazepam	138	73
Brotiazolam	144	70
Klonazepam	152	66
7-Aminoklonazepam	107	94
Lorazepam	153	65
Lorazepam glukuronid	275	36
Chlordiazepoxid	156	64
Desmetylchlordiazepoxid	138	73
Norchlordiazepoxid	150	67
Pinazepam	160	63
Flurazepam	164	61
Desalkylflurazepam	106	95
Hydroxyetylflurazepam	127	79
Didesetylflurazepam	144	70
Desmetylmedazepam	168	59
Halazepam	187	53
Midazolam	190	53

**Benzodiazepiny II**

$\alpha$ -Hydroxymidazolam	125	80	Flurazepam	333	60
Prazepam	194	51	Desalkylflurazepam	225	89
Nimetazepam	1045	10	Hydroxyetylflurazepam	259	77
Oxaprozín	2283	4	Didesetylflurazepam	297	67
Zolpidem	106383	0.09	Lorazepam	335	60

b) Odsazená sloučenina je metabolitem předchozí látky.

<b>Sloučenina<sup>c)</sup></b>	<b>ng/mL ekvivalent k 200 ng/mL nordiazepa- mu</b>	<b>Přibl. % křížové reaktivity</b>			
Deschloroetizolam	159	126	Midazolam	343	58
Flubromazepam	180	111	$\alpha$ -Hydroxymidazolam	253	79
3-OH-Flubromazepam	246	81	Halazepam	354	56
Clonazolam	185	108	Pinazepam	364	55
Pyrazolam	188	106	Chlordiazepoxid	371	54
Flubromazolam	221	91	Desmethylchlordiazepoxid	313	64
Diclazepam	225	89	Norchlordiazepoxid	360	56
Etizolam	234	86	Prazepam	408	49
Meclonazepam	329	61	Desmethylmedazepam	422	47
Bentazepam	376	53	Nimetazepam	2191	9
Nifoxipam	391	51	Oxaprozín	7500	3
Estazolam	197	101	Zolpidem	206186	0.10
Bromazepam	208	96			
Oxazepam	224	89	<b>Sloučenina<sup>c)</sup></b>	<b>ng/mL</b>	<b>Přibl.</b>
Oxazepam glukuronid	506	40		<b>ekvivalent k</b>	<b>%</b>
Clorazepat	227	88	Deschloroetizolam	242	124
Fenazepam	230	87	Flubromazepam	274	110
Alprazolam	236	85	3-OH-Flubromazepam	358	84
$\alpha$ -Hydroxyalprazolam	241	83	Pyrazolam	279	107
4-Hydroxyalprazolam	246	81	Clonazolam	290	103
Nitrazepam	243	82	Diclazepam	346	87
7-Aminonitrazepam	159	126	Etizolam	343	88
7-Acetamidonitrazepam	55488	0.36	Flubromazolam	351	85
Demoxepam	253	79	Meclonazepam	424	71
Clobazam	256	78	Bentazepam	504	60
Diazepam	258	78	Nifoxipam	552	54
Nordiazepam	204	98	Bromazepam	299	100
Delorazepam	258	77	Estazolam	303	99
Triazolam	279	72	Oxazepam	325	92
$\alpha$ -Hydroxytriazolam	287	70	Oxazepam glukuronid	684	44
Temazepam	282	71	Fenazepam	346	87
Temazepam glukuronid	647	31	Demoxepam	352	85
Flunitrazepam	284	70	Nitrazepam	354	85
7-Aminoflunitrazepam	244	82	7-Aminonitrazepam	218	138
Desmethylflunitrazepam	248	81	7-Acetamidonitrazepam	55328	0.54
Lormetazepam	284	70	Alprazolam	372	81
Brotiazolam	292	68	4-Hydroxyalprazolam	342	88
Klonazepam	318	63	$\alpha$ -Hydroxyalprazolam	347	86
7-Aminoklonazepam	232	86	Clorazepat	374	80
			Clobazam	386	78
			Delorazepam	389	77

c) Odsazená sloučenina je metabolitem předchozí látky.

**Benzodiazepiny II**

Diazepam	400	75	Benzokain	<i>d</i> -Metamfetamin
Nordiazepam	316	95	Benzoylekgonin	<i>l</i> -Metamfetamin
Lormetazepam	410	73	(metabolit kokainu)	
Temazepam	416	72	Benzfetamin	Metaqualon
Temazepam glukuronid	923	33	Buspiron	Metylfenidat
Triazolam	425	71	Butabarbital	Metyprylon
$\alpha$ -Hydroxytriazolam	440	68	Kofein	Morfinsulfát
Flunitrazepam	439	68	Chlornan vápenatý	Naloxon
Desmetylflunitrazepam	338	89	Kanabidiol	Naltrexon
7-Aminoflunitrazepam	368	82	Kaptopril	Naproxen
Brotiazolam	464	65	Chlorochin	Niacinamid
Klonazepam	483	62	Chlorfeniramin	Nikotin
7-Aminoklonazepam	334	90	Chlorpromazin	Noretindron
Chlordiazepoxid	499	60	Kokain	<i>l</i> -Norpseudoefedrin
Desmetylchlordiazepoxid	452	66	Kodein	Omeprazol
Norchlordiazepoxid	483	62	Desipramin HCl	Penicilin G
Lorazepam	506	59	Dextrometorfan	Pentazocin
Lorazepam glukuronid	825	36	Dextropropoxyfen	Pentobarbital
Flurazepam	511	59	Digoxin	Fencyklidin
Desalkylflurazepam	336	89	Difenhydramin	Fenobarbital
Hydroxyetylflurazepam	394	76	Difenylhydantoin	Fenothiazin
Didesetylflurazepam	458	65	Doxepin	Fenylbutazon
Desmethylmedazepam	539	56	Ekgonin	<i>d,l</i> -Fenylpropanolamin
Midazolam	564	53	Ekgoninmetylester	Prokain
$\alpha$ -Hydroxymidazolam	428	70	Enalapril	Promethazin
Pinazepam	572	52	<i>d</i> -Efedrin	<i>d</i> -Pseudoefedrin
Halazepam	595	50	<i>l</i> -Efedrin	Chinidin
Prazepam	637	47	Epinefrin	Chinin
Nimetazepam	3247	9	Erytromycin	Sekobarbital
Oxaprozín	7507	4	Estriol	Sulindac
Zolpidem	200000	0.15	Fenoprofen	Tetracyklin

Mnoho benzodiazepinů se objevuje v moči většinou jako glukuronidy. Glukuronidové metabolity mohou mít větší nebo menší křížovou reaktivitu než původní sloučenina. Přítomnost enzymu  $\beta$ -glukuronidázy zvyšuje křížovou reaktivitu stanovení Benzodiazepines II na některé glukuronidové metabolity.

**Interference léčiv**

Následující sloučeniny byly připraveny v alikvotech poolované normální lidské moči pro získání konečné koncentrace 100000 ng/mL. Žádná z těchto sloučenin neposkytla ve stanovení hodnoty větší než 0.08 % křížové reaktivity pro cut-off 100 ng/mL a 200 ng/mL a 0.13 % křížové reaktivity pro cut-off 300 ng/mL.

Acetaminofen	Imipramin
Kys. acetylsalicylová	Izoproterenol
Amitriptylin	Ketamin
Amobarbital	Lidokain
<i>d</i> -Amfetamin	LSD
<i>l</i> -Amfetamin	MDA
Ampicilin	MDMA
Kys. askorbová	Melanin
Aspartam	Meperidin
Atropin	Metadon

Flumazenil	$\Delta^9$ THC-9-karboxylová kys.
Furosemid	Tetrahydrozolin
Kys. gentisová	Thioridazin
Glutethimid	Tolmetin
Guajakol glyceroléter	Trifluoperazin
Hydrochlorotiazid	Trimipramin
Hydroxyindolctová kys.	Tyramin
Hydroxyindolkarboxylová kys.	Verapamil
Ibuprofen	Zomepirac

**Odkazy**

- 1 Karch SB, ed. Drug Abuse Handbook. Boca Raton, FL: CRC Press LLC 1998.
- 2 Salamone SJ, ed. Benzodiazepines and GHB: Detection and Pharmacology. Totowa, NJ: Humana Press 2001.
- 3 Hardman JG, Limbird LE, Gilman A, eds. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. New York, NY: McGraw Hill Pub Co. 2001.
- 4 Baselt RC. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 7th ed. Foster City, CA: Biomedical Publications 2004.
- 5 Laurijsens BE, Greenblatt DJ. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for benzodiazepines. Clin Pharmacokinet 1996;30:52-76.

- 6 Hallfors DD, Saxe L. The dependence potential of short half-life benzodiazepines: a meta-analysis. *Am J Public Health* 1993;83:1300-1304.
- 7 Chouinard G. Issues in the clinical use of benzodiazepines: potency, withdrawal, and rebound. *J Clin Psychiatry* 2004;65(5):7-12.
- 8 Abernethy DR, Greenblatt DJ, Ochs HR, et al. Benzodiazepine drug-drug interactions commonly occurring in clinical practice. *Curr Med Res Opin* 1984;8:80-93.
- 9 Tanaka E. Toxicological interactions between alcohol and benzodiazepines. *J Toxicol Clin Toxicol* 2002;40:69-75.
- 10 Dou C, Bournique JS, Zinda MK, et al. Comparison of the Rates of Hydrolysis of Lorazepam-Glucuronide, Oxazepam-Glucuronide and Temazepam-Glucuronide Catalyzed by E. Coli  $\beta$ -D-Glucuronidase Using the OnLine Benzodiazepine Screening Immunoassay on the Roche/Hitachi 917 Analyzer. *J of Forensic Science* 2001;46(2):335-340.
- 11 Beck O, Lin Z, Brodin K, et al. The online screening technique for urinary benzodiazepines: comparison with EMIT, FPIA, and GC-MS. *J Anal Toxicology* 1997;21(7):554-557.
- 12 Salamone SJ, Honasoge S, Brenner C, et al. Flunitrazepam excretion patterns using the Abuscreen OnTrak and OnLine immunoassays: comparison with GC-MS. *J Anal Toxicol* 1997;21:341-345.
- 13 Klette KL, Wiegand RF, Horn CK, et al. Urine benzodiazepine screening using Roche Online KIMS immunoassay with beta-glucuronidase hydrolysis and confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2005;29:193-200.
- 14 Valentine JL, Middleton R, Sparks C. Identification of urinary benzodiazepines and their metabolites: comparison of automated HPLC and GC-MS after immunoassay screening of clinical specimens. *J Anal Toxicol* 1996;20(6):416-424.
- 15 Armbruster DA, Schwarzhoff RH, Hubster EC, et al. Enzyme immunoassay, kinetic microparticle immunoassay, radioimmunoassay, and fluorescence polarization immunoassay compared for drugs-of-abuse screening. *Clin Chem* 1993;39:2137-2146.
- 16 Toxicology and Drug Testing in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. 2nd ed. (C52-A2). Clinical and Laboratory Standards Institute 2007;27:33.
- 17 Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs. *Fed Regist* 2008 Nov 25;73:71858-71907.

Tečka se v tomto metodickém listu vždy používá jako desetinný oddělovač k označení hranice mezi celými a desetinnými místy desetinného čísla. Oddělení tisíců se nepoužívá.

**Symboly**

Roche Diagnostics používá kromě symbolů a znaků uvedených v normě ISO 15223-1 následující znaky (pro USA: pro definici použitých symbolů navštivte stránku <https://usdiagnostics.roche.com>):

CONTENT	Obsah soupravy
→	Objem po rekonstituci nebo promíchání
GTIN	Globální číslo obchodní položky

Doplnění, odstranění nebo změny textu jsou označeny pruhem podél textu.

© 2018, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim  
[www.roche.com](http://www.roche.com)

