

## Utilità del dosaggio CEDIA della EDDP (2-etilidene-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina) urinaria per la valutazione dell'outcome di soggetti tossicodipendenti sottoposti a programma di trattamento farmacologico con metadone

Lucio Marchioro, Angela Trombin, Federica Boscolo, Mario Plebani

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova

### ABSTRACT

**Utility of cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA) determination of urinary 2-ethylidene-1,5dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) for outcome evaluation in drug addict subjects treated with methadone.** Aim of the study was the evaluation of usefulness of the urinary EDDP determination by CEDIA in patients undergoing methadone pharmacological treatment programs. Some patients can present a fast metabolism of methadone ("fast metabolizers") with the consequence to produce low urinary concentrations of this substance, not easily detected by screening methods. Moreover, as attempt of result falsification by patients, addition of small amounts of methadone in drug-free urine samples is frequent. Measurement of EDDP, one of the main metabolic substances of methadone, can be very useful to evaluate the correct behaviour and the patients' compliance to treatment, showing several advantages for clinical application in the monitoring of drug addict subjects treated with methadone.

### INTRODUZIONE

Il metadone, sostanza analgesica oppioide di sintesi, è ampiamente utilizzato come sostituto dell'eroina per trattamento delle sindromi d'astinenza nel paziente tossicodipendente (1). Il trattamento metadonico si inserisce in un progetto terapeutico a lungo termine, di durata non programmabile a priori, che consente a persone dipendenti da oppiacei di condurre una vita normale e produttiva. Tale sostanza risulta inoltre essere un potente analgesico per la cura di pazienti con dolore maligno o post-operatorio (2).

Secondo quanto emerge dai dati rilevati dal Ministero della Salute, nel 2006 il numero dei soggetti sottoposti a trattamento riabilitativo non farmacologicamente assistito corrispondeva al 38% dell'utenza trattata nei servizi rilevati, mentre il rimanente 62% riceveva una terapia farmacologica attraverso la somministrazione di metadone (68%), di buprenorfina (20%) o di entrambi (4%).

Il processo metabolico di N-demetilazione del metadone produce i suoi due principali metaboliti farmacologicamente inattivi: la 2-etilidene-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP) e la 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirrolina (EMDP) (3). Entrambi i composti vengono successivamente idrolizzati in certa misura, con susseguente glucuronazione (4,5).

L'eliminazione del metadone e dei suoi metaboliti avviene attraverso filtrazione glomerulare renale: circa il 25% viene escreto attraverso le urine durante le prime 24 ore dopo l'assunzione, mentre il 52% durante le successive 96 ore (6).

Alcuni soggetti, definiti "rapidi metabolizzatori" ("fast metabolizers"), metabolizzano il metadone così veloce-

mente che la concentrazione di tale farmaco nelle urine può risultare, dopo breve tempo, al di sotto del limite di rivelabilità dei comuni metodi di screening (7,8).

Importante è anche che le alterazioni a carico del metabolismo del metadone possono essere dovute non solo a differenze genetiche nei sistemi metabolici della sostanza, ma anche ad interferenze tra farmaci e/o sostanze consumate nel tipico profilo del poliabuso.

Inoltre, tra gli innumerevoli tentativi di falsificazione dei risultati adottati dai pazienti tossicodipendenti, è frequente l'aggiunta di piccole quantità di metadone a campioni di urina "pulita" di altra provenienza.

La determinazione di EDDP può divenire quindi di grande importanza, sia per smascherare questo tipo di comportamento, che per la valutazione della "compliance" dei pazienti, che si dimostra fondamentale nel sostegno del loro percorso terapeutico globale.

Scopo del presente lavoro è la valutazione dell'utilità del dosaggio urinario di EDDP, utilizzando la metodologia "cloned enzyme donor immunoassay" (CEDIA) applicata allo strumento ILab650 (Instrumentation Laboratory).

### MATERIALI E METODI

#### Casistica clinica

In un periodo di circa due mesi sono stati selezionati, tra quelli pervenuti, 107 campioni di urina provenienti dal Servizio delle Tossicodipendenze (Ser.T.) di Padova e appartenenti a soggetti tossicodipendenti sottoposti o meno a trattamento farmacologico con metadone. Inoltre, dopo l'introduzione in regime ordinario della determinazione di EDDP, e riguardo la problematica dell'ipotizzato comportamento "spikers" (manipolatori), sono

stati selezionati, in un periodo di tre settimane, 202 campioni per una verifica delle contemporanee concentrazioni urinarie di metadone e EDDP.

Durante tutto il periodo di sperimentazione del metodo è stata rispettata ed applicata la dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996 (9).

## Metodi

La metodologia CEDIA è un immunodosaggio omogeneo che si avvale, tramite tecnologia del DNA ricombinante, dell'enzima di origine batterica  $\beta$ -galattosidasi, il quale è geneticamente sviluppato in due frammenti inattivi: l'enzima accettore (EA) e l'enzima donatore (ED). Il sistema omogeneo CEDIA opera attraverso il controllo dell'assemblaggio spontaneo degli ED con gli EA con una reazione antigene-anticorpo. L'aptene (analita) è legato covalentemente all'ED in modo da non interferire nella formazione dell'enzima  $\beta$ -galattosidasi attivo, nel momento in cui l'ED coniugato viene posto in soluzione con EA. La riassociazione spontanea dell'enzima sarà inibita aggiungendo al sistema un anticorpo specifico per l'aptene. Ponendo tale sistema in competizione con l'analita da testare presente nel campione biologico, si formerà un enzima attivo in quantità proporzionale alla quota di analita libero o di aptene. Se l'analita è presente nel campione si legherà all'anticorpo, lasciando liberi i frammenti inattivi di formare enzimi attivi. Se invece l'analita non è presente nel campione, l'anticorpo si legherà all'analita coniugato sul frammento inattivo di enzima, inibendo la riassociazione dei frammenti inattivi di  $\beta$ -galattosidasi e quindi la formazione di enzima attivo (Figura 1). La quantità di enzima formato è determinata attraverso l'idrolisi di un substrato specifico per la  $\beta$ -galattosidasi (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galattopiranoside) misurabile spettrofotometricamente a 570 nm, con conseguente riduzione delle possibili interferenze dovute a torbidità del campione urinario.

Per il dosaggio dell'EDDP (Microgenics GmbH) sono stati utilizzati quattro calibratori con le seguenti concentrazioni: 0  $\mu$ g/L (Calibrator 1, Negativo), 100  $\mu$ g/L (Calibrator 2, Primo), 500  $\mu$ g/L (Calibrator 3, Intermedio) e 2000  $\mu$ g/L (Calibrator 4, Alto). Durante ogni sessione di lavoro sono stati utilizzati due controlli MGC Clinical DAU Control (Microgenics GmbH) uno basso (75  $\mu$ g/L) ed uno alto (125  $\mu$ g/L).

Su tutti i campioni urinari è stato anche eseguito il

dosaggio della creatinina (metodo al picrato alcalino) su strumentazione Modular P (Roche Diagnostics), oltre che quello del metadone (metodologia CEDIA, Microgenics GmbH).

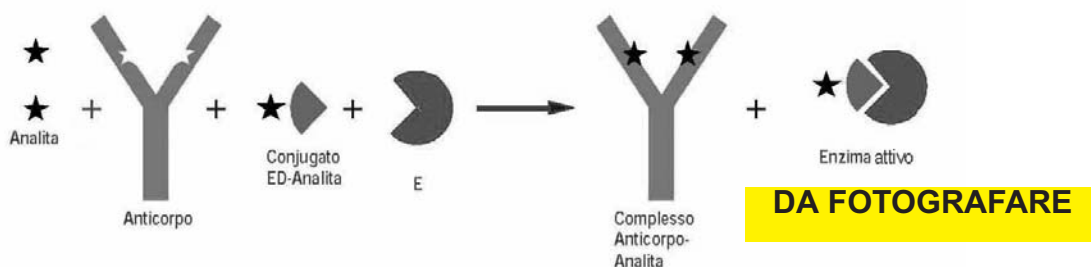
Il limite di rivelabilità della determinazione di EDDP, ottenuto tramite 20 replicati del calibratore zero (media + 3 DS), è 2,7  $\mu$ g/L.

La positività o negatività dei risultati è stata espressa secondo i cut-off indicati dalla ditta produttrice (300  $\mu$ g/L per metadone e 100  $\mu$ g/L per EDDP).

## RISULTATI

I 107 campioni urinari sottoposti al dosaggio di metadone e EDDP sono stati divisi in due gruppi in base alla concentrazione della creatinina urinaria. Nel primo gruppo (n=38), con creatinina <1,8  $\mu$ mol/L, limite indicato da Lafolie et al. (10) per la constatazione di idoneità del campione di urina, 18 campioni (47,3%) sono risultati positivi sia al metadone che alla EDDP, con concentrazioni medie ( $\pm$  DS) di 1115 ( $\pm$  174)  $\mu$ g/L (intervallo: 549-1210  $\mu$ g/L) per il primo e di 1625 ( $\pm$  678)  $\mu$ g/L per il secondo (intervallo: 126-2651  $\mu$ g/L). In questi campioni è stato anche eseguito il dosaggio dell'etanolo con un riscontro di positività (1,31  $\pm$  0,80 g/L, intervallo: 0,29-2,79) in 13 di essi. Sempre in questo primo gruppo 10 campioni (26,3%) sono risultati negativi sia al metadone che al suo metabolita, mentre per i rimanenti 10 campioni sono stati riscontrati esiti di positività per il metadone (1096  $\pm$  119  $\mu$ g/L, intervallo: 848-1230  $\mu$ g/L), ma non per EDDP (8  $\pm$  9  $\mu$ g/L, intervallo: 3-28  $\mu$ g/L).

Nel secondo gruppo di campioni (n=69) con creatinina urinaria >1,8  $\mu$ mol/L, 38 (55,1%) sono risultati positivi sia per metadone che EDDP, con concentrazioni di sostanza mediamente 2,9 e 21,5 volte superiori ai valori di cut-off [metadone (media  $\pm$  DS): 899  $\pm$  337  $\mu$ g/L, intervallo: 316-1222  $\mu$ g/L e EDDP (media  $\pm$  DS): 2150  $\pm$  788  $\mu$ g/L, intervallo: 160-3074  $\mu$ g/L], a conferma di una corretta assunzione del farmaco e quindi di buona "compliance" da parte dei pazienti. Sempre all'interno di questo gruppo, 14 campioni (20,2%) sono risultati negativi ad entrambe le sostanze e 7 campioni (10,1%) sono risultati positivi al metadone (media  $\pm$  DS: 1108  $\pm$  86  $\mu$ g/L, intervallo: 962-1215  $\mu$ g/L), ma non al suo metabolita (media  $\pm$  DS: 4,6  $\pm$  5,5  $\mu$ g/L, intervallo: 3-15  $\mu$ g/L). Infine, i rimanenti 10 campioni (14,5%) hanno mostrato risultati negativi per metadone (media  $\pm$  DS: 222  $\pm$  39  $\mu$ g/L, intervallo:



**Figura 1**

Schema della metodologia di misura CEDIA ("cloned enzyme donor immunoassay"). ED, enzima donatore; EA, enzima accettore.

151-275  $\mu\text{g/L}$ ), ma positivi per EDDP (media  $\pm$  DS: 1889  $\pm$  621  $\mu\text{g/L}$ , intervallo: 707-2660  $\mu\text{g/L}$ ).

Due profili rappresentativi, il primo di corretta adesione alla terapia metadonica e il secondo riconducibile a tentativi di falsificazione dei campioni di urina, ricavati da 202 campioni selezionati nel periodo di tre settimane, sono illustrati nelle Figure 2 e 3. Nella Figura 2 sono stati tolti tre campioni risultati negativi per metadone (176, 274 e 291  $\mu\text{g/L}$  le rispettive concentrazioni), ma positivi per EDDP (363, 325 e 455  $\mu\text{g/L}$ ).

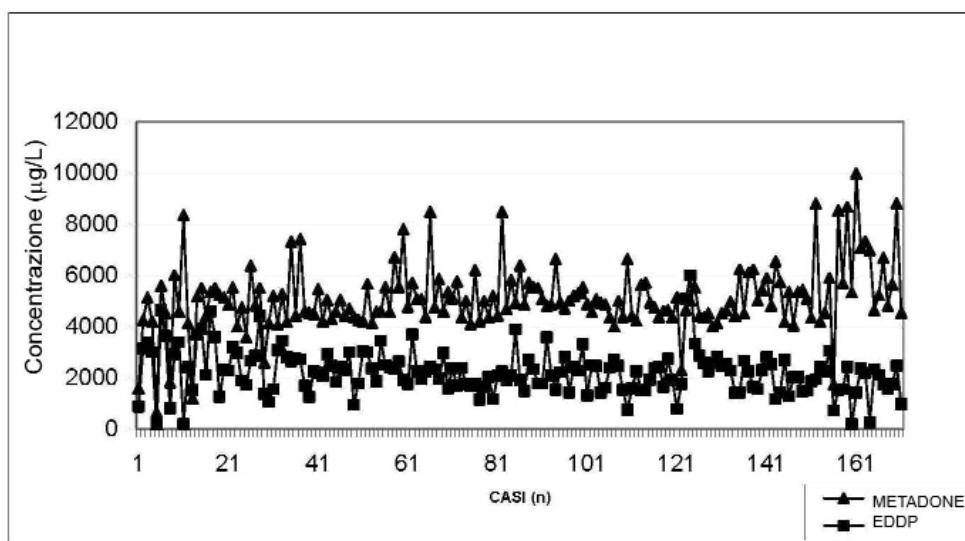
## DISCUSSIONE

Il termine "compliance" è comunemente utilizzato nel linguaggio scientifico per esprimere il grado di adesione di un soggetto a una prescrizione medica, definendo così la sua volontà di collaborazione. E' indubbio che da questa volontà deriva il buon esito di un qualsiasi tipo di trattamento, sia esso farmacologico o no.

Nell'ambito delle tossicodipendenze, il monitoraggio dei campioni di urina con i metodi di laboratorio ben si colloca all'interno delle iniziative che servono a documentare gli esiti dei trattamenti applicati (11). La valutazione è comunemente affidata alle dichiarazioni del soggetto, che dovrebbero dimostrare coerenza con quanto riscontrato con le analisi di laboratorio (12). Uno screening periodico delle sostanze d'abuso in campioni biologici (urine) si dimostra utile, tuttavia, nella valutazione clinica del soggetto tossicodipendente e dei progressi ottenuti con l'intervento, la correzione e l'implementazione della terapia, incoraggiando a mantenere i cambiamenti positivi raggiunti (11).

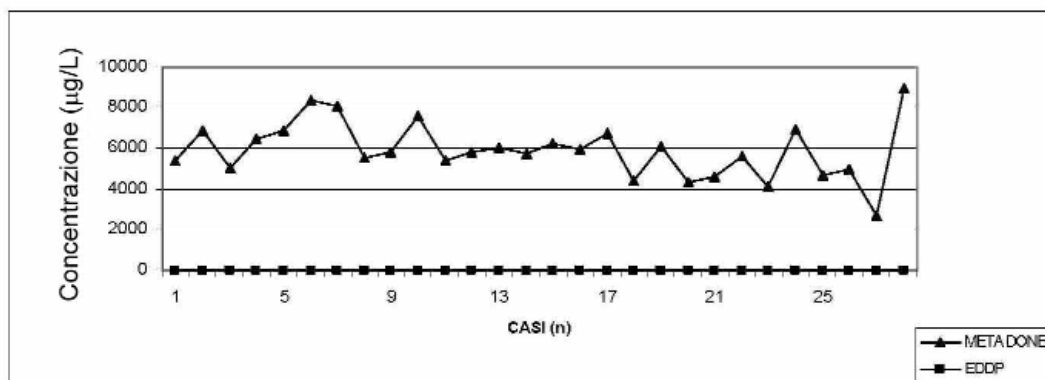
Per quanto riguarda i risultati del nostro studio, la determinazione di EDDP, metabolita principale del metadone, ha permesso di stabilire che il 26,3% dei campioni con creatinina urinaria  $<1,8 \mu\text{mol/L}$  erano effettivamente campioni adulterati.

Sempre nell'ambito di questo gruppo con basse con-



**Figura 2**

Risultati relativi a 171 casi evidenzianti una corretta adesione alla terapia metadonica.



**Figura 3**

Risultati relativi a 28 campioni evidenzianti tentativi di falsificazione (soggetti manipolatori o "spikers").

centrazioni urinarie di creatinina, il dosaggio aggiuntivo dell'etanolo, non richiesto da parte del Ser.T., suggerisce l'ipotesi che per 13 campioni il risultato di creatinina  $<1,8 \mu\text{mol/L}$  possa essere causato dall'azione inibente sulla vasopressina propria dell'etanolo stesso. Per 5 campioni, tuttavia, il dosaggio dell'etanolo, dimostratosi negativo, non aiuta a trovare una spiegazione plausibile, presupponendo solo, in base ai risultati positivi per metadone e EDDP, un aumentato introito di acqua precedente la raccolta del campione.

Nel gruppo di campioni idonei (creatinina urinaria  $>1,8 \mu\text{mol/L}$ ) la determinazione di EDDP è stata utile per individuare 7 soggetti (10,1%) cosiddetti "manipolatori" e 10 soggetti con esiti di negatività per metadone, ma positività per EDDP. Per questi soggetti possibili "fast metabolizers" o in terapia in corso di aggiustamento, EDDP ha confermato l'aderenza al protocollo terapeutico.

In conclusione, il dosaggio di EDDP è un esempio di come un programma di trattamento di dipendenza da sostanze d'abuso difficilmente possa prescindere da un contributo del laboratorio. Attualmente, presso il nostro Servizio di Medicina di Laboratorio, la determinazione di EDDP viene attivata come "reflex test" sulla base di regole che prendono in considerazione risultati relativi a metadone e creatinina urinaria. Tuttavia, in ragione di quanto fino ad oggi ottenuto, siamo in linea di principio favorevoli alla contemporanea determinazione di metadone e EDDP, anche se preparati a sostituire in futuro la determinazione convenzionale di metadone con quella della sola EDDP se l'obiettivo è quello di monitorare il trattamento metadonico. La determinazione di metadone e EDDP rimane peraltro sicuramente indispensabile all'inizio di ogni trattamento farmacologico o variazione sostanziale dello stesso.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ferrari A, Coccia CPR, Bertolini A. Metadone-metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Research* 2004;50:551-9.
2. Garrido MJ, Trocóniz IF. Methadon: a review of its pharmacokinetic/pharmacodynamic properties. *J Pharmacol Toxicol* 1999;42:61-6.
3. Bernard JP, Opdal MS, Karinem R. Relationship between metadone and EDDP (2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine) in urine samples from Norwegian prisons. *Eur J Clin Pharmacol* 2007;63:777-82.
4. Baselt RC, Bickel MH. Biliary excretion of methadone by the rat: identification of a para-hydroxylated major metabolite. *Biochem Pharm* 1973;22:3117-20.
5. Sullivan HR, Due SL, McMahon RE. The identification of three new metabolites of methadone in man and in the rat. *J Am Chem Soc* 1972;94:4050-1.
6. Inturrisi CE, Colburn WA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methadone in patients with chronic pain. *Clin Pharmacol Ther* 1987;41:392-401.
7. Eap CB, Deglon JJ, Baumann P. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of methadone. Clinical relevance. *Heroin Add & Rel Clin Probl* 1999;1:19-34.
8. Nilsson MI, Grönbladh L, Widerlöv E, et al. Pharmacokinetics of methadone in methadone maintenance treatment: Characterization of therapeutic failures. *Eur J Clin Pharmacol* 1983;25:497-501.
9. [http://www.wma.net/e/humanrights/policy\\_meetings.htm](http://www.wma.net/e/humanrights/policy_meetings.htm)
10. Lafolie P, Beck O, Blennow G, et al. Importance of creatinine analyses of urine when screening for abused drugs. *Clin Chem* 1991;37:1927-31.
11. Macchia T, Gentili S, Merola G. Aspetti laboratoristici nella valutazione dell'outcome durante il trattamento. Serpelloni G, Macchia T, Mariani F, eds. La valutazione dell'outcome nella pratica clinica. 2<sup>a</sup> ed. Verona: Dipartimento delle Dipendenze ULSS 20 Regione Veneto, 2006:213-25.
12. Katz N, Fanciullo GJ. Role of urine toxicology testing in the management of chronic opioid therapy. *Clin J Pain* 2002;18:S76-82.