

## Esperienze nella misura della buprenorfina nelle urine con metodica CEDIA

Giovanni Cangiano<sup>1</sup>, Camillo Esempio<sup>2</sup>, Maria Russo<sup>1</sup>, Francesco Forte<sup>1</sup>, Annachiara Latte<sup>1</sup>, Rossella Garofano<sup>3</sup>, Maurizio D'Amora<sup>4</sup>, Andrea Risitano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Patologia Clinica P.O. "Pellegrini", <sup>2</sup>U.O. SERT, Distretto 50, <sup>3</sup>U.O. SERT, Distretto 47, <sup>4</sup>Laboratorio Patologia Clinica P.O. "Incurabili", ASL NA1, Napoli

### ABSTRACT

**CEDIA assay of buprenorphine.** A new immunoenzymatic method in homogenous phase has been applied to determine urinary buprenorphine and its high effectiveness has been demonstrated by our research. The automatic dilution of urine samples has permitted to quantify over 85% of the tested samples. Data coming from the urinary buprenorphine/creatinine ratio from every monitored subject for a long period of time were clinically relevant.

### INTRODUZIONE

La buprenorfina (BUP) è un oppioide utilizzato nel trattamento delle tossicodipendenze da eroina in sostituzione al metadone, per il suo minore potenziale d'abuso, la lieve sintomatologia astinenziale provocata dalla sua sospensione e per il maggiore effetto protettivo sulla depressione respiratoria (1,2).

L'utilizzo di diverse posologie e l'aumento delle richieste di quantificazione urinaria ha indotto il nostro laboratorio a ricercare un test rapido, facilmente automatizzabile e più efficace rispetto a quelli effettuati con tecniche eterogenee immunoenzimatiche, radioimmunometriche e cromatografiche (HPLC – Remedi).

Nel presente lavoro è stato valutato un nuovo e veloce dosaggio della BUP urinaria effettuato con tecnica immunoenzimatica omogenea CEDIA evidenziando inoltre l'utilità del rapporto BUP/creatinina urinarie.

### MATERIALI E METODI

Lo studio si riferisce a 693 campioni di urine appartenenti a 27 pazienti in terapia con BUP da 2 a 16 mg. I campioni sono stati testati presso il Laboratorio di Patologia Clinica del P.O. dei Pellegrini dell'ASL NA 1.

I dati sono stati raccolti nel periodo maggio-giugno 2005 e poi ampliati con uno studio semestrale (dicembre 2005-maggio 2006) condotto su campioni ottenuti da alcuni pazienti afferenti ai Servizi Tossicodipendenze (SERT) dei Distretti 47 e 50 dell'Azienda Sanitaria Locale Napoli 1 (ASL NA 1). In tutti i casi si trattava di campioni residui resi anonimi prima dello studio.

Le determinazioni sono state effettuate con la tecnica CEDIA sull'analizzatore biochimico AU 400 della ditta Olympus (3,4). Per la calibrazione si utilizza la modalità siero servendosi della interpolazione strumentale a 5 punti aventi concentrazioni di 0, 5, 20, 50 e 75 µg/L.

L'unica variazione apportata alla metodica e capace di mettere in evidenza concentrazioni di BUP urinaria entro i 1500 µg/L è rappresentata dalla prediluizione automatica del campione urinario (1:20 con acqua distillata).

A 87 µL di reagente R1 (anticorpi monoclonali murini anti-buprenorfina, sali tampone ed accettore enzimatico) vengono miscelati 7 µL di urina. Dopo opportuna incubazione (circa 10 cicli macchina) l'analizzatore biochimico aggiunge 87 µL di reagente R2 (donatore enzimatico coniugato con buprenorfina, substrato, sali tampone). La lettura in cinetica viene effettuata tra i cicli 24 e 27 alla lunghezza d'onda primaria di 570 nm ed a quella secondaria di 660 nm. Ogni ciclo macchina corrisponde a circa 20 secondi.

Per alcune conferme cromatografiche è stato utilizzato il sistema multicolonnare Remedi-HS della ditta Bio-Rad Laboratories capace di evidenziare contemporaneamente sia BUP che il suo metabolita norbuprenorfina (5,6,7).

La creatinina urinaria (CREA) è stata determinata con la metodica al picrato alcalino utilizzando l'analizzatore AU 400.

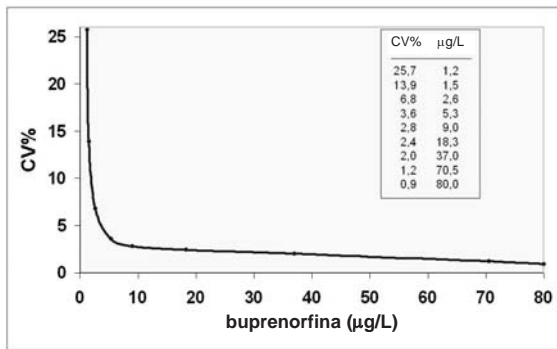
### RISULTATI

Le prove di precisione nella serie (n=20) e tra le serie (20 giorni lavorativi), effettuate con controlli a titolo noto di BUP, mostravano CV inferiori al 5% (Tabella 1). Nella Figura 1 è rappresentato il profilo di imprecisione della determinazione immunoenzimatica di BUP: per ogni campione urinario contenente BUP erano effettuati 6 dosaggi e ricavato il relativo CV. Nell'intervallo analitico compreso tra 5 (valore di cut-off) e 75 µg/L si evidenzia un CV <4%. Concentrazioni inferiori a 5 µg/L mostravano una discreta imprecisione.

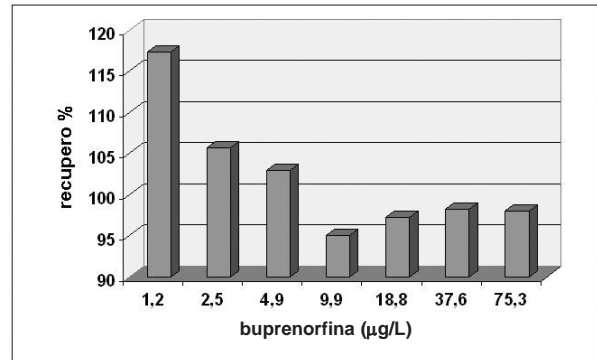
Nella Figura 2 vengono mostrati i recuperi percentuali ricavati da un campione a titolo elevato di BUP e progressivamente diluito con urina negativa. Erano ottenuti risultati compresi tra il 95,0% ed il 117,4%.

Abbiamo quindi misurato il rapporto BUP urinaria/CREA in una serie di campioni urinari di 27 soggetti, monitorati nel tempo e sottoposti a somministrazione di 2, 4, 8 e 16 mg di BUP: i relativi intervalli fiduciarci al 95% sono rappresentati in Tabella 2.

La Figura 3 mette in evidenza l'andamento del rapporto BUP urinaria/CREA di 4 pazienti, monitorati nel



**Figura 1**  
*Profilo di imprecisione del metodo CEDIA per il dosaggio della buprenorfina urinaria.*



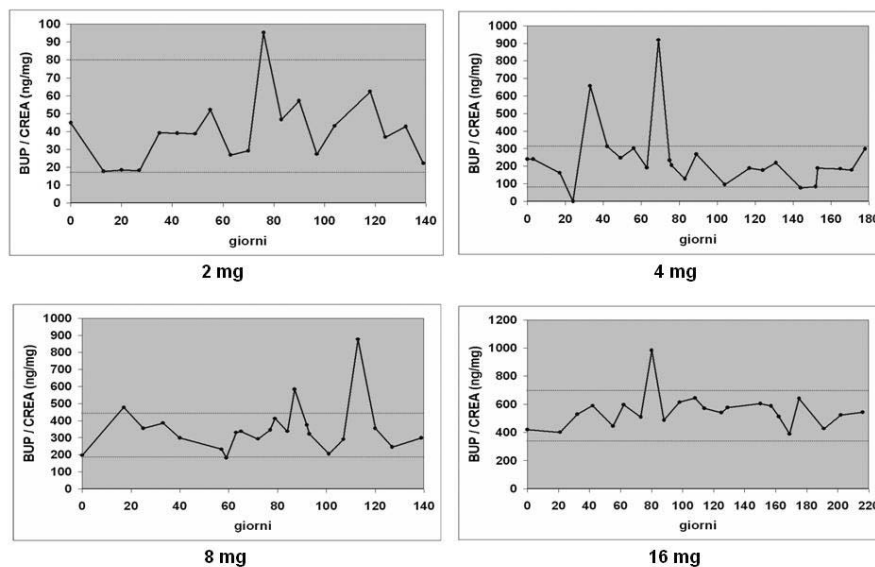
**Figura 2**  
*Prova di linearità. Gli istogrammi mostrano il recupero per ciascun punto in diluizione.*

**Tabella 1**  
*Prove di precisione*

BUP (µg/L)	CV%	
	nella serie	tra le serie
5,3	3,6	4,5
9,1	2,8	3,4
18,3	2,4	3,0

**Tabella 2**  
*Intervalli fiduciali di BUP urinaria/CREA riferiti a pazienti a cui venivano somministrati 2, 4, 8 e 16 mg di BUP*

BUP (mg) somministrata	n. pazienti monitorati	BUP/CREA (ng/mg) (intervalli fiduciali al 95%)
2	3	17,9 - 80,4
4	8	80,2 - 307,5
8	9	189,1 - 446,6
16	7	394,8 - 642,5



**Figura 3**  
*Andamento temporale del rapporto BUP urinaria/CREA in soggetti con 2, 4, 8 e 16 mg di BUP somministrata.*

tempo, a cui erano somministrati rispettivamente 2, 4, 8 e 16 mg di farmaco.

**DISCUSSIONE**

Il dosaggio della BUP urinaria effettuato col sistema immunoenzimatico CEDIA è facilmente adattabile sull'a-

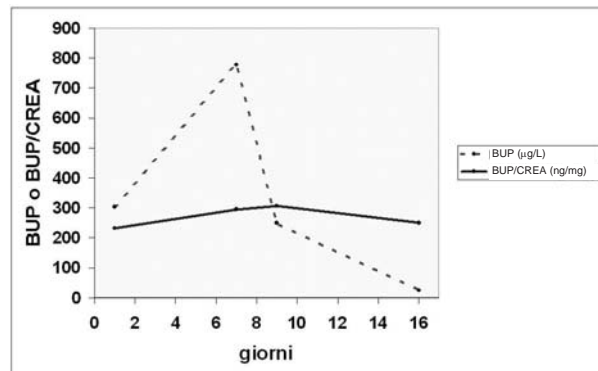
nalizzatore biochimico AU 400 Olympus e rappresenta inoltre l'unico metodo in commercio capace di effettuare un dosaggio in fase omogenea in pochi minuti.

La necessità di dosare concentrazioni di BUP urinaria superiori a 75 µg/L (limite di linearità imposto dal kit commerciale), che scaturisce dall'esigenza di monitoraggio dei pazienti SERT sottoposti a terapia con BUP, ci ha

indotto ad introdurre una prediluizione del campione. Con tale accorgimento si evita di diluire manualmente la grande parte dei campioni urinari abbassando tempi e costi necessari alla quantificazione del farmaco.

Nel nostro studio, effettuato su pazienti in terapia da 2 a 16 mg di oppioide, si rilevava che nell'85% delle misure si riscontrano concentrazioni superiori a 100  $\mu\text{g/L}$ .

La migliore correlazione con la dose somministrata si ottiene mediante il parametro BUP urinaria/CREA: la correzione della concentrazione del farmaco con la creatinina evita false interpretazioni del dato analitico dovute a concentrazioni ed a diluizioni dell'urina (8). La Figura 4 evidenzia un andamento temporale più costante dei valori BUP/CREA rispetto ai relativi valori di BUP nel monitoraggio di un paziente sottoposto alla somministrazione di 6 mg di BUP.



**Figura 4**  
Monitoraggio temporale di BUP e di BUP urinaria/CREA in un paziente con somministrazione di 6 mg di BUP.

## BIBLIOGRAFIA

1. Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. Chemical Toxicology Institute. Foster City, CA. 2000.
2. Serpelloni G, Pirastu R, Brignoli O. Medicina delle tossicodipendenze. SEMG, Firenze 1996.
3. Latte A, Cangiano G, Garofano R, et al. Determinazione della buprenorfina urinaria su AU 400 Olympus e proposta di range di riferimento in corso di terapia. *Biochim Clin* 2005; 29:186.
4. Cangiano G, Esemplio C, Latte A, et al. Utilizzo del rapporto buprenorfina urinaria/creatinina in corso di terapia farmacologica. *Biochim Clin* 2006; 30:327.
5. Sambataro S, Signorelli A, Barbaria S, et al. Analisi automatica del metabolita della buprenorfina, N-dealchil buprenorfina su campioni d'urina con sistema Remedi HS. *Biochim Clin* 2002;26:77-80.
6. Cangiano G, D'Amora M, Siconolfi M, et al. Dosaggio della norbuprenorfina in HPLC: limiti e vantaggi nell'utilizzo per i servizi per le farmacodipendenze. *Biochim Clin* 2002;26:229.
7. Cangiano G, D'Amora M, Manera B, et al. Monitoraggio farmacologico della buprenorfina a scopo terapeutico. *Biochim Clin* 2002;26:419-23.
8. Gagliano-Candela R. Tossicologia Forense. Sostanze stupefacenti e psicotrope. Giuffrè Editore. 2001:160.