

Miglioramento dell'efficacia del trattamento con buprenorfina e dell'adesione al piano terapeutico attraverso la determinazione delle concentrazioni urinarie del farmaco

Lucio Marchioro¹, Alessandra Marin¹, Andrea Vendramin², Mario Plebani¹

¹Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Padova

²Dipartimento per le Tossicodipendenze, ULSS 16, Padova

ABSTRACT

Improvement of the effectiveness of buprenorphine treatment by determination of its urinary concentrations.

An automated immunoenzymatic method in homogeneous phase [cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA)] was used to detect urinary buprenorphine in a group of heroin addicts treated with the drug at different dosages. A good analytical performance was obtained with this method in comparison with the ELISA methods reported in literature, although some cross-reactivity should be considered if some opiate substances, such as methadone and morphine, are present in urine at high concentrations.

INTRODUZIONE

Il metadone è il farmaco più comunemente prescritto nel trattamento della dipendenza da oppiacei e viene somministrato al 80-90% dei soggetti in terapia sostitutiva rappresentando, per il complesso delle sue caratteristiche, uno strumento efficace e maneggevole. L'impiego di questo principio attivo rappresenta, nel 50-80% dei casi trattati, un'importante opportunità per migliorare lo stato di salute, il comportamento sociale e le capacità di aderenza agli altri eventuali interventi non farmacologici. Specificamente, il trattamento di mantenimento con metadone a dosi adeguate, assunto secondo prescrizione e con regolarità da pazienti il cui problema si limiti all'abuso di oppioidi, pur non determinando la guarigione, riduce (o elimina) il "craving" per l'eroina che condiziona i comportamenti di ricerca e autosomministrazione caratteristici di questo disturbo (1). Inoltre favorisce il riequilibrio di quelle funzioni (immunitaria, stress-responsiva dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e riproduttiva dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi) che sono tipicamente alterate nelle fasi attive della tossicomania da eroina, conservando tuttavia la fisiologica risposta al dolore acuto e cronico.

Nonostante questi vantaggi, le terapie di mantenimento con metadone non sono sempre ben accettate a causa di pregiudizi culturali e interpretazioni ideologiche apparentemente insormontabili. Sono state quindi proposte opzioni terapeutiche alternative. In Italia, ormai da alcuni anni, è possibile prescrivere per il trattamento della dipendenza da oppiacei la buprenorfina, in specifica formulazione sublinguale (SubutexTM, Reckitt Benckiser Healthcare). Recentemente è stata anche registrata l'associazione buprenorfina/naloxone (SuboxoneTM, Reckitt Benckiser Healthcare), anch'essa in formulazione sublinguale, certamente più sicura rispetto all'impiego del farmaco per via endovenosa (2).

Così come il metadone, tanto la buprenorfina quanto l'associazione buprenorfina/naloxone possono essere impiegati sia per il trattamento di disintossicazione che per quello di stabilizzazione/mantenimento (3). La terapia di mantenimento prevede, come parte integrante della stessa, lo screening tossicologico eseguito regolarmente sui campioni di urina dei pazienti al fine di dimostrare la eventuale contemporanea assunzione di eroina o di altre sostanze di abuso.

L'intento del presente lavoro è stato quello di valutare se e come i risultati di laboratorio possano rappresentare un utile strumento per la verifica dell'avvenuta assunzione del farmaco e della sua efficacia terapeutica a diversi dosaggi. Il monitoraggio clinico dei pazienti è stato effettuato con l'esecuzione di un immunodosaggio CEDIA ("Cloned Enzyme Donor Immunoassay") in fase omogenea per la determinazione del farmaco su campioni di urina.

MATERIALI E METODI

Casistica clinica

In un periodo complessivo di otto mesi sono stati selezionati dall'attività giornaliera del laboratorio 62 campioni di urina di 9 pazienti tossicodipendenti, 6 maschi e 3 femmine, tutti afferenti al Ser. T. di Padova e in trattamento con differenti posologie di buprenorfina (da un minimo di 2 mg/die a un massimo di 16 mg/die). Durante la sperimentazione è stata rispettata ed applicata la dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996.

Tutti i campioni sono stati sottoposti alla determinazione delle principali classi di sostanze d'abuso: oppiacei, metadone, cocaina, cannabinoidi, amfetamine ed amfetamine/3,4-metilendioossimetamfetamina (MDMA) con metodologia immunologica basata sull'interazione cinetica di microparticelle in soluzione (KIMS) (Roche

Diagnostics), a quella della buprenorfina (CEDIA, Microgenics Corporation, distribuito da Olympus Italia srl) e alla determinazione della creatinina urinaria con metodo colorimetrico al picrato alcalino (Roche Diagnostics).

Come popolazione di controllo sono stati selezionati 45 soggetti afferenti al Dipartimento per le Tossicodipendenze di Padova non sottoposti a trattamento con buprenorfina e 18 volontari non tossicodipendenti.

Metodologia analitica

La determinazione semiquantitativa della buprenorfina era eseguita con metodica CEDIA, un immunodosaggio enzimatico omogeneo che si avvale della tecnologia del DNA ricombinante (4). Tale tecnica, applicata all'analizzatore biochimico automatizzato Modular P (Roche Diagnostics) opera attraverso il controllo della associazione dei due frammenti inattivi dell'enzima β -galattosidasi, quali l'enzima donatore (ED) e l'enzima accettore (EA), mediante una reazione antigene-anticorpo, in modo da formare l'enzima attivo. In particolare, l'aptene viene legato covalentemente all'ED in modo da non interferire nella formazione dell'enzima β -galattosidasi attivo; la riassociazione spontanea dell'enzima è inibita aggiungendo al sistema un anticorpo specifico per l'aptene. Ponendo tale sistema in competizione con l'analita da testare presente in un campione biologico di un paziente, si formerà un enzima attivo in quantità direttamente proporzionale alla quantità di analita libero. La quantità di enzima formato viene determinata attraverso l'idrolisi di un substrato specifico per la β -galattosidasi, misurabile spettrofotometricamente.

L'intero studio ha inoltre previsto una prova di imprecisione intra-serie ed inter-serie sui due materiali di controllo C1 (low) e C2 (high) (CEDIA Buprenorphine Controls, Microgenics), con concentrazione rispettivamente di 3,0 $\mu\text{g/L}$ e di 7,0 $\mu\text{g/L}$, una verifica della riproducibilità sul calibratore S2 (CEDIA Buprenorphine Calibrators, Microgenics) a 5,0 $\mu\text{g/L}$, una prova di sensibilità analitica sul calibratore S1 a concentrazione 0 e una prova di stabilità dell'analita su 23 campioni di urina conservati a 4 °C fino a 1128 ore dalla determinazione iniziale.

Come VEQ sono stati utilizzati tre campioni appartenenti al circuito europeo interlaboratorio UK NEQAS ("United Kingdom National External Quality Assessment Service").

RISULTATI

Nella Tabella 1 sono riportati i risultati relativi alle

Tabella 1
Risultati delle prove di imprecisione

Intra-serie				Tra-serie			
n	Media, $\mu\text{g/L}$	DS, $\mu\text{g/L}$	CV, %	n	Media, $\mu\text{g/L}$	DS, $\mu\text{g/L}$	CV, %
60	2,37	0,29	12,2	20	2,63	0,45	17,1
60	6,70	0,52	7,8	20	7,33	0,38	5,2

prove di imprecisione effettuate sui due materiali di controllo.

Il CV ottenuto con l'esecuzione di venti ripetizioni consecutive del calibratore CEDIA S2 in una stessa seduta analitica è risultato essere di 9,8% (media \pm DS, = 4,71 \pm 0,46 $\mu\text{g/L}$).

La concentrazione minima rilevabile, ottenuta con 20 ripetizioni del calibratore CEDIA S1 in un'unica sessione di lavoro, è stata pari a 0,056 $\mu\text{g/L}$ (media + 3DS).

Nella Figura 1 sono riportati i risultati relativi alla prova di stabilità eseguita su 23 campioni di urina conservati a 4 °C e analizzati in cinque tempi diversi, al tempo 0 (basale) e successivamente a 48, 120, 288 e 1128 ore (47° giorno) dal tempo 0. La percentuale di decadimento medio della concentrazione di buprenorfina è risultata essere del 1,7% dopo 48 e 120 ore, del 7,6% dopo 288 ore e del 12,6% dopo 1128 ore.

Nella VEQ la concordanza fra i valori assegnati e i risultati di buprenorfina ottenuti è risultata del 100%.

Relativamente ai 9 soggetti in terapia con buprenorfina è stata verificata la positività/negatività agli oppiacei rispetto agli specifici valori di cutoff (5,0 $\mu\text{g/L}$ per buprenorfina, 300 $\mu\text{g/L}$ per oppiacei, metadone e cocaina, 50 $\mu\text{g/L}$ per cannabinoidi e 1000 $\mu\text{g/L}$ per amfetamine) sul totale dei 62 campioni di urina (in tutti questi campioni la determinazione della buprenorfina è risultata positiva). Nella Figura 2 sono riportate le percentuali dei risultati positivi agli oppiacei riscontrate. Nel dettaglio, le positività agli oppiacei sono riferibili ai campioni di due differenti pazienti trattati l'uno con 2,0 mg/die e l'altro con 8,0 mg/die di Subutex.

La determinazione della buprenorfina ha dato esito negativo nel 100% dell'intera popolazione di controllo, sia per quanto riguarda i soggetti tossicodipendenti non sottoposti a terapia con Subutex che i soggetti volontari non tossicodipendenti.

DISCUSSIONE

L'abuso di sostanze e, in particolare la dipendenza dagli oppiacei, sono associati a costi sociali, medici ed economici molto alti, ponendo come priorità assoluta lo sviluppo di efficaci trattamenti terapeutici (5, 6). Fino a oggi sono stati testati diversi approcci farmacologici e numerose tecniche psicosociali, al fine di verificare sia la loro efficacia terapeutica, che il loro impiego in protocolli di trattamento comunitario (7-9).

La buprenorfina è un farmaco approvato dal 2002 dalla Food and Drug Administration per il trattamento da abuso di oppiacei (10) e la sua adozione nel trattamento della dipendenza da oppiacei risulta ad oggi in espansio-

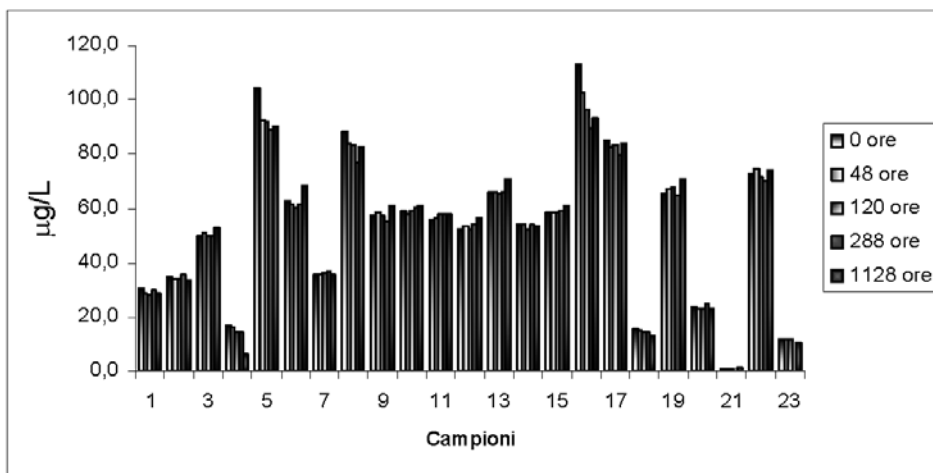


Figura 1
Valori della concentrazione di buprenorfina ottenuti sui campioni di urina conservati a 4 °C e determinati a distanza di 48, 120, 288 e 1128 ore dal tempo basale.

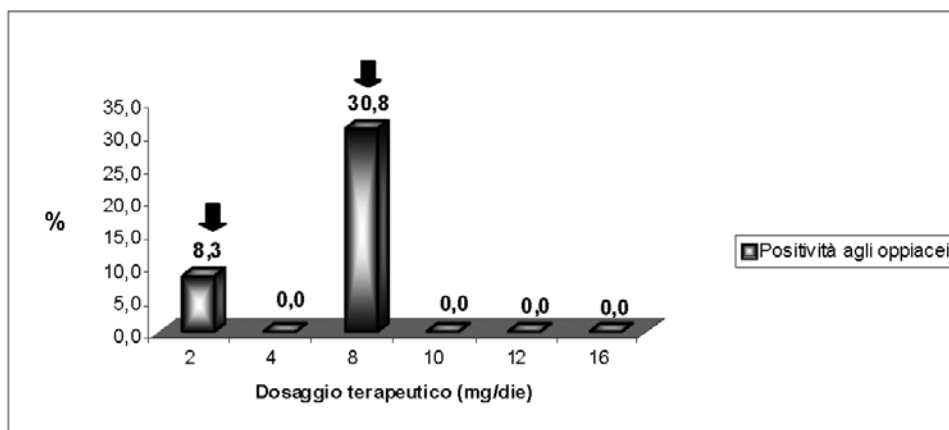


Figura 2
Percentuale dei campioni urinari risultati positivi alla determinazione degli oppiacei.

ne. In Italia nel 2003, 7113 persone risultavano in terapia con tale farmaco con un incremento della percentuale dei pazienti afferenti ai Ser.T. e sottoposti poi a trattamento con buprenorfina dal 20% del 2000 al 51% del 2003 (11).

Per quanto riguarda la sua farmacodinamica, sebbene la buprenorfina sia ancora per lo più presentata come un agonista parziale del recettore oppioide MOP (μ) con effetto antagonista sul recettore oppioide KOP (κ), essa è dotata di un meccanismo di azione assai più complesso che può essere così riassunto: agonismo parziale sul recettore MOP, agonismo/antagonismo sui recettori DOP (δ) e KOP e agonismo sul recettore NOP coinvolgente anche altri meccanismi neurobiologici sottesi all'abuso di altre sostanze, compresi alcol e cocaina (12-14).

Grazie alle caratteristiche farmacologiche di agonista dei recettori MOP e NOP, la buprenorfina è considerata un farmaco peculiare, diverso tanto dal metadone (agonista totale MOP) quanto dal naltrexone (antagonista MOP). Tali caratteristiche risultano molto utili in terapia

(15), in quanto provocano minori effetti sul cronotropismo cardiaco (modificazione della frequenza cardiaca), sul ritmo respiratorio e sul potenziale d'abuso; inoltre, le stesse caratteristiche riducono il rischio di "overdose" o di danno in caso di ingestione accidentale, oltre a fornire la possibilità di assunzione a giorni alterni, a differenza di quanto avviene per il metadone (16). Altre caratteristiche vanno invece annoverate fra i punti critici o tra quelli che necessitano di ulteriori approfondimenti. In caso di eccessiva assunzione ("overdose") di buprenorfina, avendo questa una elevatissima affinità per i recettori MOP, l'antidoto naloxone mostra scarsa efficacia terapeutica, a meno che non sia somministrato a dosi molto superiori a quelle normalmente utilizzate.

Le ricerche cliniche hanno identificato nella buprenorfina, inizialmente impiegata come farmaco analgesico, una sicura alternativa alla detossificazione e alla terapia di mantenimento da oppiacei (17). Al laboratorio viene richiesto un servizio di supporto sia alla diagnosi

che al monitoraggio del trattamento dei tossicodipendenti afferenti alle strutture pubbliche e private, con dosaggi mirati su campioni di urine appartenenti a soggetti in terapia disintossicante. Una valutazione semiquantitativa dell'analita prevede l'impiego di immunodosaggi, che dovrebbero presentare caratteristiche di semplicità, rapidità di esecuzione, convenienza in termini di costo e fornire quindi la possibilità di determinare in maniera efficiente numerosi campioni con sistemi analitici automatici. Tali metodiche dovrebbero inoltre garantire determinazioni accurate, dalle discrete caratteristiche di sensibilità e specificità, e risultare, quindi, utili strumenti per il controllo della effettiva deterrenza dall'impiego delle droghe d'abuso.

Fino ad un recente passato la determinazione della buprenorfina nelle urine era eseguita con metodologia ELISA (18); questo tipo di metodo aveva tuttavia un impiego ridotto, in quanto presentava limiti in termini di automazione e di produttività. Per questa ragione l'introduzione degli immunodosaggi ha assunto una particolare importanza. Nel nostro studio di verifica metodologica, le prove di imprecisione hanno fornito risultati comparabili con quelli della letteratura (18, 19). Per quanto riguarda la determinazione del limite di rilevabilità il valore di 0,056 µg/L ottenuto risulta inferiore rispetto a quello dichiarato dalla ditta produttrice (1,25 µg/L). L'esito della prova di riproducibilità con calibratore S2, nella quale si è ottenuto un CV di 9,8%, sembra indicare l'utilità dell'introduzione di un calibratore intermedio tra calibratore S1 (0) e calibratore S2 (5,0 µg/L). Questo accorgimento renderebbe anche più accurata la definizione di negatività/positività di un campione di urina, qualora il valore risultasse prossimo al valore decisionale di 5 µg/L.

Le indicazioni fornite dalla ditta produttrice sulla stabilità dell'analita suggeriscono di eseguire l'analisi sui campioni di urina entro 7 giorni dalla raccolta, se conservati a 4 °C, o entro due settimane, se conservati a -20 °C. Le prove eseguite hanno tuttavia indicato una buona stabilità dei campioni fino al 47° giorno dalla raccolta (percentuale di decadimento massima del 12,6%).

Dei 62 campioni di urina raccolti da nove soggetti selezionati e monitorati, il 39,1% è risultato positivo agli oppiacei sebbene i corrispondenti soggetti risultassero in terapia sostitutiva con buprenorfina rispettivamente con 2,0 (8,3%) e 8,0 mg/die (30,8%). Tale risultato contrasta con alcuni dati della letteratura, che indicherebbero come la riduzione dell'impiego di oppiacei sia dose-dipendente, a partire da una somministrazione di farmaco pari a 8,0 mg/die (20). Le osservazioni del gruppo di Pavlic (20) su pazienti in terapia con buprenorfina (risultati positivi agli oppiacei nel 40% dei casi) indurrebbero anche a sospettare sulla positività dei campioni agli oppiacei, poichè la buprenorfina, grazie alle sue proprietà di agonista/antagonista parziale dovrebbe bloccare gli effetti degli oppiacei stessi. Tali risultati potrebbero suggerire la presenza di una certa crossreattività tra il metodo CEDIA e gli oppiacei, in particolare con morfina e metadone, se questi sono presenti a concentrazioni superiori, rispettivamente, a 120 mg/L e 320 mg/L (20). Lo stesso autore ha suggerito di aumentare il valore di

cutoff da 5,0 a 30,0 µg/L al fine di accrescere la specificità del metodo, a svantaggio, tuttavia, della sua sensibilità. Per la valutazione di questo tipo di interferenza sarebbero comunque opportuni ulteriori approfondimenti.

In conclusione, il presente studio ha evidenziato come l'immunodosaggio CEDIA per la determinazione della buprenorfina possa risultare idoneo al monitoraggio urinario di soggetti tossicodipendenti sottoposti a terapia farmacologica con tale farmaco. La possibilità di implementazione su strumentazione automatica ne permette l'utilizzo per l'analisi di un numero elevato di campioni con un guadagno in termini di costo/beneficio rispetto alle metodiche ELISA precedentemente impiegate. La somministrazione di 4,0 mg/die di buprenorfina potrebbe già risultare efficace sia dal punto di vista farmacologico che di rispetto del piano terapeutico da parte dei soggetti in trattamento. Particolare attenzione dovrebbe comunque essere riservata nel monitoraggio dei soggetti che presentano contemporanea positività per buprenorfina e oppiacei, in possibile relazione a recidive di abuso, a causa di una possibile crossreattività metodologica.

BIBLIOGRAFIA

1. Kreek MJ, Zhou Y, Schlussman SD. Il craving nella dipendenza da oppiacei, cocaina e alcol. *Medicina delle Tossicodipendenze* 2003;Anno XI:19-34.
2. Cicero TJ, Surratt HL, Inciardi J. Use and misuse of buprenorphine in the management of opioid addiction. *J Opioid Manag* 2007;3:302-8.
3. Fiellin DA, Moore BA, Sullivan LE, et al. Long-term treatment with buprenorphine/naloxone in primary case: results at 2-5 years. *Am J Addict* 2008;17:116-20.
4. Henderson D, Friedman SB, Harris JD, et al. CEDIA, a new homogeneous immunoassay system. *Clin Chem* 1986;32:1637-41.
5. Mark TL, Woody GE, Juday T, et al. The economic cost of heroin addiction in the United States. *Drug Alcohol Depend* 2001;61:195-206.
6. Rosenbeck R, Kosten T. Buprenorphine for opiate addiction: potential economic impact. *Drug Alcohol Depend* 2001;63:253-62.
7. Ling W, Smith D. Buprenorphine: blending practice and research. *J Subst Abuse Treat* 2002;23:87-92.
8. Magura S, Schidhaus S, Rosenblum A, et al. Substance user treatment program quality; selected topics. *Subst Use Misuse* 2002;37:1185-214.
9. Sindelar JL, Fiellin D. Innovation in treatment for drug abuse: solutions to a public health problem. *Annu Rev Public Health* 2001;22:249-72.
10. Fudala PJ, Bridge TP, Herbert S, et al. Office-based treatment of opiate addiction with sublingual-tablet formulation of buprenorphine and naloxone. *N Engl J Med* 2003;349:949-58.
11. Relazione Annuale dell'Osservatorio Europeo delle Tossicodipendenze, n° 11, 2005. <http://annualreport.emcdda.eu.int>
12. Huang P, Kehner GB, Cowan A, et al. Comparison of pharmacological activities of buprenorphine and norbuprenorphine: norbuprenorphine is a potent opioid agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:688-95.
13. Spagnolo B, Calo G, Polgar WE, et al. Activities of mixed NOP and mu-opioid receptor ligands. *Br J Pharmacol*

- 2008;153:609-19.
14. Ciccocioppo R, Economidou D, Rimondini R, et al. Buprenorphine reduces alcohol drinking through activation of the nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor system. *Biol Psychiatry* 2007;61:4-12.
 15. Pani PP, Maremmani I, Piratsu R, et al. Buprenorphine: a controlled clinical trial in the treatment of opioid dependence. *Drug Alcohol Depend* 2000;62:97-104.
 16. Amass L, Bickel WK, Higgins ST, et al. A preliminary investigation of outcome following gradual or rapid buprenorphine detoxification. *J Addict Dis* 1994; 13:33-45.
 17. Walsh SL, Eissenberg T. The clinical pharmacology of buprenorphine: Swiss multicenter study. *Eur Addiction Res* 2003;41:13-8.
 18. Cirimele V, Kintz P, Lohner S, et al. Enzyme immunoassay validation for the detection of buprenorphine in urine. *J Anal Toxicol* 2003;27:103-5.
 19. Mattick RP, Kimber J, Breen C, et al. Buprenorphine maintenance versus placebo and methadone maintenance for opioid dependence. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2003; Issue 2, Oxford: Update Software.
 20. Pavlic M, Libiseller K, Grubwieser P, et al. Cross-reactivity of the CEDIA buprenorphine assay with opiates: an Austrian phenomenon. *Int J Legal Med* 2005,119:378-81.