

## Determinazione della buprenorfina: metodi ELISA e CEDIA a confronto

Immacolata Amoroso, Daniela Giardiello, Rita Fiore, Agnese Morani, Patrizia Padulano, Vincenzo Vitulano, Luigi Vrenna

Polo Tossicologico di Riferimento Territoriale per le Farmacodipendenze e le Patologie Correlate "S.M. Loreto Crispi", ASL Napoli 1, Napoli

### ABSTRACT

**Determination of buprenorphine: comparison of ELISA and CEDIA methods.** The requests for buprenorphine assay greatly increased after its recent use for treatment of drug addiction. This called for a rapid procedure for large numbers of samples and with a good analytical performance. Until 2003, buprenorphine was assayed by RIA or using 2<sup>nd</sup> level techniques, such as HPLC and gas-chromatography with mass spectroscopy, not suitable for routine use. In the past few years the CEDIA techniques, adaptable to any clinical chemistry analyser and entirely automatic, and the One step ELISA in microplate (which requires specific equipment and automated methodology) have become available. Our study assessed the analytical and diagnostic efficiency of the above techniques in 100 urinary samples from subjects referred by the Ser.T. To calculate intra and interassay CVs two controls with a known concentration (3 and 7 µg/L for CEDIA and 3 and 5 µg/L for One step ELISA) were assayed 20 times. The CEDIA showed a 11,63% (low concentration sample, intra-series) and a 12,85% (low concentration sample, inter-series) maximal CV. One step ELISA showed a 8,77% (low concentration sample, intra-series) and a 9,11% (low concentration sample, inter-series) maximal CV. The diagnostic efficiency of two methods were compared to the gold standard procedure using ROC curves. For CEDIA the optimal threshold was 21 µg/L with a diagnostic sensitivity of 94,6% and a diagnostic specificity of 87,3%; for One step ELISA, the 10 µg/L threshold was associated with a diagnostic sensitivity of 97,3% and a diagnostic specificity of 82,5%. Both techniques had high diagnostic sensitivity, but lower specificity. Therefore we suggest their use as screening procedures followed by 2<sup>nd</sup> level confirmatory tests for positive samples.

### INTRODUZIONE

La buprenorfina, appartenente alla classe delle ammine terziarie, è un potente analgesico, derivato semisintetico della tebaina (alcaloide dell'oppio), ottenuta chimicamente con l'introduzione di un gruppo ciclopropilico in posizione 17 e un gruppo 1-idrossi-1,2,2-trimetilpropile in posizione 7. La sua formula di struttura mostra analogie sia con la morfina che con la tebaina (Figura 1). La buprenorfina è agonista parziale dei recettori per gli oppiacei di tipo  $\mu$  ed antagonista dei recettori di tipo  $\kappa$  (1); la sua lenta dissociazione dai recettori garantisce alla molecola una lunga durata d'azione (emivita: 2-5 ore; durata d'azione: 24-48 ore), mentre la ridotta attività agonista riduce il rischio di abuso e il grado di dipendenza rispetto agli agonisti puri come la morfina, il metadone e l'eroina stessa (2,3). Inoltre, l'antagonismo sui recettori  $\kappa$  provoca un minor effetto sedativo ed euforizzante. Per tutti questi motivi da alcuni anni la molecola è largamente utilizzata nei programmi di disassuefazione dagli oppiacei (4).

La buprenorfina, facilmente assorbita attraverso la mucosa del cavo orale e il tratto gastrointestinale, è una molecola altamente lipofila, immagazzinata nei tessuti adiposi e poi lentamente rilasciata. Il suo metabolismo avviene mediante coniugazione con acido glucuronico, anche se una quota del farmaco è preventivamente sottoposta a N-dealchilazione ad opera del citocromo

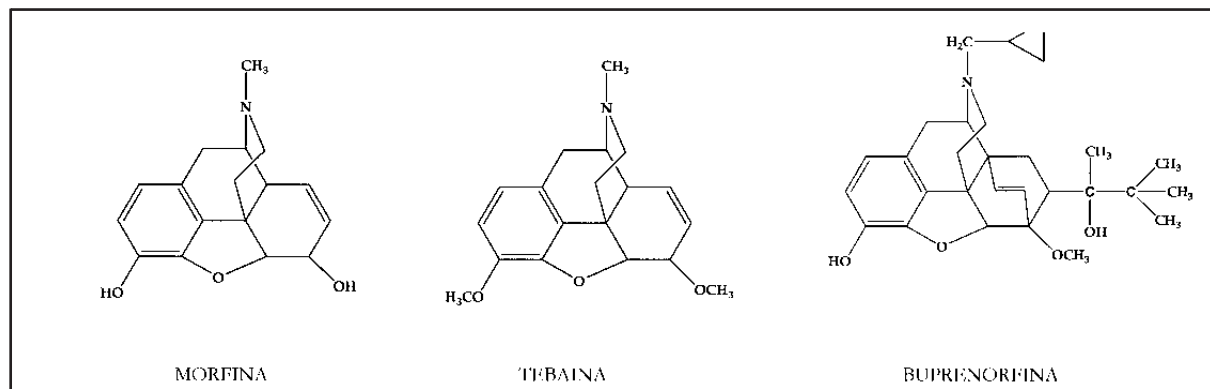
CYP3A4 che la trasforma in norbuprenorfina. Il 70-90% della buprenorfina e dei suoi cataboliti è quindi escreto nelle feci, mentre la restante percentuale si ritrova nelle urine sotto forma di buprenorfina e dei suoi cataboliti: buprenorfina glucuronide, norbuprenorfina e norbuprenorfina glucuronide (5). Esiste un'ampia variabilità individuale nella risposta al farmaco legata a fattori genetici (6).

Il dosaggio della buprenorfina urinaria contribuisce a monitorare i soggetti in trattamento e a individuare un eventuale uso improprio del farmaco (7). Ciò ha portato ad un crescente impiego della buprenorfina e all'immissione sul mercato di kits commerciali per le analisi di screening.

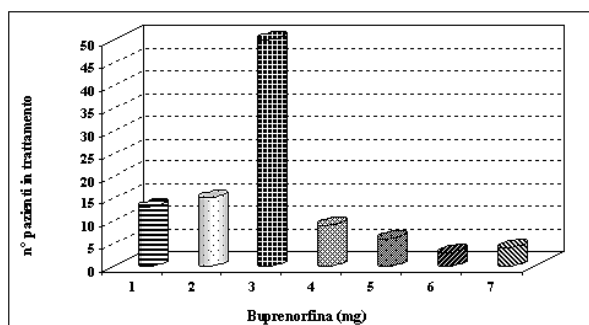
### MATERIALI E METODI

Per il nostro studio sono stati utilizzati 100 campioni urinari di utenti in trattamento farmacologico con buprenorfina a vari dosaggi (Figura 2), provenienti da U.O. Ser.T, Pronto Soccorso e case circondariali territoriali, analizzati mediante i due metodi in valutazione (CEDIA e IDS One step ELISA) e successivamente col sistema cromatografico multicolonna REMEDI-HS come metodo di riferimento.

Il metodo CEDIA (Microgenics Corporation) è una tecnica immunochimica in fase omogenea, in cui l'analita presente nel campione compete con l'analita coniuga-



**Figura 1**  
Formule di struttura.



**Figura 2**  
Dosaggio terapeutico giornaliero di buprenorphina in 100 campioni di urine randomizzati da soggetti cui erano state prescritte quantità variabili di buprenorphina.

to con beta-galattosidasi (inattivo) per un numero limitato di siti di legame anticorpale. L'immunodosaggio è basato sulla tecnologia del DNA ricombinante: l'enzima batterico beta-galattosidasi è geneticamente diviso in due frammenti inattivi che solo riassociandosi formano un enzima attivo, in grado di scindere un substrato, con conseguente cambiamento di colore. L'enzima attivo si forma solo se nel campione è presente l'analita ricercato, la cui concentrazione risulterà proporzionale alla quantità di enzima formata e, quindi, alla variazione di assorbanza rilevata. Il dosaggio è stato effettuato su analizzatore Olympus AU600. Il metodo, secondo il produttore, è lineare fino a concentrazioni di 75 µg/L ed è indicato un livello decisionale di 5 µg/L.

Il metodo IDS One step ELISA (International Diagnostic System Corporation) è un saggio immunochimico eterogeneo "one step" in fase solida progettato per la determinazione qualitativa e semiquantitativa della buprenorphina in micropiastra (8). Il campione compete con un coniugato enzimatico per i siti di legame dell'anticorpo presente nella micropiastra. Lo sviluppo cromatico avviene per aggiunta di monosubstrato. L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla quantità di farmaco presente: i campioni positivi, inibendo il legame del coniugato enzimatico con l'anticorpo, risultano meno colorati. Per la tecnica One step ELISA è

stato utilizzato l'analizzatore Coda-Analyzer (Biorad). Il metodo, secondo il produttore, è lineare fino a concentrazioni di 10 µg/L ed è indicato un livello decisionale di 5 µg/L.

Il sistema multicolonna REMEDI-HS (Biorad) può riconoscere 920 sostanze di natura basica o debolmente acida, basandosi sullo spettro d'assorbimento UV e sul tempo di ritenzione in relazione a due standard interni: N-etil-nordiazepam e clorfenilamina. Per l'identificazione dei metaboliti urinari della buprenorphina in forma glucuronata è stato necessario eseguire su 1 mL di campione portato a pH 5 l'idrolisi enzimatica (glucuronidasi) a 55 °C per 90 min. Successivamente alla aggiunta di 200 µL della miscela combinata dei due standard interni, si è proceduto con una centrifugazione per 5 min a 4500 rpm prima del caricamento sull'autocampionatore per l'analisi cromatografica.

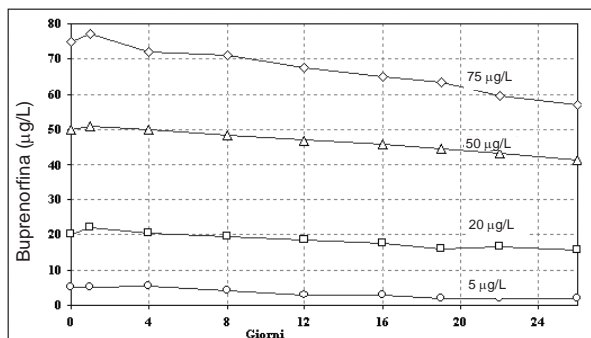
## RISULTATI

### Curve di calibrazione

Le curve di calibrazione sono state ottenute utilizzando standards di urina umana contenenti buprenorphina e metaboliti forniti dal kit in concentrazioni pari a 0-5-20-50-75 µg/L per il metodo CEDIA e pari a 0-1-3-5-10 µg/L per il metodo One step ELISA. E' stata quindi valutata la stabilità della curva nel tempo solo per il metodo CEDIA, poiché per il metodo One step ELISA è prescritta una calibrazione giornaliera. La stabilità della curva è stata calcolata effettuando misure in doppio dei 5 calibratori ogni 4 giorni per un totale di 27 giorni (Figura 3). La curva era stabile per 8 giorni, superati i quali si osservava una significativa riduzione del segnale.

### Imprecisione

Per la valutazione dell'imprecisione nella serie e tra le serie sono stati utilizzati i due controlli a concentrazione nota forniti dai kit (3 e 7 µg/L per CEDIA e 3 e 5 µg/L per One step ELISA). Per entrambe le valutazioni sono state eseguite serie di 20 determinazioni e sono stati calcolati i parametri statistici di base: media, SD e CV (Tabella 1).



**Figura 3**  
Stabilità della curva di calibrazione del metodo CEDIA.

### Linearità

Sono state preparate diluizioni scalari di controlli ad alta concentrazione di buprenorfina in urine negative a droghe d'abuso e ne sono state misurate le relative concentrazioni. La percentuale di recupero è stata calcolata come rapporto tra la concentrazione sperimentale media (20 determinazioni) e quella teorica. Per quanto riguarda la metodica CEDIA l'intervallo di linearità è risultato compreso tra 25 e 200 µg/L; per la metodica One step ELISA è stata necessaria una diluizione più spinta riscontrando un intervallo tra 2 e 10 µg/L. Riportando le concentrazioni sperimentali in funzione di quelle teoriche erano ottenute le seguenti rette con equazione:  $y = 1,176x - 31,07$  con  $r^2 = 0,97$  per la metodica CEDIA e equazione:  $y = 1,086x + 0,386$  con  $r^2 = 0,99$  per la metodica One step ELISA.

### Limite di rivelabilità

Per ciascuna metodica è stata calcolata la minima quantità rilevabile come media di 30 determinazioni su campioni di urina privi di buprenorfina. La minima quantità rilevabile risultava più elevata per la metodica CEDIA (1,77 µg/L) rispetto alla One step ELISA (1,02 µg/L).

### Efficienza diagnostica

I 100 campioni analizzati hanno presentato positività non solo alla buprenorfina bensì anche ad altre sostanze d'abuso come oppiacei, cocaina, tetraidrocannabinoidi e metadone.

Utilizzando i dati ottenuti col sistema cromatografico sono state calcolate la sensibilità e la specificità impiegando un valore soglia di 5 µg/L (indicato dalle case produttrici) (Tabella 2). Entrambi i metodi presentavano numerosi falsi positivi, presumibilmente dovuti alla presenza di sostanze interferenti (es. codeina) e un'elevata sensibilità.

Per valutare l'efficienza diagnostica dei metodi sono state costruite le curve ROC. Per il metodo CEDIA al valore soglia di 21 µg/L corrispondeva una sensibilità diagnostica del 94,6% (la stessa ottenuta al valore soglia di 5 µg/L) ed una specificità diagnostica dell'87,3%. Per il metodo One step ELISA, al valore soglia di 9,9 µg/L corrispondeva una sensibilità diagnostica pari a 97,3% (uguale a quella ottenuta alla soglia di 5 ng/mL) e una specificità diagnostica del 82,5%. Le aree delle curve ROC sono risultate: 0,94 per il metodo CEDIA con SE di 0,028 (95% intervallo di confidenza: 0,877-0,979) e 0,89 per il metodo One step-ELISA con SE di 0,037 (95% intervallo di confidenza: 0,820-0,948).

**Tabella 1**

Imprecisione intra e interserie calcolata eseguendo 20 determinazioni sui controlli forniti dai kit

	One step ELISA				
	NELLA SERIE		TRA LE SERIE		
Media (µg/L)	3,26	5,37	Media (µg/L)	3,09	5,31
SD (µg/L)	0,29	0,23	SD (µg/L)	0,28	0,22
CV %	8,77	4,33	CV %	9,11	4,15
	CEDIA				
	NELLA SERIE		TRA LE SERIE		
Media (µg/L)	3,15	6,95	Media (µg/L)	2,85	6,45
SD (µg/L)	0,37	0,69	SD (µg/L)	0,37	0,76
CV %	11,63	9,88	CV %	12,85	11,77

**Tabella 2**

Sensibilità e specificità per i metodi valutati ottenute utilizzando come valore soglia 5 µg/L

	Sensibilità	Specificità
CEDIA	94%	71%
One step ELISA	97%	68%

### CONCLUSIONI

Le due tecniche immunochimiche esaminate differiscono per il costo e per i parametri seguenti: standards, stabilità della curva di calibrazione, matrici biologiche, interferenze farmacologiche, tempi di analisi e, non ultimi, valori di sensibilità e specificità (9-10). Per quanto riguarda le matrici biologiche è bene sottolineare che con la tecnica One step ELISA è possibile determinare la buprenorfina su diverse matrici (siero, urine e saliva);

viceversa il test CEDIA è utilizzabile solo per matrici urinarie. Quest'ultimo permette tuttavia di effettuare più facilmente il monitoraggio del paziente in terapia in quanto utilizza come standard a concentrazione più alta, una concentrazione di 75 µg/L rispetto ai 10 µg/L della metodica One step ELISA. Infine, la metodica CEDIA rispetto a One step ELISA può essere effettuata su diversi analizzatori di chimica clinica.

Entrambe le tecniche mostravano un'elevata sensibilità, ma una specificità relativa. Quindi può esserne suggerito l'uso come metodiche di screening riservandosi di confermare i campioni positivi con metodiche di secondo livello.

### BIBLIOGRAFIA

1. Takemori AE, Ikeda M, Portoghese PS. The mu, kappa, and delta properties of various opioid agonists. *Eur J Pharmacol* 1986;123:357-61.
2. Fisher G. Buprenorphine versus methadone maintenance for the treatment of opioid dependence. *Addiction* 1999;94:1337-47.
3. Strain EC, Stitzer ML, Liebson IA, et al. Buprenorphine versus methadone in the treatment of opioid-dependent cocaine users. *Psychopharmacol* 1994;116:401-6.
4. Pani PP, Maremmani I, Pirastu R, et al. Buprenorphine: a controlled clinical trial in the treatment of opioid dependence. *Drug Alcohol Depend* 2000;60:39-50.
5. Kuhlman JJ, Lalani S, Magliulo J, et al. Human pharmacokinetics of intravenous, sublingual, and buccal buprenorphine. *J Anal Toxicol* 1996;20:369-78.
6. Barratt DT, Collier JK, Somogyi AA. Association between the DRD2 a(1) allele and response to methadone and buprenorphine maintenance treatments. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006;4:323-31.
7. Kintz P. Death involving buprenorphine: a compendium of French cases. *Forensic Sci. Int* 2001;121:65-9.
8. 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.
9. Bottcher M, Beck O. Evaluation of buprenorphine CEDIA® assay versus GC-MS and ELISA using urine samples from patients in substitution treatment. *J Anal Toxicol* 2005;29:769-76.
10. Cirimele V, Etienne S, Villain M, et al. Evaluation of the one-step ELISA kit for the detection of buprenorphine in urine, blood and hair specimens. *Forensic Science Int* 2004;143:153-6.