

Validazione di una metodica di screening per buprenorfina mediante confronto con metodo HPLC

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",
A.S.L. Napoli 1

ABSTRACT

Validation of a screening method for buprenorphine in comparison with HPLC. The recent introduction of buprenorphine use by the drug addiction services has induced toxicology laboratories to develop new qualitative or semi-quantitative urinary screening assays, which could be useful for both the patients and the physicians overseeing the treatment of drug dependence. The aim of this study was to verify whether the new Immunoanalysis EIA-Buprenorfina kit fits both the requirements of the physicians who follows drug-dependent subjects and those of the laboratory by validating it by comparison with HPLC. Results indicate that both method sensitivity and specificity are >90%.

INTRODUZIONE

La dipendenza da oppioidi, in particolare da eroina, è oggi affrontata con diverse prescrizioni farmacologiche note come terapie sostitutive (1). Queste, agiscono sul sistema dopaminergico, eludendo il desiderio di droga e permettendo, con la diminuzione graduale della dose somministrata, di ottenere una disassuefazione dell'organismo senza indurre una crisi di astinenza.

Il primo farmaco utilizzato è stato il metadone (agonista recettori μ) che, pur rimanendo un farmaco fondamentale e unico per la terapia della tossicomania da eroina, negli ultimi anni è stato affiancato dalla nuova molecola buprenorfina (2,3). Tale farmaco è metabolizzato nel fegato dal citocromo P450 a norbuprenorfina per N-dealchilazione e per glucuroconiugazione con formazione di metaboliti che possono essere rilevati nelle urine (4-9).

La buprenorfina è un farmaco oppiaceo con proprietà di agonista parziale a livello dei recettori μ e di antagonista a livello dei recettori k (2). Poiché presenta un basso potenziale di tossicomania e scarsi effetti tossici a livello generale, la buprenorfina viene utilizzata sia per la dissuefazione da eroina sia come trattamento a lungo termine per la prevenzione delle frequenti ricadute del tossicodipendente.

La scelta del metodo analitico per la sua determinazione deve essere effettuata nell'ambito dell'attività di laboratorio considerando i costi, il carico di lavoro, i livelli di sensibilità, specificità e affidabilità, fondamentali per la validità del dato analitico erogato (10). L'utilizzo di tecniche analitiche accurate e standardizzate da parte del laboratorio consente ai servizi per le tossicodipendenze un'adeguata valutazione sull'intervento terapeutico-clinico, un controllo sull'assunzione del farmaco concernente la sua riduzione o implementazione della dose da utilizzare.

Oggi, la determinazione analitica della buprenorfina in campioni biologici è eseguita mediante tecniche immu-

noenzimatiche che si rilevano spesso adeguate per l'importanza dell'immediatezza dei risultati analitici nella valutazione clinica e per promuovere un più rapido inquadramento del paziente (11-13).

Il nostro studio ha avuto come oggetto la validazione del nuovo kit Immunoanalysis EIA-Buprenorfina allo scopo di valutarne il livello di attendibilità e di efficienza. Il metodo in esame è stato confrontato con metodo HPLC utilizzando campioni urinari provenienti dai diversi distretti dell'ASL Napoli 1.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati utilizzati sia materiali a concentrazione nota (standard e controlli) sia 100 campioni di urine, appartenenti a soggetti in trattamento presso i servizi per le tossicodipendenze dell'ASL Napoli 1, resi opportunamente anonimi prima dell'uso.

In precedenza, l'analisi dei campioni di urine, effettuata presso il nostro laboratorio mediante l'utilizzo del metodo EMIT Dimension-ARx (Dade Behring), aveva evidenziato la positività a diverse classi di sostanze d'abuso singole o combinate tra loro, quali oppiacei, cocaina, benzodiazepine, tetraidrocannabinoidi e metadone (Tabella 1).

I campioni risultati positivi alla buprenorfina erano anche successivamente analizzati con il sistema multicolonna Remedi-HS Drugs Profiling e con un sistema HPLC aperto (Agilent 1100 series) (14-16).

Immunoanalysis EIA

L'Immunoanalysis EIA kit (Immunoanalysis Corporation) è un metodo per evidenziare la presenza di buprenorfina e norbuprenorfina in campioni di urine. L'anticorpo utilizzato presenta una significativa cross-reattività verso la norbuprenorfina e una minima cross-reazione verso gli

Tabella 1*Positività dei campioni studiati alle diverse classi di sostanze*

N° campioni	Sostanza					
	Benzodiazepine	Cocaina	Metadone	Oppiacei	Cannabinoidi	Buprenorfina
8						+
7		+				+
4		+				+
5				+		+
2	+					+
5			+			+
2			+			+
10			+	+		
20		+	+			
7				+		
1	+			+		+
16		+		+		+
9		+				+
4	+					+

associati glucuronati. Il metodo è di tipo competitivo: la buprenorfina, marcata con l'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD), compete con la buprenorfina libera presente nel campione, per un numero limitato di siti anticorpali (17). In assenza di buprenorfina nel campione, si ha il legame tra l'anticorpo e la buprenorfina coniugata inibendo, così, l'attività dell'enzima. L'attività della G6PD è determinata spettrofotometricamente a 340 nm dalla riduzione del NAD⁺ a NADH. L'incremento della assorbanza a 340 nm (aumento di NADH) è correlato alla concentrazione di buprenorfina nel campione urinario.

Per l'esecuzione di tale metodo è stato utilizzato l'analizzatore Dimension-ARx. La curva di calibrazione del metodo è stata ottenuta utilizzando standard di urina umana contenente buprenorfina e metaboliti in concentrazioni pari a 0-5-10-20-40 µg/L. La curva è costruita mediante la trasformazione Logit, un approccio che consente la linearizzazione della curva dose-risposta.

Metodi HPLC

Il sistema multicolonna Remedi-HS (BioRad), utilizzato come screening di II° livello, può riconoscere 920 sostanze di natura basica o debolmente acida, basandosi sullo spettro di assorbimento UV e sul tempo di ritenzione in relazione ai due standard interni, N-etil-nordiazepam e clorfenilamina. Ogni corsa cromatografica ha una durata di circa 18 min. La metodica consiste nell'aggiungere 20 µL di β-glucuronidasi a 1 mL di urina centrifugata ed acidificata a pH 5 con acido acetico. Dopo idrolisi enzimatica a 55 °C per 90 min, necessaria per l'identificazione dei metaboliti urinari della buprenorfina, al campione vengono aggiunti 200 µL della miscela combinata dei due standard interni per esaminarlo, dopo centrifugazione a 4500 rpm per 5 min, sul sistema Remedi-HS.

L'identificazione della norbuprenorfina è stata anche eseguita mediante HPLC su strumentazione Agilent 1100 series con sistema isocratico e con rivelatore UV. L'analisi è effettuata su campioni di urine sottoposti ad idrolisi enzimatica con β-glucuronidasi a 55 °C per 90 min e successivamente ad una microestrazione in fase solida su colonnine "clean-up" (BioRad) a fase inversa. Per l'analisi cromatografica viene utilizzato come fase mobile un tampone fosfato 20 mM pH 3,5 in acetonitrile (7:3 v/v) e un calibratore in matrice urinaria fornito dalla ditta BioRad. Le condizioni analitiche strumentali sono le seguenti: colonna analitica a fase inversa, lunghezza d'onda 212 nm, temperatura 45 °C, flusso 1,4 mL/min e tempo di analisi 15 min.

L'analisi in HPLC rivela la presenza della norbuprenorfina e della buprenorfina. Il cromatogramma del calibratore presenta il picco della norbuprenorfina ad un tempo di ritenzione pari a 4,35 min, mentre quello ottenuto analizzando lo standard di buprenorfina presenta il picco a 12,70 min.

Nella Figura 1 sono riportati alcuni cromatogrammi esemplificativi di campioni positivi e negativi dei soggetti esaminati.

RISULTATI

Curva di calibrazione

Ottenuta la curva di calibrazione, è stata valutata la sua stabilità nel tempo effettuando misure in doppio dei 5 calibratori ogni giorno per un totale di 35 giorni (Figura 2). La curva è risultata stabile per 30 giorni, superati i quali si osserva una significativa riduzione del segnale.

Ripetibilità e riproducibilità del metodo

Per il calcolo dell'imprecisione nella serie e tra la

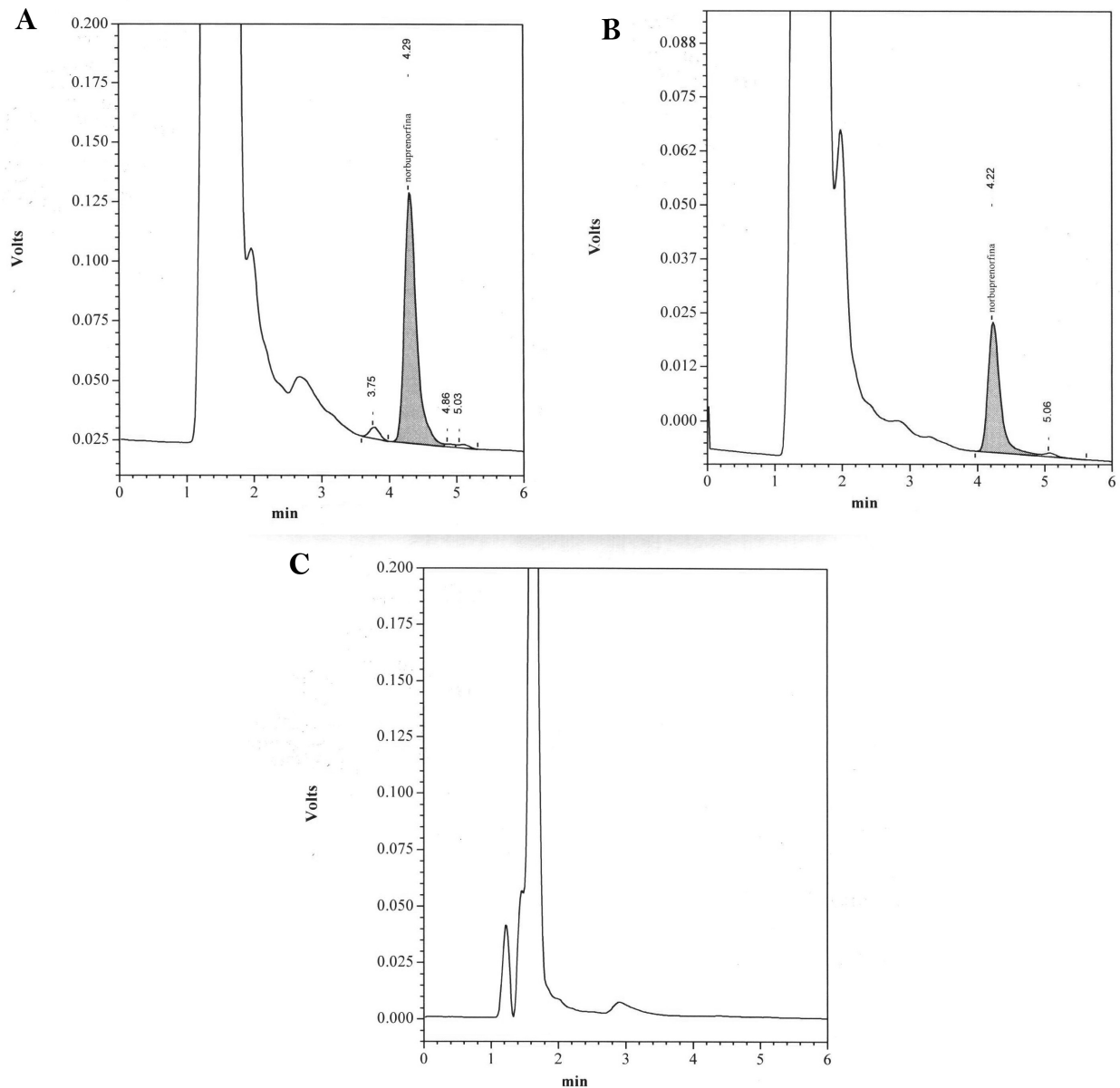


Figura 1

Esempi di cromatogrammi di due campioni positivi alla norbuprenorfina (A e B) e di un campione negativo (C) esaminati in HPLC.

serie sono stati utilizzati i due controlli a concentrazione nota forniti dal kit. Per entrambi i controlli sono state eseguite 20 determinazioni e sono stati calcolati i parametri statistici di base: media, DS e CV (Tabella 2).

Linearità

Sono state preparate delle diluizioni seriali del calibratore a più alta concentrazione di buprenorfina (40 µg/L) in urine negative 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 (Figura 3).

Per le concentrazioni <5 µg/L si osservavano valori

aberranti di recupero percentuale.

Riportando in grafico le concentrazioni sperimentali in funzione di quelle teoriche si otteneva la seguente retta di regressione: $y = 0,907x + 1,15$, con $r^2 = 0,998$.

Efficienza diagnostica

Dal confronto dei risultati ottenuti in HPLC è stato possibile costruire la tabella di contingenza (Tabella 3), da cui sono stati ricavati i valori della sensibilità (98%) e specificità (92%) del metodo (valore soglia di 4,3 µg/L).

L'area della curva ROC è risultata pari a 0,94, con SE di 0,022 (intervallo di confidenza 95%: 0,881-0,981).

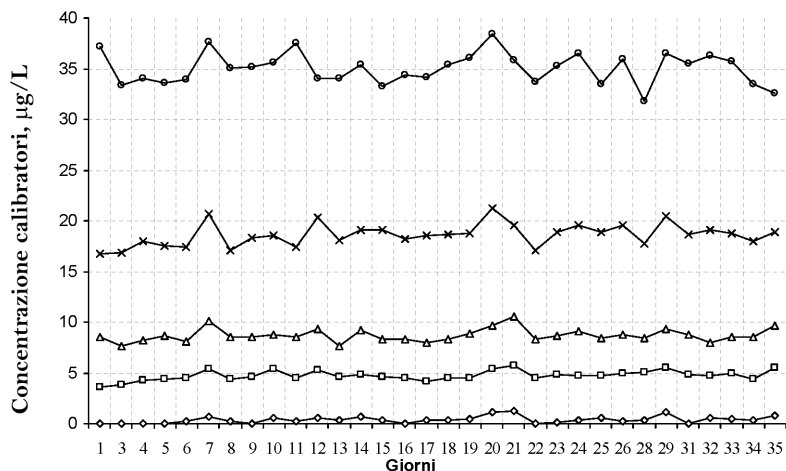


Figura 2
Stabilità della curva di calibrazione del metodo Immunoassay EIA.

Tabella 2
Imprecisione del metodo Immunoassay EIA

	Intra-serie		Inter-serie	
Media, µg/L	3,18	5,69	4,15	6,45
DS, µg/L	0,24	0,33	0,27	0,33
CV, %	7,69	5,76	6,47	5,09

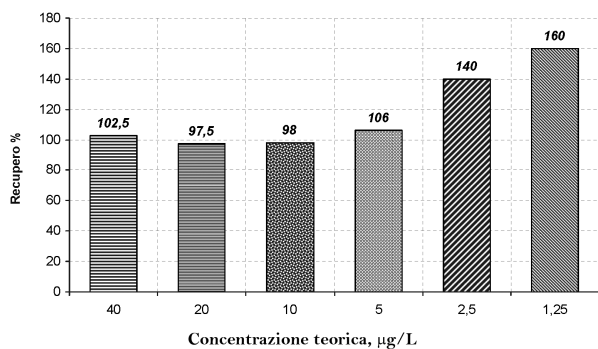


Figura 3
Recupero di diluzioni seriali del calibratore a più elevata concentrazione.

CONCLUSIONI

L'inserimento della buprenorfina come utilizzo terapeutico nei servizi per le tossicodipendenze (Decreto Ministeriale del 16/11/1999 (G.U. n° 272 del 1999)) ha determinato una crescente richiesta della determinazione della stessa.

In questo lavoro abbiamo valutato il metodo Immunoassay EIA. Dalle prove condotte, il metodo presenta una stabilità della curva di calibrazione pari a 30 giorni, valori di CV inferiori al 10% e alti valori di sensibilità e specificità che ne confermano l'affidabilità e la pre-

Tabella 3
Confronto dei risultati ottenuti con il metodo in valutazione e con HPLC

	HPLC	
	+	-
Immunoassay EIA	62	3
	1	34

cisione. In particolare, il valore di sensibilità è paragonabile a quello ottenuto con i metodi CEDIA ed ELISA, validati in precedenti lavori (18,19), mentre il valore della specificità è nettamente superiore. Inoltre, il metodo preso in esame è applicabile allo stesso analizzatore su cui viene eseguito lo screening per le diverse classi di sostanze d'abuso, permettendo un risparmio sia di tempo che di risorse umane.

BIBLIOGRAFIA

1. Relazione annuale 2000 sull'evoluzione del fenomeno della droga nell'Unione europea: sostanze sostitutive utilizzate nell'UE. Osservatorio Europeo delle Droghe e delle Tossicodipendenze (OEDT).
2. Takemori AE, Ikeda M, Portoghese PS. The mu, kappa, and delta properties of various opioid agonists. Eur J Pharmacol 1986;123:357-61.
3. Fisher G. Buprenorphine versus methadone maintenance for the treatment of opioid dependence. Addiction

- 1999;94:1337-47.
4. Walter DS, Inturrisi CE. Absorption, distribution, metabolism and excretion of buprenorphine in animals and humans. In: Cowan A, Lewsi JW, eds. Buprenorphine: combating drug abuse with a unique opioid. New York: Wiley-Liss, 1995:113-35.
 5. Nath RP, Upton RA, Everhart ET, et al. Buprenorphine pharmacokinetics: relative bioavailability of sublingual tablet and liquid formulations. *J Clin Pharmacol* 1999;39:619-23.
 6. Jasinsky DR, Pevnick JS, Griffith JD. Human pharmacology and abuse potential of the analgesic buprenorphine. *Arch Gen Psychiatry* 1978;35:501-16.
 7. Brewster D, Humphery MJ, McLeavy MA. Biliary excretion, metabolism and enterohepatic circulation of buprenorphine. *Xenobiotica* 1981;11:189-96.
 8. Cone E, Gorodetzky C, Yousefnejad D, et al. The metabolism and excretion of buprenorphine in humans. *Drug Metab Dispos* 1984;12:577-81.
 9. Walsh SL, Preston KL, Stitzer ML, et al. Clinical pharmacology of buprenorphine: ceiling effects at high doses. *Clin Pharmacol Ther* 1994;55:569-80.
 10. 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.
 11. Henderson D, Friedman SB, Harris JD, et al. CEDIA, a new homogenous immunoassay system. *Clin Chem* 1986;32:1637-41.
 12. 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.
 13. 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.
 14. Debrabandere L, Van Boven M, Daenens P. Analysis of buprenorphine in urine specimens. *J Forensic Sci* 1992;37:82-9.
 15. Kronstad R, Selden T, Josefsen M. Analysis of buprenorphine, norbuprenorphine and their glucuronides in urine by liquid chromatography. *J Anal Toxicol* 2003;27:464-70.
 16. Feng S, ElSohly MA, Duckworth DT. Hydrolysis of conjugated metabolites of buprenorphine. The quantitative enzymatic hydrolysis of buprenorphine-3-beta-D-glucuronide in human urine. *J Anal Toxicol* 2001;25:589-93.
 17. Guohong W, Michael V, Warren R, et al. Development and GC-MS validation of a highly sensitive recombinant G6PDH-based homogeneous immunoassay for the detection of buprenorphine and norbuprenorphine in urine. *J Anal Toxicol* 2007;31:377-82.
 18. Amoroso I, Giardiello D, Visconti MC, et al. Determinazione della buprenorfina e suoi metaboliti in campioni biologici. Tests rapidi, ELISA e RIA a confronto. *Mission 16/2005-Anno IV, IV Trimestre*, 35-41.
 19. Amoroso I, Giardiello D, Fiore R, et al. Determinazione della buprenorfina: ELISA e CEDIA a confronto. *Biochim Clin* 2007;31:111-5.