

Buprenorphine

DOUBLE ANTIBODY

DPC[®]

Double Antibody Buprenorphine

English

Intended Use: Buprenorphine is a double-antibody ^{125}I radioimmunoassay designed for the quantitative and qualitative measurement of buprenorphine in urine. It is intended strictly for *in vitro* diagnostic use in the context of a program involving an established confirmatory test for buprenorphine and its metabolites.

Catalog Numbers: **KBPD1** (100 tubes), **KBPD2** (200 tubes).



The 100-tube kit contains less than 4 microcuries (148 kilobecquerels) of radioactive ^{125}I buprenorphine, and the 200-tube kit contains less than 8 microcuries (296 kilobecquerels).

The Double Antibody Buprenorphine kit provides only a preliminary analytical test result. A more specific alternate chemical method must be used in order to obtain a confirmed analytical result. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) is the preferred confirmatory method.¹ Clinical consideration and professional judgement should be applied to any drug of abuse test result, particularly when preliminary positive results are used.

Summary and Explanation of the Test

Buprenorphine is an oripavine derivative and is a potent mixed opiate agonist/antagonist used for pain relief. It is administered clinically by intravenous, intramuscular or sublingual routes.²

Buprenorphine is metabolized by *N*-dealkylation and 3-*O*-glucuronidation.³⁻⁷ Plasma levels of metabolites are undetectable after single doses, but in chronic dosing they are of the same order as unchanged buprenorphine.⁸ The major part (about 70%) of a dose of buprenorphine appears in the feces,⁶ and only small amounts are found in the urine, mainly as buprenorphine glucuronide,

N-dealkylbuprenorphine glucuronide and *N*-dealkylbuprenorphine.^{6,7} There is little unchanged buprenorphine in urine.

Effective doses of buprenorphine are of the order of a few hundred micrograms. Combined with extensive metabolism and low urine excretion, levels of buprenorphine equivalents in urine will be low. In a study of patients taking 0.4 to 2.0 mg buprenorphine daily for the relief of chronic pain, urine concentrations measured by the DPC Double Antibody Buprenorphine kit ranged from 5.6 to more than 100 ng/mL. The effect of enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase and sulfatase gave a mean increase in observed concentration of 48%.

Because analysis of buprenorphine by conventional techniques is difficult, radioimmunoassay has been widely used.^{8,9} HPLC methods have been reported, but have limited sensitivity for use as confirmatory tests.^{10,11} GC/MS, by comparison, has better sensitivity.^{6,7}

Principle of the Procedure

DPC's Double Antibody Buprenorphine procedure is a competitive radioimmunoassay in which ^{125}I -labeled buprenorphine competes with buprenorphine in the sample for antibody binding sites. After incubation for a fixed time, separation of bound from free is achieved by the PEG-accelerated double-antibody method. Finally, the antibody-bound fraction is precipitated and counted. Patient sample concentrations are read from a calibration curve.

Reagents to pipet: 3

Total Incubation Time: 70 minutes

Separation: The ready-to-use Precipitating Solution combines second antibody and dilute PEG.

Total counts at iodination: approximately 100,000 cpm

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C in a refrigerator designated for incoming radioactive

materials. Dispose of in accordance with applicable laws.

Do not use reagents beyond their expiration dates.

Some components supplied in this kit may contain human source material and/or other potentially hazardous ingredients which necessitate certain precautions.

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

Water: Use distilled or deionized water.

Radioactivity

A copy of any radioisotope license certificate (Specific or General) issued to a US customer must be on file with Diagnostic Products Corporation before kits or components containing radioactive material can be shipped. These radioactive materials may be acquired by any customer with the appropriate Specific license. Under a General license these radioactive materials may be acquired only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories and hospitals — and strictly for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving external or internal administration of the radioactive material or its radiation to human beings or other animals. Its acquisition, receipt, storage, use, transfer and disposal are all subject to the regulations and a (General or Specific) license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or a State with which the NRC has entered into an agreement for the exercise of regulatory control.

Handle radioactive materials according to the requirements of your General or Specific license. To minimize exposure to radiation, the user should adhere to guidelines set forth in the National Bureau of Standards publication on the *Safe*

Handling of Radioactive Materials (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) and in subsequent publications issued by State and Federal authorities.

Wipe up spills promptly and decontaminate affected surfaces. Avoid generation of aerosols. Dispose of solid radioactive waste according to license requirements. General licensees (holders of NRC Form 483) may dispose of solid radioactive waste as nonradioactive waste, after removing labeling. Specific licensees (NRC Form 313) should refer to Title 10, Code of Federal Regulations, Part 20. Licensees in Agreement States should refer to the appropriate regulations of their own state. General licensees may dispose of liquid radioactive waste of the type contained in this product through a laboratory sink drain. Licensees must remove or deface labels from empty containers of radioactive materials before disposal of solid waste. Specific licensees may dispose of small quantities of liquid radioactive waste of the type used in this product through a laboratory sink drain. Refer to the appropriate regulations applicable to your laboratory.

Materials Supplied: Initial Preparation

Prepare all components at least 10 minutes before use.

Buprenorphine Antiserum (BPD1)

Lyophilized buprenorphine antiserum, with preservative. Reconstitute each vial by adding **11 mL** distilled or deionized water. Mix by *gentle* inversion. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution.

KBPD1: 1 vial **KBPD2:** 2 vials

¹²⁵I Buprenorphine (BPD2)

Lyophilized iodinated buprenorphine, with preservative. Reconstitute each vial by adding **11 mL** distilled or deionized water. Mix by *gentle* inversion. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution, or until the expiration date marked on the label.

KBPD1: 1 vial **KBPD2:** 2 vials

Buprenorphine Calibrators (BPD3–8)

Six vials, labeled A (3 mL) and B through F (1 mL each), of buprenorphine calibrators supplied in liquid form, ready to use with preservative. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or for 6 months

(aliquotted) at –20°C.

KBPD1: 1 set **KBPD2:** 1 set

The calibrators have *lot-specific* values of *approximately* 0, 0.5, 1, 2, 5 and 10 ng/mL in processed human urine. Refer to the vial labels for exact concentrations in ng/mL. Intermediate calibration points can be obtained by mixing calibrators in suitable proportions.

Precipitating Solution (BPGG)

Precipitating Solution consisting of goat anti-rabbit gamma globulin (GARGG) and dilute polyethylene glycol (PEG) in saline, with preservative. The Precipitating Solution is supplied in liquid form, ready to use. Stable at 2–8°C for 30 days after opening. Since a fine precipitate may form after refrigeration, the Precipitating Solution should be thoroughly mixed before use, without foaming. Color: blue.

KBPD1: 1 vial **KBPD2:** 2 vials

Materials Required But Not Provided

Gamma counter – compatible with standard 12x75 mm tubes

Centrifuge – preferably refrigerated and capable of at least 1500xg

Vortex mixer

Reagent Preparation

Distilled or deionized water

Pipets – for delivering 11 mL

Radioimmunoassay

Plain 12x75 mm polypropylene tubes

Micropipets – 25 µL, 100 µL, and 1.0 mL

Foam decanting rack – available from DPC

Logit-log graph paper – available from DPC (catalog number: ZP397)

Specimen Collection

Collect urine without preservative. The specimen can be refrigerated at 2–8°C or frozen at –20°C. If cloudy, it should be cleared by filtration or centrifugation before use, and mixed by gentle swirling.

Volume Required: 25 µL of urine per tube.

Samples with buprenorphine concentrations greater than the highest calibrator (10 ng/mL) should be diluted

either with the zero calibrator or with buprenorphine-free urine.

If adulteration of the specimen is suspected, do *not* accept for analysis.

Radioimmunoassay Procedure

All components except the Precipitating Solution must be at room temperature (15–28°C) before use.

- 1 Label sixteen tubes in duplicate: T (total counts), NSB (nonspecific binding), A (maximum binding) and B through F. Label additional tubes, also in duplicate, for urine samples and controls.

Calibrator	Approximate ng/mL
A (MB)	0
B	0.5
C	1
D	2
E	5
F	10

Note: The calibrators are *lot-specific*. Refer to the vial labels for exact concentrations in ng/mL.

- 2 Pipet **25 µL** of the zero calibrator A into the NSB and A tubes, and **25 µL** of each of the remaining calibrators B through F into correspondingly labeled tubes. Pipet **25 µL** of each urine sample and each control into the tubes prepared.

Patient samples expected to contain buprenorphine concentrations greater than the highest calibrator (10 ng/mL) should be diluted in the zero calibrator before assay.

- 3 Add **100 µL** of ¹²⁵I Buprenorphine to all tubes.

A repeating dispenser is recommended for this step and for the addition of antiserum at step 4. Remove the T tubes for counting at step 10; they require no further processing.

- 4 Add **100 µL** of Buprenorphine Antiserum to all tubes except the NSB and T tubes. Vortex.

- 5 Incubate for **60 minutes** at room temperature (15–28°C).

- 6 Add **1.0 mL** of *cold* Precipitating Solution to all tubes. Vortex.

Before dispensing, the Precipitating Solution should be thoroughly mixed (without foaming) until all visible precipitate has disappeared.
- 7 Incubate for **10 minutes** at room temperature (15–28°C).
- 8 Centrifuge for **15 minutes** at 3000xg – or for a suitably longer period of time at a lower acceleration, e.g. 30 minutes at 1500xg.
- 9 Using a foam decanting rack, decant (or aspirate) the supernatant, retaining the precipitate for counting.

Let the tubes stand inverted on absorbant paper for 10 minutes. Then tap the tubes gently and blot the rims, to remove residual droplets.
- 10 Count each tube for **1 minute**.

Calculation of Results

To calculate buprenorphine concentrations from a logit-log representation of the calibration curve, first calculate for each pair of tubes the average NSB-corrected counts per minute:

Net Counts = (Average CPM) minus (Average NSB CPM)

Then determine the binding of each pair of tubes as a percent of maximum binding (MB), with the NSB-corrected counts of the A tubes taken as 100%:

Percent Bound = (Net Counts / Net **MB** Counts) × 100

Using logit-log graph paper, plot Percent Bound on the vertical (probability) axis against Concentration on the horizontal (logarithmic) axis for each of the nonzero calibrators, and draw a straight line approximating the path of these points. Results for the unknowns may then be read from the line by interpolation.

It is good practice to inspect results for agreement within replicates, and to construct a graph of the calibration curve (even if the calculations are handled by computer) as a visual check on the appropriateness of the transformation used and as a way to detect deviant

calibration points. We also recommend keeping track of these data reduction parameters:

T = Total Counts (as counts per minute)

%NSB = $100 \times (\text{Average NSB Counts} / \text{Total Counts})$

%MB = $100 \times (\text{Net Counts} / \text{Total Counts})$

And the 20, 50 and 80 percent "intercepts," where

20% = Concentration at 20 Percent Bound, etc.

Note that other approaches, e.g. a sound implementation of the 4-parameter logistic, are also acceptable. See Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Example Run: For illustration only, not for calculating results from another run. Because the calibrator values are *lot-specific*, concentrations listed in the right-most column may not match the values of the calibrators supplied in your shipment. (See "Example Run" table.)

Quality Control

Controls or urine pools with at least two buprenorphine concentration level, low and high, should routinely be assayed as unknowns.

Report patient results only if the control results for that assay meet your laboratory's established criteria for acceptability.

It is good laboratory practice to record for each assay the lot numbers of the components used, as well as the dates when they were first reconstituted or opened. We also recommend charting control results from day to day — as described, for example, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Note that repeat samples can serve as a valuable additional tool for monitoring interassay precision, and that pairs of control tubes can be spaced throughout the assay to help verify the absence of significant drift.

Centrifugation: The procedure calls for centrifuging at 3000xg for 15 minutes. Lower accelerations are satisfactory only if the centrifugation time is increased appropriately — for example, to 30 minutes at 1500xg. A high-speed, refrigerated centrifuge is desirable but not essential.

Use the formulas below to calculate the acceleration of your centrifuge at a given speed, or the speed (in revolutions per minute) required to achieve a desired g force.

$$g \text{ force} = 28.38 \times (\text{rpm} / 1,000)^2 \times \text{radius [inches]}$$

$$\text{rpm} = 187.7 \times \sqrt{(g \text{ force} / \text{radius [inches]})}$$

or

$$g \text{ force} = 11.18 \times (\text{rpm} / 1,000)^2 \times \text{radius [cm]}$$

$$\text{rpm} = 299.07 \times \sqrt{(g \text{ force} / \text{radius [cm]})}$$

Limitations

Based on a review of the literature and on studies summarized in the Performance Data section, there do not appear to be any substances that could cause a false positive reaction. Nevertheless, there is the possibility that substances and/or factors not listed in the Specificity section — e.g. technical or procedural errors — may interfere with the test and cause false positive results.

The kit measures buprenorphine and crossreacts extensively with buprenorphine metabolites. Accordingly, the kit should not be used for pharmacokinetic analysis.

Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the Double Antibody Buprenorphine kit's performance. Results are expressed in ng/mL.

Calibration Range:

Approximately 0.5 – 10 ng/mL.

The calibrator values are lot-specific.

Analytical Sensitivity: 0.1 ng/mL.

Intraassay Precision (Within-Run):

Statistics were calculated for samples from the results of 20 pairs of tubes in a single assay. (See "Intraassay Precision" table.)

Interassay Precision (Run-to-Run):

Statistics were calculated for samples from the results of pairs of tubes in 20 different assays. (See "Interassay Precision" table.)

End-of-Run Effect: none up to 100 tubes. (See "End-of-run Effect" table.)

Specificity: The antiserum is highly specific for buprenorphine, with an extremely low crossreactivity to other compounds that may be present in equine

urine samples. All compounds tested were weighed out and aliquoted in urine, and then frozen at –20°C until assay. (See "Specificity" table.)

The following compounds were found to be nondetectable by the Double Antibody Buprenorphine procedure at a level of 100,000 ng/mL.

Acetaminophen
Acetylsalicylic acid
Allylcyclopentylbarbituric acid
Amobarbital
d-Amphetamine
d,l-Amphetamine
Aprobarbital
Barbituric acid
Benzoylcegonine (cocaine metab.)
Butabarbital
Butethal
Caffeine
Chlorazepate
Chlorpromazine
Clonazepam
Cocaine
Codeine
Cotinine (nicotine metabolite)
5,5-Diallylbarbituric acid
Diazepam
Ecgonine (cocaine metabolite)
Ethylmorphine
Fenfluramine
Fentanyl
Lidocaine
Methadone
Methamphetamine
Methaqualone
Morphine
Morphine-3-glucuronide
Nalorphine
Normorphine
Phencyclidine
Phenobarbital
d-Propoxyphene
Secobarbital

Linearity: Three urine samples from subjects who had buprenorphine administered for pain relief were assayed, both undiluted and diluted. Some loss in linearity should be expected with actual samples due to the presence of buprenorphine metabolites.¹² (See "Linearity" Table.)

Recovery: Samples spiked 1 to 19 with three Buprenorphine solutions (40, 60 and 120 ng/mL) were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

References

1) National Institute on Drug Abuse (NIDA).
Urine testing for drugs of abuse. Research

Monograph 1986; 73. 2) McQuay HJ, Moore RA, Bullingham RES. Buprenorphine kinetics. In: Foley K, Inturrisi C, editors. Advances in pain research and therapy. New York: Raven Press, 1986: 271-8. 3) Brewster D, Humphrey MJ, McLeavy MA. Biliary excretion, metabolism and enterohepatic circulation of buprenorphine. *Xenobiotica* 1981;11:189-96. 4) Brewster D, Humphrey MJ, McLeavy MA. The systemic bioavailability of buprenorphine by various routes of administration. *J Pharm Pharmacol* 1981;33:500-6. 5) Rance MJ, Shillingford JS. The metabolism of phenolic opiates by rat intestine. *Xenobiotica* 1977;7:529-36. 6) Cone EJ, et al. The metabolism and excretion of buprenorphine in humans. *Drug Metab Dispos* 1984;12:577-81. 7) Blom Y, Bondesson U, Anggard E. Analysis of buprenorphine and its *N*-dealkylated metabolite in plasma and urine by selected-ion monitoring. *J Chromatogr* 1985;338:89-98. 8) Hand CW, et al. Radioimmunoassay of buprenorphine with iodine label: analysis of buprenorphine and metabolites in human plasma. *Ann Clin Biochem* 1986;23:47-53. 9) Bartlett AJ, et al. The radioimmunoassay of buprenorphine. *Eur J Clin Pharmacol* 1980;18:339-45. 10) Tebbett IR. Analysis of buprenorphine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1985;347:411-3. 11) Noda J, Kojima T. Quantitative determination of buprenorphine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Hiroshima J Med Sci* 1985;43:261-5. 12) Lee JW, Shaver JM. Sensitive and specific radioimmunoassays for opiates using commercially available materials. III. Buprenorphine assay. *J Clin Immunoassay* 1991;14:49. 13) Hand CW, et al. Radioimmunoassay of buprenorphine in urine: studies in patients and in a drug clinic. *J Anal Toxicol* 1989;13:100-4.

Technical Assistance

Available outside the United States only.
For technical assistance, contact your National Distributor.

The Quality System of Diagnostic Products Corporation is registered to ISO 13485:2003.

Tables and Graphs

Example Run

Tube	Duplicate CPM	Average CPM	Net CPM	Percent Bound	Approx. Bupren. ng/mL
T	64,577 64,114	64,346			
(NSB)	905 882	894			

Tube	Duplicate CPM	Average CPM	Net CPM	Percent Bound	Approx. Bupren. ng/mL
A(MB)	38,494 37,940	38,217	37,323	100%	0
B	31,966 31,684	31,825	30,931	82.9%	0.5
C	26,396 26,262	26,329	25,435	68.2%	1
D	19,187 18,277	18,732	17,838	47.8%	2
E	10,254 10,056	10,155	9,261	24.8%	5
F	5,985 5,587	5,786	4,892	13.1%	10

Unknowns:

X1	16,858 16,463	16,660	15,766	42.2%	2.5
X2	8,948 8,827	8,888	7,994	21.4%	5.9
X3	7,448 7,103	7,276	6,383	17.1%	7.5

Quality Control Parameters:

T = 64,346 cpm
%NSB = 1.4%
%MB = 58%
20% Intercept = 6.4 ng/mL
50% Intercept = 1.9 ng/mL
80% Intercept = 0.58 ng/mL

Intraassay Precision (ng/mL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	1.4	0.09	6.4%
2	2.4	0.17	7.1%
3	4.9	0.29	5.9%

Interassay Precision (ng/mL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	1.5	0.11	7.3%
2	2.8	0.15	5.4%
3	6.2	0.41	6.6%

End-of-Run Effect (ng/mL)

	Tubes ¹ 17–22	Tubes 73–78	Tubes 145–150
1	1.9	1.8	1.9
2	4.0	4.1	4.2
3	7.6	7.5	8.4

Specificity

Compound ¹	ng/mL Added ²	Apparent ng/mL ³	% Cross- reactivity ⁴
N-dealkyl- buprenorphine	1	2.3	234%
	10	9.8	98.1%
	100	22.1	22.1%
Etorphine	100	1.8	1.8%
	1,000	3.8	0.38%
	10,000	7.1	0.07%
Diprenorphine	100,000	6.56	0.0066%
	50,000	4.20	0.0084%
	10,000	1.69	0.0169%
	5,000	1.22	0.0244%
	1,000	0.64	0.064%
Nalbuphine	500	0.48	0.096%
	100,000	1.52	0.0015%
	50,000	0.56	0.0011%

Linearity (ng/mL)

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	8 in 8	8.5	—	—
	4 in 8	5.1	4.3	119%
	2 in 8	2.8	2.1	133%
	1 in 8	1.4	1.1	127%
2	8 in 8	8.7	—	—
	4 in 8	5.2	4.3	121%
	2 in 8	2.7	2.2	123%
	1 in 8	1.4	1.1	127%
3	8 in 8	10.4	—	—
	4 in 8	6.4	5.2	123%
	2 in 8	3.3	2.6	127%
	1 in 8	1.5	1.3	115%

Recovery (ng/mL)

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	—	0	—	—
	A	1.6	2.0	80%
	B	2.6	3.0	87%
	C	5.5	6.0	92%
2	—	0.5	—	—
	A	2.6	2.5	104%
	B	3.7	3.5	106%
	C	6.0	6.5	92%
3	—	2.9	—	—
	A	5.2	4.8	108%
	B	5.5	5.8	95%
	C	7.8	8.8	89%
4	—	4.4	—	—
	A	6.5	6.2	105%
	B	7.0	7.2	97%
	C	11.1	10.2	109%

Deutsch. Intraassay Precision: ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Interassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Lösung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E. **Specificity:** ¹Verbindung, ²zugesetzte Menge, ³Gemessene Konzentration, ⁴% Kreuzreaktivität. **End-of-Run Effect:** ¹Röhrchen.

Español. Intraassay Precision: ¹Media, ²DS, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Linearity:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵8 en 8. **Recovery:** ¹Solución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Compuesto, ²Cantidad añadida, ³Concentración aparente, ⁴% Reacción cruzada. **End-of-Run Effect:** ¹Tubos.

Français. Intraassay Precision: ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A, ⁵8 dans 8. **Recovery:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composé, ²ajouté, ³Concentration apparente, ⁴Réaction croisée %. **End-of-Run Effect:** ¹Tubes.

Italiano. Intraassay Precision: ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Interassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Linearity:** ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A.

Specificity: ¹Composto, ²quantità aggiunta, ³Concentrazione apparente, ⁴Percentuale di Crossreattività. **End-of-Run Effect:** ¹Provette.

Deutsch

Buprenorphin Doppelantikörper RIA

Anwendung: Buprenorphin ist ein Doppel-Antikörper ¹²⁵I Radioimmunoassay zur direkten quantitativen und qualitativen Bestimmung des Buprenorphin im Urin. Die Anwendung ist strikt auf die In-Vitro-Diagnostik in Verbindung mit einem etablierten Bestätigungstest für Buprenorphin und dessen Metabolite begrenzt.

Artikelnummern: **KBPD1** (100 Tests), **KBPD2** (200 Tests).



Die Packung mit 100 Röhrchen enthält weniger als 4 Microcurie (148 Kilobecquerel) an radioaktivem ¹²⁵I-markiertem Buprenorphin; die Packung mit 200 Röhrchen enthält weniger als 8 Microcurie (296 Kilobecquerel).

Mit dem Buprenorphin Doppelantikörper RIA erhält man nur ein vorläufiges analytisches Testergebnis. Um ein bestätigtes analytisches Ergebnis zu erhalten muss ein spezifischeres chemisches Verfahren verwendet werden. Gaschromatografie/Massenspektrometrie (GC/MS) ist das Bestätigungsverfahren der Wahl.¹ Die Ergebnisse von Drogenassays sind unter klinischen Gesichtspunkten und mit Sorgfalt und Sachverstand zu interpretieren; dies gilt insbesondere für vorläufige positive Testergebnisse.

Klinische Relevanz

Buprenorphin ist ein Endoethylen-Morphinan-Derivat der als potenter Opiat-Agonist/Antagonist und wird zur Schmerzbekämpfung eingesetzt. Die Applikation kann intravenös, intramuskulär oder sublingual erfolgen.²

Buprenorphin wird durch *N*-Dealkylierung und 3-O-Glukuronisierung metabolisiert.³⁻⁷

Nach Einzeldosen sind die Plasmaspiegel der Metabolite nicht nachweisbar, können aber bei chronischem Gebrauch die gleiche Größenordnung wie das unveränderte Buprenorphin erreichen.⁸ Der größte Teil einer Buprenorphin Applikation (ca. 70%) erscheint im Stuhl⁶ und nur ein geringer Anteil findet sich im Urin in Form von Buprenorphinglukuronid, *N*-Dealkylbuprenorphinglukuronid und *N*-Dealkylbuprenorphin.^{6,7} Es findet sich nur wenig Buprenorphin in unveränderter Form im Urin.

Effektive Buprenorphin Dosen liegen in der Größenordnung von wenigen hundert Mikrogramm. In Verbindung mit dem extensiven Metabolismus und einer niedrigen Ausscheidungsrate in den Urin sind die Spiegel der Buprenorphin Äquivalente im Urin niedrig. In einer Studie, bei der die Patienten 0,4 bis 0,2 mg Buprenorphin pro Tag zur Schmerzbekämpfung erhielten, lagen die mit dem Buprenorphin Doppelantikörper RIA der DPC gemessenen Konzentrationen zwischen 5,6 bis über 100 ng/ml. Durch enzymatische Hydrolyse mit β -Glucuronidase und Sulfatase ließ sich ein mittlerer Anstieg der Konzentrationen um 48% erzielen.

Aufgrund der Tatsache, dass die Buprenorphin Analyse mit konventionellen Methoden sehr aufwändig, sind Radioimmunoassays weit verbreitet.^{8,9} HPLC Verfahren sind beschrieben, haben aber nur eine begrenzte Sensitivität für den Einsatz als Bestätigungstest.^{10,11} GC/MS zeigt im Vergleich eine bessere Sensitivität.^{6,7}

Methodik

Der Doppelantikörper Buprenorphin RIA von DPC ist ein kompetitiver Radioimmunoassay in dem ¹²⁵I-markiertes Buprenorphin mit dem Buprenorphin in der Patientenprobe um eine limitierte Zahl von Antikörpern konkurriert. Nach einer definierten Inkubationszeit werden die gebundenen Komponenten von den freien durch die PEG-vermittelte Doppelantikörper Methode getrennt. Am Ende wird die Antikörper-gebundene Fraktion präzipitiert und gemessen. Die Konzentrationen in den Patientenproben werden an einer Standardkurve abgelesen.

Zu pipettierende Reagenzien: 3

Testdauer: 70 min

Trennung: Die gebrauchsfertige Präzipitationslösung enthält eine Kombination aus 2. Antikörper und PEG.

Totalaktivität zum Zeitpunkt der

Markierung: ca. 100 000 cpm

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Die Packung mit den Reagenzien sollte bei 2–8°C in einem Kühlschrank gelagert werden, der für radioaktives Material ausgewiesen ist. Die Entsorgung muss nach den jeweils gültigen Gesetzen erfolgen.

Die Reagenzien dürfen nur bis zum Verfallsdatum verwendet werden.

Einige Komponenten des Kits können Material humanen Ursprungs und/oder in anderer Weise gefährliche Inhaltsstoffe enthalten, die es unbedingt notwendig machen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten.

Die generell geltenden Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten und alle Komponenten als potenziell infektiös zu behandeln. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wurden auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper untersucht und negativ befundet.

Bestimmten Komponenten wurde Natriumazid (<0,1 g/dl) hinzugefügt. Um die Bildung von explosiven Metallaziden in Blei- und Kupferrohren zu vermeiden, sollten die Reagenzien nur zusammen mit großen Wassermengen in die Kanalisation gespült werden.

Wasser: Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser benutzen.

Radioaktivität

Der Umgang mit radioaktivem Material ist in Deutschland genehmigungspflichtig. Deshalb muss der DPC eine Kopie der aktuellen gültigen Umgangsgenehmigung des Kunden vorliegen, bevor radioaktive Reagenzien versendet werden dürfen. Die

Strahlenschutzverordnung ist zu beachten.

Das radioaktive Material ist gemäß der jeweiligen Umgangsgenehmigung zu handhaben.

Die Strahlenexposition ist zu minimieren. Spritzer sind sofort aufzuwischen und die betroffene Oberfläche zu dekontaminieren. Aerosolbildung ist zu vermeiden. Flüssiger und fester radioaktiver Abfall sind unter Beachtung der gültigen Richtlinien zu entsorgen.

Bestandteile der Testpackung: Vorbereitung

Die Vorbereitung der einzelnen Komponenten sollte mindestens 10 Minuten vor dem Testansatz erfolgen.

Buprenorphin Antiserum (BPD1)

Lyophilisiertes Buprenorphin Antiserum, mit Konservierungsmitteln. Jede Flasche mit **11 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren. Durch vorsichtiges Umdrehen mischen. Nach Rekonstituierung 30 Tage bei 2–8°C haltbar.

KBPD1: 1 Flasche **KBPD2:** 2 Flaschen

¹²⁵I Buprenorphin (BPD2)

Lyophilisiert jodiertes Buprenorphin, mit Konservierungsmitteln. Jede Flasche mit **11 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren. Durch vorsichtiges Umdrehen mischen. Bei 2–8°C für 30 Tage nach dem Öffnen oder bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett haltbar.

KBPD1: 1 Flasche **KBPD2:** 2 Flaschen

Buprenorphin Standards (BPD3–8)

6 Flaschen, A (3 ml) und B – F (je 1 ml), mit Buprenorphin Standards, geliefert in flüssiger Form, gebrauchsfertig, mit Konservierungsmitteln. 30 Tage nach dem Öffnen bei 2–8°C haltbar oder 6 Monate bei –20°C (portioniert).

KBPD1: 1 Set **KBPD2:** 1 Set

Die Standards haben chargen-spezifische Werte von ca. 0, 0,5, 1, 2, 5 und 10 ng/ml Buprenorphin in behandeltem Humanurin. Die exakten Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Etiketten der Standardflaschen. Weitere Standardkurvenpunkte können durch Mischen der Standards hergestellt werden.

Präzipitierendes Reagenz (BPGG)

Enthält 2. Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG) u. verdünntes Polyethylenglykol in Kochsalzlösung. Das Präzipitierende Reagenz wird gebrauchsfertig in flüssiger Form geliefert. Bei 2–8°C bis 30 Tage nach dem Öffnen haltbar. Falls nach der Lagerung im Kühlen feine Präzipitate auftreten, ist das Reagenz gründlich, ohne Schaumbildung, zu schütteln. Farbe: Blau.

KBPD1: 1 Flasche **KBPD2:** 2 Flaschen

Separat erhältliche Testsystem-Komponenten

Gammacounter – kompatibel mit 12x75 mm Röhrchen

Zentrifuge – vorzugsweise gekühlt für 1500xg

Wirbelmischer

Reagenz Vorbereitung

Destilliertes oder deionisiertes Wasser

Pipetten: für 11 ml

Radioimmunoassay

Unbeschichtete 12x75 mm Polypropylen-Röhrchen – erhältlich bei DPC

Mikropipetten – 25 µl, 100 µl und 1,0 ml

Dekantierständer – erhältlich bei DPC.

Logit-Log-Papier – erhältlich bei DPC (Artikelnummer: ZP397)

Probengewinnung

Urin ohne Konservierungsmittel sammeln. Die Proben können gekühlt bei 2–8°C oder eingefroren bei –20°C gelagert werden. Bei Trübung kann die Probe durch Filtration oder Zentrifugation vor Verwendung geklärt werden, dann vorsichtig mischen.

Erforderliche Menge: 25 µl Urin pro Röhrchen.

Proben mit Buprenorphin Konzentrationen über dem höchsten Standard (10 ng/ml) sollten mit dem 0-Standard oder mit Buprenorphin-freiem-Urin vorverdünnt werden.

Bei Verdacht auf eine Verfälschung der Probe sollte diese nicht analysiert werden.

Testansatz und Durchführung

Alle Testkomponenten, mit Ausnahme des Präzipitierenden Reagenz, vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen.

- 1 Jeweils zwei Röhrchen mit T (Totalaktivität), NSB (Unspezifische Bindung), A (Maximale Bindung, B0) und B bis F beschriften. Jeweils 2 Röhrchen pro Urinprobe und Kontrolle beschriften.

Standard	Ca. ng/ml
A (MB)	0
B	0,5
C	1
D	2
E	5
F	10

Beachte: Die Standards sind *chargenspezifisch*. Die exakten Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Etiketten auf den Flaschen.

- 2 Jeweils **25 µl** des 0-Standards A in die NSB und A Röhrchen, und jeweils **25 µl** der restlichen Standards in die entsprechend beschrifteten Röhrchen pipettieren. Jeweils **25 µl** von jeder Urinprobe und Kontrolle in die vorbereiteten Röhrchen pipettieren.

Patientenproben (Serum oder Plasma), in denen Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (10 ng/ml) erwartet werden, sind mit 0-Standard vor dem Einsatz in den Test zu verdünnen.

- 3 **100 µl ¹²⁵I Buprenorphin** in jedes Röhrchen hinzufügen.

Für diesen Schritt und für die Zugabe des Antiserums in Schritt 4 wird die Verwendung eines Dispensers empfohlen. Die T-Röhrchen bis zur Messung (siehe Schritt 10) beiseite stellen; sie bedürfen keiner weiteren Behandlung.

- 4 **100 µl Buprenorphin Antiserum** in jedes Röhrchen, außer die NSB und T Röhrchen, hinzufügen. Mischen.

- 5 Für **60 Minuten** bei Raumtemperatur (15–28°C) inkubieren.

- 6 **1,0 ml kaltes präzipitierendes Reagenz** in alle Röhrchen hinzufügen. Mischen.

Vor dem Verteilen sollte die Präzipitationslösung gründlich durchmischt werden (ohne Schaumbildung) bis alle eventuell sichtbaren Präzipitate verschwunden sind.

- 7 Für **10 Minuten** bei Raumtemperatur (15–28°C) inkubieren.
- 8 **15 Minuten** bei 3000xg zentrifugieren – oder entsprechend länger bei niedrigerer Beschleunigung, z. B. 30 Minuten bei 1500xg.
- 9 Mit Hilfe eines Dekantierständers alle Röhrchen (außer die T-Röhrchen) dekantieren oder absaugen, das Präzipitat zur Messung zurückhalten.

Röhrchen für 10 Minuten umgedreht auf Fließpapier stehen lassen. Anschließend werden die Röhrchen vorsichtig ausgeklopft und abgestreift, um alle restlichen Tröpfchen zu entfernen.
- 10 Alle Röhrchen **1 Minute** messen.

Berechnung der Ergebnisse

Um die Konzentrationen aus der Logit-Log Darstellung der Standardkurve abzulesen werden zunächst der Mittelwert der zwei Röhrchen bereinigt um den Mittelwert der NSB Counts pro Minute (cpm) berechnet:

Netto Counts = (Mittelwert CPM) minus (Mittelwert **NSB** CPM)

Anschließend wird die Bindung jedes Röhrchenpaars als Prozent der Maximalbindung (MB, B₀) bestimmt. Hierzu werden die mittleren CPM des A-Standards korrigiert um die mittlere NSB als 100% gesetzt:

Prozentbindung = (Netto Counts / Netto **MB** Counts) × 100

Die so ermittelten B/B₀ aller Standards außer des 0-Standards werden auf der y-Achse auf Logit-Log Papier gegen die Konzentration auf der x-Achse (logarithmisch) aufgetragen. Die Punkte werden mit bestmöglicher Annäherung durch eine gerade Linie verbunden. Die Ergebnisse der unbekannten Proben können dann durch Interpolation an der Kurve abgelesen werden.

Es ist gute Laborpraxis die Ergebnisse der Doppelbestimmung auf Übereinstimmung

zu prüfen und eine Grafik der Standardkurve darzustellen (auch wenn die eigentliche Berechnung durch ein Computerprogramm erfolgt) um visuell zu überprüfen, ob für die Standardkurve die geeignete Transformation verwendet wurde und um eventuell abweichende Standardkurvenpunkte zu entdecken. Es wird weiterhin empfohlen, folgende Parameter der Berechnung zu protokollieren:

T = Totalaktivität (als Counts pro Minute)

%NSB = $100 \times (\text{Mittelwert NSB Counts} / \text{Total Counts})$

%MB = $100 \times (\text{Netto Counts} / \text{Total Counts})$

und die 20, 50 und 80 Prozent "intercepts," wobei

20% = Konzentration bei 20 Prozent Bindung, etc.

Bitte beachten Sie, dass auch andere Auswertungen z. B. nach der 4-Parameter-Logistik akzeptabel sind. Siehe: Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Auswertebeispiel: Dieses Beispiel dient nur zur Veranschaulichung und ist nicht dazu geeignet Werte aus einem anderen Testansatz damit zu ermitteln. Aufgrund der *Chargenabhängigkeit* der Standardkonzentrationen müssen die in der rechten Spalte der Tabelle gelisteten Konzentrationen nicht mit den Konzentrationen in Ihrer Lieferung übereinstimmen. (siehe Tabelle "Example Run").

Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen Kontrollen oder mit mindestens 2 Konzentrationen (niedrig und hoch) an Buprenorphin routinemäßig als unbekannte Proben einzusetzen.

Patientenergebnisse dürfen nur dann freigegeben werden, wenn die laborspezifischen Akzeptanzkriterien erfüllt sind. Hierzu sind die jeweils gültigen Richtlinien zu berücksichtigen.

Es ist gute Laborpraxis die Chargennummern, sowie das Datum der ersten Öffnung bzw. Rekonstitution der verwendeten Komponenten zu protokollieren. Die wiederholte Messung von Proben kann bei der Beurteilung der Interassay Präzision hilfreich sein. Der Einsatz von Kontrollprobenpaaren an

unterschiedlichen Positionen des Testansatzes ist hilfreich, um einen eventuellen Drift zu erkennen.

Zentrifugation: Die Durchführung erfordert eine Zentrifugation bei 3000xg für 15 Minuten. Niedrigere Beschleunigungen sind ebenfalls akzeptabel, wenn die Zentrifugationszeit verlängert wird, z. B. auf 30 Minuten bei 1500xg. Eine gekühlte Hochgeschwindigkeitszentrifuge ist empfehlenswert, aber nicht zwingend notwendig. Mit den unten genannten Formeln kann die Beschleunigung der eingesetzten Zentrifuge bei einer bestimmten Umdrehungszahl oder die benötigte Umdrehungszahl (Umdrehungen pro Minute) für die erforderliche Zentrifugalbeschleunigung berechnet werden.

$$g = 28,38 \times (U/\text{min} / 1\,000)^2 \times \text{Radius [Zoll]}$$

$$U/\text{min} = 187,7 \times \sqrt{(g / \text{Radius [Zoll]})}$$

oder

$$g = 11,18 \times (U/\text{min} / 1\,000)^2 \times \text{Radius [cm]}$$

$$U/\text{min} = 299,07 \times \sqrt{(g / \text{Radius [cm]})}$$

Grenzen der Methode

Aufgrund von Literaturrecherchen und Studien, die in dem Kapitel "Leistungsdaten" zusammengefasst sind ist keine Substanz bekannt, die zu einem falsch positiven Testergebnis führen kann. Trotzdem ist es möglich, dass Substanzen/Faktoren, die nicht in der Tabelle „Specificity“ aufgeführt sind (z.B. technische oder Handhabungsfehler) interferieren und falsch positive Resultate verursachen können.

Der Test misst Buprenorphin und kreuzreagiert mit den wichtigsten Buprenorphin Metaboliten. Dem entsprechend sollte der Test nicht für pharmakokinetische Untersuchungen eingesetzt werden.

Leistungsdaten

Im folgenden Abschnitt sind Daten gezeigt, die für die Leistung des Buprenorphin Doppelantikörper RIA repräsentativ sind. Die Ergebnisse sind in ng/ml angegeben.

Messbereich:

ca. 0,5 – 10 ng/ml.

Die Standardwerte sind chargen-spezifisch.

Analytische Sensitivität: 0,1 ng/ml.

Intraassay-Präzision: Statistische Berechnung der Ergebnisse von Proben, die in 20 Röhrchenpaaren in einem Ansatz gemessen wurden. (Siehe Tabelle „Intraassay-Precision“.)

Interassay-Präzision: Statistische Berechnung der Ergebnisse von Proben, die in 20 Röhrchenpaaren in mehreren Ansätzen gemessen wurden. (Siehe Tabelle „Interassay-Precision“.)

"End of Run" Effekt: Tritt bis ca. 100 Röhrchen nicht auf (siehe Tabelle "End-of-Run Effect").

Spezifität: Das Antiserum ist hochspezifisch für Buprenorphin, mit einer extrem niedrigen Kreuzreaktivität zu anderen Komponenten, die im Pferdeurin vorkommen können. Alle getesteten Komponenten wurden eingewogen und in Urin portioniert anschließend bis zur Messung bei –20°C eingefroren. (siehe Tabelle „Spezifität“.)

Die folgenden Komponenten wurden bei einer Konzentration von 100 000 ng/ml als nicht nachweisbar im Doppelantikörper Buprenorphin Verfahren gefunden.

Acetaminophen
Acetylsalicylsäure
Allylcyclopentylbarbituric Säure
Amobarbital
d-Amphetamin
d,l-Amphetamin
Aprobarbital
Barbituric Säure
Benzoylcegonin (Kokainmetabolit)
Butabarbital
Butethal
Caffein
Chlorazepat
Chlorpromazin
Clonazepam
Kokain
Kodein
Kotinin (Nikotinmetabolit)
5,5-Diallylbarbituric acid
Diazepam
Ecgonin (Kokainmetabolit)
Ethylmorphin
Fenfluramin
Fentanyl
Lidocain
Methadone
Methamphetamine
Methaqualone
Morphin
Morphin-3-glucuronid
Nalorphin
Normorphin
Phencyclidine

Phenobarbital
d-Propoxyphene
Secobarbital

Linearität: Drei Urinproben von Patienten, die Buprenorphin zur Schmerzbekämpfung bekamen, wurden unverdünnt und verdünnt gemessen. Aufgrund vorhandener Buprenorphin Metabolite ist ein Abweichen von der Verdünnungslinearität zu erwarten.¹² (Siehe Tabelle "Linearity".)

Wiederfindung: Proben wurden 1:19 mit 3 Buprenorphin Lösungen (40, 60 und 120 ng/ml) versetzt und gemessen. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Recovery“.)

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

Das Qualitätssystem der Diagnostic Products Corporation ist nach ISO 13485:2003 registriert.

Español

Buprenorfina Doble Anticuerpo

Utilidad del análisis: El ensayo buprenorfina doble anticuerpo es un ¹²⁵I radioinmunoanálisis diseñado para la medición cuantitativa y cualitativa de buprenorfina en orina. Su uso es estrictamente para diagnóstico *in vitro* en el contexto de un programa que involucre un análisis confirmatorio establecido para la buprenorfina y sus metabolitos.

Referencia: **KBPD1** (100 tubos), **KBPD2** (200 tubos).



El kit de 100 tubos contiene menos de 4 microcurios (148 kilobequerelios) de buprenorfina marcada con ¹²⁵I radiactivo; El kit de 200 tubos contiene menos de 8 microcurios (296 kilobequerelios).

El kit Buprenorfina Doble Anticuerpo sólo proporciona un resultado analítico preliminar. Para obtener un resultado analítico confirmado se debe usar un método químico alternativo más específico. El método de confirmación preferido es la cromatografía gaseosa / espectrometría de masa (GC/MS).¹ La consideración clínica y el criterio profesional deberán aplicarse a cualquier resultado de un análisis para abuso de drogas, particularmente cuando se utilicen resultados positivos preliminares.

Resumen y Explicación del Test

La buprenorfina es un derivado de la oripavina y un potente agonista/antagonista opiáceo mixto utilizado para aliviar el dolor. Se administra clínicamente en forma intravenosa, intramuscular o sublingual.²

La buprenorfina es metabolizada por *N*-desalquilación y 3-O-glucuronidación.³⁻⁷ Los niveles en plasma de los metabolitos no son detectables después de la administración de dosis únicas, pero en las dosis crónicas tiene el mismo orden que la buprenorfina no modificada.⁸ La parte principal de una dosis de buprenorfina (aproximadamente el 70%) aparece en las heces,⁶ y sólo cantidades pequeñas se encuentran en la orina, principalmente como buprenorfina glucurónida, *N*-desalquilbuprenorfina glucurónida y *N*-desalquilbuprenorfina.^{6,7} Hay poca buprenorfina no modificada en la orina.

Las dosis eficaces de buprenorfina se encuentran en el orden de algunos cientos de microgramos. En combinación con un metabolismo importante y la baja excreción en orina, los niveles de buprenorfina equivalentes en orina serán bajos. En un estudio de pacientes que tomaban 0,4 a 2,0 mg de buprenorfina diariamente para aliviar el dolor crónico, las concentraciones en orina medidas por el kit Buprenorfina Doble Anticuerpo de DPC fueron de 5,6 a más de 100 ng/ml. El efecto de la hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa y sulfatasa dio un aumento

medio del 48% a la concentración observada.

Debido a que el análisis de la buprenorfina es difícil por técnicas convencionales, se ha utilizado ampliamente el radioinmunoensayo.^{8,9} Se han informado métodos de HPLC pero estos tienen una sensibilidad limitada como pruebas confirmatorias.^{10,11} Comparativamente, la GC/MS tiene mejor sensibilidad.^{6,7}

Principio del análisis

El procedimiento Buprenorfina Doble Anticuerpo de DPC es un radioinmunoanálisis competitivo en el cual la buprenorfina marcada radiativamente con ¹²⁵I compete con la buprenorfina en la muestra por los sitios de unión de los anticuerpos. Después de incubar por un tiempo determinado, la separación de la forma unida de la libre se logra mediante un método de doble anticuerpo acelerado por PEG. Finalmente, la fracción unida al anticuerpo se precipita y cuenta. Las concentraciones en la muestra del paciente se leen a partir de una curva de calibración.

Reactivos a pipetear: 3

Tiempo total de incubación: 70 minutos

Separación: La solución de precipitación lista para usar contiene el segundo anticuerpo y PEG diluido.

Cuentas totales en la iodización:
aproximadamente 100 000 cpm

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Almacenar a 2–8°C en una cámara preparada para almacenar material radiactivo. Desechar de acuerdo a la legislación en vigor.

No usar los reactivos después de su fecha de caducidad.

Algunos componentes suministrados en el kit pueden contener material de origen humano y/o otros componentes potencialmente peligrosos que necesitan ciertas precauciones.

Siga las precauciones universales y manipule todos los componentes como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Los materiales derivados de

sangre humana han sido analizados y son negativos para sífilis; para anticuerpos frente al VIH 1 y 2; para el antígeno de superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

Se ha usado azida sódica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminación, lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitución de residuos de azidas metálicas, potencialmente explosivas, en las cañerías de cobre y plomo.

Agua: Usar agua destilada o desionizada.

Radiactividad

Una copia de cualquier certificado de licencia de radioisótopos (específico o general) emitido a la aduana de los EE.UU. se registrará en los ficheros de Diagnostic Products Corporation antes de que se puedan enviar kits o componentes conteniendo material radiactivo. Estos materiales radiactivos pueden adquirirse por cualquier cliente con la licencia específica apropiada. Con una licencia general, estos materiales radiactivos pueden adquirirse sólo por médicos, veterinarios en la práctica de la medicina veterinaria, laboratorios clínicos y hospitales — y estrictamente para la clínica *in vitro* o tests de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa de material radiactivo o su radiación a humanos u otros animales. Su adquisición, recepción, almacenaje, uso, transferencia y desecho están regulados y se expenderá una licencia (general o específica) de la Comisión Nuclear de EE.UU. o de un Estado con el NRC para su consiguiente control.

Manejar los materiales radiactivos de acuerdo a los requerimientos de su licencia general o específica. Para minimizar la exposición a la radiación, el usuario debe adherirse al cuarto conjunto de guías publicadas por el National Bureau of Standards con el nombre *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) y en las consiguientes publicaciones de las autoridades Federales o Estatales.

Limpiar y descontaminar rápidamente las superficies afectadas. Evitar la generación de aerosoles. Eliminar los residuos sólidos radiactivos de acuerdo con los

requerimientos de su licencia. Licencias generales (NRC Form 483) pueden eliminar sus residuos sólidos radiactivos como residuos no radiactivos, después de retirar las etiquetas. Licencias específicas (NRC Form 313) se deben referir al Título 10, Código de Regulaciones Federales, Parte 20. Las licencias en Estados Asociados deben referirse a las normativas de su correspondiente Estado. Licencias generales pueden eliminar sus residuos líquidos radiactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido, quitando las etiquetas de los contenedores y procesándolos como residuos sólidos. Licencias específicas pueden eliminar pequeñas cantidades de residuos líquidos radiactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido. Refiérase a la normativa aplicable a su laboratorio.

Materiales Suministrados: Preparación Inicial

Preparar todos los componentes por los menos 10 minutos antes de usarlos.

Antisuero para buprenorfina (BPD1)

Antisuero liofilizado para buprenorfina, con conservante. Reconstituir cada vial añadiendo **11 ml** de agua destilada o desionizada. Mezclar por inversión *suave*. Estable a 2–8°C durante 30 días después de la reconstitución.

KBPD1: 1 vial **KBPD2:** 2 viales

¹²⁵I buprenorfina (BPD2)

Buprenorfina iodizada, con conservante. Reconstituir cada vial añadiendo **11 ml** de agua destilada o desionizada. Mezclar por inversión *suave*. Estable a 2–8°C durante 30 días después de la reconstitución, o hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta.

KBPD1: 1 vial **KBPD2:** 2 viales

Calibradores de buprenorfina (BPD3–8)

Seis viales marcados A (3 ml) y B a F (1 ml cada uno) de calibradores de buprenorfina suministrados en forma líquida, listos para usar, con conservante. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrir, o hasta 6 meses (alícuotados) a –20°C.

KBPD1: 1 juego **KBPD2:** 1 juego

Los calibradores tienen valores *lote-específicos de aproximadamente* 0, 0,5, 1, 2, 5 y 10 ng/ml en orina humana procesada. Para conocer las concentraciones exactas en ng/ml, consultar las etiquetas de los viales. Los puntos de calibración intermedios se pueden obtener mezclando los calibradores en las proporciones adecuadas.

Solución de Precipitación (BPGG)

Una solución de precipitación que consiste de globulina de cabra anti-conejo y polietilén glicol diluido (PEG) en solución salina, con conservante. La solución de precipitación se suministra en forma líquida, lista para usar. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su apertura. Debido a que después de refrigerar se puede formar un precipitado fino, la solución de precipitación deberá mezclarse bien antes de usar, sin crear espuma. Color: azul.

KBPD1: 1 vial **KBPD2:** 2 viales

Componentes del kit que se suministran por separado

Contador Gamma compatible con tubos de 12 x 75 mm.

Centrífuga – preferiblemente refrigerada y capaz de producir por lo menos 1500 xg.

Vortex

Preparación de los reactivos

Agua destilada o desionizada

Pipetas — para dispensar 11 ml

Radioinmunoanálisis

Tubos de ensayo de polipropileno de 12 x 75 mm

Micropipetas – 25 µl, 100 µl y 1,0 ml

Gradilla de decantación - disponible en DPC

Papel gráfico Logit-log – disponible en DPC (Referencia: ZP397)

Recogida de la muestra

Recoger la orina sin conservante. La muestra se puede guardar refrigerada a 2–8°C o congelada a –20°C. Si estuviese turbia, se deberá aclarar por filtración o centrifugación antes de usar y mezclar con movimientos circulares suaves.

Volumen requerido: 25 µl de orina por tubo.

Las muestras que contengan concentraciones de buprenorfina mayores que el calibrador más alto (10 ng/ml) se deberán diluir con el calibrador cero o con orina sin buprenorfina.

No aceptar la muestra para análisis si se sospecha que ha sido adulterada.

Procedimiento del Radioinmunoanálisis

Todos los componentes, excepto la solución de precipitación, deben llevarse a temperatura ambiente (15–28°C) antes de usar.

- 1 Marcar dieciséis tubos por duplicado: T (cuentas totales), NSB (unión no específica), A (unión máxima) y B a F. Marcar tubos adicionales, también por duplicado, para los controles y las muestras de orina.

Calibrador	Aproximado ng/ml
A (MB)	0
B	0,5
C	1
D	2
E	5
F	10

Nota: Los valores de los calibradores son *lote específicos*. Para conocer los valores en ng/ml, consultar las etiquetas de los viales.

- 2 Pipetear **25 µl** del calibrador cero A en los tubos NSB y A, y **25 µl** de cada uno de los calibradores restantes B a F en tubos correspondientemente marcados. Pipetear **25 µl** de cada muestra de orina y control en los tubos preparados.

Las muestras de los pacientes que se espera que contengan concentraciones de buprenorfina mayores que la del calibrador más alto (10 ng/ml) se deberán diluir con el calibrador cero antes del ensayo.

- 3 Añadir **100 µl** de ¹²⁵I buprenorfina a todos los tubos.

Para este paso y para añadir el antisuero en el paso 4 se recomienda usar un dispensador de repetición.

Dejar los tubos T a un lado para su conteo (paso 10); no requieren más procesamiento posterior.

- 4 Añadir **100 µl** de antisuero para buprenorfina a todos los tubos, excepto a los tubos NSB y T. Mezclar en el Vortex.
- 5 Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente (15–28°C).
- 6 Añadir **1,0 ml** de la solución de precipitación *fría* a todos los tubos. Mezclar en el Vortex.

Antes de dispensar, mezclar bien la solución de precipitación (sin crear espuma), hasta que todo el precipitado visible haya desaparecido.

- 7 Incubar durante **10 minutos** a temperatura ambiente (15–28°C).
- 8 Centrifugar durante **15 minutos** a 3000 xg, o durante un periodo de tiempo mayor a una aceleración menor, por ejemplo, 30 minutos a 1500 xg.
- 9 Usando una gradilla de decantación de espuma, decantar (o aspirar) el sobrenadante, reteniendo el precipitado para el conteo.

Dejar escurrir los tubos invertidos sobre papel absorbente durante 10 minutos. Luego, golpear los tubos suavemente y secar los bordes para remover las gotas residuales.

- 10 Contar cada tubo durante **1 minuto**.

Cálculo de resultados

Para calcular las concentraciones de buprenorfina a partir de una representación logit-log de la curva de calibración, calcular primero las cuentas medias por minuto corregidas de NSB para cada pareja de tubos:

Cuentas netas = (Media CPM) menos (Media **NSB** CPM)

Entonces, determinar la unión de cada pareja de tubos como un porcentaje de la unión máxima (MB), tomando las cuentas corregidas con el NSB de los tubos A como 100%:

Porcentaje de Unión = (Cuentas netas / Cuentas **MB** netas) × 100

Usando papel gráfico logit-log, representar el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador no cero y trazar la línea que pase por esos puntos aproximadamente. Los resultados de las muestras pueden ser leídos en la curva por interpolación.

Es una buena práctica inspeccionar los resultados para comprobar la concordancia entre los replicados, y realizar una gráfica de la curva de calibración (aunque los cálculos se realicen por ordenador) para ver la transformación más apropiada a usar y las posibles desviaciones en los puntos de calibración. También, recomendamos mantener un registro de los siguientes parámetros de la reducción de datos:

T = Cuentas totales (como cuentas por minuto)

%NSB = $100 \times (\text{Media cuentas NSB} / \text{cuentas totales})$

%MB = $100 \times (\text{Cuentas netas} / \text{Cuentas totales})$

Y los cortes 20, 50 y 80 por ciento, donde

20% = Concentración al 20 por ciento de unión, etc.

Otras aproximaciones, por ejemplo, logística 4-parámetros, también son aceptables. Ver Dudley RA, et al. "Guidelines for immunoassay data reduction". Clin Chem 1985;31:1264-71.

Ejemplo: Sólo como ilustración, no se puede utilizar para calcular resultados. Al ser los valores de los calibradores *lote-específicos*, las concentraciones expresadas en la columna derecha no pueden coincidir con los valores de los calibradores suministrados en su envío. (Ver tabla "Example Run").

Control de Calidad

Se deberán analizar rutinariamente controles o pools de orina de por lo menos dos niveles distintos de concentración –bajo y alto– de buprenorfina, como si fuesen concentraciones desconocidas.

Informar los resultados de los pacientes sólo si los resultados de los controles para este ensayo están dentro de los criterios de aceptabilidad establecidos por su laboratorio.

Es una buena práctica de laboratorio registrar para cada ensayo los números de lote de los componentes usados, así como las fechas en las que fueron abiertos por primera vez y reconstituidos. También recomendamos el uso de gráficos diarios de los controles — como se describe, por ejemplo, en Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Las muestras repetidas pueden servir como una herramienta de valor adicional para monitorizar la precisión interensayo, y las parejas de los tubos del control pueden espaciarse a lo largo de la tanda de ensayo para verificar la ausencia de deriva significativa.

Centrifugación: El procedimiento establece centrifugar a 3000 *xg* durante 15 minutos. Aceleraciones menores han probado ser satisfactorias sólo cuando el tiempo de centrifugación se aumenta adecuadamente, por ejemplo, 30 minutos a 1500 *xg*. El uso de una centrífuga de alta velocidad refrigerada es deseable pero no esencial. Usar las fórmulas que se dan a continuación para calcular la aceleración de su centrífuga a una velocidad dada, o la velocidad (en revoluciones por minuto) requerida para lograr la fuerza *g* deseada.

Fuerza *g* = $28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{radio}$
[pulgadas]

rpm = $187,7 \times \sqrt{(\text{fuerza } g / \text{radio [pulgadas]})}$

o

Fuerza *g* = $11,18 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{radio [cm]}$

rpm = $299,07 \times \sqrt{(\text{fuerza } g / \text{radio [cm]})}$

Limitaciones

En base a una revisión de la literatura y los estudios resumidos en la sección de Características Analíticas, no parece haber ninguna sustancia que podría causar una reacción positiva falsa. No obstante, existe la posibilidad de que otras sustancias y/o factores no listados en la sección de Especificidad, p. ej., errores técnicos o de procedimiento, puedan interferir con el análisis y causar resultados positivos falsos.

El kit mide la buprenorfina y tiene una reacción cruzada importante con los metabolitos de la buprenorfina. Por consiguiente, no se deberá usar el kit para análisis farmacocinético.

Características analíticas

Para obtener datos *representativos* del rendimiento del kit Buprenorfina Doble Anticuerpo, ver la sección Tablas y Gráficos. Los resultados se expresan en ng/ml.

Intervalo de calibración:

Aproximadamente 0,5 – 10 ng/ml.
Los valores de los calibradores son *lote específicos*.

Sensibilidad analítica: 0,1 ng/ml.

Precisión intraensayo (dentro de una tanda): Las estadísticas se calcularon para las muestras a partir de los resultados de 20 pares de tubos en una tanda. (Ver la tabla "Intraassay Precision").

Precisión entre ensayos (de una tanda a otra): Las estadísticas se calcularon para las muestras a partir de los resultados obtenidos por duplicado en 20 ensayos diferentes. (Ver la tabla "Interassay Precision").

Efecto deriva: Ninguno hasta 100 tubos. (Ver la tabla "End-of-Run Effect").

Especificidad: El antisuero es altamente específico para buprenorfina, con una reactividad cruzada extremadamente baja para otros compuestos que podrían estar presentes en muestras de orina equina. Todos los compuestos analizados se pesaron y alicuotaron en orina, y luego se congelaron a –20°C hasta el análisis. (Ver la tabla "Specificity").

Los compuestos siguientes no fueron detectados por el procedimiento Buprenorfina Doble Anticuerpo a un nivel de 100 000 ng/ml.

Acetaminofeno
Ácido acetilsalicílico
Ácido alilciclopentilbarbitúrico
Amobarbital
d-anfetamina
d,l-anfetamina
Aprobarbital
Ácido barbitúrico
Benzoilecgonina (metabolito de la cocaína)
Butabarbital
Butetal
Cafeína
Clorazepato
Clorpromazina
Clonazepam
Cocaína
Codeína
Cotinina (metabolito de la nicotina)
Ácido 5,5-dialilbarbitúrico

Diazepam
Ecgonina (metabolito de la cocaína)
Etilmorfina
Fenfluramina
Fentanilo
Lidocaína
Metadona
Metanfetamina
Metacualone
Morfina
Morfina-3-glucurónido
Nalorfina
Normorfina
Fenciclidina
Fenobarbital
d-propoxifeno
Secobarbital

Linealidad: Se analizaron tres muestras de orina de individuos a quienes se les había administrado buprenorfina para aliviar el dolor, tanto diluidas como sin diluir. En las muestras reales es de esperarse cierta pérdida de la linealidad debido a la presencia de metabolitos de la buprenorfina.¹² (Ver la tabla "Linearity").

Recuperación: Se han analizado las muestras cargadas 1 a 19 con tres soluciones (40, 60 y 120 ng/ml) de buprenorfina. (Ver la tabla "Recovery" para resultados representativos).

Asistencia técnica

Póngase en contacto con el distribuidor nacional.

El Sistema de Calidad de Diagnostic Products Corporation está registrado para la ISO 13485:2003.

Français

Double Anticorps Buprénorphine

Domaine d'utilisation: la trousse Buprénorphine à double anticorps est un dosage radioimmunologique, marquage à l'iode 125, conçu pour la mesure quantitative et qualitative de la buprenorphine dans l'urine. Réservé à un usage diagnostique *in vitro* dans un contexte de recherche de la buprénorphine et de ses métabolites.

Référence catalogue :
KBPD1 (100 tubes), **KBPD2** (200 tubes).



Le coffret de 100 tubes contient moins de 4 microcuries (148 kilobecquerels) de réactif buprénorphine marqué à l'iode 125. Le coffret de 200 tubes contient moins de 8 microcuries (296 kilobecquerels).

Le coffret Buprénorphine double anticorps ne fournit qu'un résultat analytique préliminaire : une méthode analytique plus spécifique doit être utilisée pour confirmer ce résultat, la GC/MS spectrographie de masse par chromatographie gazeuse est la méthode de confirmation de référence.¹ Des considérations cliniques et un jugement professionnel doivent être appliqués à tout dépistage de produit stupéfiant, particulièrement pour un test positif préliminaire.

Introduction

La buprénorphine, dérivé de l'oripavine, est un antalgique puissant, possédant à la fois des propriétés agonistes et antagonistes de la morphine, utilisé dans le traitement de la douleur. Il est administré par voies intraveineuse, intramusculaire ou sublinguale.²

La buprénorphine est métabolisée par N déalkylation et 3-O glucuronidation.³⁻⁷ Des taux plasmatiques de métabolites ne sont pas détectables après une prise unique, mais, après administrations répétées, se trouvent aux mêmes taux que la buprénorphine intacte. La majeure partie de la buprénorphine (70 %) est retrouvée dans les fèces,⁶ et seulement une petite quantité dans les urines, principalement sous forme de glucuronide, N déalkylbuprénorphine glucuronide et N déalkylbuprénorphine.⁶⁻⁷ On retrouve une très petite quantité de buprénorphine non métabolisée dans les urines.

La dose efficace de buprénorphine est de quelques centaines de microgrammes. En combinant un métabolisme accéléré et une excrétion urinaire réduite, on obtient des taux urinaires faibles. Une étude menée sur des patients sous traitement quotidien (0,4 à 2 mg/jour) à la buprénorphine pour des douleurs chroniques a montré que les concentrations mesurées à l'aide de la trousse DPC double anticorps

buprénorphine s'évaluent entre 5,6 et plus de 100 ng/ml. L'hydrolyse à la glucuronidase et sulfatase donne une élévation moyenne de 48 % dans le domaine des concentrations observées.

En raison des difficultés rencontrées avec le dosage de la buprénorphine par des méthodes classiques, la technique radioimmunologique est largement utilisée.⁸⁻⁹ Les techniques HPLC ont une sensibilité trop limitée pour être utilisées comme techniques de confirmation.¹⁰⁻¹¹ Comparativement, les techniques GC/MS (chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse) ont une meilleure sensibilité.⁵⁻⁷

Principe du test

La procédure du Double Anticorps Buprénorphine de DPC est une technique radioimmunologique par compétition, dans laquelle la buprénorphine marquée à l'iode 125 rentre en compétition avec la buprénorphine de l'urine du patient vis-à-vis des sites d'anticorps. Après une incubation d'une durée fixée, la séparation entre la partie libre et liée est réalisée par un deuxième anticorps entraîné par le PEG. Enfin, la fraction d'anticorps liée est précipitée et comptée. La concentration de l'échantillon est lue sur la courbe d'étalonnage

Réactifs à distribuer: 3

Temps d'incubation totale : 70 minutes

Séparation : la solution précipitante prête à l'emploi combine un second anticorps et du PEG dilué.

Activité totale en début de marquage : environ 100 000 cpm

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Réactifs : Conserver à +2/+8°C dans un réfrigérateur autorisé à recevoir du matériel radioactif. Éliminer les déchets conformément aux lois en vigueur.

Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date d'expiration.

Certains composants fournis avec ce coffret peuvent contenir des agents humains et/ou d'autres éléments potentiellement infectieux qui nécessitent certaines précautions.

Respecter les précautions d'emploi et manipuler tous les composants du coffret comme des produits potentiellement infectieux. Les réactifs dérivés de produits humains et utilisés dans ce coffret ont subi un test sérologique pour la Syphilis et des tests de dépistage pour les anticorps anti-VIH1 et 2, anti-HCV et pour l'antigène de surface de l'hépatite B, qui se sont tous avérés négatifs.

De l'azide de sodium à des concentrations inférieures à 0,1 g/dl a été ajouté comme conservateur ; lors de l'élimination, l'évacuer avec de grandes quantités d'eau pour éviter une accumulation d'azides métalliques explosifs dans les canalisations.

Eau : utiliser de l'eau distillée ou désionisée.

Radioactivité

Ce coffret de réactif est réservé à l'usage *in vitro* (Autorisation DGSNR).

Règles de base de protection contre les rayonnements ionisants et précautions d'emploi.

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires dotés de cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée à l'homme ou aux animaux. Respecter impérativement les dates de péremption indiquées sur l'emballage extérieur et sur les étiquettes des différents réactifs du coffret. Tous les réactifs, dont les tubes revêtus d'anticorps, doivent être conservés à + 4/+ 8 ° C dans leur conditionnement d'origine avant d'être utilisés. L'achat, la possession, l'utilisation et l'échange de matières radioactives sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur. Les règles de base de protection contre les rayonnements ionisants doivent être respectées selon des procédures en vigueur. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche. Eviter le contact direct avec la peau ou les muqueuses de tout produit radioactif en utilisant des blouses et gants de protection. Toute manipulation de matières radioactives se fera dans un local ad hoc éloigné de tout passage. Les produits radioactifs seront stockés dans leur conditionnement d'origine dans un

local approprié. Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour. Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes. Chaque contamination ou perte de substance radioactive devra être réglée selon les procédures établies. Toute mise aux déchets de matière radioactive se fera en accord avec les réglementations en vigueur. Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Les réactifs radioactifs ne peuvent être vendus qu'à des personnes habilitées à manipuler des substances radioactives.

Matériel Fourni : Préparation Initiale

Préparer chaque composant au moins 10 minutes avant utilisation.

Antisérum Buprénorphine (BPD1)

Antisérum Buprénorphine avec conservateur, lyophilisé. Reconstituer chaque flacon en ajoutant **11 ml** d'eau distillée ou désionisée. Mélanger doucement par retournements. Conserver réfrigéré: stable à +2°–8°C pendant 30 jours après reconstitution.

KBPD1: 1 flacon **KBPD2**: 2 flacons

¹²⁵I Buprénorphine (BPD2)

Traceur Buprénorphine lyophilisé marqué avec conservateur. Reconstituer chaque flacon en ajoutant **11 ml** d'eau distillée ou désionisée. Mélanger doucement par retournements. Stable à +2°/+8°C pendant 30 jours après reconstitution, ou jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon.

KBPD1: 1 flacon **KBPD2**: 2 flacons

Standards Buprénorphine (BPD3–8)

Six flacons, étiquetés de A à F, de standards de buprénorphine sous forme liquide, prêts à l'emploi avec conservateurs. Le standard zéro A contient 3,0 ml et chacun des standards restants, de B à F, 1,0 ml. Stable à +2/+8 °C pendant 30 jours après ouverture, ou 6 mois (aliquotés) à –20 °C.

KBPD1: 1 jeu **KBPD2**: 1 jeu

Les standards ont des valeurs propres à leur lot, *approximativement* 0, 0,5, 1, 2, 5

et 10 nanogrammes de buprénorphine par millilitre (ng/ml) dans de l'urine humaine prétraitée. Des points intermédiaires peuvent être obtenus en mélangeant des standards dans des proportions compatibles. Se reporter aux étiquettes de flacons pour les valeurs spécifiques en ng/ml.

Solution Précipitante (BPGG)

Solution précipitante constituée de gammaglobulines de chèvre anti-lapin et diluée dans une solution saline de polyéthylène glycol (PEG). La solution précipitante est fournie sous forme liquide, prête à l'emploi. Stable à +2°/+8°C pendant 30 jours après ouverture. Dans la mesure où un léger dépôt peut se former après réfrigération, la solution précipitante doit être parfaitement mélangée avant utilisation, en évitant la formation de mousse. *Couleur: bleue.*

KBPD1: 1 flacon **KBPD2:** 2 flacons

Matériel requis mais non fourni

Compteur Gamma – permettant l'utilisation de tubes standards 12x75 mm

Centrifugeuse – de préférence réfrigérée et d'une capacité d'au moins 1500xg

Agitateur de type Vortex

Préparation du réactif

Eau distillée ou désionisée

Pipette: pour distribuer 11 ml

Radioimmunodosage

Tubes secs en polypropylène 12x75 mm

Micropipettes – 25 µl, 100 µl et 1,0 ml

Un portoir de décantation – disponible chez DPC

Papier graphe Logit-log – disponibles chez DPC (Référence catalogue : ZP397)

Recueil des échantillons

Recueillir les urines sans conservateur – les échantillons peuvent être conservés entre 2–8°C ou congelés à –20°C. Les urines troubles doivent être clarifiées par filtration ou centrifugation avant dosage et homogénéisées par légères agitations.

Volume nécessaire : 25 µl d'urine par tube.

Les échantillons de patients suspectés de contenir des concentrations

buprénorphine supérieures au standard le plus élevé (10 ng/ml) doivent être dilués avec de l'urine normale (exempte de buprénorphine) avant le dosage.

Tout échantillon suspecté d'altération doit être refusé pour le dosage.

Protocole de dosage

Tous les composants, exceptée la solution précipitante, doivent être à température ambiante (15–28°C) avant leur utilisation.

- 1 Etiqueter 16 tubes en duplicate: T (total de cpm), LNS (liaison non spécifique), A (liaison maximale B0) et de B à F. Etiqueter les tubes supplémentaires, également en duplicate, pour les échantillons de patients et les contrôles.

Standard	Environ, ng/ml
A (LM)	0
B	0,5
C	1
D	2
E	5
F	10

Note: Les concentrations des standards sont *spécifiques d'un lot*. Se reporter à l'étiquette du standard pour les valeurs exactes en ng/ml.

- 2 Pipeter **25 µl** du standard zéro A dans les tubes LNS et A, et **25 µl** des autres standards B à F, sérums de contrôle et échantillons urinaires de patients dans les tubes respectifs.

Les échantillons de patients suspectés de contenir des concentrations buprénorphine supérieures au standard le plus élevé (10 ng/ml) doivent être dilués avec de l'urine normale (exempte de buprénorphine) avant le dosage.

- 3 Ajouter **100 µl** de traceur ¹²⁵I Buprénorphine dans chaque tube. Mélanger le portoir.

Une multipipette est recommandée pour cette étape et pour l'ajout d'antisérum lors de l'étape 4. Tous les tubes doivent être jaunes. Mettre de côté les tubes T servant au comptage jusqu'à l'étape 10, ils ne nécessitent aucune autre préparation.

- 4 Ajouter **100 µl** d'anti-sérum Buprénorphine à chaque tube excepté aux tubes LNS et T. Vortexer.
- 5 Laisser incuber pendant **60 minutes** à température ambiante (15–28°C).
- 6 Ajouter **1,0 ml** de solution précipitante froide (bleue) dans chacun des tubes. Vortexer.

Avant la distribution, la solution précipitante doit être parfaitement mélangée (en évitant la formation de mousse) jusqu'à la disparition de toute particule visible.
- 7 Incuber **10 minutes** à température ambiante (15–28°C).
- 8 Centrifuger pendant **15 minutes** à 3000xg – ou pendant une plus longue période à une accélération plus basse, par exemple 30 minutes à 1500xg.
- 9 Utiliser un portoir pour la décantation, laisser décanter (ou aspirer), séparer le surnageant en retenant le précipité pour le comptage.

Laisser les tubes retournés durant 10 minutes sur du papier absorbant. Tapoter doucement les tubes, essuyer les bords afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
- 10 Compter chaque tube pendant **1 minute**.

Calcul des Résultats

Afin d'obtenir des résultats en concentrations à partir d'une représentation logit-log de la courbe d'étalonnage, calculer pour chaque doublet de tubes les coups corrigés: moyenne cpm-moyenne des cpm du LNS:

CPM corrigés = (Moyenne cpm) moins (Moyenne cpm **LNS**)

Puis déterminer pour chaque doublet la capacité de liaison en pourcentage de liaison maximale (LM), corrigée des cpm dus au LNS des tubes A tubes considérés à 100%:

% liaison = (cpm corrigés / cpm corrigés **LM**) × 100

En utilisant un papier logit-log, on porte en ordonnée les pourcentages de liaison en

fonction des concentrations des calibrateurs qui ne sont pas à zero, en abscisse. On trace une ligne droite passant approximativement par ces points. Les concentrations des échantillons inconnus sont déterminées par interpolation sur la courbe standard.

Il est bon de vérifier les doublets et de construire une représentation graphique de la courbe de calibration (même si celle-ci est faite par ordinateur) avec les différentes valeurs de façon à visualiser le meilleur tracé et c'est une façon de détecter les points deviants. Nous recommandons aussi de suivre les paramètres suivants :

T = Activité totale (cpm)

%LNS = $100 \times (\text{Moyenne des cpm du LNS} / \text{cpm Totaux})$

%LM = $100 \times (\text{cpm corrigés} / \text{cpm totaux})$

Et les intercepts à 20, 50 et 80 % avec

20% = Concentration à 20% de liaison, etc.

Note: d'autres approches sont possibles comme l'intégration de paramètres 4-p logistique. Se reporter à Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Exemple de série : A titre d'exemple uniquement, et non pour calculer des résultats provenant d'une autre série. Comme les valeurs des calibrateurs sont *lot-dépendantes*, les concentrations indiquées peuvent être différentes de celles de vos livraisons. (Voir le tableau « Example Run ».)

Contrôle de Qualité

Des contrôles (ou pools d'urines) avec au moins deux taux de concentration de buprénorphine – haut et bas – doivent être dosés en routine comme des échantillons inconnus.

Les résultats de patient ne doivent être validés que si les résultats des contrôles correspondent aux critères d'acceptation établis par votre laboratoire.

Il est bon d'enregistrer pour chaque dosage les numéros de lots des composants utilisés ainsi que la date à laquelle ils ont été reconstitués ou ouverts. Nous recommandons également de noter jour après jour les résultats des contrôles – comme décrit par exemple dans

Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Noter qu'un redosage d'échantillon peut être précieux pour suivre la précision inter essai, et que les doublets de tubes contrôle peuvent être espacés de façon à vérifier l'absence de dérive significative.

Centrifugation: La procédure nécessite une centrifugation à 3000xg pendant 15 minutes. Des accélérations plus basses sont satisfaisantes uniquement si le temps de centrifugation est augmenté de manière appropriée – par exemple, 30 minutes à 1500xg. Une ultra-centrifugeuse réfrigérée est souhaitable mais non essentielle. Utiliser les formules ci-dessous pour calculer l'accélération de votre centrifugeuse à une vitesse donnée ou la vitesse (en tours par minute) requise pour atteindre la force g désirée.

force g = $28,38 \times (\text{tpm} / 1\,000)^2 \times \text{rayon [pouces]}$

tpm = $187,7 \times \sqrt{(\text{force g} / \text{rayon [pouces]})}$

ou

force g = $11,18 \times (\text{tpm} / 1\,000)^2 \times \text{rayon [cm]}$

tpm = $299,07 \times \sqrt{(\text{force g} / \text{rayon [cm]})}$

Limites

Sur la base d'une revue de la littérature et des études réalisées, résumées dans la section « Performance Data section » il n'apparaît pas de réaction faussement positive avec quelque substance que ce soit ; toutefois, il est possible que des substances ou des facteurs non étudiés dans la section « Specificity » e.g. des erreurs techniques ou de procédure interfèrent sur le test et donne des résultats faussement positifs.

La trousse permet le dosage de la buprénorphine, mais présente des réactions croisées élevées avec ses métabolites, c'est pourquoi elle ne doit pas être utilisée dans le cadre d'analyse pharmacocinétique.

Performances du test

Se reporter aux tableaux et aux graphiques pour les données représentatives des performances du coffret Double Anticorps Buprénorphine. Les résultats sont donnés en ng/ml.

Intervalle de linéarité :

Approximativement 0,5 – 10 ng/ml. Les standards sont lot-spécifiques.

Sensibilité analytique : 0,1 ng/ml.

Précision intra-dosage (au sein d'une même série) : Les statistiques ont été calculées pour chacun des trois échantillons à partir du résultat de 20 tubes en double sur un seul dosage. Se reporter au tableau "Intraassay Precision".)

Précision inter-dosage (entre plusieurs séries) : Les statistiques ont été calculées pour chacun des trois échantillons à partir du résultat de tubes en double lors de 20 dosages différents. (See "Interassay Precision" table)

Effet de la position des tubes : aucun jusqu'à 100 tubes. (Voir le tableau « End-of-Run Effect ».)

Spécificité : L'antisérum est très spécifique de la buprénorphine, avec une réaction croisée extrêmement faible avec les autres composés naturellement présents dans les échantillons de patients. Tous les composés testés ont été pesés, aliquotés dans de l'urine, congelés à –20°C avant analyse. (Voir le tableau « Specificity ».)

Les composés ci-dessous ne sont pas détectables avec la trousse Double Anticorps Buprénorphine même à des concentrations de 100 000 ng/ml.

Acetaminophen
Acetylsalicylic acid
Allylcyclopentylbarbituric acid
Amobarbital
d-Amphetamine
d,l-Amphetamine
Aprobarbital
Barbituric acid
Benzoyllecgonine (cocaine metab.)
Butabarbital
Butethal
Caffeine
Chlorazepate
Chlorpromazine
Clonazepam
Cocaine
Codeine
Cotinine (nicotine metabolite)
5,5-Diallylbarbituric acid
Diazepam
Ecgonine (cocaine metabolite)
Ethylmorphine
Fenfluramine
Fentanyl
Lidocaine
Methadone
Methamphetamine
Methaqualone
Morphine

Morphine-3-glucuronide
Nalorphine
Normorphine
Phencyclidine
Phenobarbital
d-Propoxyphene
Secobarbital

Test de dilution : 3 urines de patients sous traitement analgésique à la buprénorphine ont été testées pures puis diluées : une perte de linéarité peut être attendue en raison de la présence des métabolites.¹² (Voir le tableau "Linearity")

Test de récupération : Des échantillons chargés dans un rapport de 1 à 19 avec trois solutions de buprénorphine (40, 60 et 120 ng/ml) ont été dosés. (Voir le tableau « Recovery » pour des données représentatives.)

Assistance technique

Contacter votre distributeur national. En France distribué par DPC France 90 bd National 92257 La Garenne-Colombes.

Le système d'assurance qualité de DPC est certifié ISO 13485 (2003).

Italiano

Doppio Anticorpo Buprenorfina

Uso: Il dosaggio Buprenorfina è un radioimmunosaggio a doppio anticorpo marcato con I¹²⁵ per la determinazione quantitativa e qualitativa della buprenorfina nell'urina. A solo uso diagnostico *in vitro* nel contesto di un programma che comporta un test di conferma per la buprenorfina ed i suoi metaboliti.

Codice: **KBPD1** (100 provette),
KBPD2 (200 provette).



Il kit da 100 determinazioni contiene meno di 4 microcurie (148 kilobecquerel) di buprenorfina radioattiva marcata con I¹²⁵, ed il kit da 200 determinazioni contiene meno di 8 microcurie (296 kilobecquerel).

Il kit Doppio Anticorpo Buprenorfina fornisce solo un risultato analitico preliminare. Occorre utilizzare un metodo alternativo più specifico per ottenere un risultato analitico confermato. Il metodo di conferma preferito è la gas cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS).¹ Le considerazioni cliniche ed il giudizio professionale devono essere applicate ad ogni test sulle droghe d'abuso, in modo particolare quando su tratta di risultati preliminari positivi.

Riassunto e spiegazione del Test

La buprenorfina è un derivato dell'oripavina ed è un potente agonista/antagonista degli oppiacei utilizzato per alleviare il dolore. Viene somministrato clinicamente in endovena, intramuscolo o sublinguale.²

La buprenorfina viene metabolizzata in N-dealchilazione e 3-O-glucuronidazione.³⁻⁷ I livelli plasmatici ed i metaboliti sono non rilevabili dopo singole dosi, ma in assunzioni croniche sono dello stesso ordine della buprenorfina non modificata.⁸ La maggior parte (circa il 70%) della dose di buprenorfina appare nelle feci,⁶ e solo in piccole quantità viene riscontrata nelle urine, principalmente come buprenorfina glucuronide, N-dealchilbuprenorfina glucuronide ed N-delachilbuprenorfina.^{6,7} Un piccolo quantitativo di buprenorfina rimane immutata nelle urine.

Dosi efficaci di buprenorfina sono nell'ordine di poche centinaia di microgrammi. In combinazione con un metabolismo esteso e bassa escrezione di urina, gli equivalenti della buprenorfina nell'urina sono bassi. In uno studio comprendente pazienti che assumevano da 0,4 a 2,0 mg di buprenorfina al giorno per alleviare un dolore cronico, le concentrazioni nell'urina misurate con il Dosaggio DPC Doppio Anticorpo Buprenorfina andavano da 5,6 a più di 100 ng/mL. L'effetto dell'idrolisi enzimatica con β -glucuronidasi e sulfatasi ha dato un aumento medio nella concentrazione osservata del 48%.

Poiché l'analisi della buprenorfina attraverso tecniche convenzionali è

difficile, i radioimmunodosaggi sono stati largamente utilizzati.^{8,9} Sono stati inseriti anche i metodi HPLC, ma hanno una limitata sensibilità come test di conferma.^{10,11} La GC/MS al confronto, ha una sensibilità migliore.^{8,7}

Principio del Dosaggio

Il dosaggio DPC Doppio Anticorpo Buprenorfina è un radioimmunodosaggio competitivo nel quale la buprenorfina marcata con I¹²⁵ compete con la buprenorfina nel campione per i siti anticorpali. Dopo incubazione per un tempo fissato, viene ottenuta la separazione del legato dal libero attraverso un doppio anticorpo accelerato con PEG. Infine, la frazione legata all'anticorpo viene precipitata e contata. Le concentrazioni del campione sono lette dalla curva di calibrazione.

Reagenti da Dispensare: 3

Tempo Totale di Incubazione: 70 minuti.

Separazione: La Soluzione Precipitante pronta all'uso combina il secondo anticorpo ed il PEG diluito.

Conte Totali alla Iodinazione:
circa 100 000 cpm.

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare a 2–8°C in un frigorifero appositamente destinato al materiale radioattivo. Eliminare secondo le normative di legge vigenti.

Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza.

Alcuni componenti forniti in questo kit possono contenere materiale di origine umana e/o altri ingredienti potenzialmente pericolosi che necessitano di precauzioni di utilizzo.

Seguire le precauzioni universali, e manipolare tutti i componenti come se potessero trasmettere agenti infettivi. Sono stati dosati i materiali di origine umana e sono stati trovati non reattivi per la Sifilide; per gli Anticorpi Anti-HIV 1 e 2; per l'Antigene di Superficie dell'Epatite B; e per gli Anticorpi Anti-Epatite C.

E' stata aggiunta Sodio Azide a concentrazioni inferiori a 0,1 g/dL come conservante. Al momento

dell'eliminazione, irrorare con molta acqua per evitare la formazione di azidi metalliche potenzialmente esplosive nelle tubature di piombo e di rame.

Acqua: Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata.

Radioattività

Una copia di tutti i certificati di Autorizzazione per radioisotopi (Specifico o Generico) rilasciata ad un cliente americano deve essere conservata in file presso la Diagnostic Products Corporation prima che i kit o i componenti contenenti materiale radioattivo possano essere spediti. Questi materiali radioattivi possono essere acquisiti da qualsivoglia cliente in possesso dell'Autorizzazione Specifica. Con l'Autorizzazione Generica questi materiali radioattivi possono essere acquistati solo da medici, veterinari che esercitino la professione, laboratori clinici ed ospedalieri – e solo per l'esecuzione di test clinici o di laboratorio in vitro che non implicino somministrazione interna o esterna del materiale radioattivo o delle sue radiazioni alle persone o animali. La sua acquisizione, ricevimento, conservazione, utilizzo, trasferimento ed eliminazione sono soggette a regolamentazioni e ad Autorizzazione (Generica o Specifica) della Commissione Statunitense per il Nucleare o dello Stato con il quale l'NRC abbia stipulato un accordo per l'esercizio del controllo regolatorio.

Manipolare i materiali radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione Generica o Specifica. Per minimizzare l'esposizione alle radiazioni, l'utilizzatore deve attenersi alle linee guida stabilite dal National Bureau of Standards publication su "*Safe Handling of Radioactive Materials*" "*Norme per una corretta manipolazione dei Materiali Radioattivi*". (Guida N° 92, pubblicata il 9 Marzo 1964) e successive edizioni pubblicate dallo Stato e dalle Autorità Federali.

Assorbire immediatamente le fuoriuscite e decontaminare le superfici contaminate. Evitare la formazione di aerosol. Eliminare i rifiuti solidi radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione. Le licenze generiche (possessori di NRC Form 483) possono eliminare i rifiuti radioattivi solidi come non radioattivi, dopo aver rimosso

l'etichetta. I detentori di autorizzazioni specifiche (NRC Form 313) devono fare riferimento al Titolo 10, Codice delle Regolamentazioni Federali Parte 20. I detentori di Autorizzazioni negli Stati che hanno stipulato un accordo con l'NRC dovrebbero far riferimento alle regolamentazioni idonee dei loro stati. I detentori di Autorizzazioni Generali possono eliminare i rifiuti radioattivi liquidi del tipo contenuto in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. I detentori di autorizzazione devono eliminare o rendere illeggibili le etichette dei contenitori vuoti di materiali radioattivi prima di eliminare i rifiuti solidi. I detentori di autorizzazioni specifiche possono eliminare piccoli quantitativi di rifiuti radioattivi liquidi del tipo utilizzato in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. Fare riferimento alle regolamentazioni appropriate applicabili al Vostro laboratorio.

Materiali Forniti:

Preparazione Iniziale

Preparare tutti i componenti almeno 10 minuti prima dell'utilizzo.

Antisiero Buprenorfina (BPD1)

Antisiero liofilo buprenorfina, con conservanti. Ricostituire ciascun flacone aggiungendo **11 mL** di acqua distillata o deionizzata. Mescolare capovolgendo. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione.

KBPD1: 1 flacone **KBPD2:** 2 flaconi

Buprenorfina marcata con I^{125} (BPD2)

Buprenorfina iodinata liofila, con conservanti. Ricostituire ciascun flacone aggiungendo **11 mL** di acqua distillata o deionizzata. Mescolare capovolgendo. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione, o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

KBPD1: 1 flacone **KBPD2:** 2 flacone

Calibratori Buprenorfina (BPD3–8)

Sei flaconi, etichettati dalla A (3 mL) alla F (1 mL ciascuno), di calibratori buprenorfina forniti in forma liquida, pronti all'uso con conservanti. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura, o per 6 mesi (aliquotato) a –20°C.

KBPD1: 1 set **KBPD2:** 1 set

I calibratori hanno valori *lotto-specifici* di circa 0, 0.5, 1, 2, 5 e 10 ng/mL in urina umana processata. Fare riferimento alle etichette dei flaconi per le concentrazioni esatte in ng/mL. I punti intermedi della calibrazione possono essere ottenuti mescolando i calibratori in proporzioni idonee.

Soluzione Precipitante (BPGG)

La Soluzione Precipitante è composta da gamma globuline di capra anti-coniglio (GARGG) e da polietilene glicol diluito (PEG) in una soluzione salina, con conservanti. La Soluzione Precipitante viene fornita in forma liquida, pronta all'uso. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura. Poiché può verificarsi la formazione di un sottile precipitato, la Soluzione Precipitante deve essere completamente mescolata prima dell'utilizzo, senza formazione di schiuma. Colore: blu.

KBPD1: 1 flacone **KBPD2:** 2 flaconi.

Componenti del kit forniti separatamente

Gamma counter – compatibile con provette standard da 12x75 mm.

Centrifuga – preferibilmente refrigerata e capace di almeno 1500xg.

Vortex mixer.

Preparazione dei Reagenti

Acqua distillata o deionizzata.

Pipette – per la dispensazione di 11 mL

Radioimmunosaggio

Provette semplici di polipropilene da 12x75 mm.

Micropipette – da 25 μ L, 100 μ L e 1,0 mL

Foam per la decantazione delle provette – disponibile presso DPC

Carta per grafici logit-log – disponibile presso DPC (Codice: ZP397)

Prelievo dei Campioni

Prelevare l'urina senza conservanti. Il campione può essere refrigerato a 2–8°C o congelato a –20°C. Se torbido, deve essere schiarito attraverso filtrazione o centrifugazione prima dell'utilizzo e mescolato scuotendolo leggermente.

Volume richiesto: 25 μ L di urina per provetta.

Campioni con concentrazioni di buprenorfina più elevate del calibratore più alto (10 ng/mL) devono essere diluiti o con il calibratore zero o con urina priva di buprenorfina.

Se si sospetta l'adulterazione del campione, non accettarlo per l'analisi.

Dosaggio Radioimmunologico

Tutti i componenti eccetto la Soluzione Precipitante devono essere a temperatura ambiente (15–28°C) prima dell'utilizzo.

- 1 Etichettare sedici provette in duplicato: T (conte totali), NSB (legame non specifico), A (legame massimo) e dalla B alla F. Etichettare altre provette, anch'esse in duplicato, per i campioni di urina ed i controlli.

Calibratore	Circa ng/mL
A (MB)	0
B	0,5
C	1
D	2
E	5
F	10

Nota: Questi calibratori sono *lotto-specifici*. Fare riferimento alle etichette del flacone per le concentrazioni esatte in ng/mL.

- 2 Dispensare **25 µL** del calibratore zero A nelle provette NSB ed A, e **25 µL** di ciascuno dei calibratori rimanenti dalla B alla F nelle provette etichettate in maniera corrispondente. Dispensare **25 µL** di ciascuno dei campioni di urina e di ciascun controllo nelle provette preparate.

I campioni con concentrazioni attese di buprenorfina superiori al calibratore più elevato (10 ng/mL) devono essere diluiti nel calibratore zero prima del dosaggio.

- 3 Aggiungere **100 µL** di Buprenorfina marcata con I^{125} a tutte le provette.

Si consiglia l'utilizzo di un dispensatore per questo passaggio e per l'aggiunta dell'antisiero al punto 4.

Mettere da parte le provette T per la conta (al punto 10); non sono necessari ulteriori passaggi.

- 4 Aggiungere **100 µL** di Antisiero Buprenorfina a tutte le provette eccetto le provette NSB e T. Vortexare.
- 5 Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente (15–28°C).
- 6 Aggiungere **1,0 mL** di Soluzione Precipitante *fredda* a tutte le provette. Vortexare.

Prima della dispensazione, la Soluzione Precipitante deve essere completamente mescolata (senza formazione di schiuma) finché tutto il precipitato visibile non sia scomparso.

- 7 Incubare per **10 minuti** a temperatura ambiente (15–28°C).
- 8 Centrifugare per **15 minuti** a 3000xg – o per periodi più lunghi con accelerazioni inferiori, i.e. 30 minuti a 1500xg.
- 9 Utilizzando un foam per la decantazione, decantare (o aspirare) il supernatante, conservando il precipitato per la conta.

Capovolgere le provette su carta assorbente per 10 minuti. Quindi, scuoterle leggermente e blottarne i bordi per rimuovere l'umidità residua.
- 10 Contare ciascuna provetta per **1 minuto**.

Calcolo dei Risultati

Per calcolare le concentrazioni di buprenorfina da una rappresentazione logit-log della curva di calibrazione, calcolare inizialmente per ogni coppia di provette la media delle conte corrette con NSB al minuto:

Conte Nette = (Media dei CPM) Meno (Media CPM **NSB**)

Quindi determinare il legame di ogni coppia di provette come percentuale del legame massimo (MB), con le conte corrette-NSB delle provette A prese al 100%:

Percentuale di Legato = (Conte Nette / Conte Nette **MB**) × 100

Utilizzando la carta logit-log, tracciare la Percentuale di Legato sull'asse verticale (probabilità) verso la Concentrazione

sull'asse orizzontale (logaritmica) per ciascuno dei calibratori non zero e tracciare una linea retta approssimativamente lungo il tracciato di questi punti. I risultati per i campioni non noti possono essere letti dalla retta attraverso interpolazione.

Si consiglia di visionare i risultati per stabilire la correlazione entro i replicati e tracciare un grafico della curva di calibrazione (anche se i calcoli vengono effettuati dal computer) per visualizzare l'appropriatezza della trasformazione utilizzata e per individuare i punti devianti all'interno della calibrazione. Consigliamo anche di mantenere una rintracciabilità dei parametri utilizzati per il calcolo dei dati:

$T = \text{Conte Totali} / (\text{conte al minuto})$

$\%NSB = 100 \times (\text{Conte NSB Medie} / \text{Conte Totali})$

$\%MB = 100 \times (\text{Conte Nette} / \text{Conte Totali})$

E le "intercette" al 20, 50 ed 80%, dove
20% = Concentrazione al 20% di Legato ecc.

Nota: sono accettabili anche altri tipi di approccio, quali: l'implementazione della logistica a 4 parametri. Vedi Dudley Ra et al. Guidelines for immunoassay data Reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Seduta Esemplificativa: a solo scopo illustrativo e non per calcolare i risultati di un'altra seduta. I valori dei calibratori sono *lotto-specifici*, le concentrazioni elencate nella colonna più a destra possono non essere in linea con i valori dei calibratori forniti nel kit. (vedi tabella "Example Run").

Controllo di Qualità

Controlli o pool di urina con almeno due livelli di concentrazione di buprenorfina, basso ed alto, devono essere dosati di routine come campioni non noti.

Riportare i risultati dei pazienti solo se i risultati dei controlli sono conformi ai criteri di accettabilità del Vostro laboratorio.

Si consiglia per ogni dosaggio di annotare i numeri di lotto dei componenti utilizzati, le date di ricostituzione o di apertura. Si consiglia anche di tracciare i grafici dei risultati dei controlli giorno dopo giorno – come descritto, ad esempio, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Campioni ripetuti possono servire come

ulteriore strumento per monitorare la precisione inter-dosaggio; coppie di campioni intervallate lungo tutto il dosaggio possono essere d'aiuto nel verificare l'assenza di deviazioni significative.

Centrifugazione: La procedura richiede per la centrifugazione 3000xg per 15 minuti. Accelerazioni inferiori sono soddisfacenti solo se si aumenta in maniera appropriata il tempo di centrifugazione – ad esempio, 30 minuti a 1500xg. Si consiglia l'uso di una centrifuga ad elevata velocità, refrigerata, anche se la stessa non è essenziale. Utilizzare le formule di cui di seguito per calcolare l'accelerazione della Vostra centrifuga ad una data velocità, o la velocità (in rivoluzioni al minuto) richiesta per raggiungere una forza g desiderata.

$\text{forza g} = 28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raggio [pollici]}$

$\text{rpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{forza g} / \text{raggio [pollici]})}$

O

$\text{forza g} = 11,18 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raggio [cm]}$

$\text{rpm} = 299,07 \times \sqrt{(\text{forza g} / \text{raggio [cm]})}$

Limiti

Sulla base dei dati presenti in letteratura e di studi riassunti nella sezione "Prestazioni del Dosaggio" non sembrano esserci sostanze che possano provocare una reazione falso positiva. Nonostante ciò, esiste la possibilità che sostanze e/o fattori non elencati nella sezione "Specificità" – i.e. errori tecnici o procedurali – possano interferire con il test e provocare risultati falso positivi.

Il kit misura la buprenorfina e crossreagisce in maniera estesa con i metaboliti della buprenorfina. In maniera analoga, il kit non deve essere utilizzato per analisi farmacocinetiche.

Prestazioni del Dosaggio

Vedi Tabelle e Grafici per dati *rappresentativi* delle prestazioni del Dosaggio Doppio Anticorpo Buprenorfina. I risultati sono espressi in ng/mL.

Range di calibrazione:

Circa da 0,5 – 10 ng/mL.

I valori dei calibratori sono lotto specifici.

Sensibilità analitica: 0,1 ng/mL.

Precisione Intra-Dosaggio (All'interno della stessa seduta): Sono state

calcolate statistiche per campioni dai risultati di 20 coppie di provette in un unico dosaggio. (Vedi tabella "Intraassay Precision".)

Precisione Inter-Dosaggio (Da una seduta all'altra): Sono state calcolate statistiche per campioni dai risultati di coppie di provette in 20 dosaggi diversi. (Vedi tabella "Interassay Precision".)

Effetto Fine-Seduta: nessuno fino a 100 provette. (Vedi tabella "End-of-Run Effect").

Specificità: L'antisiero è altamente specifico per la buprenorfina, con una crossreattività estremamente bassa verso altri composti che possano essere presenti in campioni di urina equina. Tutti i composti testati sono stati pesati ed aliquotati nell'urina e quindi congelati a -20°C fino al dosaggio. (Vedi tabella "Specificity".)

I composti seguenti sono stati riscontrati come non identificabili dal Dosaggio Doppio Anticorpo Buprenorfina ad un livello di 100 000 ng/mL.

Acetaminofene
Acido Acetilsalicilico
Acido Allilciclopentilbarbiturico
Amobarbitale
d-Amfetamina
d,l-Amfetamina
Aprobarbitale
Acido Barbiturico
Benzoilecgonina (metab. della cocaina)
Butobarbitale
Butetale
Caffeina
Clorazepato
Clorpromazina
Clonazepam
Cocaina
Codeina
Cotinina (metabolita della nicotina)
Acido 5,5-Diallilbarbiturico
Diazepam
Ecgonina (metabolita della cocaina)
Etilmorfina
Fenfluramina
Fentanile
Lidocaina
Metadone
Metamfetamina
Metaqualone
Morfina
Morfina-3-glucuronide
Nalorfina
Normorfina
Fenciclidina
Fenobarbitale
d-Propoxifene
Secobarbitale

Linearità: Sono stati dosati sia diluiti che non tre campioni di urina di soggetti cui era stata somministrata della buprenorfina per alleviare il dolore. Ci si deve attendere una certa perdita di linearità nei campioni reali a causa della presenza dei metaboliti della buprenorfina.¹² (Vedi tabella "Linearity".)

Recupero: Sono stati dosati campioni 1:19 con tre soluzioni di Buprenorfina (40, 60 e 120 ng/mL). (Vedi tabella "Recovery" per dati rappresentativi).

Assistenza Tecnica

All'Estero: Contattare il proprio Distributore Nazionale.

Il Sistema Qualità della Diagnostic Products Corporation è certificato secondo le norme ISO 13485:2003.

DPC®

Diagnostic Products Corporation
Corporate Offices
5210 Pacific Concourse Drive
Los Angeles, CA 90045-6900
USA

2005-08-29

PIKBPD1 – 5



EC REP DPC Biemann GmbH
61231 Bad Nauheim
Germany
+49 -6032-994-00