

Control de la calidad interno y externo del enzimoanálisis Abbott IMx[®] Tacrolimus II: algunas consideraciones prácticas

S. Represa Veiga, J. A. Casal Antelo, J. C. Tutor Valcarce

Resumen

Se llevó a cabo un control de la calidad interno y externo del enzimoanálisis Abbott IMx[®] Tacrolimus II con resultados satisfactorios. Sin embargo los coeficientes de variación intra e interseriales obtenidos fueron mayores que los clínicamente aceptables. Asimismo las diferencias entre resultados duplicados fueron frecuentemente mayores que el error clínicamente aceptable. Consecuentemente, se recomienda realizar la determinación de la concentración de tacrolimus por duplicado para su monitorización terapéutica, sobre todo en el periodo inicial postrasplante.

Summary

An internal and external quality control of the enzyme immunoassay Abbott IMx[®] Tacrolimus II was carried out with satisfactory results. Nevertheless, the within and between run variation coefficients were greater than the clinically acceptable values. Likewise, the differences between the replicate results were frequently greater than the clinically acceptable error. Consequently, the determination in duplicate of the tacrolimus concentration for its therapeutic monitoring is recommended, overcoat in the initial postrasplantation period.

Introducción

El tacrolimus es un macrólido con una masa molar de 822 g/mol (1), que presenta una potente actividad inmunosupresora y es ampliamente utilizado como terapia primaria o de rescate en pacientes con trasplantes de órganos sólidos.

Los inmunoanálisis monoclonales son los métodos más utilizados para la monitorización terapéutica del tacrolimus (2), aunque son menos específicos que las técnicas de cromatografía líquida / espectrometría de masas que se reservan para fines de investigación. El problema de su relativa falta de especificidad analítica, podría incrementarse cuando se analizan muestras de sangre de pacientes cuyo alterado funcionalismo hepático pueda conducir a una acumulación de metabolitos del tacrolimus a nivel circulante (3-5). Sin embargo, las interferencias en estos casos son generalmente menos importantes que las encontradas para la ciclosporina (6).

El enzimoanálisis de micropartículas de Abbott es con gran diferencia el procedimiento más utilizado en la práctica clínica para la cuantificación del tacrolimus. La técnica original (7) ha sido mejorada y la utilización de los reactivos de segunda generación (Abbott IMx[®] Tacrolimus II) permite

alcanzar un límite de detección más adecuado para su monitorización terapéutica (8-15). En la presente nota técnica se indican los resultados obtenidos en el control de la calidad interno y externo de este inmunoanálisis, así como algunas consideraciones prácticas para su utilización en rutina.

Material y métodos

Instrumentación

Para la determinación de la concentración de tacrolimus en sangre se utilizó el enzimoanálisis Abbott IMx[®] Tacrolimus II siguiendo las instrucciones del fabricante (Abbott Laboratories, Abbott Park, EEUU).

Especímenes y reactivos

Para el estudio de la imprecisión interserial se utilizaron los controles IMx[®] Tacrolimus II de Abbott L, M y H con unas concentraciones asignadas de 6,08 nmol/L, 13,38 nmol/L y 26,75 nmol/L respectivamente. El estudio de la imprecisión intraserial se hizo por el método de los duplicados, mediante el análisis de 158 muestras de pacientes con trasplante hepático o renal a los que se estaba administrando tacrolimus. Para ello se hizo una distribución de los resultados en tres grupos con unos intervalos de concentración de 6,08 - 12,16 nmol/L, 12,16 - 18,24 nmol/L y mayor de 18,24 nmol/L.

Control de la calidad

El control externo de la calidad se hizo participando en el Tacrolimus International Proficiency Testing Scheme (Cord. Dr D. W. Holt, The Analytical Unit, St George's Hospital

Medical School, London), que agrupa a más de 200 laboratorios de los que el 97 % utilizan la técnica Abbott IMx[®] Tacrolimus II. El programa implica el análisis mensual de 3 muestras de sangre con una adición conocida de tacrolimus o de pacientes a los que se administraba el fármaco.

Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizaron pruebas no paramétricas (prueba de rango de signos de Wilcoxon y coeficiente de correlación de Spearman) ya que sus distribuciones no eran gaussianas según la prueba de Smirnov - Kolmogorov. Los estudios de regresión lineal se hicieron mediante el método de Passing y Bablok. Las diferencias, los coeficientes de variación y los errores de la estima clínicamente aceptables se calcularon, en función de los intervalos terapéuticos de tacrolimus recomendados (2), de acuerdo con criterios previamente señalados (16, 17). Los coeficientes de variación

Tabla I. Intervalos terapéuticos recomendados para las concentraciones de tacrolimus en pacientes trasplantados (2) y coeficientes de variación clínicamente aceptables calculados (17)

Trasplante	INICIO (< 3 meses)		MANTENIMIENTO	
	Int. Terapéutico (nmol/L)	CV aceptable (%)	Int. Terapéutico (nmol/L)	CV aceptable (%)
Renal	12,16-18,24	2,50	6,08-12,16	4,17
Hepático	12,16-18,24	2,50	6,08-12,16	4,17
Cardíaco	12,16-21,89	3,57	9,72-18,24	3,80

clínicamente aceptables de acuerdo con estos criterios en los períodos inicial y de mantenimiento para los distintos tipos de trasplante se indican en la tabla I

Tabla II. Resultados estudio imprecisión interserial

Control	n	$\bar{x} \pm s$ (nmol/L)	CV (%)
L	61	5,86 ± 0,56	9,64
M	61	12,45 ± 0,87	7,00
H	61	26,02 ± 1,25	4,81

Resultados

Para el estudio de la imprecisión interserial se analizaron diariamente los controles L, M y H y los resultados obtenidos se indican en la tabla II.

Tabla III. Resultados estudio imprecisión intraserial

Intervalo (nmol/L)	Número duplicados	$\bar{x} \pm s$ (nmol/L)	CV (%)
6,08-12,16	86	9,89 ± 0,54	5,44
12,16-18,24	49	14,68 ± 0,73	5,00
> 18,24	23	21,82 ± 0,89	4,09

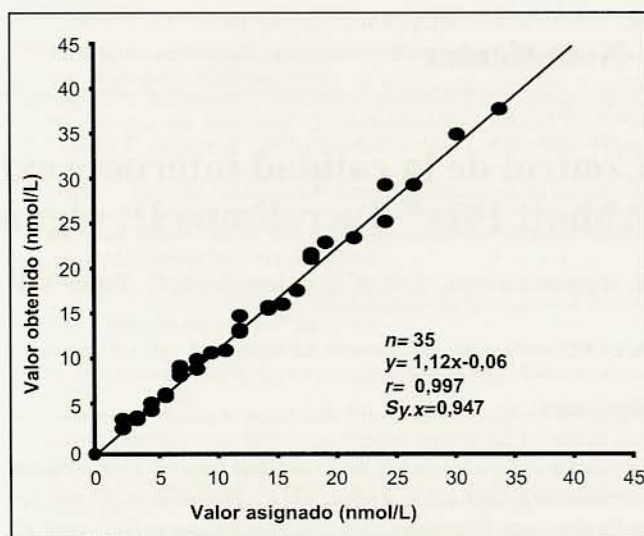


Figura 1. Correlación y regresión entre los valores obtenidos y los asignados para las muestras con adición de tacrolimus del control externo.

Los resultados obtenidos para la imprecisión intraserial se indican en la tabla III. En todos los casos los coeficientes de variación experimentales fueron mayores que los clínicamente aceptables, (tabla I) exceptuando el obtenido para la imprecisión intraserial a concentraciones mayores de 18,24 nmol/L.

La diferencia media entre los duplicados para el intervalo de concentraciones 6,08 - 12,16 nmol/L fue de 0,64 nmol/L que es inferior al error clínicamente aceptable (0,76 nmol/L). Sin embargo, en el 23,2 % de los casos la diferencia entre los duplicados era mayor que el error clínicamente aceptable. La diferencia media entre los duplicados para el intervalo de concentraciones de 12,16 - 18,24 nmol/L fue de 0,74 nmol/L que es inferior al error clínicamente aceptable. No obstante, en el 38,7 % de los casos la diferencia entre los duplicados era mayor que el error clínicamente aceptable. Para concentraciones mayores de 18,24 nmol/L la diferencia media entre los duplicados fue de 0,99 nmol/L que es mayor que el error clínicamente aceptable. En el 43,4 % de los casos la diferencia entre los duplicados era mayor que el error clínicamente aceptable.

La correlación y regresión entre los valores obtenidos y los asignados para las muestras con adición de tacrolimus del control externo se indica en la figura 1. No existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambas poblaciones de va-

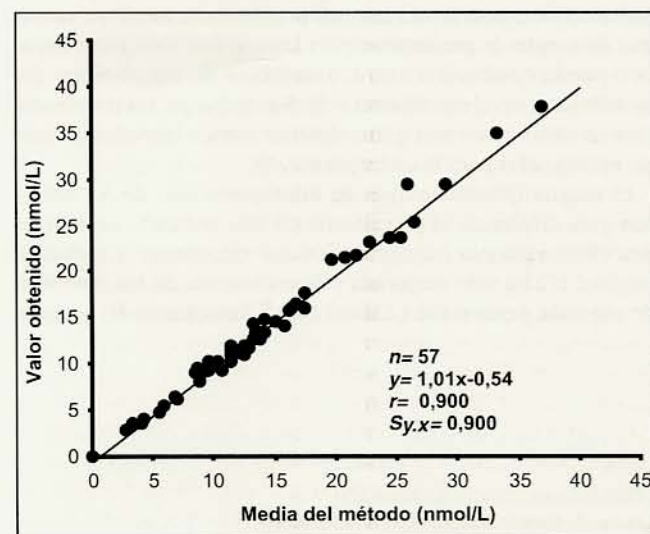


Figura 2. Correlación y regresión entre los valores obtenidos y la media del método para las muestras del control externo.

lores pero la diferencia entre las medianas (13,38 nmol/L vs 12,16 nmol/L) es superior al error clínicamente aceptable. El error constante (ordenada en el origen) es inferior al límite de detección de la técnica señalado en la bibliografía (8 - 11, 13), aunque el error de la estima es mayor que el clínicamente aceptable (0,38 nmol/L). La correlación y regresión entre los valores obtenidos y la media del método en las muestras del control externo se indican en la figura 2. No existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambas poblaciones de valores. Asimismo, la diferencia entre las medianas (11,92 nmol/L vs 12,52 nmol/L) es inferior al error clínicamente aceptable. El error constante es inferior al límite de detección de la técnica, aunque el error de la estima es mayor que el clínicamente aceptable (0,38 nmol/L).

La recuperación media del inmunoanálisis IMx[®] Tacrolimus II calculada a partir de los valores asignados y las medias del método en 35 muestras del control externo fue del 110 %.

Discusión

Teniendo en cuenta los estrechos márgenes terapéuticos de las concentraciones de tacrolimus, los coeficientes de variación clínicamente aceptables son muy exigentes (tabla I). Los resultados obtenidos para la imprecisión intra e interserial del procedimiento (tablas II y III) han de considerarse satisfactorios en función de los datos de la bibliografía (9-11, 13, 14), pero los coeficientes de variación son mayores que los clínicamente aceptables. Se ha definido como sensibilidad funcional de un procedimiento a la menor concentración de constituyente que puede ser determinada con un coeficiente de variación interserial menor del 20 % (19). Recientemente Schambeck et al. (8) señalan que la sensibilidad funcional del inmunoanálisis IMx[®] Tacrolimus II es de 3,8 nmol/L para determinaciones simples y de 2,3 nmol/L para determinaciones por duplicado. Es evidente que para concentraciones subterapéuticas de tacrolimus, aunque significativamente mayores que el límite de detección del procedimiento que sería del orden de 1,22 nmol/L (8, 9, 11, 13), la imprecisión aumenta significativamente. Se ha señalado que el inmunoanálisis IMx[®] Tacrolimus II presenta una deficiente recuperación (aproximadamente 80 %) debido a una incompleta extracción del fármaco (10, 11). Esto explicaría que mediante la técnica original IMx[®] Tacrolimus I, que utiliza una mayor relación reactivo extracción / muestra, se obtengan resultados más altos que con la técnica de segunda generación (10, 11). Sin embargo este hecho no ha sido confirmado por otros autores (12, 13, 18).

De acuerdo con publicaciones previas (12, 14), los resultados obtenidos por nosotros para las muestras de sangre con adiciones conocidas de tacrolimus (figura 1) no sugieren que la técnica tenga una baja recuperación. Según nuestra experiencia es de la máxima importancia agitar los tubos con la muestra y el reactivo de extracción al menos durante 15-20 segundos. Tiempos menores de agitación conducen a una mayor variabilidad de los resultados y frecuentemente a una menor recuperación en la extracción del fármaco.

Los coeficientes de variación experimentales son mayores que los clínicamente aceptables y las diferencias entre resultados duplicados muy frecuentemente superan al error clínicamente aceptable sea cual sea la concentración. Consecuentemente, en una práctica clínica rigurosa la determinación de la concentración de tacrolimus mediante el inmunoanálisis Abbott IMx[®], debe realizarse por duplicado. Este aspecto sería particularmente importante durante el período inicial postrasplante en que la imprecisión y los errores clínicamente aceptables son menores.

Agradecimientos

Los autores S. Represa y J.A. Casal agradecen a Roche Diagnóstica y Dade - Behring las becas concedidas durante el año 1999 por medio de la Fundación Empresa - Universidad Gallega.

Correspondencia:
J. Carlos Tutor
Laboratorio Central
Hospital Clínico Universitario
Santiago de Compostela.
A Coruña

Bibliografía

1. Tanaka H, Kuroda A, Marusawa H, Hashimoto M, Hatanaka H, Kino T, et al. Physicochemical properties of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc* 1987; 19 (Suppl. 6): 11 - 6.
2. Oellerich M, Armstrong VW, Schutz E, Shaw LM. Therapeutic drug monitoring of ciclosporine and tacrolimus. *Clin Biochem* 1998; 31: 309 - 16.
3. Gonshior AK, Christians U, Winkler M, Linck A, Baumann J, Sewing KF. Tacrolimus (FK 506) metabolite patterns in blood from liver and kidney transplant patients. *Clin Chem* 1996; 42: 1426 - 32.
4. Braun F, Schutz E, Christians U, et al. Pitfalls in monitoring tacrolimus (FK 506). *Ther Drug Monit* 1997; 19: 628 - 31.
5. Murthy JN, Davis DL, Yatscoff RW, Soldin SJ. Tacrolimus metabolite cross-reactivity in different tacrolimus assays. *Clin Biochem* 1998; 31: 613 - 7.
6. Holt DW, Jones K, Lee T, Stadler P, Johnston A. Quality assessment issues of new immunosuppressive drugs and experimental experience. *Ther Drug Monit* 1996; 18: 362 - 7.
7. Grenier FC, Luczkiv J, Bergmann M, Lunetta S, Morrison M, Blonski D, et al. A whole blood FK 506 assay for the IMx analyzer. *Transplant Proc* 1991; 23: 2748 - 9.
8. Schambeck CM, Bedel A, Keller F. Limit of quantification (functional sensitivity) of the new IMx Tacrolimus II Microparticle Enzyme Immunoassay. *Clin Chem* 1998; 44: 2217.
9. Cannon RD, Wong SHY, Hariharan S, Adams MB, Johnson CP, Roza AM, et al. Clinical evaluation of an improved sensitivity tacrolimus (FK 506) assay by microparticle enzyme immunoassay. *Clin Chem* 1997; 43: S 213.
10. Garg UC, Austin G, Barnes C, Hamilton M. Comparison of the Abbott IMx Tacrolimus I and Tacrolimus II assays. *Clin Chem* 1998; 44: 1783 - 5.
11. Wallemacq P, Leal T, Besse T, Squifflet JD, Reding R, Otte JB, et al. IMx Tacrolimus II vs Tacrolimus microparticle enzyme immunoassay evaluated in renal and hepatic transplant patients. *Clin Chem* 1997; 43: 1989 - 91.
12. Cao Z, Linder MW, Jevans AW, Brown G, Valdes R. Comparison of tacrolimus concentrations measured by the IMx Tacrolimus II vs the PRO - TRAC II FK 506 ELISA assays. *Clin Chem* 1999; 45: 1868 - 70.
13. Brunet M, Pou L, Manzanares C, Palacios G, Corbella J. Multicenter comparison of first and second - generation IMx Tacrolimus microparticle enzyme immunoassays in liver and kidney transplantation. *Ther Drug Monit* 1998; 20: 676 - 9.
14. Cogill JL, Taylor PJ, Westley IS, Morris RG, Lynch SV, Johnson AG. Evaluation of the tacrolimus II microparticle enzyme immunoassay (MEIA) in liver and renal transplant recipients. *Clin Chem* 1998; 44: 1942 - 6.
15. Cannon RD, Wong SHY, Hariharan S, Adams MB, Johnson CP, Roza AM, et al. Clinical efficacy of the Abbott Tacrolimus II Assay for the IMx. *Ann Clin Lab Sci* 1999; 29: 299 - 302.
16. Harris EK. Proposed goals for analytical precision and accuracy in single - point diagnostic testing. Theoretical basis and comparison with data from College of American Pathologists Proficiency Surveys. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 416 - 20.
17. Knoll E, Hafner F, Dettmer K, Wissner H. The determination of calcium, urea and uric acid using the Kodak Ektachem multilayer technology: An evaluation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1982; 20: 491 - 9.
18. Tredger JM, Gilkes CD, Gonde CE. Therapeutic monitoring of tacrolimus (FK 506) with first and second generation microparticle enzyme immunoassay: Performance and results in four patient population. *Ther Drug Monit* 1998; 20: 266 - 75.
19. Spencer CA. Thyroid profiling for the 1990 s; free T4 estimate or sensitive TSH measurement. *J Clin Immunoassay* 1989; 12: 82 - 9.