

# Protocolo para el estudio de las interferencias analíticas *in vitro* por sistemas binarios de medicamentos

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular  
Comité Científico.  
Comisión Efectos de los medicamentos en química clínica<sup>a</sup>

Documento C, Fase 3, Versión 2

## 1. Introducción

El objetivo de este documento es estandarizar el estudio experimental de las posibles interferencias analíticas producidas por la asociación de dos medicamentos (principios activos o sus metabolitos). Deberán estudiarse aquellos que pueden ser administrados conjuntamente y se determinará si su asociación produce una interferencia distinta de la que producen individualmente.

Es condición previa disponer de un estudio de cada uno de los medicamentos que se administran. Para la correcta aplicación de este protocolo, deberá revisarse previamente el documento B: «Protocolo para la valoración *in vitro* de las interferencias por medicamentos» (1) en sus apartados 2 y 3, referentes a la información del medicamento y de las magnitudes biológicas a estudiar.

## 2. Protocolo para el estudio de la interferencia analítica

Los estudios se realizarán en dos fases. En primer lugar, se realizará la detección de una eventual interferencia y posteriormente se cuantificará (2).

### 2.1. Disolución del medicamento o de su metabolito principal

Si el medicamento o metabolito principal es soluble en agua, se utilizará agua grado reactivo o una disolución de cloruro de sodio 154 mmol/L. En determinados casos, será preciso disolver el producto en medio proteico (albúmina humana o bovina).

Si la sustancia a estudiar es insoluble en agua pero soluble en un disolvente miscible en agua (etanol, acetona, dimetilsulfóxido, etc.) se preparará una disolución acuosa conteniendo la cantidad mínima de disolvente orgánico capaz de disolver la sustancia. Por medio de un «disolvente-testigo» se garantizará que el disolvente no provoca desnaturalización de la proteína o una interferencia analítica.

### 2.2. Especímenes biológicos a estudiar

Se utilizará plasma o suero, líquido o liofilizado, sangre, orina u otros líquidos biológicos. Estos especímenes deberán proceder de personas supuestamente sanas, que no tomen ningún medicamento.

En ciertos casos, no se recomienda la utilización de especímenes procedentes de animales (valoración de proteínas específicas, valoración de actividades enzimáticas, inmunoenálisis, etc.). Tampoco se recomienda el uso de controles comerciales, porque a menudo tienen una composición arbitraria y pueden contener aditivos que causen interferencias (3).

### 2.3. Procedimiento analítico

Deberá describirse detalladamente. Es absolutamente necesario proporcionar el modo operativo completo y la preparación de los reactivos, de forma que los resultados puedan compararse con los de otros laboratorios.

### 2.4. Protocolo para detectar la interferencia

#### 2.4.1. Concentración del medicamento

Para cada uno de los dos medicamentos (principio activo o metabolito principal) A y B, se preparará una disolución primaria individual, según se describe en los apartados siguientes.

##### 2.4.1.1. Plasma, suero o sangre

Para las sustancias cuya concentración plasmática es conocida, se utilizará una concentración equivalente a veinte veces la concentración plasmática del medicamento o su metabolito principal alcanzado durante el tratamiento o una intoxicación.

Para las sustancias cuya concentración plasmática se desconoce, se utilizará una cantidad equivalente a veinte veces la dosis terapéutica prescrita en veinticuatro horas, disuelta en cinco litros del disolvente adecuado si el producto permanece en el sistema vascular o quince litros si el producto difunde al sistema extravascular.

##### 2.4.1.2. Orina

Si se conoce la forma de eliminación urinaria del medicamento, se utilizará una concentración equivalente a veinte veces la concentración de sustancia eliminada en veinticuatro horas. Si se desconoce la forma de eliminación urinaria del medicamento, el estudio será muy difícil o inviable.

#### 2.4.2. Preparación de los especímenes

##### 2.4.2.1. Plasma o suero líquido

Se añadirá un volumen de la solución primaria del medicamento a nueve volúmenes de la mezcla de plasma o sueros descrita en el apartado 2.2.

Se preparará una muestra testigo, añadiendo un volumen del disolvente empleado en la disolución primaria a nueve volúmenes de la misma mezcla de plasmas o sueros.

La proporción 1/10 no podrá variarse en ningún caso con el

<sup>a</sup> F Antoja, MT Casamajó, JL Castaño, P Chueca, M Doménech, MD Fernández, R Galimany (presidente), JM Gelabert, R Güell, J Herrera, I Rojo.

fin de que no se altere la concentración de los constituyentes.

#### 2.4.2.2. Plasma o suero liofilizado

Se puede operar en las mismas condiciones anteriores. Se añadirá un volumen de solución primaria (problema) o de disolvente (testigo) a nueve volúmenes de liofilizado reconstituido siguiendo las normas habituales.

#### 2.4.2.3. Sangre

Se procederá de la misma forma que para los especímenes líquidos, pero garantizando que la disolución primaria sea isotónica y no provoque hemólisis.

#### 2.4.2.4. Orina

Se preparará una disolución primaria del producto y se añadirá a una mezcla de orinas.

Es posible disolver directamente el medicamento o su metabolito principal en la orina.

En ambos casos, se mantendrá la proporción 1/10.

#### 2.4.3. Valoración e interpretación de los resultados

Se mezclarán, tomando partes iguales, el espécimen que contiene el medicamento A y el que contiene el medicamento B. Esta mezcla se denomina «problema» (con medicamento) y los del «testigo». Se procesarán quince muestras de cada espécimen dentro de una misma serie analítica y en unas condiciones tales que se minimicen los efectos de la contaminación debida al instrumento.

Para cada uno de los dos grupos de resultados, se calculará la media, la desviación típica, la variancia y el coeficiente de variación. Para todos los constituyentes, los resultados obtenidos deberán estar comprendidos dentro de los límites de la imprecisión del procedimiento analítico utilizado. Se realizará la prueba *t* de Student de comparación de medias observadas en grupos de datos independientes (muestras pequeñas). Para ello, deberán cumplirse las siguientes condiciones: gaussianidad (prueba de normalidad de D'Agostino) y homogeneidad de variancias (prueba *F* de Snedecor). Si no se cumplen estas condiciones de aplicación, se realizará una prueba no paramétrica (*U* de Mann-Whitney).

Si las medias no son significativamente diferentes para  $P < 0,01$ , se considera que la asociación de medicamentos A y B no es interferente y el estudio se dará por concluido.

En caso contrario, se verificará si se cumple el criterio de significación clínica de la interferencia (4):

$$(L_s - L_i) / 12 \leq | \bar{x}_p - \bar{x}_t |$$

$L_s$ : límite superior del intervalo de referencia

$L_i$ : límite inferior del intervalo de referencia

$\bar{x}_p$ : media del grupo problema

$\bar{x}_t$ : media del grupo testigo

En tal caso, la interferencia se considera clínicamente significativa y el estudio proseguirá según el protocolo que se describe a continuación, con el que se podrá cuantificar la interferencia.

### 2.5. Protocolo para cuantificar la interferencia

#### 2.5.1. Preparación de los especímenes.

La adición de las disoluciones de medicamentos a la mezcla de sueros se efectúa de la siguiente manera:

—A seis tubos que contienen 9,0 volúmenes de la mezcla de sueros se le añaden 0,5 volúmenes de la disolución primaria del medicamento A; a continuación se añaden 0,5 volúmenes de las distintas disoluciones de concentraciones decrecientes del medicamento B, desde la disolución primaria hasta la disolución testigo (sólo disolvente); seis en total, teniendo en cuenta que dos de ellas deben estar incluidas dentro del intervalo terapéutico.

—A seis tubos que contienen 9,0 volúmenes de la mezcla de sueros, se les añade 0,5 volúmenes de la disolución primaria del medicamento B; a continuación se añaden 0,5 volúmenes de las distintas disoluciones decrecientes del medicamento A, desde la disolución primaria hasta la disolución testigo (sólo disolvente); seis en total, teniendo en cuenta que dos de ellos deben estar incluidos dentro del intervalo terapéutico.

—Para ambas series se preparará un testigo común con 9,0 volúmenes de la mezcla de sueros, 0,5 volúmenes del disolvente del medicamento A y 0,5 volúmenes del disolvente del medicamento B.

#### 2.5.2. Procesamiento de los especímenes.

De cada espécimen preparado anteriormente (disolución de A, más disolución de B, más mezcla de sueros), se obtendrán cinco datos para cada procedimiento analítico cuyo resultado está interferido y para cada una de las concentraciones de medicamento. Con los datos obtenidos se aplica el tratamiento estadístico.

#### 2.5.3. Tratamiento estadístico de los datos.

De cada grupo de cinco datos obtenidos se calculará la media y el coeficiente de variación; los resultados hallados deberán estar comprendidos dentro de los límites de imprecisión del procedimiento analítico utilizado.

Al grupo testigo y a los grupos problema se aplica la prueba de comparación no paramétrica de Mann-Whitney.

Si existe interferencia, se expresa cuantitativamente mediante la fórmula:

$$100 \times (C_i - C_o) / C_o$$

donde  $C_i$  es la concentración del constituyente en el espécimen problema y  $C_o$  es la concentración del constituyente en el espécimen testigo.

Finalmente se aplica el criterio de significación clínica, para las interferencias estadísticamente significativas.

Correspondencia: Comisión Efectos de los medicamentos en química clínica  
Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular  
C/ Llançà 51, bajos 3º, 08015 Barcelona.

#### Bibliografía

1. Comisión Efectos de los medicamentos en química clínica. SEQC. Protocolo para la valoración *in vitro* de las interferencias por medicamentos. *Quim Clin* 1992; 11: 449-452.
2. Camacho AT. Estudio *in vitro* de las posibles interferencias en Bioquímica Clínica producidas por medicamentos de uso más frecuente en el complejo hospitalario Xeral-Cies sobre 18 parámetros bioquímicos en un sistema automatizado. Tesis Doctoral. 1990.
3. Vinet B, Letellier G. The *in vitro* effect of drugs on biochemical parameters determined by a SMAC system. *Clin Biochem* 1977; 10: 47-51.
4. Stamm D. How the reliability of Clinical Laboratory Analyses affects the medical assessment of results: a new model and its uses. En: Lin HJ, Swaminathan R, Robertshaw AM. Fourth Asian-Pacific Congress of Clinical Biochemistry. Proceedings. Hong Kong: Gardiner-Caldwell Communications, 1990: 410-416.