

Comparación de la determinación de la concentración de teofilina en los analizadores TDX[®]-Abbott y Kodak Ektachem XR-700

C. Núñez Martín, A. Caballero Carmona, A. Benítez Estévez, E. Fernández Rodríguez

Resumen

Se ha realizado un estudio comparativo entre dos de los métodos utilizados actualmente para la determinación de las concentraciones de teofilina en suero: el inmunoanálisis de fluorescencia polarizada (FPIA) adaptado al analizador TDX[®]-Abbott (Abbott Laboratories, N Chicago, IL, EEUU) y el método basado en la inhibición de la fosfatasa alcalina de hígado de carnero (EC 3.1.3.1) por la teofilina adaptado al analizador Kodak Ektachem XR-700 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EEUU).

Los resultados obtenidos muestran unos coeficientes de variación (CV) intraserales de 1,78 % (Abbott-TDX[®]) y 3,60 % (Ektachem XR-700) e interserales de 4,09 % (Abbott-TDX[®]) y 4,53 % (Ektachem XR-700). La correlación entre ambos métodos viene expresada por la ecuación $TDX^{\circ} = 0,4187 + 0,9687 \text{ Ektachem XR-700}$, $r = 0,9877$ para una $P < 0,05$. Se concluye que ambos métodos presentan características analíticas (linealidad, recuperación e interferencias), similares.

Introducción

La teofilina (1,3-dimetilxantina) es, en la actualidad, uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de pacientes afectos de asma bronquial y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (1).

Tanto por el estrecho margen terapéutico de este fármaco como por sus propiedades farmacocinéticas dosis-dependientes y las grandes variaciones interindividuales en su metabolismo (2), es necesaria la monitorización de sus concentraciones plasmáticas para mantener una concentración óptima en sangre y conseguir su máximo efecto farmacológico (3). Por estas razones, es importante evaluar los métodos disponibles para su determinación. Se han descrito numerosos métodos, entre los que destacan la espectrometría ultravioleta, cromatografía líquida de alta resolución, radioinmunoanálisis, enzoinmunoanálisis e inmunoanálisis de fluorescencia polarizada (2,4).

El propósito de este trabajo es comparar las características analíticas de dos de los métodos más utilizados actualmente para la monitorización de las concentraciones plasmáticas de teofilina: el inmunoanálisis de fluorescencia polarizada (5,6) adaptado al analizador TDX[®]-Abbott (Abbott TDX[®] Theophylline II assay) y el método basado en la inhibición de la fosfatasa alcalina de hígado de carnero (EC 3.1.3.1) por la teofilina adaptado al analizador Kodak Ektachem XR-700 (7).

Summary

We have compared two methods for theophylline serum concentrations assessment: the fluorescence polarization immunoassay (FPIA) adapted to TDX[®]-Abbott analyzer (Abbott Laboratories, N Chicago, IL USA) and the method based on the uncompetitive inhibition of the beef liver alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) by theophylline, adapted to Kodak Ektachem XR-700 analyzer. (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). The results obtained show intraassay CV values of 1,78 % (Abbott-TDX[®]) and 3,60 % (Ektachem XR-700) and interassay CV values of 4,09 % (Abbott-TDX[®]) and 4,53 % (Ektachem XR-700). Correlation between both methods gave the equation of regression $TDX^{\circ} = 0,4187 + 0,9687 \text{ Ektachem XR-700}$, $r = 0,9877$ for $P < 0,05$. We conclude that a great resemblance with the rest of aspects studied (linearity, recovery and interferences) between both methods exist.

Material y métodos

Procedimientos analíticos

Las determinaciones en cada método se realizaron siguiendo las recomendaciones de las respectivas casas comerciales. Para llevar a cabo la evaluación se ha recurrido al protocolo del NCCLS (8) y a los criterios establecidos por la Comisión de Instrumentación de la SEQC (9).

Imprecisión

La evaluación de la imprecisión de cada método se ha realizado empleando material de control en concentraciones diferentes, proporcionados por cada uno de los equipos comerciales. Para el analizador TDX[®]-Abbott se usaron viales de liofilizados de teofilina con concentraciones de 66 y 143 $\mu\text{mol/L}$ (TDX[®] Theophylline II Control # Ref. 55219Q100) y para el Kodak Ektachem XR-700 se utilizaron viales liofilizados de teofilina con concentraciones de 74,37 y 133,75 $\mu\text{mol/L}$ (Kodak Control Assay Level I, II; # Ref. G0911001 y H0921002).

Para obtener la imprecisión intraserial se analizó cada material de control en 20 determinaciones sucesivas y se calculó el coeficiente de variación. Para hallar la imprecisión interserial los materiales de control se congelaron en alícuotas a -20°C , y se analizaron diariamente durante 20 días consecutivos, calculándose el coeficiente de variación.

Linealidad

Se ha estudiado calculando el intervalo de concentraciones de teofilina en el cual el método es aplicable sin modificación (10). El intervalo de linealidad aportado por las casas comerciales está comprendido entre 0 y 222 $\mu\text{mol/L}$.

Hospital «Virgen de la Salud». Servicio de bioquímica.
Avenida de Barber s/n. Toledo 45004
Recibido: 8-5-92
Aceptado: 16-10-92

A partir de un estándar de teofilina de concentración 222 $\mu\text{mol/L}$ se realizaron cinco diluciones no seriadas en solución acuosa (1:2) obteniéndose cinco concentraciones diferentes de teofilina espaciadas en todo el intervalo de interés clínico. Los estándares acuosos así preparados fueron añadidos a una mezcla de sueros exentos de teofilina y se procedió al análisis por triplicado de cada espécimen. La porción recta de la curva obtenida al representar la correlación entre los valores teóricos y los experimentales obtenidos, representa la parte lineal del método.

Recuperación

La evaluación de la inexactitud en cada método se ha realizado añadiendo concentraciones conocidas (de 6,5 $\mu\text{mol/L}$ a 111 $\mu\text{mol/L}$) de teofilina anhidra (Sigma Chemical Co.) a un suero libre de teofilina y determinando por triplicado la concentración de teofilina en estos especímenes. La recuperación se calculó como la fracción de la cantidad de teofilina añadida.

Interferencias

En ambos métodos se ha estudiado las posibles interferencias que en la determinación de teofilina pueden tener ciertos componentes que pueden estar presentes en el suero en elevadas concentraciones; hemoglobina, bilirrubina y lípidos. Para ello, se siguió el protocolo establecido por el NCCLS (11). Para cada componente a estudiar se ha preparado una solución concentrada en suero (513 $\mu\text{mol/L}$ para bilirrubina, 6,206 mmol/L para hemoglobina y 0,113 mmol/L para lípidos). Usando el mismo suero se preparó una matriz acuosa libre de componentes interferentes y de concentración conocida de teofilina (suero diluyente). A continuación se realizaron diluciones en serie de las soluciones concentradas de componentes interferentes en suero, por adición a alícuotas del suero diluyente. Cada espécimen así obtenido fue analizado por triplicado. La evaluación de las interferencias se realizó comparando las concentraciones medias de teofilina obtenidas con y sin componente interferente añadido.

Correlación entre métodos

El análisis de regresión se efectuó sobre los resultados del análisis de un total de 84 sueros de pacientes del hospital en tratamiento con teofilina (THEODUR®). Los especímenes se extrajeron antes de ingerir una nueva dosis (situación basal), en ayunas, mediante venopunción con tubos de vacío Venoject® y, una vez retraído el coágulo, se centrifugó durante 15 minutos a 1300 g y se procedió a su análisis por ambos métodos.

Comparación de métodos

El análisis estadístico se ha realizado sobre la concentración de teofilina de 84 especímenes, utilizando para ello un or-

denador personal IBM modelo 30, y el paquete estadístico Sigma [(c) Horus Hardware 1987] y siguiendo las recomendaciones de la SEQC sobre técnicas estadísticas en la comparación de métodos (12). El análisis de regresión se efectuó aplicando la prueba de Passing y Bablok (13). La comparación de valores medios entre ambos métodos se realizó utilizando la prueba *t* de Student para datos apareados.

Resultados y discusión

Los resultados del estudio de imprecisión inter e intraserial se reflejan en la tabla I. Se han obtenido coeficientes de variación comprendidos entre 1,44% y 4,09% para el analizador TDX® -Abbott y entre 2,40% y 4,53% en el analizador Kodak Ektachem XR-700.

En la figura 1 se representa la curva de calibración, que es lineal hasta concentraciones de 222 $\mu\text{mol/L}$ en el analizador TDX® -Abbott y de 166,5 $\mu\text{mol/L}$ en el analizador Kodak Ektachem XR-700.

En la tabla II aparecen los porcentajes de recuperación de ambos métodos para diferentes concentraciones de teofilina. La recuperación media para un intervalo de concentraciones de 6,9 a 11 $\mu\text{mol/L}$ es de 98,8% para el analizador Kodak Ektachem XR-700 y de 106% para el analizador TDX® -Abbott.

La figura 2 muestra la recta de regresión obtenida a partir de los resultados de las determinaciones realizadas por ambos métodos.

El valor de la intersección con el eje Y (TDX®) es de 0,4187 y el de la pendiente 0,9687. La desviación estándar de los residuales ($s_{y/x}$) es de 6,563. La variabilidad de la intersección y pendiente se estimó mediante sus respectivas desviaciones estándar, estableciéndose el intervalo de confianza con un nivel del 95%. El intervalo de confianza para la pendiente es de 0,9318-1,0000 y el de la intersección es de 0,0000-0,7954.

Los interferogramas correspondientes no están representados, pues en ninguno de los métodos encontramos interferencias a altas concentraciones de bilirrubina (513 $\mu\text{mol/L}$), hemoglobina (6,206 mmol/L) y lípidos (0,113 mmol/L).

Actualmente el inmunoanálisis de fluorescencia polarizada aplicado al laboratorio clínico es una técnica que goza de gran aceptación y es ampliamente utilizada. Entre las ventajas de esta técnica cabe destacar la rapidez de la determinación (aproximadamente 12 minutos), no precisa calibración diaria y los reactivos no requieren ninguna reconstitución (4,5,6,14).

Por otra parte, el método de análisis en química seca mediante «slides» provee una alternativa práctica a la determinación de teofilina por inmunoanálisis de fluorescencia polarizada, especialmente cuando en el laboratorio se dis-

Tabla I. Estudio de imprecisión

TDX® -Abbott			Ektachem XR-700		
Intraserial (n = 20)			Intraserial		
\bar{x} = 66,2 $\mu\text{mol/L}$	s = 1,11	CV = 1,78%	\bar{x} = 75,2 $\mu\text{mol/L}$	s = 2,71	CV = 3,60%
\bar{x} = 137,5 $\mu\text{mol/L}$	s = 1,92	CV = 1,44%	\bar{x} = 123,8 $\mu\text{mol/L}$	s = 2,94	CV = 2,40%
Interserial (n = 20)			Interserial		
\bar{x} = 65,5 $\mu\text{mol/L}$	s = 2,66	CV = 4,09%	\bar{x} = 73,7 $\mu\text{mol/L}$	s = 3,27	CV = 4,49%
\bar{x} = 140,6 $\mu\text{mol/L}$	s = 3,99	CV = 2,84%	\bar{x} = 120,6 $\mu\text{mol/L}$	s = 5,44	CV = 4,53%

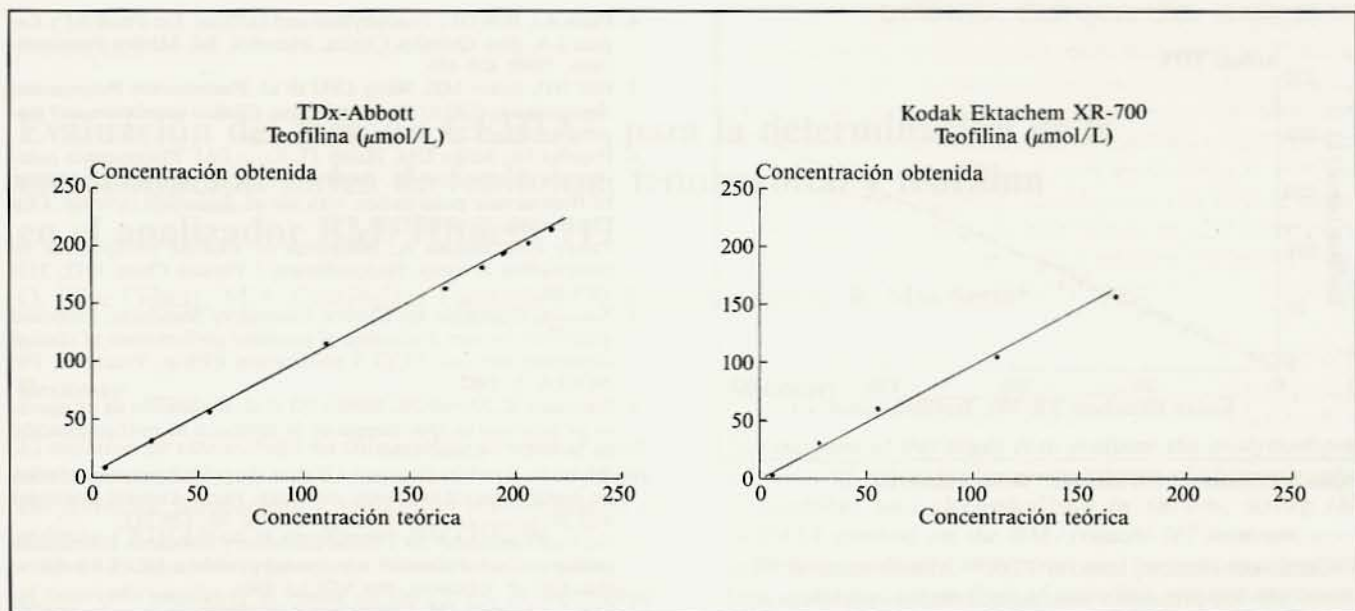


Figura 1. Estudio de linealidad

pone de un analizador Kodak Ektachem destinado a las determinaciones urgentes, ya que en este caso el coste por determinación sería un factor a tener en cuenta (7,15). Ambos métodos requieren un volumen del suero muy pequeño para llevar a cabo la reacción (10 µL en el Kodak Ektachem XR-700 y 20 µL en el TDX® -Abbott).

Aunque los coeficientes de variación obtenidos con el analizador TDX® -Abbott son ligeramente inferiores a los obtenidos en el analizador Kodak Ektachem XR-700, la imprecisión es similar en ambos, siendo además éstos valores menores que los observados en otros métodos de análisis de teofilina (14,16). Los coeficientes de variación tanto intra como interserial son, para ambos analizadores, menores del 5% para todas las concentraciones estudiadas. Por tanto, ambas técnicas pueden ser adecuadas para el cálculo farmacocinético de la dosificación individual de los pacientes (3).

Asimismo, el estudio de la inexactitud por medio de la fracción recuperada al añadir teofilina pura a un espécimen, ofrece unos porcentajes de recuperación próximos al 100% en ambos casos, y no existen diferencias significativas entre los dos analizadores.

El analizador TDX-Abbott mantiene una respuesta lineal entre los valores de concentración descritos por el fabricante (0 a 222 µmol/L), mientras que el analizador Kodak-Ektachem (5,6 a 222 µmol/L) sólo la mantiene hasta una concentración de 166,5 µmol/L, valor inferior al

reseñado por la casa comercial. Ambos analizadores permiten la determinación de teofilina en concentraciones comprendidas en el intervalo terapéutico de interés (55,5-111 µmol/L).

El estudio de interferencias revela que no aparecen interferencias significativas con concentraciones elevadas de hemoglobina, bilirrubina y lípidos en ninguno de los dos métodos.

Por otra parte, la comparación de resultados entre ambos analizadores pone de manifiesto que las diferencias entre valores medios obtenidos no es significativa.

El análisis de regresión efectuado proporciona una estimación para la pendiente de 0,987, conteniendo el intervalo de confianza (95%) el valor de 1,000. Por otra parte, la estimación de la intersección con el eje de ordenadas es de 0,4187 y el intervalo de confianza (95%) contiene el valor de 0,000. Estos datos permiten rechazar la existencia de error sistemático en los resultados obtenidos por ambos métodos.

El error aleatorio entre los métodos está indicado por el valor de la desviación estándar de los residuales ($s_{y/x}$) que indica la dispersión de los puntos alrededor de la recta de regresión.

Por último, destacar que existe un elevado grado de correlación estadísticamente significativo ($P < 0,05$) entre los resultados de ambas técnicas, presentando un coeficiente de correlación (r) de 0,9877.

Tabla II. Recuperación

	Teofilina añadida (µmol/L)	Teofilina recuperada (µmol/L)	% Recuperación
TDX® -Abbott	111	114,6	103,2
	55,5	57,7	103,9
	27,8	28,1	101,3
	13,9	15,4	111,3
	6,9	7,8	112,5
Ektachem XR-700	111	114,1	102,8
	55,5	60,1	108,4
	27,8	28,5	102,7
	13,9	12,6	90,8
	6,9	6,2	89,3

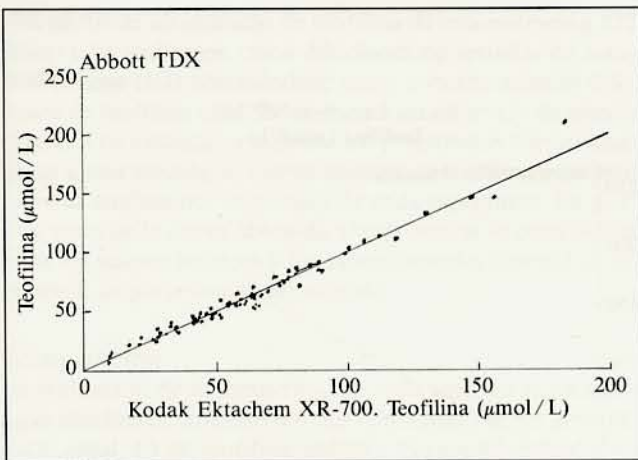


Figura 2. Correlación TDX/Ektachem. Teofilina ($\mu\text{mol/L}$)

Como conclusión, tanto el TDX[®] -Abbott como el Ektachem XR-700 presentan unas características analíticas similares en la determinación de las concentraciones séricas de teofilina, no existiendo diferencias en los resultados dentro del intervalo terapéutico.

Bibliografía

- Hendeles L, Weinberger N. Theophylline: A state of the art review. *Pharmacotherapy* 1983; 3: 2-44.
- Mouine J, Richard L, Ribon B, Hersant J, Sermini H, Houin G. Methods of theophylline assay and therapeutic monitoring of this drug. *Ann Biol Clin* 1990; 48: 287-293.
- Plaine B, Lapulus P, Lemoigne F, Bugnes B. Théophylline: paramètre pharmacocinetique et détermination d'une posologie individuelle efficace. *Bull Europ Physiopath Resp.* 1981; 17: 133.
- Pesce AJ, Bills GL. Theophylline and caffeine. En: Pesce AJ y Kaplan LA. dirs. *Química Clínica. Métodos.* Ed. Médica Panamericana, 1990; 458-466.
- Hill HD, Jolley ME, Wang CHJ et al. Fluorescence Polarization immunoassay (FPIA) for theophylline. Clinical correlation and reagent stability. *Clin Chem* 1981.
- Popelka SR, Miller DM, Holen JT, Kelso DM. Fluorescence polarization immunoassay II. Analyzer for rapid, precise measurement of fluorescence polarization with use of disposable cuvettes. *Clin Chem* 1981; 27: 1198-1201.
- Pawaz EN, Tejirian A. Inhibition of alkaline phosphatase by theophylline in vitro. *Hoppe-Seylers 7 Physiol Chem* 1972; 353: 1179-83.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Proposed guidelines for user evaluation of precision performance of clinical chemistry devices. NCCLS publication EPS-p. Villanova, Pa: NCCLS, 1, 1982.
- Galimany R, Alonso JR, Barrio JM et al. Evaluación de un aparato de laboratorio. Documento de la comisión de instrumentación de la SEQC. Junio, 1980.
- Buther R, Borth R, Boutwell J H et al. Approved recommendation on quality control in clinical chemistry. Part I. General principles and Terminology. *Clin Chim Acta* 1979; 98: 129-143.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Interference testing in clinical chemistry; proposed guideline. NCCLS publication EP7-P. Villanova, Pa: NCCLS 1986.
- Frey E, Queraltó JM. Comparación estadística de métodos analíticos. *Educación continuada en Química Clínica* 1988; 1: 69-75.
- Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 709-720.
- Jolley ME, Stroupe SD, Schwenzer KS et al. Fluorescence Polarization immunoassay. An automated system for therapeutic drug determination. *Clin Chem* 1981; 27/9: 1575-1579.
- Bissell MG, Hussain S, Sanghavi P, Ward E, Shaw ST. An user evaluation of four Kodak Ektachem slide assays. *Clin Chem* 1988; 34: 964-965.
- Frontera MB, Lluch M, Mulet JM, Servera M. Comparación del método Acculevel para la determinación de teofilina con el enzoinmunoensayo homogéneo (EMIT) y la fluorescencia polarizada (TDX). *Análisis Clínicos* 1990; XV: 62-65.