

DOCUMENTOS

Protocolo para la valoración *in vitro* de las interferencias por medicamentos

Comite científico. Comisión Efectos de los Medicamentos en Química Clínica
Sociedad Española de Química Clínica

Documento B, Fase 2, Versión 4

R. Andrés, F. Antoja, M.T. Casamajó, J.L. Castaño, P. Chueca, M. Doménech, M.D. Fernández,
R. Galimany (presidente), J.M. Gelabert, R. Güell, J. Herrera, F. Lema, I. Rojo

Introducción

El efecto de los medicamentos sobre las magnitudes biológicas puede considerarse desde dos aspectos distintos (documento 1):

- un aspecto analítico (interferencia analítica).
- un aspecto biológico (efecto biológico).

Es evidente que para valorar los efectos biológicos es indispensable conocer las interferencias analíticas.

La adición al espécimen de otras sustancias (anticoagulantes, conservantes, antiglucofíticos, etc.) puede ocasionar interferencias analíticas que deben estudiarse siguiendo el mismo protocolo.

En el organismo, un medicamento puede transformarse en varios metabolitos; al no poder estudiar las interferencias analíticas de todos ellos, nos limitaremos al estudio del medicamento y/o su metabolito principal.

La valoración de las interferencias analíticas de un medicamento debe efectuarse:

- previamente a los ensayos clínicos del medicamento.
- en el estudio de un método para la medición de una magnitud biológica.

2. Estudio de un medicamento

El estudio *in vitro* de las interferencias analíticas de un medicamento es indispensable antes de iniciar un estudio del efecto biológico de este medicamento, con el fin de:

- Garantizar la validez de estos resultados.
- Poder estudiar con toda garantía las acciones farmacológicas o tóxicas.
- Evitar atribuir al medicamento un efecto que no tiene.

2.1. Producto(s) a estudiar

2.1.1. Principio activo

Se trata de la materia prima utilizada por el fabricante inscrita en una farmacopea; en otros casos, se trata del metabolito principal. De todas formas, el producto que se estudiará será la forma metabolizada que se encuentre en los líquidos biológicos, según el tipo de espécimen que se desee estudiar.

2.1.2. Forma farmacéutica

Deberá tenerse en cuenta la presencia de componentes susceptibles de interferir sobre el medio reactivo:

- excipientes y aditivos (lactosa, almidón, etc.).
- colorantes, aromatizantes, etc.
- óxidos o sales metálicas (óxido de titanio, de cinc, etc.).
- conservantes (fenol, parahidroxibenzoato de metilo, de propilo, etc.).

2.1.3. Estudio del producto: características físico-químicas y farmacocinéticas

Es indispensable disponer de toda la documentación que pueda facilitar el fabricante para conocer:

— La fórmula del producto y sus principales propiedades:

- Propiedades físicas: forma (cristalina, amorfa), solubilidad, pH en solución, etc.
- Propiedades químicas: grupos funcionales y su reactividad en la molécula.
- Estabilidad en estado sólido y especialmente en disolución (eventual aparición de productos de degradación).
- El metabolismo puede modificar la reactividad química y, por consiguiente, el tipo y/o la intensidad de la interferencia. Es necesario conocer la farmacocinética y el metabolismo:
 - Metabolitos que se forman.
 - Concentraciones sanguíneas que el producto y/o el metabolito principal pueden alcanzar tras su absorción.
 - Concentraciones sanguíneas del producto y/o el metabolito principal después de alcanzada la meseta de equilibrio.
 - Porcentajes de eliminación urinaria del producto y/o el metabolito principal.
 - Porcentajes de fijación a las proteínas plasmáticas y naturaleza de esta interacción.

2.2. Métodos analíticos a estudiar en función del medicamento

La selección de los métodos analíticos puede efectuarse siguiendo diferentes criterios:

- Frecuencia de solicitud.
- Detección de una toxicidad eventual.
- Evidenciar la acción farmacológica propia.
- Experimentación tóxico-farmacológica animal.
- Mecanismos de reacción que pueden *a priori* alterarse por la estructura y/o propiedades físico-químicas del principio activo y/o de su metabolito principal.

El estudio de las interferencias deberá realizarse dentro del intervalo de referencia de la magnitud biológica, aunque para las magnitudes biológicas cuyas concentraciones fisiológicas son muy pequeñas o tienen elevada variabilidad el estudio deberá repetirse dentro de los valores correspondientes a los límites de decisión.

3. Estudio de un método para la valoración de una magnitud biológica

3.1. Medicamentos a estudiar

Se estudiará el mayor número posible de medicamentos para cada magnitud biológica. Su elección podría basarse en las siguientes consideraciones:

- Los utilizados más frecuentemente.
- Los prescritos en las enfermedades controladas por esta prueba de laboratorio.
- Los que por su naturaleza química son susceptibles de interferir esta prueba de laboratorio.

3.2. Métodos analíticos a estudiar para una magnitud biológica dada

Deberían estudiarse todos los métodos analíticos utilizados. Si no es posible, se seleccionarán:

- Los de referencia o recomendados.
- Los más utilizados.
- Si existen varios métodos basados sobre principios diferentes, por lo menos uno de cada tipo.
- Los más utilizados en el estudio farmacológico o clínico.

4. Protocolo para el estudio de una interferencia analítica

Los estudios se realizarán en dos fases, según metodologías complementarias. En primer lugar, se realizará la detección de una eventual interferencia y, en un segundo estudio, se cuantificará esta interferencia.

4.1. Disolución del medicamento y/o su metabolito principal

— Si el medicamento y/o su metabolito principal es soluble en agua, se utilizará agua bidestilada 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 es 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-control» se garantizará que el disolvente no provoque desnaturalización de la proteína o una alteración analítica.

— Si la sustancia a estudiar es insoluble en agua o en cualquier disolvente miscible en agua, el estudio será muy difícil o imposible.

4.2. Especímenes biológicos a estudiar

Se utilizará plasma o suero líquido humano, plasma o suero liofilizado, humano o animal, sangre, orina u otros líquidos biológicos.

Estos especímenes deberán proceder de personas o ani-

males presuntamente sanos, que no tomen ningún medicamento.

4.3. Métodos analíticos

Deberán describirse detalladamente. Es absolutamente necesario proporcionar el modo operatorio completo y la preparación de los reactivos, de forma que los resultados puedan compararse con los de otro laboratorio.

4.4. Metodología para detectar una interferencia

4.4.1. Concentración del medicamento

Se utilizará una sola dosis elevada del medicamento y/o de su metabolito principal.

4.4.1.1. Plasma, suero o sangre

Para las sustancias cuya concentración plasmática es conocida, se utilizará una concentración equivalente a diez veces la concentración plasmática del medicamento y/o su metabolito principal, alcanzado durante un tratamiento de una intoxicación.

Para las sustancias cuya concentración plasmática se desconoce, se utilizará una concentración equivalente a diez veces la dosis terapéutica prescrita en 24 horas, diluida en 5 ó 15 litros de diluyente adecuado, según que el producto permanezca en el sistema vascular o difunda al sistema extravascular.

4.4.1.2. Orina

Si se conoce la eliminación urinaria del medicamento, se utilizará una concentración equivalente a diez veces la concentración máxima de sustancia eliminada en 24 horas.

Si se desconoce la eliminación urinaria, se utilizará una concentración equivalente a diez veces la dosis terapéutica máxima, diluida hasta 2 litros en el diluyente adecuado.

4.4.2. Preparación de los especímenes

4.4.2.1. Plasma o suero líquido humano

— Se preparará una disolución primaria del medicamento cuya concentración será diez veces superior a la concentración deseada (4.4.1.1.). Se añadirá 1 mL de esta solución a 9 mL de una mezcla de plasma o de suero.

— Se preparará una muestra control del disolvente añadiendo 1 mL del disolvente empleado a 9 mL de la misma mezcla de plasma o suero.

Nota: la proporción 1 / 10 no podrá variarse en ningún caso, con el fin de que no se alteren las valoraciones debido a la baja concentración de sus constituyentes.

4.4.2.2. Plasma o suero liofilizado, humano o animal

— Se puede operar en las mismas condiciones anteriores (4.4.2.1.). Entonces se añadirá 1 mL de solución primaria (problema) o de disolvente (control) a 9 mL de liofilizado reconstituido según las indicaciones del fabricante.

— También es posible disolver el medicamento y/o su metabolito principal en el disolvente destinado a la reconstitución de las muestras liofilizadas. En este caso, se preparará una disolución del medicamento y/o de su me-

tabolito principal a la concentración deseada en el disolvente recomendado por el fabricante. Además, se preparará una muestra control del disolvente, reconstituida con la ayuda de un disolvente puro.

Nota: los sueros animales no podrán utilizarse en ciertos casos: valoración de proteínas específicas, valoración de actividades enzimáticas, radioinmunoanálisis, etc.

4.4.2.3. Sangre

Se operará de la misma forma que para los especímenes líquidos (4.4.2.1.), pero garantizando que la disolución primaria sea isotónica y no provoque hemólisis.

4.4.2.4. Orina

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

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

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

4.4.2.5. Otros líquidos biológicos.

Se aplicará una metodología similar a la expuesta anteriormente.

4.4.3. Valoración e interpretación de los resultados

Se utilizará una sola dosis elevada del medicamento y/o de su metabolito principal.

Se valorarán los constituyentes del espécimen problema (con medicamento) y del espécimen control (sin medicamento), preparados según el protocolo descrito, procesando quince veces cada espécimen dentro de una misma serie analítica y siguiendo una secuencia aleatoria, y en unas condiciones tales que se minimicen los efectos de contaminación debida al instrumento.

Se obtendrán dos grupos de resultados. Se aplicará a ambos la prueba de Dixon para la eliminación de valores aberrantes.

Para cada uno de los dos grupos de resultados sin valores aberrantes se calculará la media, la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación. Para todos los constituyentes, la imprecisión de los resultados hallados debe estar comprendida dentro de los límites de la imprecisión del método analítico utilizado.

Se verificará si se cumplen las siguientes condiciones de aplicación:

- Gaussianidad, mediante la prueba de D'Agostino.
- Homogeneidad de varianzas, mediante la prueba F de Snedecor.

Si se cumplen las condiciones de aplicación de gaussianidad y homogeneidad de varianzas, se realizará la prueba paramétrica de comparación de medias en muestras pequeñas con datos independientes (prueba de la t de Student).

Si se cumple la condición de gaussianidad pero no se cumple la condición de homogeneidad de varianzas, se realizará la prueba paramétrica de Welch de comparación de medias.

Si no se cumplen las condiciones de aplicación de gaussianidad y homogeneidad de varianzas, se realizará la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Si las medias no son significativamente diferentes para

$\alpha < 0,01$, el medicamento se considerará no interferente y el estudio se dará por terminado.

En caso contrario, se considerará que existe una interferencia estadísticamente significativa y deberá comprobarse si también es analíticamente significativa y clínicamente significativa. En caso afirmativo, el estudio proseguirá para cuantificar la amplitud de la interferencia.

4.5. Protocolo para cuantificar la amplitud de la interferencia

4.5.1. Selección de las concentraciones.

Se seleccionará la concentración más elevada según el protocolo descrito anteriormente (4.4.1).

Seguidamente, se preparará una serie de disoluciones de concentraciones decrecientes diluyendo la mezcla problema con la mezcla control. Se preparan, como mínimo, cinco muestras de diferentes concentraciones, dos de ellas incluidas dentro del intervalo terapéutico.

4.5.2. Valoración e interpretación de los resultados.

Se valorarán por quintuplicado los especímenes problema y control, según un orden tal que minimice los efectos de contaminación debida al instrumento.

Se obtendrán seis grupos de resultados. Se calculará la media de cada grupo y con ellas se efectuará la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, comparando para cada constituyente, la media de la concentración del constituyente a una determinada concentración de medicamento con la media de la concentración del constituyente en el espécimen sin medicamento. Para cada constituyente se efectuarán, por tanto, cinco comparaciones.

Asimismo, se traza un interferograma, representando en ordenadas el cociente C_f/C_o y en abscisas la concentración del medicamento, siendo C_f la concentración del constituyente en el espécimen problema y C_o la concentración del constituyente en el espécimen control.

Observando los datos y las gráficas, puede verse el signo de la relación (la interferencia del medicamento provoca que la concentración hallada del constituyente analizado aumente o disminuya).

5. Conclusión

El estudio de las interferencias analíticas de los medicamentos tiene una gran importancia si se desea apreciar con exactitud los efectos farmacológicos deseados o indeseados, así como los efectos tóxicos eventuales de un medicamento.

La literatura existente es muy abundante, pero frecuentemente es difícil separar las alteraciones analíticas de las tóxico-farmacológicas, así como las incidencias prácticas reales.

Por tanto, los estudios deben seguir un protocolo definido, con el fin de estudiar los efectos perturbadores de los medicamentos más utilizados y la fiabilidad de los

principales métodos de exploración clínica frente a las medicaciones eventuales. El perfecto conocimiento de los mecanismos de acción tendrá un interés previsor importante. Si se estudian sistemáticamente bajo este ángulo los nuevos medicamentos y las nuevas metodologías, tendremos en un futuro próximo un completo y puntual conocimiento de este problema.

Bibliografía

1. Comisión «Effets des médicaments sur les examens de laboratoire» SFBC. Lignes directrices pour l'étude et définition d'une interférence analytique pour proposition d'un protocole. Ann Biol Clin 1984; 42: 137-144.
2. Galimany R, Galli A. Analytical Interferences Definition of a protocol. En: Kaiser E, Gabl M, Müller M, Bayer M, eds. XI International Congress of Clinical Chemistry. Berlin, 1982: 795-802.
3. Glick MR, Ryder KR, Hooker RP. «Interferograms» designed to depict the influence of interfering substances on many clinical chemistry instruments (Abstract). Clin Chem 1983; 29: 1.208.
4. Frey E, Fuentes Arderiu X, Queraltó JM. Comparación estadística de métodos analíticos. Educación continuada en Química Clínica 1988; 1: 69-80.
5. Galteau MM, Siest G. (Expert Panel on Drug Effects in Clinical Chemistry, IFCC). Drug effects in Clinical Chemistry part. 2. Guidelines for evaluation of analytical interference. Clin Chem Newsletter 1984; 4: 15-19.