

## Comparación de dos sistemas TDx<sup>®</sup> para la determinación de ciclosporina y metabolitos en sangre

C. Montojo Guillén<sup>a</sup>, M.V. Calvo Hernández, M.M. Fernández de Gatta, A. Domínguez-Gil Hurlé.

### Resumen

Se ha realizado un análisis comparativo de dos sistemas TDx<sup>®</sup> (Abbott) para la determinación de las concentraciones de ciclosporina y metabolitos en sangre por inmunoanálisis de fluorescencia polarizada. Los sistemas analíticos comparados incorporaban los equipos de reactivos CsA/metabolitos (W-B)<sup>®</sup> y CsA/metabolitos (P/S)<sup>®</sup> modificado, en nuestro servicio de farmacocinética clínica, para poder evaluar las concentraciones del fármaco en sangre. Se determinaron por ambos métodos las concentraciones de ciclosporina y metabolitos de 100 especímenes procedentes de 30 pacientes con trasplante renal, sometidos a terapia inmunosupresora con ciclosporina.

Los pares de datos se clasificaron en 3 grupos: grupo I: <400 µg/L; grupo II: 400-800 µg/L y grupo III: >800 µg/L. Para concentraciones del fármaco inferiores a 800 µg/L la exactitud de ambos métodos mostró diferencias estadísticamente significativas (P < 0,05).

### Summary

A comparative analysis of two TDx<sup>®</sup> systems (Abbott) for the determination of ciclosporina and its metabolites in blood by fluorescence polarization immunoassay was made. The kits used were CsA/metabolites (W-B)<sup>®</sup> and CsA/metabolites (P/S)<sup>®</sup> modified, at our clinical pharmacokinetic service, for the drug concentration evaluation in blood. One hundred blood concentration data evaluated by both methods and obtained from 30 renal transplant patients receiving therapy with the drug were used.

The pairs of data were classified in three groups: group I: <400 µg/L; group II: 400-800 µg/L and group III >800 µg/L. It was found that only in the highest range (group III) did the techniques analyzed not differ significantly in accuracy (P < 0.05).

### Introducción

En muchos centros asistenciales se realiza, de forma habitual, la determinación seriada de las concentraciones mínimas de ciclosporina en el estado de equilibrio estacionario, fundamentalmente, por su contribución al diagnóstico diferencial, entre los síntomas de rechazo del aloinjerto y la nefrotoxicidad, en pacientes con trasplante renal (1).

<sup>a</sup> Servicio de Farmacia.  
Complejo Hospitalario de Salamanca.  
Salamanca, España.  
Recibido 18-12-90  
Aceptado 14-2-91

El inmunoanálisis de fluorescencia polarizada comercializado por Abbott incorporó, inicialmente, en la práctica clínica el sistema TDx<sup>®</sup> para la determinación de ciclosporina y metabolitos en plasma (2), resultando más sencillo y rápido que el radioinmunoanálisis (3). En nuestro servicio de farmacocinética clínica este sistema TDx<sup>®</sup> se modificó para la determinación de ciclosporina en sangre (4), debido a que las recomendaciones sobre el material analítico a emplear recaían, preferentemente, sobre la sangre por su facilidad de manejo y disminución de la imprecisión, entre otros motivos (5). Posteriormente, se introdujo, en el mercado, un equipo de reactivos TDx<sup>®</sup> para la determinación de ciclosporina y metabolitos que utiliza sangre como espécimen (6).

El objetivo del presente trabajo ha consistido en el análisis comparativo de los sistemas TDx<sup>®</sup> modificado y TDx<sup>®</sup> para la determinación de ciclosporina y metabolitos en sangre, con el fin de establecer las posibles diferencias que pudieran haber entre ellos, como paso previo a la adopción de este último sistema por nuestro Servicio. Debemos reseñar que, durante el tiempo transcurrido desde la terminación del trabajo a la redacción del mismo se ha presentado un nuevo equipo de reactivos TDx<sup>®</sup> que incorpora un anticuerpo monoclonal con una elevada especificidad para ciclosporina (la reactividad cruzada es menor del 8% para el metabolito M1) (7).

## Materiales y métodos

### Instrumentación

Las determinaciones se realizaron en el analizador TDx (Abbott, Inving, Texas, USA).

### Reactivos

Se utilizaron los equipos de reactivos CsA/metabolitos (P/S)<sup>®</sup> y CsA/metabolitos (W-B)<sup>®</sup> (Abbott Diagnostics, North Chicago, Illinois, USA) para el sistema TDx<sup>®</sup> modificado y para el sistema TDx<sup>®</sup>, respectivamente.

### Especímenes

Cien especímenes de sangre venosa periférica anticoagulada con EDTA, procedente de 30 pacientes con trasplante renal de cadáver, sometidos a terapia inmunosupresora con ciclosporina. La recogida de los mismos se realizó por la mañana, correspondiendo con el final del intervalo posológico utilizado de 12 horas.

### Preparación de especímenes

Alícuotas de cada espécimen fueron analizadas por los dos sistemas TDx<sup>®</sup>, siguiendo los esquemas A y B de la

Figura 1. Las muestras cuyas concentraciones<sup>b</sup> sobrepasaban los 1000  $\mu\text{g/L}$  fueron diluidas con disolución tampón del equipo de reactivos TDx<sup>®</sup> antes de ser valorada por el sistema TDx<sup>®</sup> modificado. La linealidad del sistema TDx<sup>®</sup> modificado en el intervalo analítico de 0-2000  $\mu\text{g/L}$  fue previamente estudiada habiéndose obtenido un coeficiente de correlación lineal  $r=0,999$ . Para la calibración y procedimientos de control se utilizaron calibradores y controles de Abbott Diagnostics siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

## Análisis estadístico

Los cien pares de datos de concentración de ciclosporina en sangre se clasificaron para un análisis descriptivo en tres grupos: grupo I:  $<400 \mu\text{g/L}$ ; grupo II:  $400-800 \mu\text{g/L}$  y grupo III:  $>800 \mu\text{g/L}$ . La clasificación se realizó de acuerdo al resultado correspondiente al análisis efectuado por el sistema TDx<sup>®</sup> modificado. El grado de asociación entre las concentraciones de ciclosporina determinadas por ambos sistemas se estimó con el coeficiente de correlación de Pearson. La relación entre las concentraciones se estableció mediante un análisis de regresión de  $y$  sobre  $x$  y de  $x$  sobre  $y$  determinando, posteriormente, la media aritmética de los parámetros de regresión resultantes.

La imprecisión de los dos sistemas se estimó calculando la variabilidad en las determinaciones de las concentraciones de ciclosporina obtenidas en el análisis periódico, en condiciones de rutina, durante 6 meses, de 3 controles (Abbott Diagnostics) que contenían ciclosporina en sangre humana.

## Resultados y discusión

En la figura 2 se muestra el diagrama de dispersión de las concentraciones de ciclosporina en las muestras clínicas de los pacientes obtenidas con los dos sistemas TDx<sup>®</sup> utilizados. Generalmente, el método de regresión de  $y$  sobre  $x$  es apropiado en la mayoría de los casos. Cuando se analizan series de datos ( $n > 20$ ) con errores semejantes en  $x$  e  $y$ , los métodos de regresión ortogonales son probablemente superiores, admitiéndose como válida la utilización de métodos de regresión ortogonal que asumen semejante variancia del error en  $x$  y en  $y$ , que los más complicados y rigurosos métodos ortogonales. No obstante, hemos utilizado en este trabajo el método  $y$  sobre  $x$  y  $x$  sobre  $y$  que promedia los parámetros obtenidos de las dos regresiones porque utiliza cálculos sencillos y

<sup>b</sup> En este artículo se usan unidades SI de concentración de masa en lugar de concentración de sustancia, ya que la determinación de ciclosporina más metabolitos se valora una mezcla indeterminada de diferentes moléculas, por lo que no puede usarse una masa molecular relativa única.

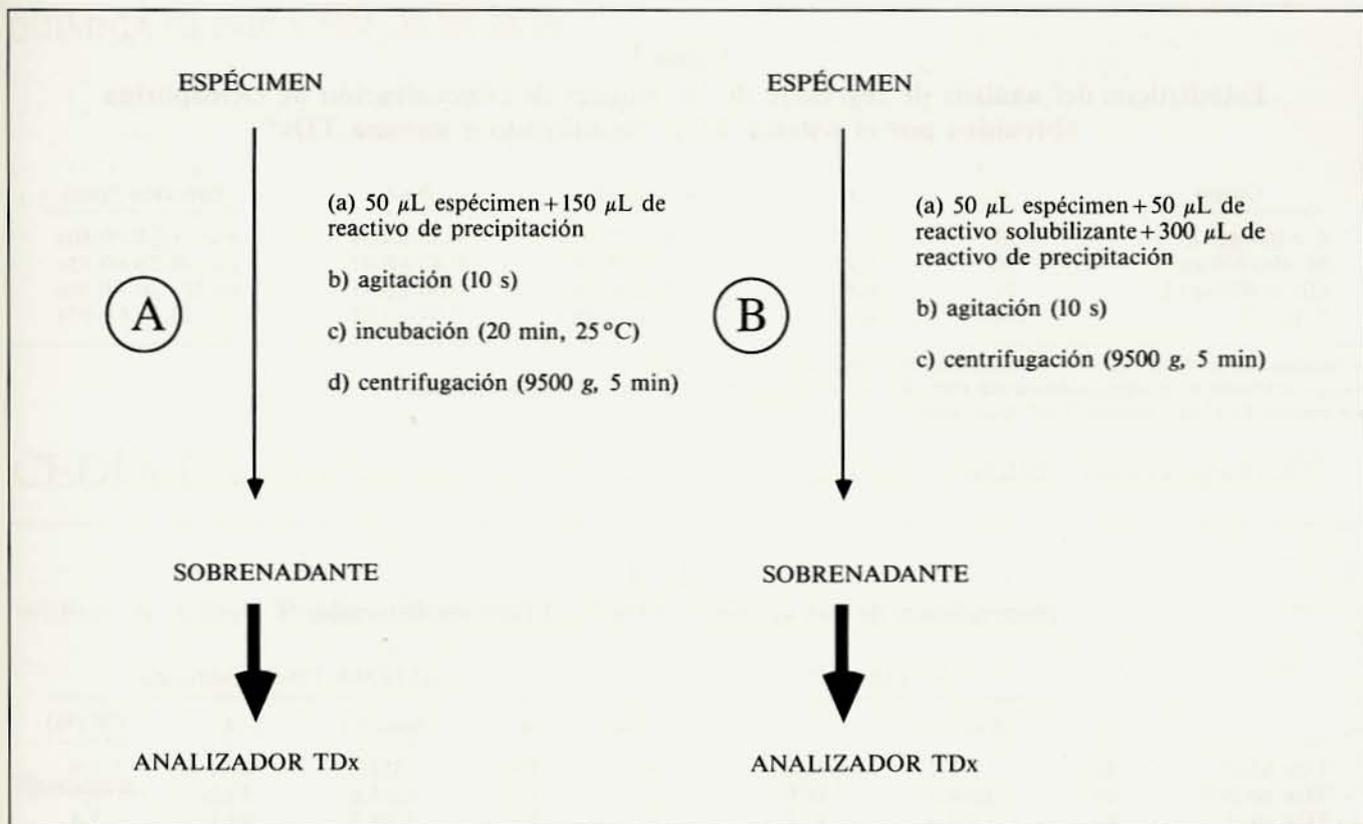


Figura 1. Diagrama de flujo que esquematiza el tratamiento de las alícuotas del espécimen antes de la determinación de ciclosporina por el sistema TDx modificado (A) y por el sistema TDx (B).

resulta equivalente a los métodos ortogonales en la estimación de los parámetros de regresión (8). Consideramos las concentraciones de ciclosporina obtenidas por el sistema TDx<sup>®</sup> modificado como variable independiente debido a que, a pesar de no ser obtenida por un método

estándar, estaban siendo utilizadas previamente de forma rutinaria en la práctica clínica. De forma global, el valor de la pendiente de la recta de regresión fue 0,97 (Tabla I), indicando una tendencia del sistema TDx<sup>®</sup> modificado a sobreestimar en un 3% de las concentraciones obtenidas por el sistema TDx<sup>®</sup> en el intervalo analítico estudiado. Teniendo en cuenta que el tipo de anticuerpo utilizado es el mismo en ambos equipos de reactivos, la tendencia podría, posiblemente, ser debida a la inevitable evaporación de la muestra que se produce en el sistema TDx<sup>®</sup> modificado durante la incubación, a temperatura ambiente, de 20 minutos incrementándose, consiguientemente, la concentración de ciclosporina.

Analizando el intervalo analítico más detalladamente, desde el grupo I al grupo III, las ecuaciones de las rectas cambian de forma sustancial, encontrándose que solamente en el intervalo de concentraciones más altas (grupo III) el sistema TDx<sup>®</sup> no manifestaba errores de tipo constante o proporcional con respecto al sistema TDx<sup>®</sup> modificado. El valor de la ordenada en el origen y de la pendiente no diferían de forma significativa ( $P < 0,05$ ) de 0 y 1, respectivamente. Por tanto, la adopción del sistema TDx<sup>®</sup> como sistema de reactivos para el análisis rutinario de ciclosporina en la práctica clínica supone, respecto de las concentraciones obtenidas por el sistema TDx<sup>®</sup> modificado, una subestimación de las concentraciones del fármaco del 10 al 20% (pendientes de 0,90 a 0,80) en el margen de concentraciones  $< 800 \mu\text{g/L}$ .

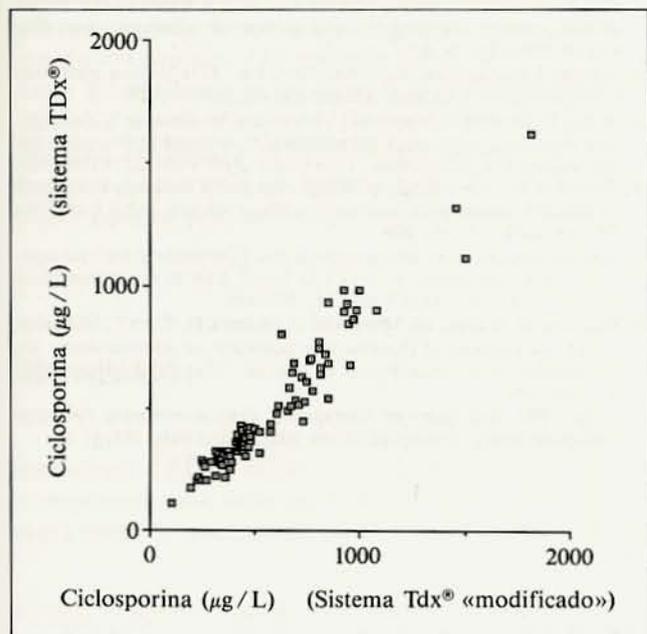


Figura 2. Diagrama de dispersión de las concentraciones de ciclosporina en sangre obtenidos por el sistema TDx<sup>®</sup> modificado y por el sistema TDx<sup>®</sup>.

**Tabla I**  
**Estadísticos del análisis de regresión de los valores de concentración de ciclosporina**  
**obtenidos por el sistema TDx® modificado y sistema TDx®**

Grupo	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>a</i> ± <i>s<sub>a</sub></i> (µg/L)	<i>b</i> ± <i>s<sub>b</sub></i>	Ecuación lineal
I, < 400 µg/L	29	0,77	62,80 ± 37,05	0,80 ± 0,09	<i>y</i> = 62,8 + 0,80 <i>x</i>
II, 400-800 µg/L	50	0,85	76,58 ± 69,50	0,85 ± 0,07	<i>y</i> = 76,58 + 0,85 <i>x</i>
III, ≥ 800 µg/L	21	0,89	103,26 ± 102,0	0,90 ± 0,11	<i>y</i> = 103,26 + 0,90 <i>x</i>
I, II, III	100	0,97	21,55 ± 16,49	0,97 ± 0,03	<i>y</i> = 21,55 + 0,97 <i>x</i>

*n* = número de pares de valores; *r* = coeficiente de correlación lineal de Pearson  
*a* ± *s<sub>a</sub>* = ordenada en el origen ± desviación estándar; *b* ± *s<sub>b</sub>* = pendiente de la recta ± desviación estándar  
*y* = Sistema TDx®; *x* = Sistema TDx® modificado.

**Tabla II**  
**Imprecisión de los sistemas TDx® y TDx® modificado**

	SISTEMA TDx®				SISTEMA TDx® modificado			
	<i>n</i>	$\bar{x}$ (µg/L)	<i>s</i>	<i>CV</i> (%)	<i>n</i>	$\bar{x}$ (µg/L)	<i>s</i>	<i>CV</i> (%)
TDx bajo <sup>a</sup>	10	372,1	24,2	6,9	10	352,2	28,1	7,9
TDx medio <sup>a</sup>	10	1214,0	11,9	2,1	10	1236,6	50,2	4,1
TDx alto <sup>a</sup>	10	1658,4	30,8	5,9	10	1748,8	94,1	5,4

*a*: ciclosporina en sangre humana (controles de Abbott). Valores fijados por Abbott: bajo: 350 µg/L; medio: 1200 µg/L; alto: 1700 µg/L  
*n* = número de determinaciones;  $\bar{x}$  = valor medio de concentración, *s* = desviación estándar, *CV*% = coeficiente de variación en porcentaje

La imprecisión de ambos sistemas analíticos resulta satisfactoria desde el punto de vista de la monitorización clínica del fármaco (Tabla II), aunque empeora para concentraciones bajas de ciclosporina, coincidiendo con los resultados publicados por otros autores (9,10).

Los datos disponibles en la actualidad sugieren que las dificultades existentes para relacionar las observaciones clínicas (nefrotoxicidad o rechazo) con las concentraciones mínimas en el estado de equilibrio estacionario no se resuelven fácilmente por el mero hecho de medir selectivamente el medicamento (11). En consecuencia, nuestra actitud consiste en adoptar el sistema TDx® para la determinación de ciclosporina y metabolitos en sangre, entre tanto no se definen cuidadosamente los valores predictivos de las concentraciones mínimas determinadas por inmunoanálisis de fluorescencia polarizada con anticuerpo monoclonal específico.

- Sanghvi A, Warren D, Seltman H, Starzl T. Abbott's fluorescence polarization immunoassay for cyclosporine and metabolites compared with the Sandoz RIA. Clin Chem 1988; 34: 1904-1906.
- Vogt W, Welsh I. Modified TDx® assay for cyclosporine and metabolites for use with blood samples. Clin Chem 1988; 34: 1459-1461.
- Lensmeyer GL, Wiebe DA, Carlson IH. Distribution of cyclosporine A metabolites among plasma adn cells in whole blood: Effect of temperature, hematocrit, and metabolite concentration. Clin Chem 1989; 35: 56-63.
- Abbott Laboratories Diagnostic Division. TDx System operation manual. North Chicago: Abbott Laboratories, 1989.
- Wang P, Meucci V, Simpson E, Morrison M, Sunetta S, Zajac M, and Boeckx R. A monoclonal antibody fluorescent polarization immunoassay for cyclosporine. Transplant. Proc 1990; 22: 1186-1188.
- Parish R.C. Comparison of linear regression methods when both variables contain error: relation to clinical studies. Drug Intell Clin Pharm 1989; 23: 891-898.
- Vanderbroucke A.C. Evaluation of the TDx method for cyclosporine and a comparison to CYCLO-Trac® RIA in renal transplant patients. Clin Biochem 1988; 21: 307-309.
- Hayashi Y, Shibata N, Minouchi T, Shibata H, Ono T, Shimakawa H. Evaluation of fluorescence polarization immunoassay for determination of cyclosporine in plasma. Ther Drug Monit 1989; 11: 205-209.
- Kahan BD. Summary on therapeutic drug monitoring for renal transplantation. Transplant Proc 1990; 22: 1348-1351.

#### Bibliografía

- Grevel J, Welsh MS, Kahan BD. Cyclosporine monitoring in renal transplantation: Area under the curve monitoring is superior to trough-level monitoring. Ther Drug Monit 1989; 11: 246-248.
- Wang P, Morrison MA, Wang N. A Fluorescence polarization immunoassay (FPIA) for the quantitation of cyclosporin. Clin Chem 1986; 32: 1061-1062.