

Evaluación analítica de la determinación de ciclosporina mediante "Ciclosporin Ria-Kit"

L. Sabaté Salvia, L. Juan Pereira, M. Guardià Lluch, M. Macià Montserrat, P. Valle Estradera, F. Barragán Rastrollo

La optimización del tratamiento con ciclosporina (Cs A), exige una monitorización de la concentración de dicho fármaco en sangre o en plasma.

En este artículo se describe nuestra experiencia en la evaluación analítica de la Cs A en sangre (Sg) mediante "Ciclosporin RIA-Kit".

Se ha estudiado la recuperación, linealidad y la imprecisión entre días a 6 concentraciones que incluyen los márgenes subterapéutico, terapéutico y tóxico. La imprecisión más alta se ha obtenido a la concentración que corresponde al nivel subterapéutico.

Introducción

La ciclosporina (Cs A) es un fármaco inmunosupresor que ha marcado una importante etapa en la terapéutica del trasplante de órganos. También se ha utilizado en el tratamiento de otros procesos de etiología autoinmune (1).

Sin embargo, el manejo clínico de dicho fármaco es complicado por su estrecho margen terapéutico (el margen terapéutico aconsejado en sangre es 200-800 $\mu\text{g/L}$) (166-665 nmol/L) y por su variabilidad farmacocinética interindividual. Ello obliga a un ajuste individual de la dosis mediante la monitorización periódica de las concentraciones de ciclosporina en plasma o sangre.

Se han desarrollado varios métodos para el análisis de Cs A en plasma o sangre. El primer método descrito fue

El límite de detección ha sido de 62 $\mu\text{g/L}$.

Se ha evaluado el efecto de la lisis previa (mediante congelación-descongelación), tal como recomienda la casa comercial, con respecto al análisis de las muestras sin hemolizar y no se han observado diferencias estadísticamente significativas.

Se concluye que la determinación de Sg-Cs A mediante "Ciclosporin RIA-Kit" es un método útil desde el punto de vista analítico para la monitorización clínica en pacientes bajo tratamiento con Cs A.

por radioinmunoanálisis (RIA) (2). La principal crítica a este método es que los anticuerpos usados presentan reacciones cruzadas con los metabolitos del fármaco. Subsecuentemente a la introducción del RIA se han desarrollado varios métodos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (3,4), que requieren una extracción previa de la muestra y un acondicionamiento de la columna entre 70-75 °C. Sin embargo, estos métodos son laboriosos y requieren un tiempo importante para su realización.

En este artículo describimos nuestra experiencia en la evaluación analítica de la determinación de la Cs A por RIA en sangre, método que utilizamos para la monitorización clínica del fármaco en pacientes con trasplante hepático y renal.

Material y métodos

El método de RIA utilizado es el descrito por Donatsch

Unitat de Farmacocinètica. Servei de Bioquímica. Hospital de Bellvitge "Prínceps d'Espanya". L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona.

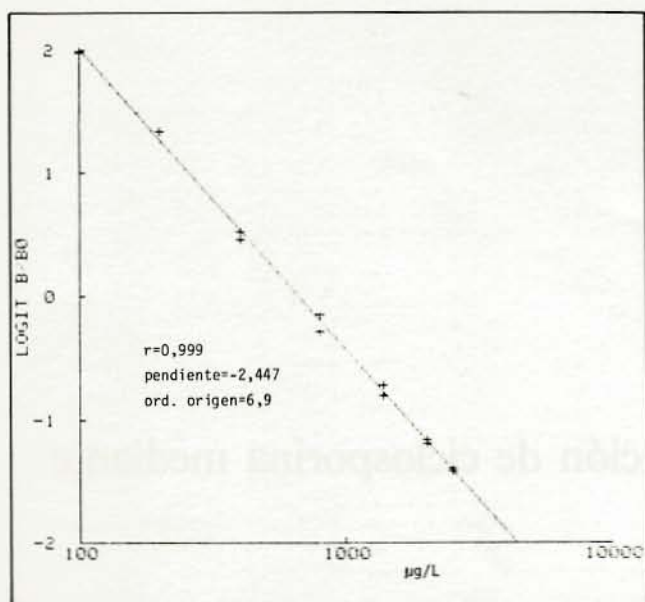


Figura 1:
Linealidad de la ciclosporina en el intervalo de concentraciones 100-2500 µg/L.

y col. (2), desarrollado y comercializado en forma de "Kit" por Sandoz Co. (Basilea, Suiza)

El método analítico se ha realizado estrictamente siguiendo las instrucciones de la casa comercial, excepto en la preparación de la curva de calibración y en la supresión de la hemólisis en las muestras de pacientes.

Patrones de calibración

Se preparan con un "pool" de sangre libre de Cs A tratada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y con el patrón "stock" de Cs A (40 mg/L) suministrado por Sandoz Co. El "pool" de sangre se mezcla y se filtra a través de un papel de filtro Albet nº 176834 previamente mojado con tampón A, incluido en el "Kit" usando un embudo de porcelana y un matraz kitasato conectado al vacío. Seguidamente se incuba una hora en un baño de agua a 37 °C y transcurrido ese tiempo se mezcla nuevamente.

El patrón "stock" de Cs A debe estar a temperatura ambiente antes de su utilización.

Las cantidades de sangre y de patrón "stock" de Cs A, así como la preparación de los diferentes patrones de trabajo se muestran en la tabla I.

Una vez preparados los patrones de calibración a diferentes concentraciones, se dividen en alícuotas de 100 µL y se guardan congelados a -20 °C como mínimo, renovándose cada 1-2 meses.

Materiales de control

Como controles de rutina se utilizan dos muestras de sangre a las que se les ha añadido Cs A a dos concentraciones diferentes, 400 µg/L y 137 µg/L, preparados de la forma que se ha citado anteriormente para los patrones de calibración.

Esporádicamente, se han utilizado unos materiales de control suministrados por Sandoz (QC Specimens lote 0184) a cuatro concentraciones distintas, los cuales se han reconstituido según las normas dictadas por la casa comer-

Tabla I
Preparación de la curva de calibración

Concentración de los patrones de calibración (µg/L)	"Pool" de sangre (mL)	Patrón "stock" de Cs A (40 mg/L) (µL)
2500	4,5	300
2000	3,8	200
1379	5,6	200
800	4,9	100
400	9,9	100
200	9,95	50
100	19,95	50

Agitar en "vortex" cada tubo e incubarlos en baño de agua a 37 °C durante 5 minutos; repetir este proceso tres veces.

Tabla II
Imprecisión interserial

Controles	n	\bar{x} (µg/L)	s (µg/L)	CV (%)
A	23	397	23,8	5,9
B	23	1367	75,2	5,5
C	7	1200	46,2	3,8
D	7	402	14,6	3,6
E	7	297	11,6	3,9
F	7	148	29,5	19,9

n: número de resultados

\bar{x} : valor medio

s: desviación estándar

CV: coeficiente de variación

cial y, conservado en alícuotas a -20 °C como mínimo.

Muestras de pacientes

Se utiliza sangre conteniendo EDTA como anticoagulante. El análisis de dichas muestras se realiza el mismo día de la extracción, sin hemólisis previa, a diferencia de lo que indica la casa comercial, la cual recomienda que hay que lisar los hematíes antes del análisis mediante congelación-descongelación. Si el análisis no se realiza el mismo día de la extracción se almacenan las muestras a 4 °C, ya que según Johnston y col. (5), las concentraciones de Cs A en sangre son estables durante un mínimo de 7 días.

Los patrones de calibración, controles y muestras de pacientes se analizan por duplicado siguiendo exactamente las pautas dadas por el fabricante del "Kit".

La radiactividad de cada vial se mide en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 7000) durante 10

minutos.

Los resultados se calculan mediante un método de linealización logit-log en un ordenador Hewlett-Packard modelo HP-9845.

Resultados

Linealidad

En la figura 1 se muestra la linealidad de la curva de calibración en términos de logit B/B_0 frente al logaritmo de la concentración de ciclosporina. El método es lineal en el intervalo de concentraciones estudiados (100-2500 $\mu\text{g/L}$.)

Límite de detección

La concentración mínima detectable de Cs A que puede diferenciarse del patrón de calibración cero ("blanco"), es de 62 $\mu\text{g/L}$ con un intervalo de confianza del 95%.

Recuperación

El ensayo de recuperación se ha efectuado añadiendo cantidades crecientes de Cs A exógena, desde 100 hasta 2000 $\mu\text{g/L}$, a un "pool" de sangre procedente de pacientes tratados con Cs A. Cada muestra se analizó por duplicado. Los porcentajes de recuperación de Cs A exógena oscilaron de 90% a 106%.

Imprecisión interserial

El estudio de la imprecisión interserial se expresa en la tabla II. Los controles A y B corresponden a dos concentraciones diferentes de ciclosporina, 400 y 1379 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. Dichos controles se han procesado en un período de dos meses.

Los controles C, D, E y F, suministrados por Sandoz Co. se han procesado esporádicamente y corresponden a cuatro concentraciones diferentes. Los valores asignados ($\bar{x} \pm 2s$) son los siguientes: C = 1350 \pm 100, D = 401 \pm 17, E = 290 \pm 20 y F = 137 \pm 13 $\mu\text{g/L}$.

Adicionalmente, se lleva un control de la curva de calibración. En la tabla III se expresa los resultados de la variabilidad de la pendiente, de la ordenada en el origen y de la concentración correspondiente a un 50% de unión (C_{50}).

Evaluación de la lisis de la muestra previa al análisis

Para valorar el efecto de la lisis de las muestras previa al análisis, se escogieron 20 muestras de pacientes tratados con ciclosporina y se separaron en dos alícuotas. Una de ellas se analizó directamente y la otra se sometió a una congelación-descongelación. Los resultados no mostraron diferencia estadísticamente significativas en el intervalo de concentraciones 180 $\mu\text{g/L}$ -800 $\mu\text{g/L}$ (prueba T de Wilcoxon).

Discusión

La monitorización de la Cs A es un tema discutido en la literatura científica. Las principales discrepancias exis-

Tabla III
Variabilidad de la curva de calibración

	n	\bar{x}	s	CV (%)
pendiente	23	2,5	0,12	4,84
ordenada en el origen	23	6,98	0,34	4,85
C_{50}	23	618	71,5	11,5

n: número de resultados

\bar{x} : valor medio

s: desviación estándar

CV: coeficiente de variación

C_{50} : concentración correspondiente a un 50% de unión

ten en lo referente al método analítico y al tipo de muestra biológica empleada para su determinación.

Los resultados obtenidos por RIA, son aproximadamente el doble de los obtenidos por HPLC (3). En consecuencia el margen terapéutico por HPLC es más bajo.

En lo referente a la elección de la muestra biológica, los resultados son también diferentes si se comparan las concentraciones obtenidas en diferentes maestras biológicas (suero, plasma o sangre). Las concentraciones en sangre son aproximadamente 2,5 veces superiores a las concentraciones en suero, ya que Cs A se une a la hemoglobina en un 60%. Además, se ha demostrado "in vitro", que esta afinidad por la hemoglobina está en función de la temperatura de separación del plasma de los hematíes (6, 7, 8). Por ello, es aconsejable utilizar sangre para la monitorización del fármaco, siendo también más fácil la comparación de resultados entre diferentes laboratorios.

Según los datos basados en nuestra experiencia, la determinación de Cs A por RIA en sangre es un método útil para la monitorización clínica del fármaco, tal como lo demuestran los resultados de precisión obtenidos a concentraciones terapéuticas y a concentraciones altas. El coeficiente de variación más alto lo hemos observado a concentraciones bajas (alrededor de 100 $\mu\text{g/L}$), pero que en la práctica no repercute significativamente en la interpretación clínica de los resultados.

El análisis directo de las muestras de pacientes, no demostró diferencias significativas en los resultados con respecto a los obtenidos mediante una congelación-descongelación previa. La ventaja del análisis directo, sin hemólisis previa, representa un ahorro de tiempo considerable si la determinación se realiza el mismo día de la extracción.

Cabe destacar que es aconsejable llevar un control de la curva de calibración, para poder detectar variaciones de la pendiente, de la ordenada en el origen y de la C_{50} , cada vez que se cambia de lote de patrones de calibración y/o se modifican las condiciones analíticas generales.

Agradecimientos

Agradecemos al Laboratorio de Farmacocinética de la Universidad de Pittsburgh las sugerencias aportadas y a Mercedes Fortuny y Rosa Miñarro su excelente asistencia técnica.

Bibliografia

1. White D. Cyclosporin A: Clinical pharmacology ad therapeutic potential. *Drugs* 1982; 24: 322-334.
2. Donatsch P, Abisch E, Hamburger M, et al. A radioimmunoassay to measure Cyclosporin A in plasma and serum samples. *J Immunoassay* 1981; 2: 19-32.
3. Carruthers SG, Freeman DJ, Koegler JC, Homson W et al. Simplified liquid-chromatographic analysis for Cyclosporin A and comparison with radioimmunoassay. *Clin Chem* 1983; 29: 180-183.
4. Yee GC, Gmur JD, Kennedy SM. Liquid chromatographic determi-

- nation of cyclosporine in serum with use of a rapid extraction procedure. *Clin Chem* 1982; 28: 2269-2271.
5. Jhonston A, Harsden JT, Holt D. The United Kingdom Cyclosporin Quality Assesment Shem. *Ther Drug Monit* 1986; 8: 200-204.
6. Robinson CA, Ketchum CH. Monitoring of Cyclosporin A: Is it possible? *Ther Drug Monit* 1983; 5: 371-372.
7. Diepesink H. Temperature dependency of Cyclosporine plasma levels. *Lancet* 1983; 1: 416.
8. Niederberger W, Lamaire M, Meurer G et al. Distribution an and binding of Cyclosporine in blood and tissues. *Transplant Proc* 1983; 15: 2419-2421.