

Validación del método inmunológico de interacción cinética de micropartículas en solución (KIMS) para la determinación de fenitoína en saliva en el hospital de Niños de la Santísima Trinidad.

Minetti, Araceli; Ducheins, Solange; Suarez, Hector Andrés; Rivolta, Susana; Gonzalez, Isabel Inés.

Resumen:

La Fenitoína (DFH), es un anticonvulsivante ampliamente utilizado para el tratamiento de distintos tipos de convulsiones.¹El monitoreo terapéutico (TDM) es requerido para la DFH debido a su estrecho rango terapéutico y farmacocinética no lineal, entre otras características. Los monitoreos se realizan frecuentemente en plasma o suero (droga total) a través de métodos inmunológicos. También se puede monitorear DFH en saliva, la cual presenta una buena correlación con el plasma. La concentración de DFH en saliva refleja la concentración de droga libre y debido a la simplicidad en su recolección, conlleva a un proceso menos estresante para el paciente. El objetivo del trabajo fue validar el método inmunológico de interacción cinética de micropartículas en solución (KIMS) para la determinación de DFH usando como matriz biológica saliva. Se analizó linealidad, precisión, límite de detección y cuantificación, exactitud e interferencia. Se utilizó el software Infostat 8.0 versión estudiantil para el análisis estadístico. El método fue lineal en un intervalo entre 0,41 y 5ug/ml. Los límites de detección y cuantificación fueron 0,14 y 0,45ug/ml respectivamente. La ecuación de la recta obtenida en base a la comparación de métodos entre KIMS y HPLC-UV fue $DFH_{KIMS} = 0,81 * DFH_{HPLC} - 0,03$.

El método KIMS demostró tener las características analíticas necesarias para ser aplicada como herramienta útil y práctica para el seguimiento de aquellos pacientes de difícil acceso venoso y/o niños con tratamientos crónicos con DFH.

Palabras claves: fenitoína; saliva; inmunoensayo; monitoreo terapéutico

Introducción:

La Fenitoína (DFH), es un anticonvulsivante eficaz en las convulsiones parciales y tonicoclónicas, además de ser utilizada para el tratamiento en convulsiones que ocurren durante o luego de neurocirugías o traumatismos de cráneo severos. Su actividad anticonvulsiva la ejerce debido a que limita la activación repetitiva de los potenciales de acción evocados por la despolarización sostenida de las neuronas de

la médula espinal. Este efecto es mediado por retraso en la velocidad de recuperación de los canales de sodio activados por voltaje a partir de la inactivación.^{1,2}

La absorción de la DFH luego de una dosis oral es variable y depende de la formulación, con un tiempo máximo (T máx) de 1-12 horas. La biodisponibilidad, también depende de la formulación, y es > 80%.¹

Su farmacocinética es no lineal, tipo Michaelis-Menten. Debido al metabolismo enzimático saturable, pequeñas variaciones de dosis resultan en grandes cambios en la concentración sérica de la droga. La unión a proteínas de la fenitoína es del 90% y se metaboliza en hígado, principalmente por las CYP2C9 y CYP2C19, para formar dos metabolitos principales, que no presentan actividad farmacológica, denominados 5-(p-hidroxyfenil)-5 fenilhidantoína y un derivado dihidrodiol. Debido a que estas enzimas son encargadas de metabolizar otros fármacos, es posible que se produzcan interacciones farmacológicas. Además, las enzimas del CYP450 son fácilmente inhibidas o inducidas por gran variedad de drogas, incluso la misma fenitoína. La vida media de eliminación en adultos es de 30-100 horas ya que su depuración interindividual es muy variable.^{1,2,3,4,5}

El monitoreo terapéutico de drogas (TDM) es habitual para la DFH que tiene un estrecho rango terapéutico y farmacocinética no lineal, entre otras características. Los dosajes se realizan en plasma o suero frecuentemente, donde se mide la cantidad de droga total, es decir la droga libre más la unida a proteínas. El rango terapéutico de DFH en suero es de 10-20 ug/mL, mientras que el rango para la fracción libre es de 1-2 ug/mL.^{3,6,7} El dosaje de DFH puede realizarse en otras matrices biológicas como saliva, lágrima, sudor, LCR, entre otros.^{1,4} La matriz saliva tiene numerosas ventajas sobre el uso de suero o plasma para el TDM, ya que refleja la concentración de droga libre en suero, la recolección es más simple, menos invasiva, menor costo, causa menos estrés, miedo y malestar, especialmente en pacientes con discapacidades, ancianos y niños, la misma puede ser recolectada, en el tiempo ideal, en el hogar y luego ser trasladada al laboratorio para la medición.^{1,8}

Existen numerosos trabajos donde se ha demostrado que existe correlación entre las concentraciones de DFH en saliva y la concentración de DFH libre en plasma o suero. Estas determinaciones se han llevado a cabo a través de métodos inmunológicos que han sido validados para la determinación de DFH en saliva, como por ejemplo

inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA), enzimoimmunoensayo (ELISA), inmunoensayo de reactivación de apoenzimas en fase seca (ARIS), Radioinmunoanálisis (RIA), etc.^{5,9 10,11,12}

Por todo lo expuesto anteriormente el objetivo de nuestro trabajo fue validar el método interacción cinética de micropartículas en solución (KIMS) en la matriz saliva

Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxicología del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad.

La validación se realizó según las guías para validación de métodos analíticos del comité para productos medicinales de uso humano de la Agencia Europea de Medicamentos.¹³

Los parámetros validados fueron: linealidad, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, interferencia.

Para realizar este estudio se utilizó un pool de saliva libre de drogas, el cual se fortificó con una solución de Difenilhidantoína (DFH) preparada a partir de un estándar Sigma Aldrich (Argentina). El pool de saliva se recolectó a partir de voluntarios sanos que no reciben ningún tipo de medicación. La saliva se obtuvo sin estimulación, mediante una torunda de algodón, posteriormente el fluido fue extraído aplicando presión con una jeringa. Se prepararon estándares de DFH en saliva de concentración conocida a partir del pool mencionado anteriormente.

Las determinaciones de DFH se llevaron a cabo por el método de interacción cinética de micropartículas en solución (KIMS) en un COBAS 6000 de la línea Roche y los reactivos provistos fueron utilizados según las especificaciones y procedimientos recomendados por el fabricante. Este método utiliza anticuerpos Anti-DFH que se fijan de manera covalente a micropartículas, mientras que el derivado de fármaco se une a macromoléculas. La interacción cinética de micropartículas en solución se induce al unirse el conjugado de la DFH al Ac que recubre las micropartículas y se inhibe por la DFH presente en la muestra biológica. El conjugado de DFH y la DFH presente en la muestra, compiten por fijarse al Ac anti-DFH que recubre las micropartículas. La interacción cinética de micropartículas resultante es indirectamente proporcional a la cantidad de fármaco presente en la muestra.

El método de referencia fue la cromatografía líquida de alta performance con detector ultravioleta (HPLC-UV), utilizado en un equipo de la marca Agilent, 1220 LC System; las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: columna Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6x150mm, 5 μ m; fase móvil isocrática compuesta por un buffer fosfato 0,025M y Acetonitrilo (100:10 v/v) a pH 3, con un flujo de 1 mL/min; el volumen de inyección utilizado fue 20 μ L y la lectura se realizó a 220 nm.

La extracción de la DFH de la matriz saliva se realizó utilizando una columna de extracción en fase sólida Strata C-18-E (Phenomenex). El procedimiento se llevó a cabo según Kabra P. M. and cols.^{xv} El estándar de DFH que se utilizó como fue Sigma Aldrich y como estándar interno CBZ (Supelco PHR1067).

Estudio de Linealidad: se realizó una curva de calibración donde se utilizaron estándares de saliva de concentración conocida: 0; 0,3; 0,63; 1,25; 2,5; 5ug/ml. Se midió cada estándar por cuadruplicado utilizando el método KIMS. La curva de regresión lineal se obtuvo graficando la concentración de los estándares conocidos en función de la concentración de DFH obtenida por el método inmunológico.

Estudio de Precisión: se tomaron los datos del análisis por cuatuplicado de los distintos estándares de saliva preparados y se calculó el desvío estándar (DE) y el coeficiente de variación porcentual (CV%) a cada nivel de concentración.

Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ): Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se obtuvieron a partir de la curva de linealidad; $LOD=3Sa/b$; $LOQ=10Sa/b$, donde Sa es el desvío estándar de la ordenada al origen y b la pendiente.

Estudio de Interferencia: Para el estudio de interferencia se utilizaron dos estándares de DFH en saliva de concentraciones 1 y 2ug/ml a los cuales se les agregó 100ul de calibrador Preciset TDM. El calibrador Preciset TDM contiene Carbamacepina (2ug/mL), Digoxina (0,5ug/mL), Gentamicina (0,87ug/mL), Fenobarbital (6ug/mL), Primidona (2,4ug/mL), Theofilina (4ug/mL), Tobramicina (1ug/mL), Acido Valproico (15ug/mL) y Vancomicina (8ug/mL). Se analizaron los dos estándares de saliva de concentración conocida con KIMS sin agregado y con agregado de los interferentes con un n= 10. Se aplicó el test t para muestras apareadas para el análisis de los resultados.

Exactitud: se realizó una comparación de métodos en donde se procesaron estándares de DFH en saliva simultáneamente por ambos métodos, KIMS y HPLC, con los datos obtenidos se realizó una regresión lineal.

Resultados:

Linealidad:

Del análisis de regresión se obtuvo la siguiente ecuación de la recta: $y = 0,88x - 0,09$; $R^2 = 0,99$. Del análisis estadístico se obtuvo un $t_{obs} > t_{crit}$ ($75,20 > -0,87$) lo que permite concluir que existe una correlación lineal estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%. El rango de medición obtenido fue de 0,41 a 5 $\mu\text{g/mL}$.

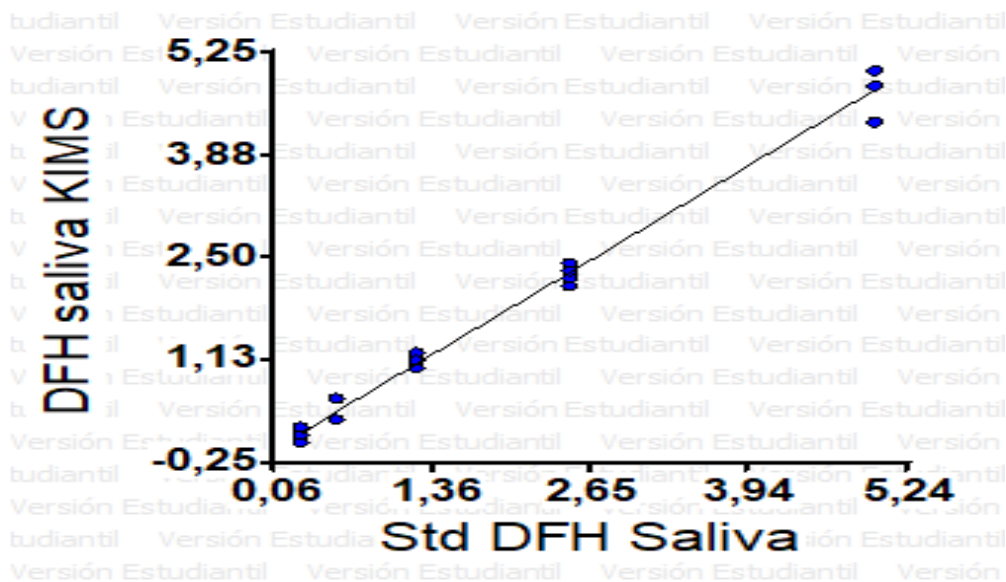


Figura N° 1. Linealidad del método KIMS para la determinación de DFH en saliva 0,41- 5 $y = 0,88x - 0,09$; $R^2 = 0,99$.

Precisión:

Los resultados del estudio de precisión se expresaron en términos de desviación estándar (DE) y coeficiente de variación porcentual (CV%) y se muestran en la Tabla1.

Tabla N°1: Datos del análisis de precisión.

DFH (ug/mL)	X (ug/mL)	SD (ug/mL)	CV% (ug/mL)
0	0	0	
0,2	0,14	0,08	57,14
0,6	0,42	0,15	35,7
1,25	1,1	0,06	5,5
2,5	2,26	0,10	4,4
5,0	4,38	0,83	18,96

Límite de Detección y Cuantificación:

En base a los resultados donde $S_a=0,04$ y $b=0,88$, se pueden establecer $LOD= 0,14$ $\mu\text{g/mL}$ ($LOD= 3S_a/b$) y; $LOQ= 0,45$ $\mu\text{g/mL}$ ($LOQ= 10S_a/b$).

Interferencia:

Los resultados obtenidos, en la prueba t para muestras apareadas, demostraron que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de estándar de DFH con y sin el agregado de los interferentes descritos previamente tanto para el nivel de 1 como 2 $\mu\text{g/mL}$ ($p= 0,16$ y $0,49$ respectivamente.)

Tabla N2: Datos de análisis de interferencia.

Estándar DFH1ug/mL Sin Interferente.	Estándar DFH 1ug/mL con Interferente.	Estándar DFH 2ug/mL sin Interferente.	Estándar de DFH 2ug/mL con Interferente.
1,3	1,0	1,9	1,9
0,9	1,1	2,0	1,8
0,8	0,9	1,8	2,1
0,9	0,4	1,8	1,1
1,8	0,2	1,5	0,9
1,5	0,7	2,0	0,1
1,0	0,8	2,8	0,8
1,3	2,2	2,6	1,5
1,2	1,3	2,3	2,4

1,2	1,0	2,5	2,2
-----	-----	-----	-----

Exactitud:

Se realizó una comparación de KIMS vs HPLC donde se obtuvo la siguiente ecuación de la recta $DFH_{KIMS} = 0,81 * DFH_{HPLC} - 0,03$ con un $R^2 = 1,0$. Tanto la pendiente como la ordenada al origen se encuentran dentro de los parámetros estadísticamente significativos ($p = 0,656$ y $< 0,0001$ respectivamente).

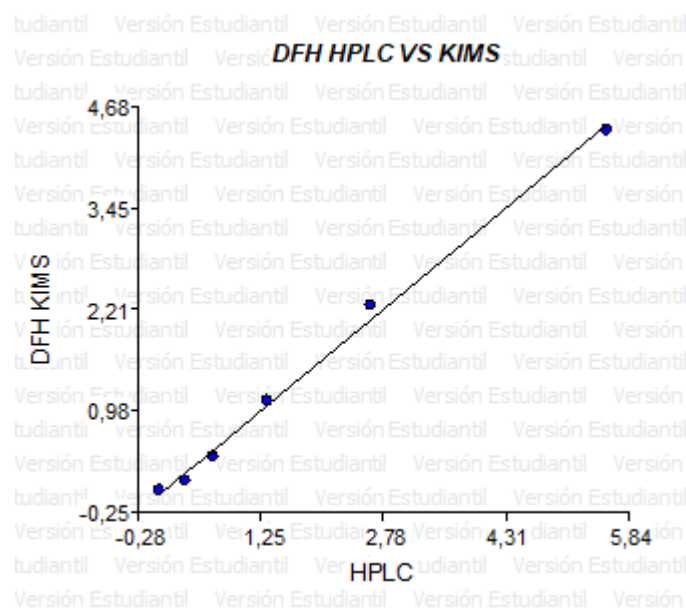


Figura N2: Comparación de métodos, KIMS vs HPLC-UV. $y = 0,81x - 0,03$ $R^2 = 1,0$

Discusión:

Numerosos investigadores realizaron la validación de dosaje de DFH en saliva. En general se observa que los métodos inmunológicos cuantifican por encima del método considerado como referencia.^{11,16,17,18} En nuestro caso también se obtuvo que el método KIMS mide ligeramente más que HPLC, $DFH_{KIMS} = 0,81 * DFH_{HPLC} - 0,03$ coincidiendo con lo que publicaron otros autores.

En el caso de la linealidad obtuvimos una linealidad de 0,41 a 5,0 ug/mL y esto difiere con el de otros trabajos publicados en donde los rangos en general son mayores. Sin

embargo, el rango obtenido por KIMS incluye los niveles de concentraciones de DFH de decisión médica (1-2 ug/mL) en esta matriz.

Respecto del límite de detección en el trabajo realizado por nuestro equipo de trabajo anteriormente, donde se validó el dosaje de DFH en saliva por el método inmunológico FPIA fue de 0,15ug/mL siendo el nuestro igual, 0.14ug/mL, cubriendo las mínimas concentraciones que se necesitan medir en esta matriz.¹¹

Los ensayos de interferencia mostraron que no existe reacción cruzada o interferencia significativa con las drogas que habitualmente se coadministra la DFH, como se ha observado en otros trabajos.^{11,16,18,19}

Conclusión:

Se realizó la validación del método KIMS para cuantificar DFH en la matriz saliva resultando un método con la sensibilidad y especificidad adecuada para el monitoreo de DFH. La validación de esta metodología ofrece una herramienta útil en laboratorio para el seguimiento y control de los pacientes en tratamientos crónicos, pediátricos y de difícil acceso venoso para la cuantificación de DFH en saliva.

Bibliografía:

1 Patsalos P, Berry D. Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs in Epilepsy: A 2018 Update. Therapeutic Drug Monitoring

2 Mc Namara J. Farmacoterapia de las epilepsias. Bruton L, Lazo J, Parker K, editores. Goodman E Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 12 ed, en español, México;2012 p501-25.

3 López-Gonzalez R. Epilepsia, Tratamiento Farmacológico y su Monitoreo. Revista Cúpula 2016; 30 (2): 44-53.

4 Silvado C. E, Terra V. C, Twardowschy C. A. CYP2C9 polymorphisms in epilepsy: influence on phenytoin treatment. Pharmacogenomics and Personalized Medicine 2018:11

5 Guevara N, Maldonado C, Uría M, González R, Ibarra M, Alvariza S, et al. Role of CYP2C9, CYP2C19 and EPHX Polymorphism in the Pharmacokinetic of Phenytoin: A

Study on Uruguayan Caucasian Subjects. *Pharmaceuticals* 2017, 10, 73; doi:10.3390/ph10030073 ¡Error! Referencia de hipervínculo no válida..

6 Aldaz A, Ferriols R, Aumente D, Calvo M. V, Farre M.R, García B, et al. Monitorización farmacocinética de antiepilépticos. *Farm. Hospi.* 2011;35 (6): 326-339.

7 Faye Wu M.; Hing Lim W. Phenytoin: A Guide to Therapeutic Drug Monitoring. *Proceedings of Singapore Healthcare.* Volume 22. Number 3. 2013

8 Hutchinson L, Sinclair M, Bernadette R, Burnett K and Callan B. A descriptive systematic review of salivary therapeutic drug monitoring in neonates and infants. *Br J Clin. Pharmacol* (2018) 84 1089-1108.

9 Liamsuwan S, Jaiweerawattana U. Correlation between serum and salivary phenytoin concentrations in Thai epileptic children. *J Med Assoc Thai.* 2011 Aug;94 Suppl 3: S172-7

10 Tennison M1, Ali I, Miles MV, D'Cruz O, Vaughn B, Greenwood R. Feasibility and acceptance of salivary monitoring of antiepileptic drugs via the US Postal Service. *Ther Drug Monit.* 2004 jun;26(3):295-9.

11 Gonzalez I. I. R, Suarez H. A, Odierna E. R, Rivolta S. E, Hansen C. Fenitoína en Saliva: Cuantificación por FPIA y su Aplicación en la Práctica Clínica.

12 Paxton J. W, Whitinh B and Stephen K. W. Phenytoin Concentrations in Mixed, Parotid and Submandibular Saliva and Serum Measured by Radioimmunoassay. *Br. J. clin. Pharmac.* (1977), 4, 185-191.

13 European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use. 21 July 2011.

14 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline- Second Edition. EP9-A2 Vol 22 N°19 Replaces EP9-A Vol15 N°17.

15 Kabra P. M, Nelson M. A and Marton L.J. Simultaneous Very Fast Liquid-Chromatographic Analysis of Ethosuximide, Primidone, Phenobarbital, Phenytoin, and Carbamazepine in Serum. *CLINICALCHEMISTRY*, Vol. 29, No. 3, 1983 p 473-476.

16 Liu, H; Delgado M.R. Therapeutic Drug Concentration Monitoring Using Saliva Samples Focus on Anticonvulsants. Clin Pharmacokinet 1999; 36 (6): 453-470.

17. Tutor-Crespo, M.J; Hermida, J.; Tutor, J.C. Phenytoin Immunoassay Measurements in Serum Samples From Patients With Renal Insufficiency: Comparison With High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Clinical Laboratory Analysis 21:119–123 (2007).

18. Miles MV., Tennison M., Greenwood R., Evaluation of the Ames Seralyser for the determination of carbamazepine, phenobarbital and phenytoin concentrations in saliva Ther Drug Monit 1990;12:501-10

19 Dolatabadi, R; Mohammadi, A; Nojavan, S.; Yaripour, S.; Tafakhori, A.; Shirangi, M. Electromembrane extraction-high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection of phenobarbital and phenytoin in human plasma, saliva, and urine. Journal of the Chinese Chemical Society. 2021;1–9.