

Comparación de la cromatografía líquida de alta resolución frente al enzimoimmunoensayo de micropartículas para la determinación de sirolimus en trasplante renal

R. Asensi Díez, M. P. Quesada Sanz, E. Valverde Molina, E. de Ramón Garrido¹, J. Gómez Maldonado, I. Muñoz Castillo

Servicios de Farmacia y Medicina Interna. Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga

Resumen

Objetivo: Comparar los niveles de sirolimus obtenidos en sangre total, mediante dos técnicas analíticas: cromatografía líquida de alta resolución y enzimoimmunoensayo de micropartículas y evaluar si los valores de hemoglobina, hematocrito y tiempo transcurrido desde el trasplante renal influyen en los resultados obtenidos con la técnica inmunoenzimática.

Método: Estudio observacional, retrospectivo, en el que se incluyeron de manera consecutiva todos aquellos pacientes trasplantados renales con al menos una determinación de sirolimus, mediante cromatografía líquida de alta resolución y enzimoimmunoensayo de micropartículas, entre los meses de octubre de 2004 a mayo de 2005, ambos inclusive. Para los contrastes estadísticos se utilizaron la regresión lineal simple, el ANCOVA, el coeficiente de correlación intraclase y el método de los límites del acuerdo.

Resultados: Se evaluaron 91 pacientes con un total de 307 determinaciones (mediana: 2, rango intercuartílico: 1-4, rango: 1-15) de sirolimus. La ecuación de la recta mediante análisis de regresión lineal fue la siguiente: MEIA = 0,70 (IC95%: 0,39-1,01)

+ 1,14 (IC95%: 1,10-1,17) x HPLC/UV. El coeficiente de correlación intraclase entre ambas mediciones fue de 0,955 (IC95% 0,944-0,964). La media de sobreestimación por enzimoimmunoensayo fue de 24,8% ± 19,4%. La diferencia de medias entre ambas mediciones fue de 1,9 ± 1,3 ng/mL. Los límites del acuerdo quedaron establecidos entre -0,8 ng/mL (IC95%: -1,05; -0,55) y +4,6 ng/mL (IC95%: 4,35; 4,85). Los factores tiempo postrasplante, hemoglobina y hematocrito no influyeron en la sobreestimación obtenida con el enzimoimmunoensayo. Estos resultados no se vieron influidos por la no independencia de las mediciones.

Conclusiones: A pesar de la sobreestimación del enzimoimmunoensayo en la determinación de sirolimus en sangre total, su correlación con la técnica cromatográfica es aceptable. Esto, unido a las ventajas que presenta frente a las técnicas cromatográficas, hace del enzimoimmunoensayo una buena alternativa en la determinación de sirolimus en sangre total.

Palabras clave: Sirolimus. Cromatografía líquida de alta resolución. HPLC. Enzimoimmunoensayo de micropartículas. MEIA.

Asensi Díez R, Quesada Sanz MP, Valverde Molina E, de Ramón Garrido E, Gómez Maldonado J, Muñoz Castillo I. Comparación de la cromatografía líquida de alta resolución frente al enzimoimmunoensayo de micropartículas para la determinación de sirolimus en trasplante renal. Farm Hosp 2006; 30: 142-148

Trabajo presentado como póster al II Congreso de la Sociedad Andaluza de Farmacia Hospitalaria que se celebró en Jerez de La Frontera los días 21-23 abril de 2005.

Recibido: 11-10-2005
Aceptado: 21-03-2006

Correspondencia: Rocío Asensi Díez. Servicio de Farmacia. Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Avenida de Carlos Haya, s/n. 29010 Málaga. Fax Servicio de Farmacia: 951 291 493. e-mail: rocioasensidiez@hotmail.com

Summary

Objective: To compare sirolimus levels measured in whole blood using two analytical techniques: high-resolution liquid chromatography and microparticle enzyme immunoassay, and to evaluate whether hemoglobin, hematocrit, and time from kidney transplantation influence results obtained using the immune-enzymatic technique.

Method: A retrospective, observational study in which all transplanted patients with at least one measurement of sirolimus levels using high-resolution liquid chromatography or microparticle enzyme immunoassay from October 2004 to May 2005 were consecutively included. For statistical comparisons simple linear regression, ANCOVA, intra-class correlation coefficient, and the method of agreement limits were all used.

Results: Ninety-one patients were assessed for a total of 307 measurements (median: 2, inter-quartile range: 1-4, range: 1-15) of sirolimus levels. The straight-line equation using the linear regression analysis was as follows: MEIA = 0.70 (95% CI: 0.39-1.01) + 1.14 (95% CI: 1.10-1.17) x HPLC/UV. The intra-class correlation coefficient between both measurements was 0.955 (95% CI 0.944-0.964). Mean overestimation using enzyme

immunoassay was $24.8\% \pm 19.4\%$. Difference in means between both measurements was 1.9 ± 1.3 ng/mL. Agreement limits were established between -0.8 ng/mL (95% CI: -1.05 ; -0.55) and $+4.6$ ng/mL (95% CI: 4.35 ; 4.85). Factors such as post-transplant time, hemoglobin, and hematocrit did not influence overestimates obtained using enzyme immunoassays. These results were not influenced by non-independence in measurements.

Conclusions: Despite enzyme immunoassay overestimates in establishing sirolimus levels in whole blood, its correlation with chromatography is acceptable. Added to its benefits versus chromatographic techniques, this renders enzyme immunoassay a good alternative for the measurement of sirolimus levels in whole blood.

Key words: Sirolimus. High-resolution liquid chromatography. HPLC. Microparticle enzyme immunoassay. MEIA.

INTRODUCCIÓN

Sirolimus (SRL, rapamicina) es un antibiótico macrólido, aislado de *Streptomyces hygroscopicus*. Su actividad inmunosupresora se basa en la inhibición de la señal específica para la interleuquina 2 (IL-2), que inhibe la respuesta proliferativa a numerosos estímulos de los linfocitos T y B. El SRL se une a la misma ciclofilina que el tacrolimus (TAC), la FK-BP12, y a través de esta unión inhibe la molécula diana de SRL en mamíferos, la mTOR (*mammalian target of rapamycin*)^{1,2}, una quinasa crítica para la progresión del ciclo celular, produciéndose el bloqueo de varias rutas específicas de transducción de señales. El resultado neto es la inhibición de la activación de los linfocitos y tiene como consecuencia un efecto inmunosupresor.

En la actualidad SRL se suele emplear asociado a ciclosporina A (CsA) y corticoides en la prevención del rechazo agudo en pacientes adultos sometidos a trasplante renal. Se recomienda que se utilice inicialmente con CsA microemulsión y corticosteroides durante dos a tres meses. SRL puede mantenerse como terapia de mantenimiento sólo si la CsA microemulsión puede interrumpirse progresivamente³.

Desde el punto de vista farmacocinético, SRL muestra una semivida de eliminación de 57-62 horas, lo que permite la administración una vez al día. El tiempo para alcanzar la concentración máxima (T_{max}) < 1 hora². Debido a la elevada semivida de eliminación no es necesaria la monitorización diaria. Se aconseja realizar la primera determinación transcurridos al menos 5-7 días desde el inicio de la terapia o de un cambio de dosificación^{4,5}, después una vez a la semana el primer mes y una vez al mes, posteriormente⁶.

Debido a que la CsA actúa como un potente inhibidor del metabolismo del SRL, la administración conjunta de ambos implica un aumento considerable (cuatro a cinco veces) del valor del área bajo la curva (AUC) y de las concentraciones predosis (C_{min}) de SRL. Para minimizar

esta interacción, en los pacientes tratados con CsA, SRL se administra cuatro horas después de la CsA⁷.

Los intervalos recomendados para el sirolimus se basan en métodos cromatográficos. Por término medio, los métodos cromatográficos, tanto de detección ultravioleta como de espectrometría de masas, producen resultados que son un 20% inferior que las determinaciones de la concentración en sangre total por inmunoensayo³. Las C_{min} apropiadas para evitar episodios de rechazo (obtenidas por métodos cromatográficos) se establecen en función de la exposición concomitante a CsA. Se aconseja una $C_{min} = 4-12$ ng/mL en combinación con CsA en la fase de inducción, y una $C_{min} = 12-20$ ng/mL en la fase de mantenimiento sin anticalcineurínico^{1,3}. En general, concentraciones de SRL < 5 ng/mL, se correlacionan con rechazo tisular, mientras que concentraciones > 15 ng/mL se asocian con reacciones adversas^{8,9}.

Una de las razones para monitorizar el SRL es que la dosis administrada es un pobre predictor de la verdadera exposición del fármaco en el organismo. Otra razón es que el metabolismo presistémico y hepático es susceptible, al igual que en el caso de CsA y TAC, a la acción de otros fármacos inductores e inhibidores de las isoenzimas CYP3A4, lo que explica la elevada variabilidad interindividual en el proceso de absorción. Por último, es importante monitorizarlo en pacientes con insuficiencia hepática, ya que el SRL y sus metabolitos se eliminan mayoritariamente por vía biliar y alteraciones graves de la función hepática pueden favorecer una acumulación del medicamento y en consecuencia la aparición de toxicidad^{1,6}.

Aproximadamente el 95% del SRL se localiza en el interior de los glóbulos rojos y un 3% queda libre en el plasma^{2,4,6}. Por este motivo su monitorización se realiza en sangre total anticoagulada con ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), anticoagulante que minimiza los problemas asociados a la coagulación^{5,10}.

El SRL se determina en sangre total mediante cromatografía líquida de alta resolución-detección ultravioleta (HPLC/UV)¹¹⁻¹⁴, cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas (HPLC/MS)^{15,16} y recientemente con inmunoensayos¹⁰ basados en metodología con anticuerpos. El ensayo inmunoenzimático de micropartículas (MEIA) llevado a cabo en un analizador IMx, presenta una serie de ventajas frente a los métodos basados en HPLC como son: facilidad de manejo, disponibilidad del equipo, son semiautomáticos y requieren menor tiempo de preparación y procesamiento de la muestra. Sin embargo, como factor negativo nos encontramos que el SRL se metaboliza principalmente en el hígado, por acción de las isoenzimas CYP3A4, dando lugar a una serie de metabolitos¹⁷ (41-O-desmetil-sirolimus, 7-O-desmetil-sirolimus, 11-hidroxi-sirolimus y 41-O-desmetil-hidroxi-sirolimus), que presentan una reactividad cruzada con el anticuerpo específico empleado en el ensayo MEIA, ocasionando una sobreestimación en las concentraciones de SRL en las muestras de los pacientes trasplantados renales^{3,18,19}.

Varios autores han comparado las concentraciones de SRL obtenidas por HPLC y MEIA. Así, en el trabajo de Salm y cols.⁴ obtienen una sobreestimación de $42,5 \pm 16,9\%$. Estos autores sugieren, a la vista de sus resultados, que los factores tiempo postrasplante y hemoglobina explican en parte esta sobreestimación. Una posible explicación para estos resultados es que, debido al aumento de la concentración de hemoglobina con el tiempo, una mayor proporción de SRL es secuestrado en el interior de los glóbulos rojos, reduciendo así la cantidad de fármaco libre susceptible de ser metabolizado, y por tanto originar metabolitos capaces de ocasionar reactividad cruzada con el anticuerpo usado en el MEIA.

El objetivo de este estudio es comparar los niveles de SRL obtenidos en sangre total mediante dos técnicas analíticas: HPLC/UV y MEIA, en muestras de pacientes trasplantados renales. Secundariamente, evaluar si los valores de hemoglobina, hematocrito y tiempo transcurrido desde el trasplante renal en meses influyen en los resultados obtenidos con la técnica inmunoenzimática.

MÉTODOS

Población de estudio y recogida de datos

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo, en el que se incluyeron consecutivamente todos aquellos pacientes trasplantados renales, con al menos una determinación de SRL mediante las técnicas HPLC/UV y MEIA.

Se registraron los siguientes datos analíticos: C_{min} de SRL (ng/mL) de pacientes trasplantados renales en sangre total, anticoaguladas con EDTA, determinados el mismo día de la extracción de la sangre, en el laboratorio de farmacocinética del servicio de farmacia de nuestro centro hospitalario. El periodo de seguimiento fue entre octubre de 2004 a mayo de 2005, ambos inclusive.

Se recogieron también los siguientes datos: edad, sexo, niveles de hemoglobina y hematocrito y tiempo transcurrido desde el trasplante renal en meses, mediante la revisión de las historias clínicas de los pacientes en la consulta de trasplante renal.

Se elaboró una base de datos Excel para la recogida de datos.

Reactivos e instrumentación

SRL y 32-O-desmetoxirapamicina (SI, estándar interno) fueron proporcionados por los laboratorios Wyeth. Acetonitrilo, acetona, hexano, 1-clorobutano, metanol y agua con calidad HPLC, utilizados en la extracción o en el procedimiento analítico, fueron suministrados por Merck (Alemania). El sulfato de zinc heptahidratado y el hidróxido sódico fueron proporcionados por Panreac (España).

Las determinaciones se realizaron con un equipo de HPLC Waters Corporation 1525, bomba binaria y detector Waters VIS-UV W 2487.

Los datos fueron recogidos y procesados utilizando un software Breeze (Waters Corporation).

Condiciones cromatográficas

Detector VIS-UV: longitud de onda 280 nm.

Bomba binaria: flujo constante 1 mL/min.

Columna: Symmetry 300™ C₁₈ 3,5 μm 4,6 x 150 mm.

Fase móvil: acetonitrilo/agua, 60:40.

Volumen de inyección: 70 μL.

Temperatura del horno (columna): 50 °C.

Preparación de la curva de calibración para HPLC

La curva de calibración se realizó utilizando siete calibradores con concentraciones de: 0,0, 3,0, 6,0, 12,0, 24,0, 36,0 y 60,0 ng/mL de SRL, preparadas a partir de una solución madre de SRL en metanol con una concentración de 1.000 ng/mL. Se calibró cada vez que se introducía un carrusel de muestras.

Preparación de la muestra

El método HPLC/UV se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos publicados por French y cols.²⁰ modificados.

Para la preparación de la muestra se tomaron 500 μL de sangre anticoagulada con EDTA, en tubos desechables de polipropileno, y se añadieron 30 μL de solución de SI (2,5 μg/mL). Los tubos se agitaron vigorosamente durante 40 segundos y a continuación se añadió 1 mL de solución acuosa de sulfato de zinc 5%, seguido de 1 mL de acetona. Se agitaron 1,5 minutos y se centrifugaron a 4.000 rpm durante 8 minutos a temperatura ambiente (TA). Se recogió el sobrenadante y se añadió NaOH (200 μL, NaOH 0,1 M) en cada uno de los tubos, seguidamente se le adicionaron 2 mL de clorobutano. Se agitaron durante un minuto y se centrifugaron a 4.000 rpm 5 minutos.

Una vez centrifugadas las muestras se recogió la capa sobrenadante, sin llegar a tocar la interfase, y se evaporó a sequedad en corriente de helio, en baño maría a 40 °C durante 60 minutos. El residuo se reconstituyó con 150 μL de fase móvil, y a continuación se añadió hexano (500 μL). Se agitó durante 1 minuto y se pasó a microtubos que se centrifugaron a 4.000 rpm durante 3 minutos. Se recuperó la fase inferior (al menos 100 μL) y se pasó a microviales para su posterior analítica.

Enzimoimmunoensayo de micropartículas (MEIA)

La técnica MEIA se llevó a cabo en un analizador IMx (Abbott, Laboratories, EE.UU.). El sistema IMx puede efectuar ensayos inmunológicos utilizando las técnicas de sustrato enzimático fluorescente y de polarización fluorescente. La técnica de inmunoensayo enzimático utiliza habitualmente micropartículas submicrónicas como medio de captura de la sustancia a analizar. Los ensayos que emplean esta técnica se denominan inmunoensayos enzimáticos de micropartículas (MEIA).

Los calibradores y los controles fueron suministrados por la casa comercial (Abbott Laboratories). El ensayo fue calibrado antes del comienzo del estudio y recalibrado tal como viene indicado por el proveedor. Los controles (5,0, 11,0 y 22,0 ng/mL) se pusieron con cada carrusel de muestras.

La validación analítica del ensayo se llevó a cabo mediante el cálculo del coeficiente de variación y la recuperación analítica. Se utilizaron calibradores con concentraciones conocidas de SRL para la técnica HPLC/UV de 3,0, 24,0 y 60,0 ng/mL, y utilizando los controles suministrados por la casa comercial (Abbott Laboratories, EE.UU.) de 5,0, 11,0 y 22,0 ng/mL para la técnica MEIA.

Análisis estadístico

Para la estadística descriptiva se utilizaron la media y la desviación estándar o la mediana y el recorrido intercuartílico (RIC) y el rango para variables cuantitativas y frecuencias para las cualitativas. El acuerdo entre las determinaciones de SRL en sangre por ambas técnicas, HPLC/UV y MEIA, se estableció mediante el coeficiente de correlación intraclase y el análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, así como estableciendo los límites del acuerdo, como han descrito Bland y Altman²¹. Para evaluar la influencia que las variables, edad del paciente, sexo, niveles de hemoglobina, hematocrito y tiempo transcurrido desde el trasplante en meses, pudieran tener en la discordancia entre las dos técnicas de determinación de SRL, se llevó a cabo un análisis de covarianza (ANCOVA) donde se incluyó, como variable resultado, la concentración de SRL en sangre medida por MEIA, y el factor sexo y las covariables concentración de SRL en sangre medida por HPLC, niveles de hemoglobina, hematocrito y tiempo transcurrido desde el trasplante renal en meses, como variables predictoras. Dado que la mayoría de los pacientes tenían más de una medición, en los análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados y ANCOVA se incluyó en el modelo, tal y como recomiendan Bland y Altman²², un factor correspondiente al paciente evaluado, de forma que se pudiese valorar la variabilidad intrasujeto y resolver así el problema de la no independencia de las mediciones. Se consideró significativa una $p < 0,05$ en pruebas para dos colas. El análisis

estadístico se llevó a cabo usando los paquetes estadísticos SPSS versión 11.5.

RESULTADOS

Se estudiaron 91 pacientes, 35 mujeres (38,5%) y 56 hombres (61,5%), con un total de 307 determinaciones (mediana: 2; RIC: 1-4; rango: 1-15). El promedio de edad de las mujeres fue $49,6 \pm 13,0$ años y el de los hombres $50,6 \pm 14,2$ años. La media de tiempo desde el trasplante en meses fue de $40,50 \pm 46,14$ meses. Se excluyeron 7 muestras cuyos valores de SRL con HPLC/UV superaban los 30 ng/mL ya que el límite de detección máximo de SRL por MEIA en el IMx es de 30 ng/mL.

Basándonos en las muestras usadas como control de calidad, y siguiendo las recomendaciones científicas²³ para comprobar la fiabilidad de los aparatos de medida HPLC/UV y MEIA, se calculó la imprecisión (expresada como el coeficiente de variación) y la recuperación analítica. Estos resultados están resumidos en la tabla I.

Tabla I. Intervalo de imprecisión y recuperación analítica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC/UV) (n = 84) y enzimoimmunoensayo de micropartículas (MEIA) (n = 114) para la determinación de SRL en sangre total

Método	Sirolimus (ng/mL)	Media \pm DE	Imprecisión CV (%)	Recuperación analítica (%)
HPLC/UV	3,00	3,04 \pm 0,34	11,18	101,34
	24,00	24,60 \pm 1,73	7,03	102,50
	60,00	60,79 \pm 3,59	5,90	101,32
MEIA	5,00	4,86 \pm 0,35	7,20	97,20
	11,00	10,50 \pm 0,53	5,04	95,45
	22,00	21,40 \pm 1,38	6,44	97,27

DE = desviación estándar; CV = coeficiente de variación.

Los valores mínimo y máximo de SRL medidos por HPLC/UV fueron de 1,70 y 22,45 ng/mL y por MEIA fue de 2,10 y 26,80 ng/mL. Sólo una de las determinaciones dio un valor superior en la determinación por HPLC/UV. En el resto de las determinaciones siempre fueron superiores los valores obtenidos con MEIA.

En ninguno de los análisis de regresión lineal y ANCOVA la variabilidad intrasujeto, incluida en el modelo como un factor correspondiente al paciente evaluado, según recomiendan Bland y Altman²², mostraron significación estadística, por lo que en los resultados que se presentan no se ha considerado esta variable.

La nube de puntos muestra las concentraciones de SRL en sangre total en cada uno de los pacientes obtenida por ambos métodos (Fig. 1).

El análisis de regresión lineal de los datos muestra que la ecuación de la recta que mejor se ajusta a los puntos sería la siguiente:

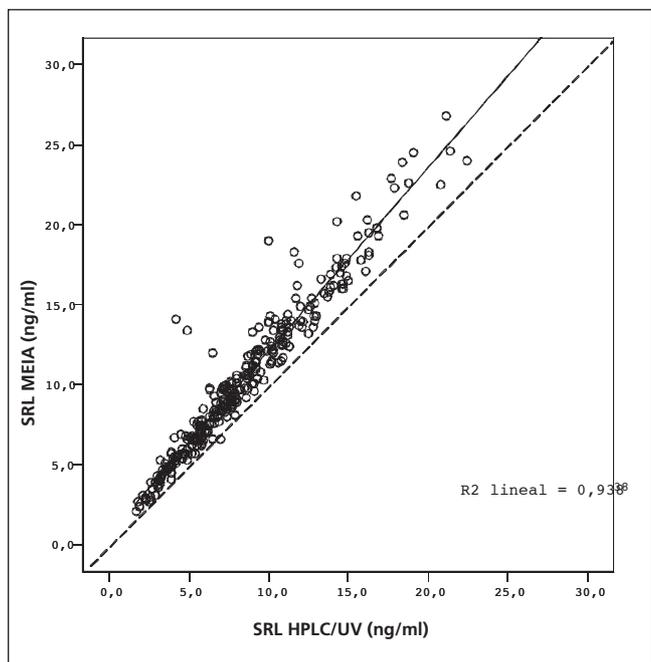


Fig. 1.- Comparación de niveles de SRL (300 muestras predosis obtenidas de 91 pacientes) medidas por ensayo de micropartículas (MEIA) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC/UV). La línea recta representa la línea de regresión de los datos y la línea discontinua la línea de identidad de los datos.

$$\text{MEIA} = 0,70 \text{ (IC95\%: } 0,39\text{-}1,01) + 1,14 \text{ (IC95\%: } 1,10\text{-}1,17) \times \text{HPLC/UV}$$

$$(r^2 = 0,938; n = 300)$$

El coeficiente de correlación intraclass entre ambas mediciones fue de 0,955 ([IC95%]: 0,944-0,964).

El porcentaje de sobreestimación del MEIA con respecto al HPLC/UV fue de $24,8 \pm 19,4$ ng/mL (IC95% 22,6-27,0 ng/mL).

La figura 2 muestra la nube de puntos formados por la intersección de la diferencia de las concentraciones de SRL, representadas en el eje de ordenadas, y las concentraciones medias de SRL, representadas en el eje de abscisas, de cada sujeto, determinadas por los dos métodos (MEIA-HPLC/UV). La media de las dos determinaciones se toma como valor real para cada sujeto y la diferencia entre ellas como la medida del desacuerdo, de forma que los límites del acuerdo quedan determinados por la media de las diferencias \pm dos veces la desviación estándar de dichas diferencias.

La media de las diferencias fue de $1,9 \pm 1,3$ ng/mL, lo que nos indica la discrepancia entre ambos métodos mediante el cálculo de los límites del acuerdo. El 95% de las diferencias de nuestra muestra se encontraron entre -0,8 y +4,6 ng/mL. El IC95% de la media de las diferencias sería 1,75-2,05 y el IC95% de los límites del acuerdo serían: -1,05; -0,55, para el límite inferior y 4,35; 4,85

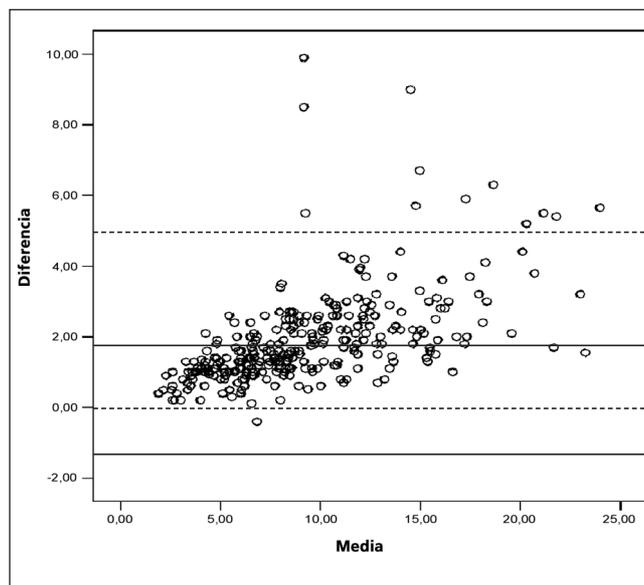


Fig. 2.- Nube de puntos donde se representan las diferencias frente a las medias de los niveles predosis de SRL obtenidos con las dos técnicas (HPLC/UV y MEIA). La línea continua representa la media de las diferencias. La línea de puntos representa ausencia de diferencias entre ambos métodos. Las dos líneas discontinuas representan el margen inferior del intervalo de confianza al 95% del límite del acuerdo inferior y el margen superior del intervalo de confianza al 95% del límite del acuerdo superior, respectivamente.

para el límite superior. Es decir, que mediante este método podemos concluir que el grado máximo de desacuerdo entre las dos técnicas de medición podría establecerse entre -1,05 y 4,85 ng/mL, tal como se muestra en la figura 2 (líneas discontinuas).

Respecto a las variables recogidas, hemoglobina, hematocrito y tiempo transcurrido desde el trasplante renal, realizamos un análisis de ANCOVA y no obtuvimos significación estadística, al comparar los niveles de SRL obtenidos por MEIA con los meses desde el trasplante, hemoglobina y niveles de SRL obtenidos por HPLC/UV.

DISCUSIÓN

El SRL es un fármaco utilizado actualmente en la práctica clínica como parte del régimen de inmunosupresión en los pacientes trasplantados renales. Su determinación en sangre total es fundamental para mantener el SRL dentro del rango terapéutico.

Por ello es importante disponer de técnicas de determinación rápidas, de fácil manejo y accesibilidad para la rutina diaria.

En nuestro estudio, ambas técnicas presentan una aceptable imprecisión y recuperación analítica con los

controles usados, lo que está en concordancia con otros estudios realizados^{4,24,25}.

El grado máximo de desacuerdo entre las dos técnicas de medición se establece entre -1,05 y +4,85 ng/mL. Así, en la figura 2 observamos que, como es habitual en todas las técnicas de determinación analítica, la discordancia entre ambas técnicas es mucho mayor a medida que nos referimos a valores más elevados de SRL. Puede verse que es a partir de valores superiores a 15 ng/mL cuando la nube de puntos se hace más dispersa. Por tanto, aunque el grado de desacuerdo indicado, entre -1,05 y +4,85 ng/mL, puede parecer excesivo a la vista de los estrechos márgenes en los que se recomienda que se mantengan los niveles de SRL en pacientes con trasplante renal, en los niveles terapéuticos el grado de desacuerdo sería menor y por tanto más aceptable.

Varios autores han comparado las técnicas de HPLC y MEIA obteniendo los siguientes resultados:

El inmunoensayo original para determinar SRL (Abbott Diagnostics, Chicago, Illinois, EE.UU.) presentaba una desviación positiva del 21% al comparar MEIA con HPLC/MS/MS¹⁰. En este caso, la reactividad cruzada con los metabolitos circulantes fue aproximadamente del 40% con los hidroximetabolitos y de un 120% con el 41-O-desmetil-sirolimus. La ecuación de la recta que se obtuvo al comparar los dos métodos en 24 muestras de 6 pacientes que recibían SRL está reflejada en la Tabla II.

En otro estudio realizado por Holt y cols.²⁴ se obtuvo una desviación media positiva de un 21,6% con el inmunoensayo. La ecuación de la recta al comparar las dos técnicas (MEIA y HPLC-MS) en 129 muestras de 108 pacientes trasplantados renales que recibían SRL, está reflejada en la tabla II.

Salm y cols.²⁵ estudiaron 125 muestras procedentes de 25 pacientes que recibían SRL. La ecuación de la recta viene reflejada en la tabla II.

La desviación media expresada como porcentaje (\pm DE) entre los dos métodos para muestras de pacientes trasplantados renales fue de $41,9 \pm 15,3\%$.

Posteriormente en otro estudio, Salm y cols.⁴ encontraron una sobreestimación de $42,5 \pm 16,9\%$ de MEIA al compararlo con HPLC-MS. Esta tendencia a la sobreestimación se explicaría por la reactividad cruzada de los metabolitos circulantes con el anticuerpo usado en la técnica MEIA. La ecuación de la recta, mediante análisis de regresión lineal, que obtienen al comparar las dos técnicas en 841 muestras de 74 pacientes trasplantados renales que recibían dosis orales de SRL viene reflejada en la tabla II.

Nosotros obtenemos una desviación media positiva de $24,8 \pm 19,4\%$. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores como Holt y cols.²⁴, desviándose bastante de los obtenidos por otros autores como es el caso de Salm y cols.^{4,25}.

Respecto a los niveles de hemoglobina, hematocrito y tiempo transcurrido desde el trasplante renal en meses

Tabla II. Ecuaciones de la recta obtenidas por distintos autores al comparar determinaciones de SRL obtenidos con las técnicas: HPLC y MEIA

Autores/año	Ecuación de la recta
Jones y cols. ¹⁰ 2000	MEIA = 1,27 x HPLC-1,6 ($r^2 = 0,81$)
Holt y cols. ²⁴ 2005	MEIA = 1,11 x HPLC + 0,97 ($r^2 = 0,92$)
Salm y cols. ²⁵ 1999	MEIA = 1,39 ($\pm 0,04$) x HPLC-MS + 1,30 ($\pm 0,46$) $\mu\text{g/l}$ ($r = 0,951$; $S_{yx} = 2,46$; $n = 125$)
Salm y cols. ⁴ 2000	MEIA = 1,37 ($\pm 0,01$) x HPLC-MS + 1,40 ($\pm 0,17$) $\mu\text{g/L}$ ($r = 0,960$, $S_{yx} = 2,76$, $n = 841$)

r: coeficiente de correlación; r^2 : coeficiente de determinación; S_{yx} : desviación estándar de la regresión.

no se ha observado influencia en la correlación existente entre las dos mediciones de SRL, ni en el análisis univariante ni en el realizado mediante ANCOVA. La discrepancia con los resultados observados por Salm y cols.⁴ puede explicarse por el hecho de que nuestro tamaño muestral es menor que el suyo y en consecuencia dispongamos de una menor potencia estadística. Salm y cols.⁴ obtuvieron mediante un análisis de regresión lineal que la concentración de SRL obtenida por HPLC-MS ($p = 0,03$), hemoglobina ($p < 0,001$) y tiempo desde el trasplante ($p < 0,001$) tenían significación estadística a la hora de predecir la sobreestimación producida por MEIA, explicando el 22% de la sobreestimación.

Por todo ello, concluimos que a pesar de la sobreestimación obtenida, la correlación que se observa al comparar ambos métodos es aceptable. La facilidad de manejo, el uso de equipos semiautomáticos, así como el menor tiempo de preparación y procesamiento de las muestras, hacen del MEIA una buena alternativa en la determinación de niveles de SRL, accesible a mayor número de laboratorios para la rutina diaria que las técnicas cromatográficas. Sin embargo, factores de riesgo tales como, una función hepática alterada o el empleo concomitante de fármacos que pudiesen alterar el metabolismo del SRL, podrían dar lugar a grandes cantidades de metabolitos que contribuirían a una sobreestimación aún mayor, lo que hace que haya que prestar especial atención a este tipo de pacientes cuando se determinen niveles de SRL por MEIA. Por otra parte, el acuerdo entre ambas técnicas no es el ideal, por lo que sería interesante llevar cabo estudios prospectivos en los que se evaluara la utilidad del MEIA, teniendo como resultado variables de interés clínico como las tasas de rechazo o infección de los pacientes trasplantados.

Bibliografía

1. Brunet Serra M. Farmacocinética y farmacodinámica de los fármacos inmunosupresores. En: Bruno Montoro J, Pascual J, editores. Farmacoterapia del trasplante de órganos, módulo II. Barcelona: SCM; 2003. p. 75-100.
2. Braun WE. Renal transplantation: basic concepts and evolution of therapy. *J Clin Apher* 2003; 18: 141-52.
3. Ficha técnica Rapamune (consulta julio 2005). Disponible en: <http://www.emea.eu.int/>.
4. Salm P, Taylor PJ, Pillans PI. The quantification of sirolimus by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and microparticle enzyme immunoassay in renal transplant recipients. *Clin Ther* 2000; 22 (Supl. B): 71-85.
5. Yatscoff RW, Boeckx R, Holt DW, Kahan BD, Legatt DF, Soldin SJ, et al. Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring of rapamycin: report of the consensus panel. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 676-80.
6. Aumente MD. Trasplantes. En: Bonal Falgas J, Domínguez Gil-Hurlé A, Gamundi Planas MC, Napal Lecumberri V, Valverde Molina E, editores. Farmacia Hospitalaria. Tomo II. 3ª ed. 2002. p. 1563-600.
7. Podder H, Stepkowski SM, Napoli KL, Clark J, Verani RR, Chou TC, et al. Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus /ciclosporine combinations. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1059-71.
8. Adis International Limited. Therapeutic drug monitoring. Is it important for newer immunosuppressive agents? *Drug Ther Perspect* 2001; 17: 8-12.
9. Kahan BD, Napoli KL. Role of therapeutic drug monitoring of rapamycin. *Transplant Proc* 1998; 30: 2189-91.
10. Jones K, Saadat-Lajevardi S, Lee T, Horwatt R, Hicks D, Johnston A, et al. An immunoassay for the measurement of sirolimus. *Clin Ther* 2000; 22 (Supl. B): 49-61.
11. Napoli KL, Kahan BD. Routine clinical monitoring of sirolimus (rapamycin) whole-blood concentrations by HPLC with ultraviolet detection. *Clin Chem* 1996; 42: 1943-8.
12. Svensson JO, Brattström C, Säwe J. Determination of rapamycin in whole blood by HPLC. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 112-6.
13. Yatscoff RW, Faraci C, Bolingbroke P. Measurement of rapamycin using reverse-phase high performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 1992; 14: 138-41.
14. Holt DW, Lee T, Johnston A. Measurement of sirolimus in whole blood using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Clin Ther* 2000; 22 (Supl. B): 38-48.
15. Streit F, Christians U, Schiebel HM, Napoli KL, Ernst L, Linck A, et al. Sensitive and specific quantification of sirolimus (rapamycin) and its metabolites in blood of kidney graft recipients by HPLC/electrospray-mass spectrometry. *Clin Chem* 1996; 42: 1417-25.
16. Holt DW, Lee T, Jones K, Johnston A. Validation of an assay for routine monitoring of sirolimus using HPLC with mass spectrometric detection. *Clin Chem* 2000; 46: 1179-83.
17. Holt DW, McKeown DA, Lee TD, Hicks D, Cal P, Johnston A. The relative proportions of sirolimus metabolites in blood using HPLC with mass-spectrometric detection. *Transplant Proc* 2004; 36: 3223-5.
18. Holt DW, Denny K, Lee TD, Johnston A. Therapeutic monitoring of sirolimus: its contribution to optimal prescription. *Transplant Proc* 2003; 35 (Supl. 3A): 157-61.
19. Napoli KL, Taylor PJ. From beach to bedside: history of the development of sirolimus. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 559-86.
20. French DC, Saltzgueber M, Hicks DR, Cowper AL, Holt DW. HPLC assay with ultraviolet detection for therapeutic drug monitoring of sirolimus. *Clin Chem* 2001; 47: 1316-9.
21. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1: 307-10.
22. Bland JM, Altman DG. Calculating correlation coefficients with repeated observations: Part 1-correlation within subjects. *BMJ* 1995; 310: 446.
23. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetics studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1991; 16: 249-55.
24. Holt DW, Moreton M, Laamanen K, Johnston A. A microparticle enzyme immunoassay to measure sirolimus. *Transplant Proc* 2005; 37: 182-4.
25. Salm P, Taylor PJ, Pillans P. Analytical performance of microparticle enzyme immunoassay and HPLC-tandem mass spectrometry in the determination of sirolimus in whole blood. *Clin Chem* 1999; 45: 2278-80.