

MONITOREO TERAPÉUTICO DE VANCOMICINA. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN MEDIANTE DISEÑO EXPERIMENTAL DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO.

Alasino Ariana^A

^A Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas UNL

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Bioquímica

Grupo: X

Palabras clave: Vancomicina, Monitoreo Terapéutico, Cromatografía Líquida

INTRODUCCIÓN

La vancomicina (VCM) es un antibiótico utilizado principalmente para tratar infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Si se administra en altas concentraciones puede producir nefrotoxicidad y ototoxicidad. Por otro lado, la terapia con niveles subterapéuticos provoca falla en el tratamiento y el riesgo de generar resistencia microbiana, tal como lo explican Rostas y col.; 2014. Se recomiendan valores plasmáticos de VCM en el valle de entre 15 – 20 µg/mL para evitar el posible desarrollo de resistencia y valores en el pico de entre 30-40 µg/mL para evitar los posibles efectos tóxicos. El monitoreo terapéutico de drogas (MTD) permite ajustar las dosis para que los pacientes puedan alcanzar estos niveles. Existen varias técnicas que se han empleado para la determinación de VCM en fluidos biológicos. Diferentes autores (Najjar y col.; 1995; Sattur y col.; 2000), demostraron que las técnicas separativas, como la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) presentan un mejor desempeño que las técnicas inmunológicas, debido a su alta selectividad y reproducibilidad. El mayor desafío en el desarrollo de un método selectivo para VCM es lograr separarla de la gran variedad y diversidad de fármacos que suelen co-administrarse, entre ellos: cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, trimetoprima, sulfametoxazol, ranitidina, colistina, amikacina, ampicilina, difenilhidramina, piperacilena, meropenem, voriconazol, meprednisona, omeprazol, aciclovir, anfotericina, fluconazol y dexametasona. El diseño de experimentos es una valiosa herramienta que permite alcanzar, mediante un número reducido y razonable de experimentos, los valores óptimos para las variables de un sistema, aún cuando hay complejas interacciones entre ellas. La optimización simultánea de varias respuestas mediante la utilización de la función deseabilidad de Derringer es además, sumamente útil para lograr alta eficiencia en el sistema, tal como lo explican en su trabajo Vera Candiotti y col.; 2014. Finalmente, la validación del método bioanalítico permite evaluar si el mismo es capaz de brindar resultados confiables en su aplicación en los análisis de rutina. La guía de validación de la Agencia Médica Europea (European Medicines Agency – EMEA) define elementos claves necesarios para llevar a cabo la validación de métodos bioanalíticos aplicados a la determinación de la concentración de drogas en matrices biológicas (suero, plasma, sangre, orina, etc).

Proyecto: “Diseño y validación de estrategias analíticas para el análisis de muestras complejas relacionadas con la industria farmacéutica y la alimentación. Aplicación de métodos quimiométricos y procedimientos para la estimación de la incertidumbre de medición.” Código del Proyecto: 50120110100025, CAI+D PI-2011, UNL.

Director del proyecto: Dra. María Silvia Cámara; Co-Director: Dra. María Mercedes De Zan

Director del becario/tesista: Dra. María Mercedes De Zan

OBJETIVOS

Desarrollar un método analítico por CLAR aplicable al monitoreo terapéutico de VCM. Aplicar métodos de diseño experimental para optimizar las condiciones de la separación cromatográfica. Validar el método desarrollado siguiendo normativas de EMEA.

METODOLOGÍA

OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Se desproteinizaron 200 μL de plasma con ácido perclórico, se inyectaron 20 μL de sobrenadante. Se utilizó una columna Poroshell 120 EC-C18 3.0 x 75 mm con un tamaño de partícula de 2.7 μm , en un cromatógrafo líquido Agilent 1260 Infinity con detector de arreglo de diodos. Se estudió la interferencia producida por 19 fármacos que suelen co-administrarse con VCM. El pH, la composición de la fase móvil (FM) (buffer de fosfato: metanol) y la temperatura del horno de columna se optimizaron quimiométricamente empleando un diseño Box-Behnken con un total de 17 experimentos previamente planificados. La longitud de onda se fijó en 240 nm y la velocidad de flujo en 0.4 mL/min. Las respuestas evaluadas fueron el tiempo de retención de la VCM (tR), la resolución de VCM con ceftazidima (R1), la resolución de VCM con trimetoprima (R2) y la pureza del pico de VCM (P). El óptimo global para las tres respuestas se calculó utilizando la función deseabilidad de Derringer.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO

Se realizaron los siguientes experimentos utilizando el método optimizado para evaluar los criterios de aceptación (CA) de EMEA.

Interferencias de la matriz blanco, hemólisis y medicación concomitante: Se inyectaron 6 plasmas provenientes de personas que no se encontraban bajo tratamiento con VCM, 3 muestras hemolizadas y una solución que contenía todos los fármacos que pueden co-administrarse con VCM. CA: Resolución aceptable con componentes endógenos, productos de hemólisis y medicación concomitante.

Límite inferior de cuantificación (LIC): Se prepararon soluciones de VCM de 0.5, 1.0 y 2.0 $\mu\text{g/mL}$. CA: La concentración predicha debe encontrarse dentro del 20 % del valor nominal y un CV <20 %.

Curva de calibrado: Se realizaron 3 curvas de calibrado de 7 niveles cada una. El rango estudiado fue de 1.00 $\mu\text{g/mL}$ a 60.0 $\mu\text{g/mL}$. Se evaluó linealidad. CA: La recuperación en cada punto de calibrado debe estar dentro del 15 % del valor nominal, excepto para el LIC que puede ser de 20 %.

Exactitud: Se prepararon 4 muestras control en el nivel LIC (MC-LIC), bajo (MC-B), medio (MC-M) y alto (MC-A). Para evaluar la exactitud entre corridas, se repitió el ensayo en un día diferente. CA: El valor promedio de concentración predicha para cada una de las muestras controles debe estar dentro del 15 % del valor nominal, excepto para MC-LIC que puede ser de 20 %.

Precisión: Se calculó el coeficiente de variación (CV) de las áreas obtenidas para cada nivel de las muestras controles evaluadas en el ensayo de exactitud. CA: El CV debe ser menor al 15 % en todos los casos.

Efecto de la dilución: Este ensayo se realizó para verificar si la dilución de la muestra afectaba el resultado final, en el caso de tener muestras fuera del rango de calibración. Se prepararon muestras diluidas y muestras control. CA: Las muestras diluidas deben cumplir con los criterios de exactitud y precisión.

Estabilidad de la solución stock: Se inyectó durante 4 días una solución acuosa de VCM y se evaluó el área del pico principal y la aparición de picos secundarios.

Comparación con un inmunotest: Los resultados obtenidos al aplicar el método desarrollado al análisis de 17 muestras reales se compararon estadísticamente con

los valores informados por el inmunotest comercial VANC2 de Roche Diagnostics GmbH, importado desde Alemania.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se muestran las condiciones experimentales y los valores óptimos de las respuestas que se obtuvieron como resultado de la optimización.

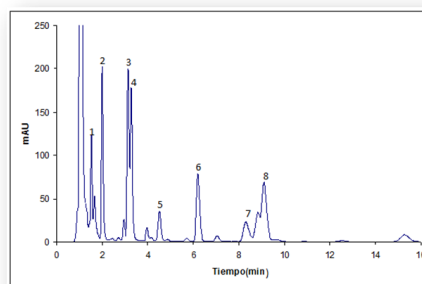
% Metanol	pH	Temp. (°C)	D
15.1	2.77	40	0.5
tr	R1	R2	P
4.52	6.76	6.84	0.87

Tabla 1: Niveles óptimos de los factores y valores óptimos de las respuestas. Donde D es el valor de la función deseabilidad.

Estudios de interferencias de la matriz blanco y muestras hemolizadas: En el tiempo de retención correspondiente a la VCM no se observó señal producida por la matriz blanco ni por muestras hemolizadas.

Estudio de interferencias producidas por medicación concomitante: Los fármacos que absorben en la longitud de onda de trabajo presentaron una excelente resolución con la VCM, tal como puede observarse en la **Figura 1**.

Figura 1: Cromatograma luego de la optimización de una muestra de plasma conteniendo fármacos co-administrados. Donde: 1 (ceftriaxona); 2 (ranitidina); 3 (ceftazidima); 4 (excipiente); **5 (VCM)**; 6 (trimetoprima); 7 (sulfametoxazol); 8 (cefotaxima). Los picos adyacentes a la vancomicina corresponden al plasma blanco.



LIC: Se estableció el LIC como 1.00 µg/mL de VCM, ya que es la menor concentración estudiada que cumple con los criterios de precisión y exactitud especificados en la EMEA.

Curva de calibrado: Todas las curvas realizadas cumplen el test de falta de ajuste y la linealidad en el rango estudiado. En la **Figura 2** se muestra una curva de calibrado cuya ecuación resultó: $y=13.0x-3.17$. Las recuperaciones estuvieron entre 93.7 y 106 % para todos los calibradores cumpliéndose los CA.

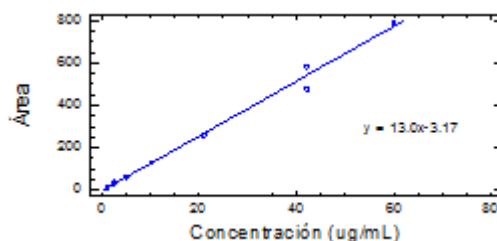


Figura 2: Curva de calibrado.

Exactitud y precisión: En la **Tabla 3** se muestran los resultados obtenidos para el ensayo de exactitud y precisión, intra e inter-ensayo. Los mismos demuestran que el método es exacto y preciso.

Nivel	Intra-ensayo		Inter-ensayo	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
MC-LIC	94.0	2.20	98.3	9.00
MC-B	106	10.8	104	12.0
MC-M	108	6.20	95.2	7.10
MC-A	103	4.00	95.2	7.00

Tabla 3: Exactitud y Precisión intra e inter ensayo.

Efecto de la dilución: Las muestras diluidas cumplen con los criterios de exactitud y precisión, con lo que se demuestra que la dilución de la muestra con plasma blanco no afecta el resultado final; por lo que se podrán procesar por este método muestras que estén fuera del rango de calibración.

Estabilidad de la solución stock: El área del analito se mantuvo estable ($\pm 20\%$) durante 3 días conservada en heladera en envase oscuro.

Comparación con el inmunotest: Se realizó un análisis estadístico descriptivo de las diferencias entre las concentraciones obtenidas utilizando el método desarrollado y el inmunotest (CLAR-INMUNO) mediante la aplicación de una prueba t por parejas. Así se pudo comprobar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de ambos métodos, ya que el estadístico t obtenido (2.34) fue mayor que el valor crítico (1.75) para un nivel de significancia $\alpha=0.05$, demostrándose que el inmunoensayo proporciona resultados significativamente superiores que el método cromatográfico. De esta manera se demostró la mayor selectividad del método cromatográfico frente al inmunoquímico.

CONCLUSIONES

El trabajo desarrollado permitió obtener un método rápido, selectivo y con buen desempeño en precisión y exactitud para la determinación de VCM en plasma por CLAR, presentando resultados más selectivos que el inmunokit. Estas características convierten a este método en una valiosa herramienta para el monitoreo terapéutico de rutina de los pacientes en tratamiento con VCM, propiciando la toma de decisiones médicas para un tratamiento personalizado.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Rostas S., Kubiak D., Calderwood M.,** 2014. High-Dose Intravenous Vancomycin Therapy and the Risk of Nephrotoxicity. *Clinical Therapeutics*, 36, 1098-1101.
- Najjar T., Al-Dhuwailie A., Tekle A.,** 1995. Comparison of high-performance liquid chromatography with fluorescence polarization immunoassay for the analysis of vancomycin in patients with chronic renal failure. *Journal of Chromatography B*, 672, 295-299.
- Sattur A., Lee J., Song K., Panda T., Kim C., Rhee S.,** 2000. Analytical Techniques for Vancomycin - A Review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5, 153-158.
- Vera Candiotti L., De Zan M., Cámara M., Goicochea H.,** 2014. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, 124, 123-138.