

Reporte de validación de método bionalítico basado en difusión en gel para la determinación de cefepime

Parra, Daniel S.; Álvarez Rodríguez, José Camilo
dsparrag@unal.edu.co

Farmacocinética poblacional en el manejo empírico de infecciones en pacientes con neoplasias hematológicas y neutropenia febril posquimioterapia
23 de diciembre de 2019

Introducción

Se analizaron los resultados de una validación de método bionalítico para la determinación de cefepime en muestras séricas. El método consistía en un bioensayo con medición por diámetro de halo de inhibición y difusión en gel de agar. El microorganismo de referencia para el ensayo es la cepa ATCC (*Bacillus subtilis*) congelado, este se extrajo por medio de un asa, y se sembró por agotamiento en una caha de petri con AGAR ANTIBIÓTICO N.º 1.

El cultivo se dejó en incubación por 24 horas a 37°C, de esta caja se extrajeron muestras de colonias adicionales, hasta obtener el microorganismo deseado. El microorganismo pasó a ser replicado de manera masiva en colonias aisladas, dentro de tubos con agar inclinado bajo las mismas condiciones de incubación. Se elaboró una suspensión de los microorganismos con el diluyente buffer fosfatos a pH 8.0, que se adicionó a las placas. Las suspensiones fueron mantenidas en refrigeración hasta su cinco días antes de su uso, con el fin de realizar la utilización del microorganismo en forma esporulada.

A las suspensiones obtenidas se les adicionó buffer fosfatos 100mM a pH 7.0, y se realizaron mediciones a λ de 600nm para garantizar una suspensión estandarizada de 10^7 a 10^8 UFC/mL, se realizó ajuste con blanco de buffer fosfatos 100mM a pH 7.0. La suspensión estandarizada fue liofilizada y congelada hasta su utilización. Las placas con antibióticos se prepararon con una proporción de 1mL de suspensión, y 100mL de medio antibiótico.

En cada caja de petri se colocaron 6 a 7 cilindros (*pen cylinders*), se adicionó 5mL de agar fundido sin inóculo, se esperó a su solidificación y se adicionaron 5mL de agar fundido inoculado. Una vez se encontraba todo el agar solidificado se retiraron los cilindros mediante una pinza de garra.

La solución madre de cefepime se preparó en una mezcla 50:50 de acetonitrilo:agua a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Las soluciones stock se prepararon a partir de la solución madre con diluciones 1 a 2 en agua, hasta obtener 12 concentraciones de cefepime diferentes.

En cada uno de los pozos del agar se adicionaron 100 μL de cada solución stock, cada ensayo se realizó con 5 repeticiones. Tras un periodo de pre-difusión de 30 minutos de cada caja, se llevaron las mismas a incubación por 6 horas a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se realizó la lectura de los halos de inhibición formados con el antibiótico, con un calibrador digital. Los halos de inhibición eran aceptables si tenían un diámetro entre 10 a 25mm, y un aspecto regular.

1. Metodología y Resultados

Se realizó una verificación de los resultados de validación de método bioanalítico, teniendo en cuenta los criterios de aceptación de la guía de EMA (1).

Se analizaron los resultados de seis (6) curvas de calibración realizadas en días diferentes con plasma proveniente de pacientes que no habían recibido antibióticos. A este plasma se le agregó estándar de referencia de cefepime con el fin de obtener concentraciones conocidas del mismo. En cada curva de calibración se tenían cinco (5) niveles de concentración, equivalentes a $3.125\mu\text{g/mL}$, $6.25\mu\text{g/mL}$, $12.5\mu\text{g/mL}$, $25\mu\text{g/mL}$, y $50\mu\text{g/mL}$, con cinco repeticiones en cada nivel, y 5 repeticiones adicionales en el nivel $12.5\mu\text{g/mL}$.

1.1. Identificación de valores anormales

Se realizó un análisis de identificación de *outliers*, mediante métodos univariados y bivariados. En el método bivariado se buscaron datos atípicos dentro de cada curva de calibración y cada nivel de concentración. Cada curva de calibración provenía de una serie de pacientes (**P**) específica, tenía una fecha de elaboración específica (**F**), y un autor específico (**A**).

En el caso univariado se consideró un dato como atípico a aquel que tuviera un valor por fuera del límite definido entre $[Q1 - 1.5 \cdot IQR, Q3 + 1.5 \cdot IQR]$. Para ello se realizó un análisis de cuartiles dentro de cada subgrupo formado por la combinación de **P**, **F**, **A**, y **N**. En la Figura 1 se puede observar un diagrama con los datos encontrados para cada subgrupo, en forma de diámetro (ϕ) de halo de inhibición estandarizado ($z_i = (x_i - \bar{x})/\sigma_s$) para cada subgrupo. Se resaltan estos datos por su número de identificación en un gráfico de cajas, con cada nivel de concentración.

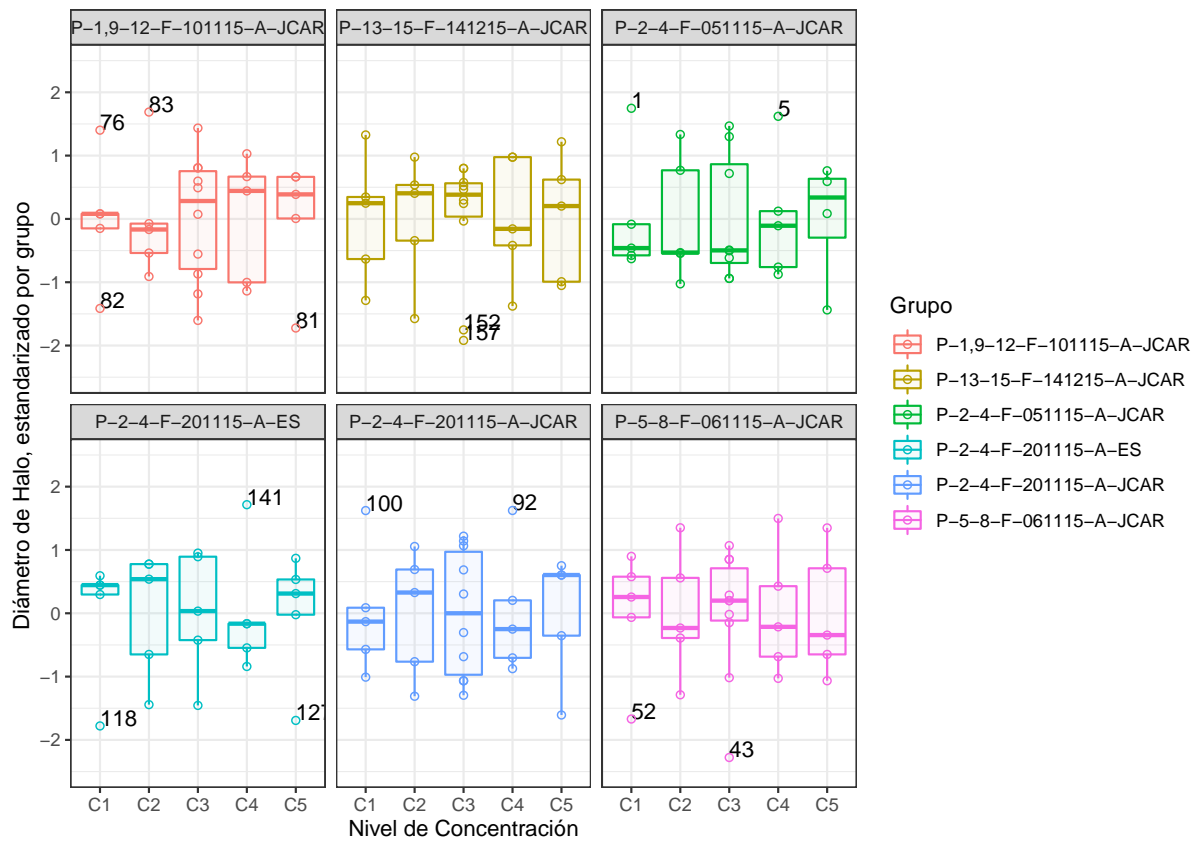


Figura 1: Análisis de datos atípicos por método univariado.

Se realizó un análisis de los datos de forma bivariada para encontrar datos atípicos. Se ajustó un modelo de regresión lineal, para ello se tomaron los datos de ϕ promedio por subgrupo, y se ajustaron como variable dependiente, frente a logaritmo natural de la concentración nominal ($\ln C_{nom}$) como variable independiente. Con el modelo y los datos originales de ϕ se realizó la retropredicción de los datos de

concentración C_{pred} , y estos se graficaron frente a los valores de concentración nominal C_{nom} .

En la Figura 2 se puede observar el gráfico de bondad de ajuste con una línea de tendencia central, la curva de cada subgrupo. Se observa que el subgrupo correspondiente a la línea de calibración **P 2-4, F: 05** de noviembre de 2015, y **A: JCAR** no tiene un comportamiento de bondad de ajuste similar al resto, por lo cual se considera como diferente y se recomienda su retiro del análisis.

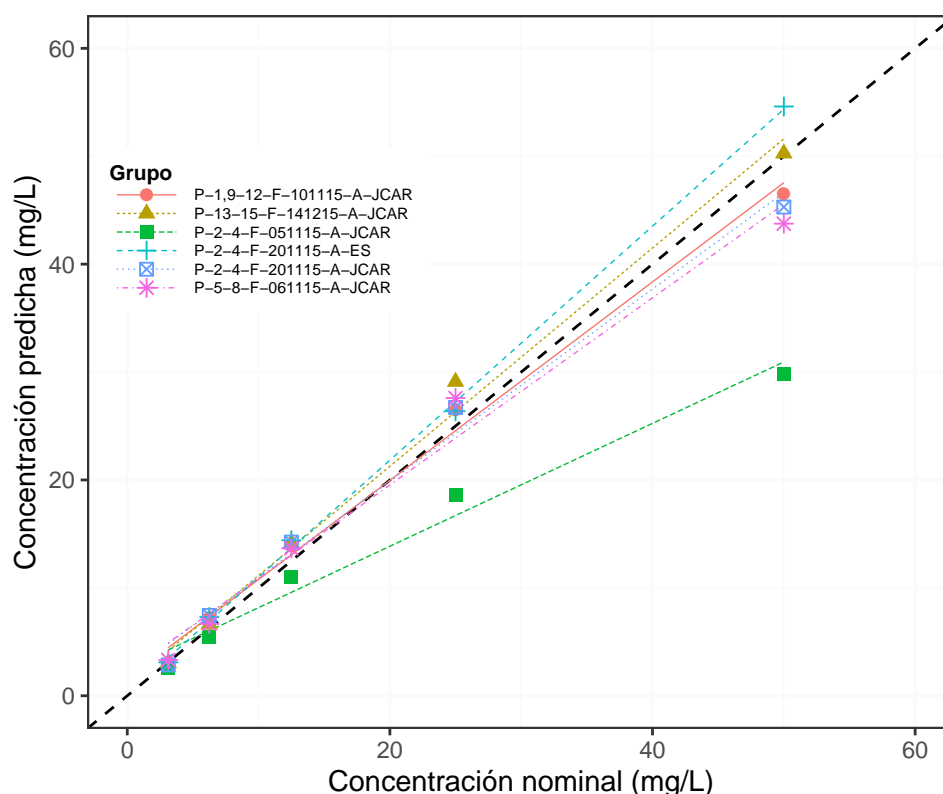


Figura 2: Análisis de bondad de ajuste de análisis de regresión, para curvas de calibración elaboradas.

Por estas razones se hace su retiro del análisis, y se continua el análisis de la validación sin el mismo.

1.2. Linealidad

Se cuenta con cinco (5) curvas de calibración con cinco (5) niveles de concentración cada una, se realizó la regresión con diferentes métodos de estimación con y sin ponderación. Los modelos probados fueron: (1) OLS - mínimos cuadrados ordinarios, (2) WLS - mínimos cuadrados ponderados por ϕ^{-1} , (3) WLS - mínimos cuadrados ponderados por ϕ^{-2} , (4) WLS - mínimos cuadrados ponderados por $(\ln C_{nom})^{-1}$, y (5) WLS - mínimos cuadrados ponderados por $(\ln C_{nom})^{-2}$.

Cada uno de los modelos ensayados describe la siguiente relación: $\phi = \theta_0 + \theta_1 \cdot \ln C_{nom}$, donde θ_0 y θ_1 , son el intercepto y la pendiente de manera respectiva, ϕ es el diámetro del halo de inhibición, y C_{nom} es la concentración nominal de cada determinación. En el Cuadro 1 se puede observar un resumen del valor de los parámetros de regresión en la evaluación de modelos. En el cuadro se observa que los modelos presentan valores de parámetros muy similares entre sí, por lo cual se esperan diferencias mínimas en la bondad de ajuste del modelo.

Parámetro	Estimador	Valor	Error Est.	Valor-t	Pr(> t)
Intercepto	OLS	11.962	0.194	61.506	5.036E-27
	WLS ϕ^{-1}	11.850	0.183	64.638	1.617E-27
	WLS ϕ^{-2}	11.746	0.173	67.71	5.587E-28
	WLS $(\ln C_{\text{nom}})^{-1}$	11.708	0.168	69.514	3.060E-28
	WLS $(\ln C_{\text{nom}})^{-2}$	11.505	0.152	75.532	4.571E-29
Pendiente	OLS	3.786	0.072	52.735	1.692E-25
	WLS ϕ^{-1}	3.828	0.072	53.147	1.417E-25
	WLS ϕ^{-2}	3.869	0.073	52.969	1.530E-25
	WLS $(\ln C_{\text{nom}})^{-1}$	3.886	0.073	53.089	1.453E-25
	WLS $(\ln C_{\text{nom}})^{-2}$	3.983	0.08	49.655	6.677E-25

Cuadro 1: Valor de parámetros de regresión lineal en modelos lineales explorados.

Se realizó una comparación de parámetros de bondad de ajuste de los modelos probados (ver Cuadro 2). Todos los modelos cuentan con una bondad de ajuste apropiada, y pasan el test F. Se tiene que el mejor modelo por su valor de estadístico F_{calc} es el modelo WLS con ponderación en la variable dependiente (ϕ^{-1}). Sin embargo, el modelo con menor error residual estándar RSE es el modelo WLS que tiene ponderación por ϕ^{-2} . Los modelos con ponderación ϕ^{-1} y $(\ln C_{\text{nom}})^{-1}$ cuentan con un valor de coeficiente de correlación ($r^2_{\text{adj.}}$) similar. Considerando que el valor de F_{calc} tiene más fundamento desde la probabilidad, se escoge al modelo WLS con ponderación ϕ^{-1} como el mejor, dentro de este conjunto de modelos ensayados.

Estimación	RSE	gL	r^2	$r^2_{\text{adj.}}$	F_{calc}	$F_{\text{tab.}}$	p
OLS	0.3518	23	0.9918	0.9914	2781.0	248.8	1.692E-25
WLS ϕ^{-1}	0.0774	23	0.9919	0.9916	2824.6	248.8	1.417E-25
WLS ϕ^{-2}	0.0171	23	0.9919	0.9915	2805.7	248.8	1.530E-25
WLS $(\ln C_{\text{nom}})^{-1}$	0.2399	23	0.9919	0.9916	2818.4	248.8	1.453E-25
WLS $(\ln C_{\text{nom}})^{-2}$	0.1698	23	0.9908	0.9904	2465.6	248.8	6.677E-25

Cuadro 2: Parámetros relacionados a la bondad de ajuste de modelos probados.

En la Figura 3, se puede observar la curva de calibración con el modelo de elección que es WLS con ponderación de tipo ϕ^{-1} . Se observa que la mayoría de las observaciones muestran una relación cercana al modelo ajustado, y se observa que existe una tendencia de los puntos a ser curvilíneos en concentraciones mayores.

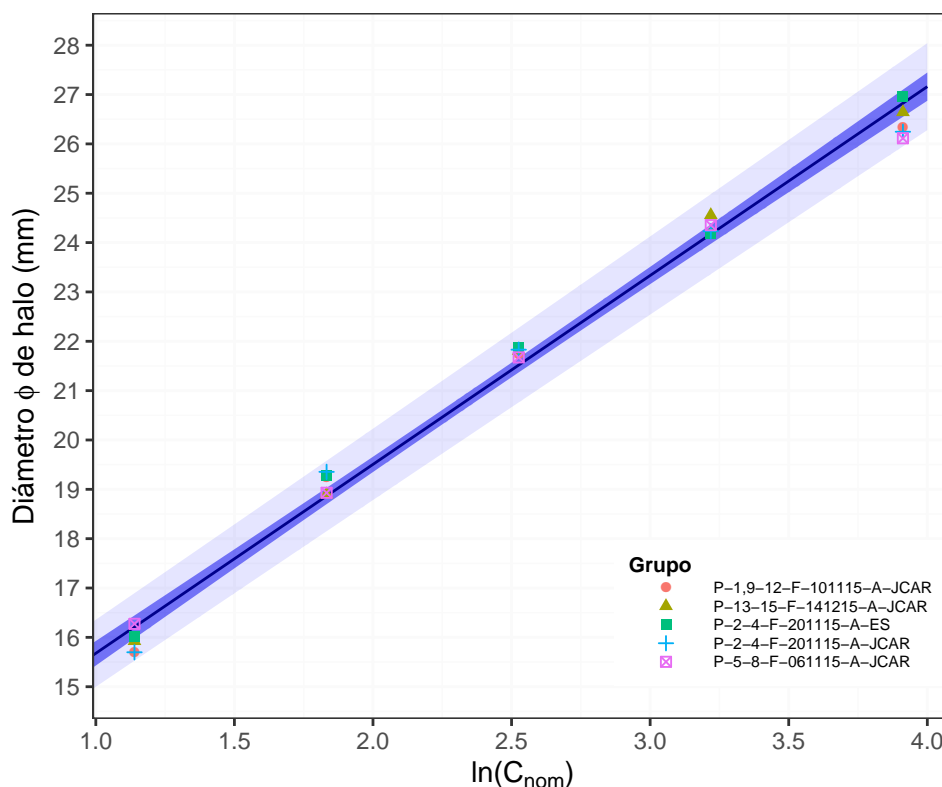


Figura 3: Curva de calibración con modelo de regresión lineal ponderada (WLS) con ponderación de tipo ϕ^{-1} .

En el Cuadro 3 se observa una resumen de los datos de regresión del modelo escogido, estos coinciden con los mostrado en los cuadros 1, y 2.

Análisis de Regresión - Modelo WLS (ϕ^{-1}): $\phi = \theta_0 + \theta_1 \cdot \ln C_{\text{nom}}$					
Estimación					
Parámetro	Valor	Error Est.	Valor t	Valor P	
Intercepto	11.850	0.183	64.64	<2E-16	***
Pendiente	3.828	0.072	53.15	<2E-16	***
$H_0: \theta_0 = 0; \theta_1 = 0$					
$H_A: \theta_0 \neq 0; \theta_1 \neq 0$					
θ_0 - IC 95 %: [11.471, 12.230]			θ_1 - IC 95 %: [3.679, 3.977]		
ANOVA					
Fuente	gL	SC	MC	F _{calc.}	P
Pendiente	1	16.90	16.90	2824.6	<2.2E-16
Residuales	23	0.1376	0.006		
Total	24	17.0391			
RSE: 0.07735 con 23gL					
R^2 : 0.9919			R^2_{adj} : 0.9916		

Cuadro 3: Resultado de modelo de regresión lineal elegido WLS con ponderación ϕ^{-1}

En la Figura 4 se muestra una comparación entre las concentraciones nominales y retropredichas de los cuatro modelos que muestran resultados muy similares. Se observa que a las concentraciones más altas el método tiende a realizar subestimar las concentraciones, lo cual podría generar un sesgo en la estimación de parámetros farmacocinéticos (p.ej. V). Se deduce que en el rango de concentraciones de $3.125 - 50 \mu\text{g/mL}$, el método no se encuentra en un rango lineal, pero aún podría ser considerado como

rango dinámico. Pese a esto, no se considera realizar un ajuste de las observaciones a un modelo cuadrático debido a que se desconoce el comportamiento real de los datos a concentraciones altas por la falta de determinaciones en esta región.

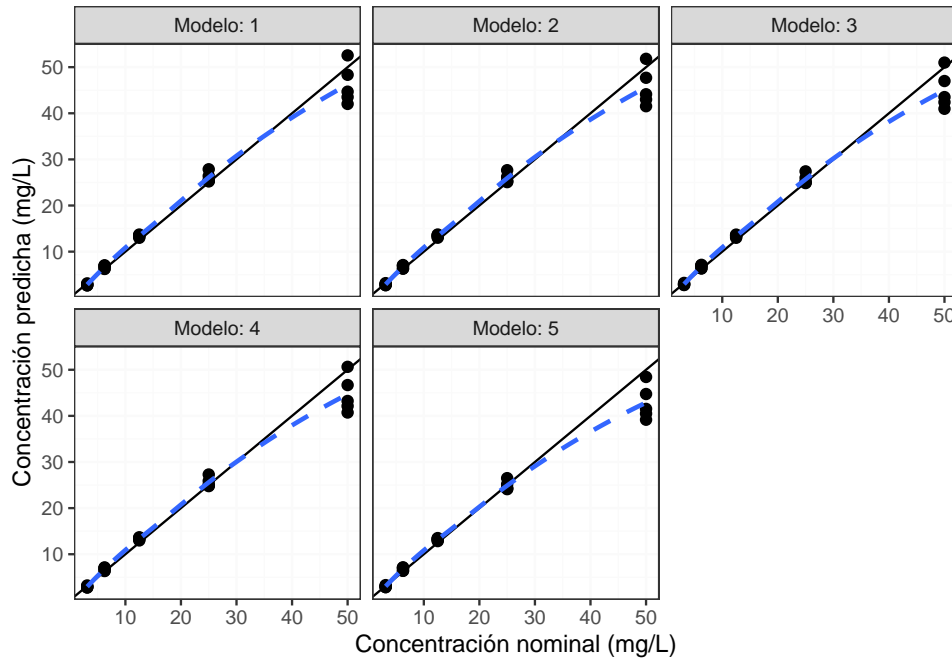


Figura 4: Análisis de bondad de ajuste de análisis de regresión, con diversos modelos de regresión. Modelo 1: OLS, Modelo 2: WLS ϕ^{-1} , Modelo 3: WLS ϕ^{-2} , Modelo 4: $(\ln C_{\text{nom}})^{-1}$, y Modelo 5: $(\ln C_{\text{nom}})^{-2}$. En negro se muestra la predicción del modelo, en azul oscuro se muestra el intervalo de confianza alrededor de la curva de calibración, y en un azul más claro se muestra el intervalo de predicción del modelo.

En la Figura 5 y Figura 6 se observan gráficos para evaluar la bondad de ajuste del modelo mediante errores residuales relativos (ER) a la concentración nominal del modelo (C_{nom}). El error residual relativo de cada predicción se calcula mediante la fórmula en la ecuación 1:

$$ER_i = \frac{\ln C_i - \ln \hat{C}_i}{\ln C_i} = \frac{\ln C_i - (\phi_i + \theta_0) / \theta_1}{\ln C_i} \quad (1)$$

En donde, \hat{C}_i corresponde a las concentraciones nominales C_{nom} , mientras que \hat{C}_i corresponde a las concentraciones retropredichas C_{pred} . En las Figuras 5 y 6 se observa que la varianza permanece relativamente constante, y por tal se cumple el supuesto de homocedasticidad. Sólo en dos puntos del gráfico los residuales sobrepasan los valores de referencia de ± 0.15 para >LLOQ, y ± 0.20 para LLOQ.

Por último, se comprobaron supuestos de normalidad de residuales con el test de Shapiro-Wilk ($W=0.923$, valor $p = 0.060$) por lo cual para un $\alpha = 0.05$ se puede rechazar la H_0 de que los residuales provienen de una distribución normal. Para la comprobación de homocedasticidad se realizó el test de Breusch-Pagan, que tomó un grado de libertad de 1, y $\chi^2 = 0.245$, y valor $p = 0.6203$ que es mayor a 0.05, por lo cual no se puede rechazar la hipótesis nula, lo que implica que no se espera heterocedasticidad significativa.

Conclusión: La mayoría de las predicciones no se alejan por más de 15 a 20% del valor de concentración, y se cumple este criterio para >75 % de las muestras con estándar analizadas. Por el cumplimiento de este criterio se considera que el método es **lineal**.

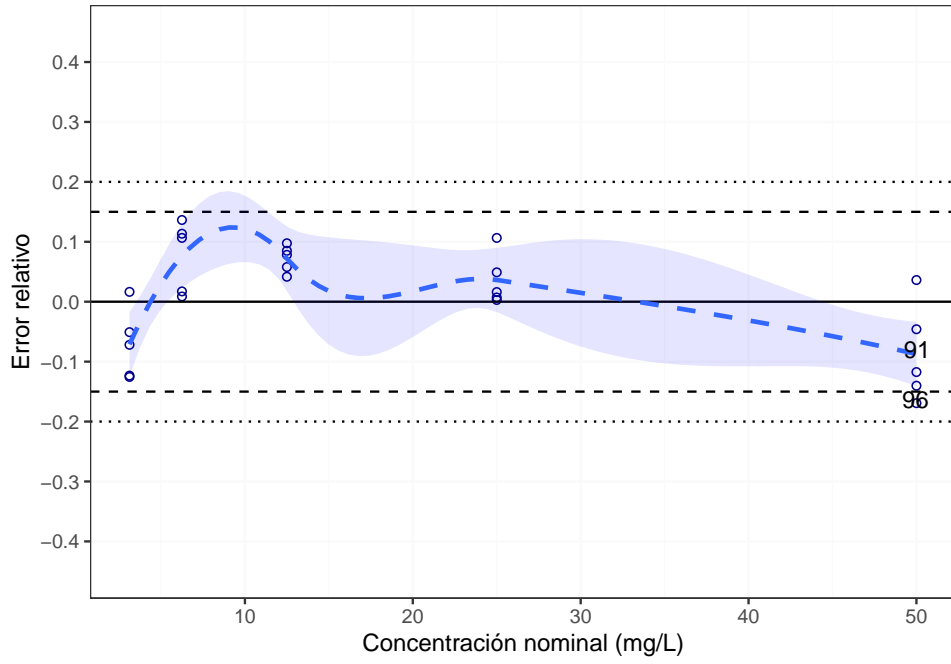


Figura 5: Gráfico de bondad de ajuste con C_{nom} vs error relativo del modelo de regresión.

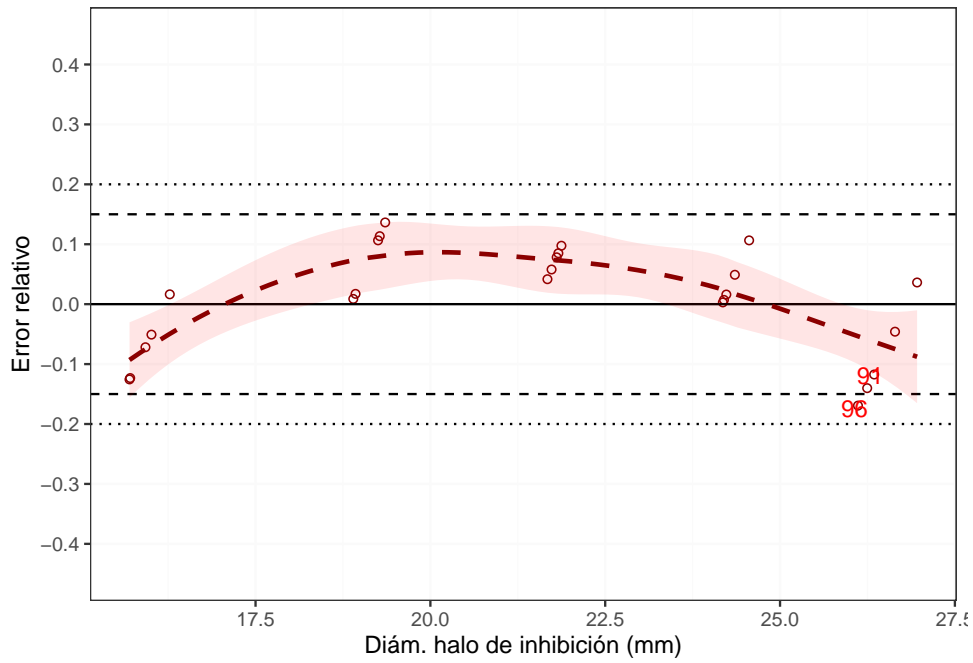


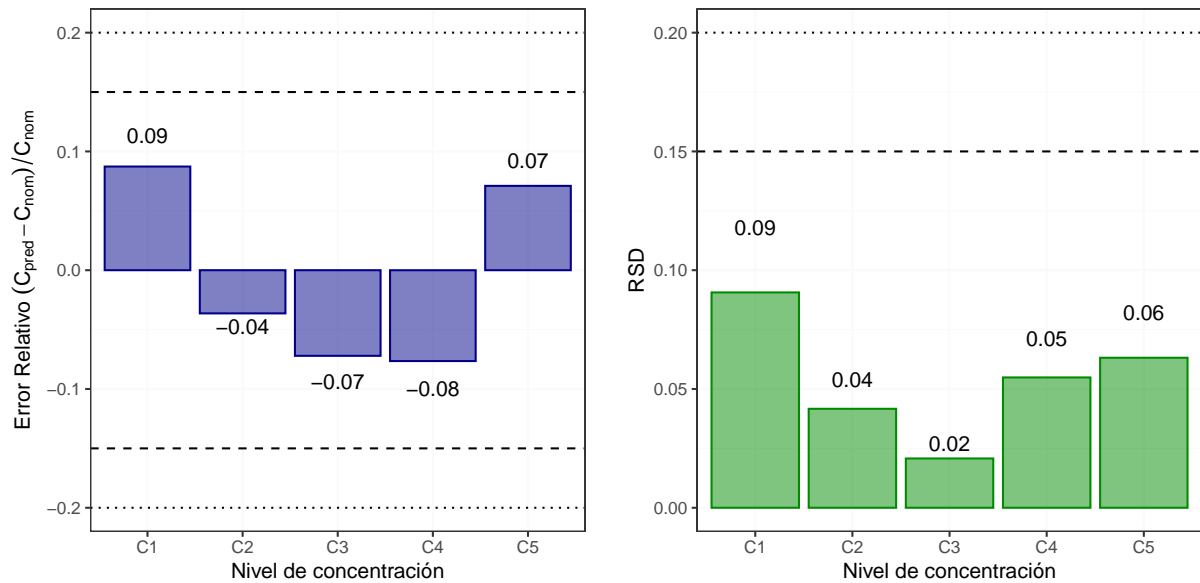
Figura 6: Gráfico de bondad de ajuste con ϕ de halo de inhibición vs error relativo del modelo de regresión.

1.3. Exactitud y Precisión

Para determinar la exactitud de este método se utilizaron los mismos datos provenientes de la curva de calibración, la exactitud se obtiene al realizar un promedio de los valores de retropredicción (\bar{C}_{pred}) y comparando frente a valores de concentración nominal (C_{nom}), por cada nivel de concentración.

$$ER = \frac{\sum_1^n C_{pred}/n - C_{nom}}{C_{nom}} \quad (2)$$

En la Figura 7 se pueden observar los resultados de exactitud (7a) y precisión (7b) para el método. En las figuras se colocaron líneas punteadas en los valores de referencia que no debían ser sobrepasados para la aceptación del método. El punto de calibración con mayor sesgo fue C1 con +9 % de sesgo, pero esto no supera el límite de $\pm 15\%$. Por otra parte, la precisión inter-ensayo se encontró en un rango de 2.08–9.07 % medido como RSD.



(a) Gráfico con error relativo a la concentración nominal de valor medio de concentración predicha.

(b) Gráfico con RSD de C_{pred} para cada nivel de concentración.

Figura 7: Parámetros de validación de modelo. Se muestra el criterio de aceptación para muestras mayores a LLOQ con la línea con guiones, y el criterio de aceptación para LLOQ con una línea punteada.

La precisión intermedia fue evaluada teniendo en cuenta las repeticiones dentro de cada grupo, que podrían equivaler a lotes analíticos diferentes. No se puede evaluar la precisión para los factores por separado (día, suero inicial, o analista) ya que no existe un diseño balanceado de los factores. Se utilizó un análisis por ANOVA teniendo en cuenta la siguiente tabla de una análisis ANOVA de un factor:

Categoría	df	Sum Cuad.	Media Cuad.	Valor F	Pr(>F)
Entre grupos	k-1	SS _{inter}	MS _{inter}	F	p
Intra grupos	N-k	SS _{intra}	MS _{intra}		
Total	N-1	SS _{total}			

Cuadro 4: Tabla ANOVA representativa.

Para el cálculo de precisión intermedia se deben tener en cuenta los siguientes fórmulas para el cálculo de los factores.

$$S_{intra}^2 = MS_{intra} \quad (3)$$

$$RSD_{intra}(\%) = \frac{\sqrt{S_{intra}^2}}{\bar{X}} \cdot 100\% \quad (4)$$

$$S_{inter}^2 = \frac{MS_{inter} - MS_{intra}}{n} \quad (5)$$

$$RSD_{inter}(\%) = \frac{\sqrt{S_{inter}^2 + S_{intra}^2}}{\bar{X}} \cdot 100\% \quad (6)$$

En el Cuadro 5 se pueden observar los resultados del cálculo de precisión intermedia. Se encuentra que la precisión intermedia (RSD_{inter}) no supera el valor de referencia de +15 %, con valores en el rango de 4.8 – 9.5 %. La repetibilidad (RSD_{intra}) en este análisis no supera los valores de referencia encontrándose en un rango de 4.2 – 6.7 %.

C_{nom}	\bar{C}_{pred}	S_{intra}^2	$RSD_{intra}(\%)$	S_{inter}^2	$RSD_{inter}(\%)$	$Pr>F$
3.125	2.91	0.032	5.8 %	0.028	7.9 %	0.004
6.25	6.74	0.177	6.7 %	0.103	8.5 %	0.016
12.5	13.4	0.326	4.6 %	0.029	4.8 %	0.13
25	25.9	1.123	4.2 %	0.97	5.8 %	0.004
50	45.7	6.311	5.0 %	16.251	9.5 %	0.00001

Cuadro 5: Resultado de Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor.

i Conclusión: Se encuentra que las concentraciones retro-predichas cumplen con los criterios de exactitud (error relativo $< \pm 15\%$, y $\pm 20\%$ para LLOQ), repetibilidad ($RSD < 15\%$, y $< 20\%$ para LLOQ), y precisión intermedia ($RSD < 15\%$, y $< 20\%$ para LLOQ).

1.4. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$LOQ = 10 \cdot c(LOQ) \quad (7)$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{\hat{\sigma}_{y0}}{b} \quad (8)$$

En el primer caso, $c(LOQ)$ es la mitad del intervalo de confianza en el límite. Con el primer método se tiene un LOQ estimado de $1.313 \mu\text{g/mL}$, y con el segundo método se tiene $1.614 \mu\text{g/mL}$. Si bien se encontraron estos valores estimados, estos no fueron confirmados de manera experimental, por tal se considera a $3.125 \mu\text{g/mL}$.

Bibliografía

- [1] European Medicines Agency (EMA). Guideline on bioanalytical method validation, 2012. ISSN 2229-4708.