



Original

Estandarización y validación en Colombia de una metodología basada en HPLC para la determinación de la concentración sérica de posaconazol



Diego H. Cáceres^a, Juan David Zapata^a, Sinar D. Granada^b, Luz E. Cano^{a,c} y Tonny W. Naranjo^{a,d,*}

^a Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia

^b Unidad de Fitosanidad y Control Biológico, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia

^c Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^d Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 12 de mayo de 2015

Aceptado el 7 de septiembre de 2015

On-line el 20 de septiembre de 2016

Palabras clave:

Antifúngicos

Posaconazol

Cromatografía líquida de alta eficiencia

Monitorización terapéutica

de medicamentos

R E S U M E N

Antecedentes: Hasta la fecha, Colombia no cuenta con un servicio especializado de medición de concentraciones séricas de antifúngicos, procedimiento esencial para el adecuado manejo del tratamiento de las infecciones invasivas por hongos.

Objetivos: Estandarizar y validar un protocolo simple, sensible y específico, basado en la cromatografía líquida de alta eficiencia, que, cumpliendo con los parámetros recomendados por la *Food and Drug Administration*, permita detectar y cuantificar concentraciones séricas de posaconazol.

Métodos: Se usó un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia Agilent, serie 1200, con detector ultravioleta de matriz de diodos y columna analítica Eclipse-XDB-C18. Como estándar primario se utilizó posaconazol SCH56592 (lote IRQ-PAZ-10-X-103), y como control interno, itraconazol (lote ZR051211PUC921). La validación se hizo teniendo en cuenta los parámetros recomendados por la *Food and Drug Administration* (selectividad, curvas de calibración, recuperación, exactitud, precisión, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad de la muestra) para este tipo de métodos.

Resultados: Los parámetros cromatográficos más adecuados fueron los siguientes: temperatura de la columna, 25 °C; detección ultravioleta, 261 nm; volumen de inyección, 50 µL; flujo, 0,8 ml/min; tiempo de migración, 10 min; fase móvil, acetonitrilo:agua (70:30). Los tiempos de retención finales fueron de 3,4 y 7,2 min para posaconazol e itraconazol, respectivamente, con un rango de cuantificación amplio y confiable, desde 0,125 hasta 16 µg/ml. Bajo estas condiciones el método fue selectivo, el R^2 de las curvas de calibración fue $\geq 0,99$ y el porcentaje de recuperación fue del 98,7%, con un porcentaje del coeficiente de variación inferior al 10%. El porcentaje de error relativo en la exactitud, así como el porcentaje del coeficiente de variación en la precisión, fueron inferiores al 15%, cumpliendo así con los criterios de aceptación recomendados por la *Food and Drug Administration*.

Conclusiones: La selectividad y pureza de la señal cromatográfica obtenida, así como los límites de detección y cuantificación estandarizados, hacen de esta metodología una excelente herramienta para el seguimiento terapéutico de los pacientes bajo tratamiento con posaconazol.

© 2016 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Standardisation and validation of an HPLC method for determining serum posaconazole levels in Colombia

A B S T R A C T

Background: Colombia currently does not have a specialised service for measuring antifungal levels in serum, which is of prime importance for the proper treatment and correct management of invasive fungal infections.

Keywords:

Antifungal agents

Posaconazole

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: tnaranjo@cib.org.co, tonny.naranjo@upb.edu.co (T.W. Naranjo).

High performance liquid chromatography
Therapeutic drug monitoring

Aims: To standardise and validate a simple, sensitive, and specific protocol, based on high performance liquid chromatography, complying with the parameters recommended by the Food and Drug Administration, to detect, identify, and quantify serum concentrations of posaconazole.

Methods: A high performance liquid chromatography Agilent series-1 200 equipment was used with ultraviolet diode array detector and analytical column-Eclipse XDB-C18. Posaconazole-SCH56592 (batch IRQ-PAZ-10-X-103) was used as the primary control and itraconazole (batch ZR051211PUC921) was used as an internal control. The validation was performed taking into account all criteria recommended by the Food and Drug Administration (selectivity, calibration curves, recovery, accuracy, precision, sensitivity, reproducibility, and stability of the sample).

Results: The most suitable chromatographic conditions were the following: column temperature 25 °C, ultraviolet detection at 261 nm, 50 µl injection volume, flow volume 0.8 ml/min, 10 min running time, mobile phase of acetonitrile:water (70:30), and final retention times of 3.4 and 7.2 min for posaconazole and itraconazole, respectively, with a wide and reliable quantification range (0.125 µg/ml to 16 µg/ml). Using these parameters, the method was selective, R^2 in the calibration curves was ≥ 0.99 , and the percentage recovery was 98.7%, with a coefficient of variation less than 10%. The relative error for accuracy and the coefficient of variation for precision were less than 15%, all meeting the acceptance criteria recommended by the Food and Drug Administration.

Conclusions: The selectivity and chromatographic purity of the obtained signal, as well as the standardised limits of detection and quantification, make this method an excellent tool for therapeutic monitoring of patients treated with posaconazole.

© 2016 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Desde hace más de una década se viene observando un alarmante aumento en la incidencia de las infecciones fúngicas invasivas (IFI) causadas tanto por hongos filamentosos como por levaduras. Dicho aumento responde al creciente número de pacientes inmunosuprimidos, principalmente pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, trasplantados, o personas bajo quimioterapia o siguiendo algún tipo de terapia inmunosupresora^{5,17}. Paralelamente a este aumento de casos de IFI, y más preocupante aún, son los continuos reportes de aislamientos de hongos resistentes a varios de los antifúngicos disponibles en el mercado^{2,9,15}.

Entre los antifúngicos utilizados para el tratamiento de las IFI se encuentra el posaconazol, un derivado azólico aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en el año 2006 para su uso en personas¹⁰; este antifúngico es indicado como tratamiento profiláctico para infecciones invasivas por especies de *Aspergillus* y *Candida*, tanto en pacientes sometidos a procesos de inmunosupresión como en aquellos con malignidades hematológicas o neutropenia debido a quimioterapia^{12,20,21,23}. Igualmente, diferentes estudios en fase III han demostrado que el posaconazol es efectivo para el tratamiento de la candidiasis esofágica, incluidas aquellas refractarias a los azoles, así como en el tratamiento de IFI refractarias a otros antifúngicos¹². En Colombia el posaconazol es usado cada vez más como profilaxis antifúngica en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea, así como en aquellos con diagnóstico de leucemia mieloide aguda; igualmente, este antifúngico es usado como tratamiento en infecciones refractarias causadas por algunos hongos filamentosos.

El mecanismo de acción del posaconazol consiste en inhibir la síntesis del ergosterol mediante su unión a la enzima lanosterol-14 α -desmetilasa, presente en la mayoría de los hongos. Debido a que su estructura química es diferente a la del fluconazol y el voriconazol¹⁰, este antifúngico puede interactuar fuertemente con otros dominios de la enzima diana, teniendo incluso efecto sobre cepas mutantes resistentes a otros azoles¹³; lo anterior hace del posaconazol el antifúngico azólico más potente que se encuentra disponible actualmente en el mercado¹².

Debido a su estructura lipofílica, el posaconazol debe ser suministrado después de haber ingerido alimentos preferiblemente ricos en grasa, lo que incrementa la absorción respecto a su administración en ayunas; la concentración plasmática máxima se alcanza tras 5–8 h⁷. La dosis terapéutica del posaconazol recomendada para

el tratamiento de las IFI es de 800 mg/día, que deben suministrarse en dos dosis de 400 mg cada 12 h o cuatro dosis de 200 mg cada 6 h. Los valores de referencia en sangre considerados eficaces están entre 0,7 y 1 µg/ml, y no se han publicado concentraciones séricas asociadas a toxicidad^{6,16,18}. Su vida media es de 35 h y la concentración en equilibrio se puede alcanzar después del séptimo día¹⁴.

El escaso metabolismo del posaconazol se da predominantemente a través de la vía uridin-difosfato-glucuronil-transferasa, y no por enzimas del sistema citocromo P450, aunque sí tiene la capacidad de inhibir el sistema CP3A4, por lo que puede presentar problemas de interacciones medicamentosas¹⁶. Al igual que para todos los medicamentos antimicrobianos, durante la terapia antifúngica es necesario que el posaconazol alcance concentraciones sanguíneas adecuadas para evitar posibles fallos en el tratamiento debido a esta causa, más aún si se tiene en cuenta la alta variabilidad farmacocinética entre pacientes reportada para este antifúngico¹⁹. En este sentido, se recomienda que, independientemente de la presentación y la vía de administración del posaconazol, se realice constantemente una monitorización terapéutica del medicamento. Algunos autores plantean que la medición de las concentraciones sanguíneas alcanzadas desde el inicio de la terapia podrían dar una pista de cómo de eficientes son las concentraciones séricas¹¹. Algunos investigadores han justificado incluso la importancia de realizar esta monitorización en pacientes bajo terapia profiláctica, lo que permitiría al médico tomar decisiones oportunas que lleven, en caso de ser necesario, al uso de un tratamiento profiláctico alternativo¹.

Aun siendo recomendable y necesario, actualmente no se encuentra disponible en Colombia un servicio para la determinación de las concentraciones sanguíneas de posaconazol en pacientes bajo tratamiento, lo que posiblemente expone a estos a terapias ineficientes que generan complicaciones clínicas, prolongaciones innecesarias de hospitalización y posibles sobrecostos al sistema de salud. En el mejor de los casos el médico envía muestras clínicas al exterior, con los costes que ello implica y el tiempo que estos procedimientos consumen. Por todo lo anterior, el objetivo de este estudio fue estandarizar y validar en Colombia un método bioanalítico por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la determinación y cuantificación de posaconazol en suero humano, cumpliendo con todos los criterios de aceptación de los parámetros recomendados por la FDA⁸. Este método fue desarrollado previamente por Cendejas-Bueno et al. en el año 2012³.

Materiales y métodos

Estándares y reactivos

Como producto estándar se utilizó posaconazol (SCH56592) 100% puro, lote IRQ-PAZ-10-X-103, de Merck Sharp & Dohme Corporation™. Como control interno se utilizó itraconazol 99,5% puro, lote ZR051211PUC921, de Janssen Pharmaceutica™. Estos antifúngicos fueron diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) (referencia 445103, Carlos Erba™). Para el tratamiento y análisis de las muestras se utilizó acetonitrilo grado HPLC (referencia 1.00030.5000, Merck™), agua tipo 1 (equipo Milli Q Direct 16, Millipore™) y filtros de celulosa Agilent Captiva de 0,45 µm (referencia 5190-5109, Agilent Technologies™).

Equipo HPLC y condiciones cromatográficas

Se utilizó un equipo HPLC Agilent serie 1200 (Agilent Technologies™) con detector ultravioleta de matriz de diodos, y una columna analítica Eclipse XDB C18 (4,6 × 150 mm, 5 µm) marca Agilent. Durante la estandarización de la metodología analítica se realizaron varios ensayos para determinar las mejores condiciones en cuanto al método, la fase móvil, la longitud de onda, el volumen de migración, el flujo, el tiempo de migración y los tiempos de detección que permitieran la clara identificación del posaconazol, así como del control interno (itraconazol).

Preparación de las soluciones estándar

Para la preparación del estándar primario se diluyeron 3,2 mg de posaconazol en 2 ml de DMSO; la solución se agitó durante 2 min en un vórtex y luego fue sometida a ultrasonidos durante 5 min, obteniendo una solución stock a una concentración de 1,6 mg/ml. A partir de esta solución se prepararon dos curvas estándar, una

Tabla 1

Condiciones cromatográficas para la determinación de posaconazol en suero

Parámetro	
Método	Isocrático, acetonitrilo:agua (70:30)
Flujo	0,8 ml/min
Volumen de inyección	50 µl
Detección	UV: 261 nm
Columna	C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm
Precolumna	C18, 20 × 4,6 mm
Temperatura de columna	25 °C
Estándar interno	Itraconazol
Unidades de concentración	µg/ml
Tiempo de retención en minutos	Posaconazol: 3,4 Itraconazol: 7,2
Tiempo de migración	10 min

usando como diluyente acetonitrilo:agua (70:30) y otra con suero humano libre del medicamento. De la solución stock se tomaron 10 µl y se realizó una dilución 1:100, siendo este el valor de mayor concentración (16 µg/ml). Para preparar los restantes valores de la curva de calibración se realizaron diluciones dobles seriadas hasta llegar a la concentración más baja evaluada en la curva (0,125 µg/ml). Para el estándar interno se diluyeron 2 mg de itraconazol en 1 ml de DMSO; la solución se agitó en vórtex durante 2 min y se sometió a ultrasonidos durante 5 min. A partir de esta solución se hizo una dilución 1:10 con DMSO para obtener una solución del control interno a una concentración de 200 µg/ml.

Preparación y extracción de las muestras

Para el control de calidad se prepararon tres muestras de suero humano libre del medicamento, a las que se añadió el estándar primario de posaconazol para obtener igual número de sueros con concentraciones conocidas diferentes (baja, media y alta) a 0,25; 8 y 16 µg/ml. Estos sueros fueron sometidos al proceso de extracción,

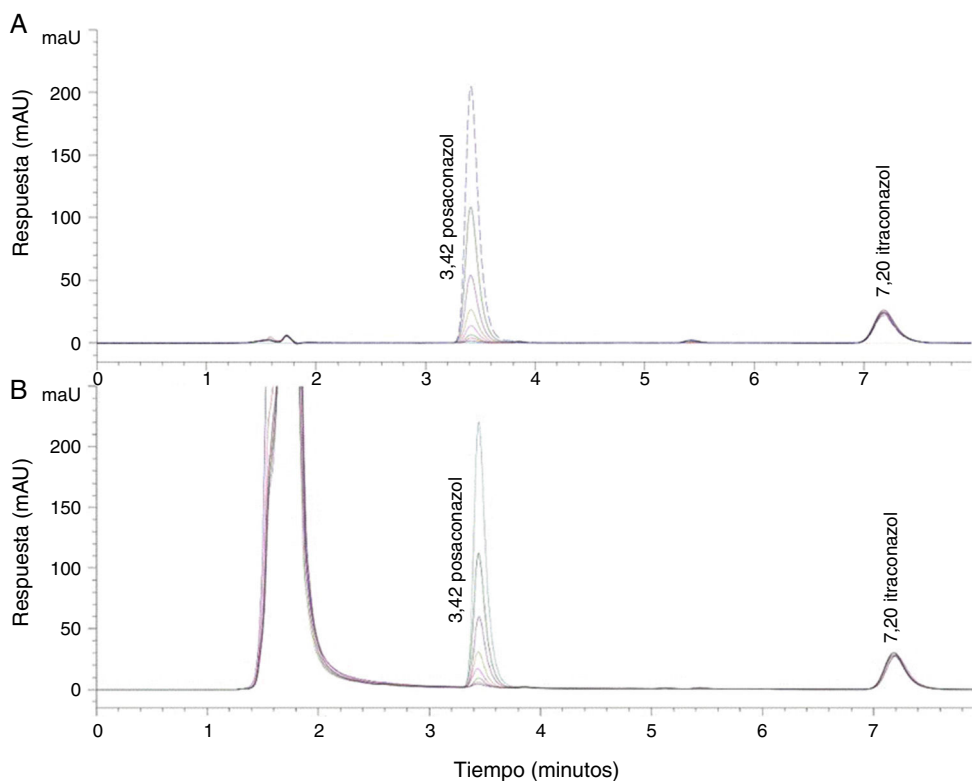


Figura 1. Cromatograma representativo de las curvas de calibración realizadas, en el que se observan los picos correspondientes al posaconazol y al control interno (itraconazol), así como los tiempos de retención para los mismos. A: Analitos diluidos en solución diluyente (acetonitrilo:agua). B: Analitos diluidos en suero.

que comenzó al añadir a 150 µl de la muestra de suero 3 µl de la solución stock del control interno; posteriormente se añadieron 147 µl de acetonitrilo frío, y la solución se mezcló en vórtex durante 30 s. Para inducir la precipitación, la muestra se centrifugó dos veces a 13.800 rpm a 15 °C durante 15 min. El sobrenadante obtenido fue filtrado a través de una membrana de 0,45 µm para posteriormente inyectar 50 µl al equipo de HPLC.

Validación del método analítico

La validación del método analítico se realizó cumpliendo con todos los criterios de aceptación de los parámetros recomendados por la FDA para la validación de este tipo de metodologías: selectividad, linealidad, recuperación, exactitud, precisión, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad de la muestra⁸. Para la evaluación de la sensibilidad se llevó a cabo la estimación del límite de cuantificación y el límite de detección, que fueron calculados utilizando la ecuación y el método basado en la extrapolación de la recta de calibración a concentración cero.

Resultados

Estandarización del método HPLC para el posaconazol

Las mejores condiciones cromatográficas para la determinación de posaconazol en suero se obtuvieron bajo los siguientes parámetros (tabla 1): 25 °C de temperatura de la columna, detección ultravioleta a 261 nm, volumen de inyección de 50 µl, flujo de 0,8 ml/min, tiempo de migración de 10 min, fase móvil de acetonitrilo:agua (70:30) y tiempos de retención de 3,42 y 7,20 min para posaconazol e itraconazol, respectivamente (fig. 1).

Validación del método según los parámetros de la FDA

Selectividad

La selectividad del método analítico cromatográfico fue demostrada al no evidenciarse en los cromatogramas de seis muestras distintas de suero humano libres de medicamento la presencia de picos apreciables, cuantificables o interferentes de posibles compuestos endógenos (fig. 1B).

Curvas de calibración

Se construyeron dos curvas de calibración con muestras patrón preparadas tanto en la solución diluyente (acetonitrilo:agua) como en suero humano al añadir cantidades conocidas de posaconazol. Las muestras así preparadas fueron sometidas al proceso de extracción y posteriormente analizadas. Cada una de las curvas se realizó por triplicado y con ocho concentraciones (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 y 16 µg/ml). El coeficiente de determinación R^2 fue siempre superior a 0,99 para todas las curvas (fig. 2); el error relativo porcentual de cada uno de los puntos de las curvas de calibración preparadas

Tabla 2

Resultados obtenidos del análisis de linealidad según las curvas de calibración realizadas para el posaconazol en solución diluyente acetonitrilo:agua (A) y suero humano (B)

A) Curvas de calibración en solución diluyente			
Concentración del patrón (µg/ml)	Promedio relación de áreas de las 3 rectas	Promedio concentración experimental	Promedio ER %
0,125	14,0	0,1	–5,0
0,25	29,1	0,3	1,3
0,5	55,1	0,5	–2,8
1	113,2	1,0	0,4
2	225,5	2,0	0,4
4	443,7	4,0	–1,1
8	906,0	8,1	1,1
16	1.789,0	16,0	–0,1
		Media (ER %)	–0,7
Parámetro	Recta 1	Recta 2	Recta 3
a	2,31	–1,60	1,62
b	114,60	110,10	111,10
r	1,00	1,00	1,00
R ²	0,9990	0,9990	1,0000
(Y = a + bX)			
B) Curvas de calibración en suero			
Concentración del patrón (mg/ml)	Promedio relación de áreas de las 3 rectas	Promedio concentración experimental	Promedio ER %
0,125	15,7	0,1	12,1
0,25	30,5	0,3	9,2
0,50	61,0	0,5	9,6
1	118,3	1,1	6,4
2	226,2	2,0	1,8
4	436,1	3,9	–1,8
8	862,1	7,8	–3,0
16	1.791,1	16,1	0,8
		Media (ER %)	3,7
Parámetro	Recta 1	Recta 2	Recta 3
a	0,87	–1,52	1,08
b	110,60	111,20	111,30
r	1,00	1,00	1,00
R ²	0,999	0,998	0,999

ER %: error relativo porcentual.

tanto en la solución diluyente como en el suero fue siempre inferior al 15%, cumpliendo así el criterio de aceptación recomendado por la FDA (tabla 2).

Porcentaje de recuperación

Este parámetro es relevante en la medida en que sea reproducible y fue determinado en tres muestras con concentraciones diferentes de posaconazol: 0,25 µg/ml (baja), 8 µg/ml (media) y 16 µg/ml (alta). Fue calculado haciendo una comparación entre

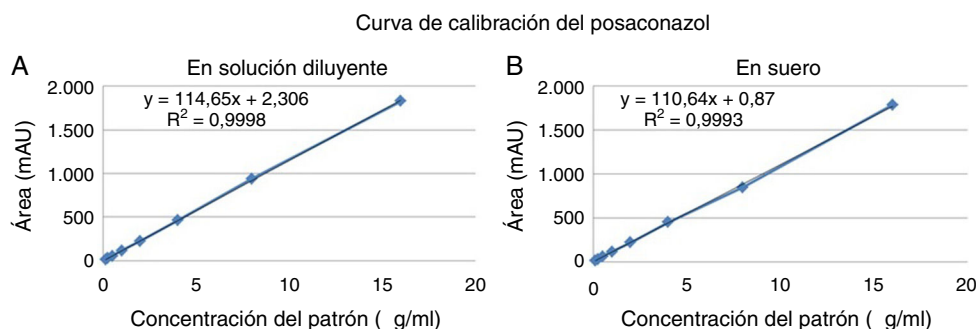


Figura 2. Representación gráfica de las curvas de calibración del posaconazol.

Tabla 3

Resultados del análisis de exactitud y precisión del ensayo realizado con tres puntos de la curva y por triplicado

Precisión y exactitud interensayo (n = 9, 3 ensayos por triplicado)		
Concentración teórica (µg/ml)		Concentración determinada (µg/ml)
0,25	Media	0,28
	% CV	4,4
	ER %	11,5
8	Media	8,3
	% CV	8,3
	ER %	3,6
16	Media	16,2
	% CV	3,2
	ER %	1,1

ER %: error relativo porcentual; % CV porcentaje del coeficiente de variación.

la respuesta en área obtenida para el posaconazol extraído de la matriz biológica (suero) y la respuesta obtenida del mismo en la solución patrón. El porcentaje de recuperación para el posaconazol fue de 98,7%, con un porcentaje del coeficiente de variación global de 6,7%.

Exactitud y precisión

Estos parámetros fueron valorados tanto a nivel intra como inter ensayo, por triplicado y en días distintos. Fueron preparadas tres muestras de suero con concentraciones diferentes de posaconazol: 0,25 µg/ml (baja), 8 µg/ml (media) y 16 µg/ml (alta). Los valores de error relativo porcentual, en el caso de la exactitud, y los valores del porcentaje del coeficiente de variación, en el caso de la precisión, estuvieron por debajo del 15%, lo que cumple con los criterios de aceptación recomendados por la FDA (tabla 3).

Sensibilidad

Se realizó por triplicado una curva de calibración en suero con 3 puntos a concentraciones bajas y supuestamente cercanas al límite de cuantificación. Con esta curva se calcula la señal ruido, la desviación estándar de la señal y la pendiente. Los límites de detección y de cuantificación para el ensayo bioanalítico basados en el

Tabla 4

Estabilidad de las soluciones patrón

A) En el inyector automático			
Tiempo (días)	Áreas para las diferentes concentraciones		
	Baja (0,25 µg/ml)	Media (8 µg/ml)	Alta (16 µg/ml)
0	30,9	874,2	1.839,4
1	26,4	760,3	1.432,5
2	25,9	772,5	1.476,6
5	24,4	781,5	1.623,2
s	2,8	52,1	183,4
x	26,9	797,1	1.592,9
% CV	10,4	6,5	11,5
B) A temperatura ambiente			
Tiempo (días)	Áreas para las diferentes concentraciones		
	Baja (0,25 µg/ml)	Media (8 µg/ml)	Alta (16 µg/ml)
0	30,9	874,2	1.839,4
1	25,2	722,2	1.579,0
2	25,5	846,1	1.562,8
5	24,7	799,0	1.648,7
s	2,9	66,4	126,9
x	26,6	810,4	1.657,5
% CV	10,9	8,2	7,7
C) A -20 °C			
Tiempo (días)	Áreas para las diferentes concentraciones		
	Baja (0,25 µg/ml)	Media (8 µg/ml)	Alta (16 µg/ml)
0	30,9	874,2	1.839,4
1	24,1	765,9	1.431,9
2	30,9	824,0	1.615,5
5	24,3	799,0	1.635,6
s	3,8	45,6	166,7
x	27,5	815,8	1.630,6
% CV	14,0	5,6	10,2

s: desviación estándar; x: promedio; % CV: porcentaje del coeficiente de variación.

Tabla 5

Estabilidad de posaconazol en suero humano después de varios ciclos de congelación/descongelación

Concentración teórica	Área basal	Ciclo de congelación/descongelación	Área	Recuperación relativa basal (%)	% CV	Promedio % CV
Baja (0,25 µg/ml)	32,9	Primero	34,2	104,2	5,6	3,0
		Segundo	34,4	104,8	0,2	
		Tercero	34,0	103,7	3,2	
Media (8 µg/ml)	856,7	Primero	910,8	106,3	3,9	3,6
		Segundo	896,8	104,7	0,8	
		Tercero	773,6	90,3	6,2	
Alta (16 µg/ml)	1.669,3	Primero	1.719,6	103,0	1,8	2,5
		Segundo	1.688,9	101,2	1,2	
		Tercero	1.537,6	92,1	4,6	

% CV: porcentaje del coeficiente de variación.

Tabla 6

Estabilidad de la muestra de acuerdo con el periodo de tiempo de permanencia en el inyector del cromatografía líquida de alta eficiencia

Concentración teórica	Área basal	Tiempo en el inyector	Área	Recuperación relativa al basal (%)	% CV	Promedio % CV
Baja (0,25 µg/ml)	32,9	1 día	35,5	107,9	4,6	5,0
		2 días	34,4	104,7	3,8	
		5 días	29,4	89,6	6,4	
Media (8 µg/ml)	856,7	1 día	966,9	112,9	6,9	5,3
		2 días	864,6	100,9	2,0	
		5 días	758,9	88,6	6,9	
Alta (16 µg/ml)	1.669,3	1 día	1.812,4	108,6	4,6	2,7
		2 días	1.674,3	100,3	0,9	
		5 días	1.594,5	95,5	2,7	

% CV: porcentaje del coeficiente de variación.

modelo matemático de extrapolación de la recta de calibración a concentración cero fueron de 0,03 y de 0,125 µg/ml, respectivamente.

Estabilidad de la muestra

Este parámetro fue evaluado teniendo en cuenta el tiempo de trabajo y las condiciones de temperatura a las que pueden ser sometidas las muestras durante su procesamiento. Los porcentajes del coeficiente de variación encontrados al evaluar tanto la estabilidad de las soluciones patrón del posaconazol después de ser almacenado durante 24 h, 48 h y 5 días en solución diluyente a temperatura ambiente, a -20°C y en el sistema de inyección del equipo (tabla 4), como al evaluar el porcentaje de recuperación del antifúngico de muestras de suero sometidas a tres ciclos de congelación/descongelación (tabla 5) y muestras almacenadas durante uno, 2 y 5 días en el sistema de inyección del equipo (tabla 6) estuvieron siempre por debajo del 15%, cumpliendo así con los criterios de aceptación recomendados por la FDA.

Discusión y conclusiones

Los resultados del presente trabajo nos permitieron estandarizar y validar, siguiendo los parámetros recomendados por la FDA, una metodología basada en HPLC que de manera sencilla y rápida nos permite la identificación y cuantificación de concentraciones séricas de posaconazol con un rango de cuantificación amplio y confiable que va desde 0,125 hasta 16 µg/ml, similar a lo encontrado por Cendejas-Bueno et al. en 2012³. La selectividad y pureza de la señal cromatográfica obtenida, así como los límites de detección y cuantificación estandarizados, hacen de esta metodología una excelente herramienta para el seguimiento terapéutico de los pacientes bajo tratamiento con posaconazol.

El tratamiento de muestras mediante la precipitación de proteínas con el uso de acetonitrilo es un método sencillo y rápido de realizar, y presenta una alta reproducibilidad y firmeza. El uso de una fase móvil, que no requiere la preparación de soluciones tampón o aditivos, simplifica de forma significativa el desarrollo del ensayo y reduce los tiempos y costes de la prueba^{4,22}.

El hecho de que la estabilidad o recuperación de los fármacos presentes en las muestras no se viera afectada ni por el tiempo de almacenamiento (72 h) ni por las condiciones de almacenamiento de la muestra (entre el rango de congelación y la temperatura ambiente) demuestra la estabilidad que la molécula de interés (posaconazol) puede tener en el material biológico cuando este sea remitido para su análisis.

Con el marcado incremento en la incidencia de las IFI en los últimos años, el poder disponer de una nueva herramienta de laboratorio, altamente sensible y específica, para la determinación de niveles séricos de posaconazol facilitará al personal médico la toma de decisiones de forma más confiable y permitirá evitar así los fallos terapéuticos o las reacciones adversas, producto de concentraciones séricas inadecuadas. Igualmente, el uso de esta herramienta beneficiaría directamente al paciente al disminuir el riesgo de complicaciones durante su tratamiento y mejorar posiblemente su calidad de vida.

Finalmente, y desde el punto de vista económico, este tipo de análisis se puede efectuar a un coste relativamente bajo, comparado incluso con el coste de un análisis de determinación indirecta de concentración sérica de una molécula hecho mediante el método de bioensayo. La implementación de este tipo de metodología, considerada en la mayoría de los casos cara en coste-efectividad, influye directamente en la reducción de los gastos causados al sistema de salud al permitir las modificaciones oportunas en los esquemas de tratamiento, mejorar el manejo de las

complicaciones y disminuir los tiempos de hospitalización de los pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores del presente trabajo expresan su agradecimiento a los doctores Manuel Cuenca-Estrella y Alicia Gómez, del Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología, del Instituto Carlos III (Madrid, España), por su asesoría durante el desarrollo del proyecto. A la doctora Catalina de Bedout, de la Unidad de Micología Médica y Experimental, y al Dr. Ever Antony Rueda, de la Unidad de Fitosanidad y Control Biológico de la CIB. A las compañías farmacéuticas Merck Sharp & Dohme y Janssen-Cilag, quienes amablemente suministraron los estándares puros de los antifúngicos evaluados. Al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología, Francisco José de Caldas, COLCIENCIAS, Bogotá, Colombia, Proyecto con contrato número: 0104-2013; al Centro de Investigación para el Desarrollo y la Innovación de la Universidad Pontificia Bolivariana (CIDI-UPB), Proyecto: 698A-12/10-12; y al Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema Nacional de Regalías, Proyecto con código de aprobación BPIN: 2013000100183.

Bibliografía

1. Ananda-Rajah MR, Grigg A, Slavin MA. Making sense of posaconazole therapeutic drug monitoring: A practical approach. *Curr Opin Infect Dis.* 2012;25:605–11.
2. Candoni A, Aversa F, Busca A, Cesaro S, Girmenia C, Luppi M, et al. Combination antifungal therapy for invasive mould diseases in haematologic patients. An update on clinical data. *J Chemother.* 2015;27:1–12.
3. Cendejas-Bueno E, Forastiero A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gómez-López A. HPLC/UV or bioassay: Two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:1229–35.
4. Chhun S, Rey E, Tran A, Lortholary O, Pons G, Jullien V. Simultaneous quantification of voriconazole and posaconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;852:223–8.
5. Cornely OA, Cuenca-Estrella M, Meis JF, Ullmann AJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study Group (EFISG) and European Confederation of Medical Mycology (ECMM) 2013 joint guidelines on diagnosis and management of rare and emerging fungal diseases. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20 Suppl 3:1–4.
6. Crombag MR, Huisman C, Kemper EM, Bruggemann RJ, Bijleveld YA. Posaconazole treatment in hematology patients: A pilot study of therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 2012;34:320–5.
7. Eiden C, Meniane JC, Peyriere H, Eymard-Duvernay S, Le Falher G, Ceballos P, et al. Therapeutic drug monitoring of posaconazole in hematology adults under posaconazole prophylaxis: Influence of food intake. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:161–7.
8. Guidance for Industry. Bioanalytical method validation. September 2013 [consultado 2013]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidanceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf>
9. Gullo FP, Rossi SA, Sardi JC, Teodoro VL, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM. Cryptococcosis: Epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32:1377–91.
10. Ianas V, Matthias KR, Klotz SA. Role of posaconazole in the treatment of oropharyngeal candidiasis. *Infect Drug Resist.* 2010;3:45–51.
11. Jang SH, Colangelo PM, Gobburi JV. Exposure-response of posaconazole used for prophylaxis against invasive fungal infections: Evaluating the need to adjust doses based on drug concentrations in plasma. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;88:115–9.
12. Katragkou A, Tsikopoulou F, Roilides E, Zaoutis TE. Posaconazole: When and how? The clinician's view. *Mycoses.* 2012;55:110–22.
13. Kohno S, Izumikawa K. Posaconazole for chronic pulmonary aspergillosis: The next strategy against the threat of azole-resistant *Aspergillus* infection. *Clin Infect Dis.* 2010;51:1392–4.
14. Krishna G, Moton A, Ma L, Medlock MM, McLeod J. Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under various gastric conditions in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:958–66.
15. Kuper KM, Coyle EA, Wanger A. Antifungal susceptibility testing: A primer for clinicians. *Pharmacotherapy.* 2012;32:1112–22.

16. Li Y, Theuretzbacher U, Clancy CJ, Nguyen MH, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of posaconazole. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49:379–96.
17. Limper AH. The changing spectrum of fungal infections in pulmonary and critical care practice: Clinical approach to diagnosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2010;7: 163–8.
18. Mavridou E, Bruggemann RJ, Melchers WJ, Mouton JW, Verweij PE. Efficacy of posaconazole against three clinical *Aspergillus fumigatus* isolates with mutations in the *cyp51A* gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54: 860–5.
19. Ullmann AJ, Cornely OA, Burchardt A, Hachem R, Kontoyiannis DP, Töpelt K, et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of posaconazole in patients with persistent febrile neutropenia or refractory invasive fungal infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:658–66.
20. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, Chandrasekar P, Langston A, Tarantolo SR, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 2007;356:335–47.
21. Winston DJ, Bartoni K, Territo MC, Schiller GJ. Efficacy, safety, and breakthrough infections associated with standard long-term posaconazole antifungal prophylaxis in allogeneic stem cell transplantation recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17:507–15.
22. Zhang M, Moore GA, Barclay ML, Begg EJ. A simple high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of three triazole antifungals in human plasma. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:484–9.
23. Zoller E, Valente C, Baker K, Klepser ME. Development, clinical utility, and place in therapy of posaconazole for prevention and treatment of invasive fungal infections. *Drug Des Devel Ther*. 2010;4:299–311.