

La difenihidantoina (DFH) es un fármaco utilizado para el tratamiento de distintos tipos de convulsiones. Al ser una droga de estrecho índice terapéutico, es decir, que pequeñas variaciones en las dosis pueden generar grandes variaciones en las concentraciones sanguíneas y consecuentemente esto puede llevar a falta de eficacia y/o toxicidad. Los niveles sanguíneos deben controlarse, y esto se lleva a cabo a través de métodos inmunológicos preparados para esa matriz, entre otros. También se pueden monitorizar los niveles de DFH en otros fluidos como saliva. Para ello debemos poner a punto dichos métodos para la matriz saliva. En este trabajo se realiza la puesta a punto de un método para la cuantificación de DFH, en saliva.

#### CONCEPTOS CLAVES:

Existen muchos trabajos en los que se ha encontrado una correlación entre la concentración de fenitoína en saliva y la concentración de fenitoína libre en suero o plasma. Muchos investigadores realizaron la validación de métodos para el dosaje de fenitoína en saliva.

El aporte de este trabajo radica en la validación de una metodología útil para el monitoreo de fenitoína en saliva, una matriz con numerosas ventajas, principalmente para el seguimiento y control de aquellos pacientes pediátricos y de difícil acceso venoso que se encuentran en tratamiento crónico con dicho anticonvulsivante.

Recibido: 2022-04-18 Aceptado: 2022-11-07

DOI: <http://dx.doi.org/10.31053/1853.0605.v80.n2.37361>



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

© Universidad Nacional de Córdoba

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

Araceli Belén Minetti<sup>1</sup>, Solange Duchein<sup>2</sup>, Hector Andrés Suarez<sup>3</sup>, Susana Rivolta<sup>4</sup>, Isabel Inés González<sup>5</sup>

1-Bioquímica en Laboratorio del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina. Mail de contacto: [ara\\_minetti@hotmail.com](mailto:ara_minetti@hotmail.com)

2-Bioquímica en Laboratorio de Fundación Lenox, Córdoba, Argentina.

3-Bioquímico, especialista en Toxicología en Laboratorio del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Farmacología, Córdoba, Argentina.

4-Magister, Especialista, Bioquímica en Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Salud Pública. Córdoba, Argentina.

5- Bioquímicas Especialista en Toxicología en Laboratorio del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Farmacología, Córdoba, Argentina.

#### RESUMEN

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

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

**Palabras claves:** fenitoína; saliva; inmunoensayo; monitoreo terapéutico

#### ABSTRACT

### Validation of the immunological method of kinetic interaction of microparticles in solution (KIMS) for the determination of phenytoin in saliva at the Hospital de Niños de Santísima Trinidad.

Phenytoin (DFH), is an anticonvulsant widely used for the treatment of different types of seizures. (1) Therapeutic monitoring (TDM) is required for DFH due to its narrow therapeutic range and nonlinear pharmacokinetics, among other characteristics. Monitoring is frequently done on plasma or serum (total drug) through immunological methods. DFH can also be monitored in saliva, which shows a good correlation with plasma. The concentration of DFH in saliva reflects the concentration of free drug and due to the simplicity in its collection, it leads to a less stressful process for the patient. The aim of this study was to validate the immunological method of kinetic interaction of microparticles in solution (KIMS) for the determination of DFH using saliva as biological matrix. Linearity, precision, detection and quantification limits, accuracy and interference were analyzed. Infostat 8.0 student version software was used for statistical analysis. The method was linear in a range between 0.41 and 5ug/ml. The detection and quantification limits were 0.14 and 0.45ug/ml, respectively. The equation of the straight line obtained based on the method comparison between KIMS and HPLC-UV was DFHKIMS= 0,81\* DFHHPLC – 0,03. The KIMS method proved to have the necessary analytical characteristics to be applied as a useful and practical tool for the follow-up of those patients with difficult venous access and/or children with chronic DFH treatments.

**Keywords:** phenytoin; saliva; immunoassay; therapeutic monitoring

## Validação do método imunológico de interação cinética de micropartículas em solução (KIMS) para a determinação de fenitoína em saliva no Hospital de Niños de la Santísima Trinidad.

A fenitoína (DFH) é um anticonvulsivante amplamente utilizado para o tratamento de diversos tipos de convulsões. O monitoramento terapêutico (TDM) é necessário para DFH devido à sua estreita faixa terapêutica e farmacocinética não linear, entre outras características. A monitorização é frequentemente feita em plasma ou soro (droga total) através de métodos imunológicos. A DFH também pode ser monitorada na saliva, o que mostra uma boa correlação com o plasma. A concentração de DFH na saliva reflete a concentração do fármaco livre e devido à simplicidade em sua coleta, leva a um processo menos estressante para o paciente. O objetivo do trabalho foi validar o método imunológico de interação cinética de micropartículas em solução (KIMS) para a determinação de DFH utilizando saliva como matriz biológica. Foram analisadas linearidade, precisão, limite de detecção e quantificação, exatidão e interferência. O software Infostat 8.0 versão estudante foi utilizado para análise estatística. O método foi linear em uma faixa entre 0,41 e 5 ug/ml. Os limites de detecção e quantificação foram 0,14 e 0,45ug/ml, respectivamente. A equação da reta obtida com base na comparação de métodos entre KIMS e HPLC-UV foi  $DFHKIMS = 0,81 * DFHHPLC - 0,03$ .

O método KIMS mostrou ter as características analíticas necessárias para ser aplicado como uma ferramenta útil e prática para o acompanhamento de pacientes com acesso venoso difícil e/ou crianças em tratamento crônico de DFH.

**Palavras chaves:** fenitoína; saliva; imunoensaio; monitoramento .

### INTRODUCCIÓN

La Fenitoína (DFH), es un anticonvulsivante eficaz en las convulsiones parciales y tonicoclónicas, además de ser utilizada para el tratamiento en convulsiones que ocurren durante o luego de neurocirugías o traumatismos de cráneo severos. Su actividad anticonvulsiva la ejerce debido a que limita la activación repetitiva de los potenciales de acción evocados por la despolarización sostenida de las neuronas de la médula espinal. Este efecto es mediado por retraso en la velocidad de recuperación de los canales de sodio activados por voltaje a partir de la inactivación. (1,2)

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

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

El monitoreo terapéutico de drogas (TDM) es habitual para la DFH que tiene un estrecho rango terapéutico y farmacocinética no lineal, entre otras características. Los dosajes se realizan en plasma o suero frecuentemente, donde se mide la cantidad

de droga total, es decir la droga libre más la unida a proteínas. El rango terapéutico de DFH en suero es de 10-20 ug/mL, mientras que el rango para la fracción libre es de 1-2 ug/mL (3,6,7) El dosaje de DFH puede realizarse en otras matrices biológicas como saliva, lágrima, sudor, LCR, entre otros. (1,4) La matriz saliva tiene numerosas ventajas sobre el uso de suero o plasma para el TDM, ya que refleja la concentración de droga libre en suero, la recolección es más simple, menos invasiva, menor costo, causa menos estrés, miedo y malestar, especialmente en pacientes con discapacidades, ancianos y niños, la misma puede ser recolectada, en el tiempo ideal, en el hogar y luego ser trasladada al laboratorio para la medición. (1,8)

Existen numerosos trabajos donde se ha demostrado que existe correlación entre las concentraciones de DFH en saliva y la concentración de DFH libre en plasma o suero. Estas determinaciones se han llevado a cabo a través de métodos inmunológicos que han sido validados para la determinación de DFH en saliva, como por ejemplo inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPFA), enzoinmunoensayo (ELISA), inmunoensayo de reactivación de apoenzimas en fase seca (ARIS), Radioinmunoanálisis (RIA), etc. (5,9 10,11,12)

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

### MATERIALES Y MÉTODOS

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

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

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

Para realizar este estudio se utilizó un pool de saliva libre de drogas, el cual se fortificó con una solución de Difenilhidantoína (DFH) preparada a partir de un estándar Sigma Aldrich (Argentina). El pool de saliva se recolectó a partir de voluntarios sanos que no reciben ningún tipo de medicación. La saliva se obtuvo sin estimulación, mediante una torunda de algodón, posteriormente el fluido fue extraído aplicando presión con una jeringa. Se prepararon estándares de DFH en saliva de concentraciones desde 0 a 5ug/mL, rango que incluye los niveles de decisión médica de 1 y 2 ug/mL para pacientes que requieren monitoreo de drogas terapéuticas en dicha matriz, a partir del pool mencionado anteriormente.

Las determinaciones de DFH se llevaron a cabo por el método de interacción cinética de micropartículas en solución (KIMS) en un autoanalizador COBAS 6000 de la línea Roche y los reactivos provistos fueron utilizados según las especificaciones y procedimientos recomendados por el fabricante. Este método utiliza anticuerpos (Ac) Anti-DFH que se fijan de manera covalente a micropartículas, mientras que el derivado de

fármaco se une a macromoléculas. La interacción cinética de micropartículas en solución se induce al unirse el conjugado de la DFH al Ac que recubre las micropartículas y se inhibe por la DFH presente en la muestra biológica. El conjugado de DFH y la DFH presente en la muestra, compiten por fijarse al Ac anti-DFH que recubre las micropartículas. La interacción cinética de micropartículas resultante es indirectamente proporcional a la cantidad de fármaco presente en la muestra.

El método utilizado como referencia fue la cromatografía líquida de alta performance con detector ultravioleta (HPLC-UV), en un equipo de la marca Agilent, 1220 LC System; las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: columna Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6x150mm, 5 µm; fase móvil isocrática compuesta por un buffer fosfato 0,025M y Acetonitrilo (100:10 v/v) a pH 3, con un flujo de 1 mL/min; el volumen de inyección utilizado fue 20 µL y la lectura se realizó a 205 nm. La extracción de la DFH de la matriz saliva se realizó utilizando una columna de extracción en fase sólida Strata C-18-E (Phenomenex). El procedimiento se llevó a cabo según Kabra P. M. et al. (15) Se utilizó un estándar de DFH Sigma Aldrich y como estándar interno Carbamazepina (CBZ)(Supelco PHR1067).

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

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

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

Estudio de Interferencia: Para el estudio de interferencia se utilizaron dos estándares de DFH en saliva de concentraciones 1 y 2ug/ml a los cuales se les agregó 100ul de calibrador Preciset TDM. El calibrador Preciset TDM contiene Carbamazepina (2ug/mL), Digoxina (0,5ug/mL), Gentamicina (0,87ug/mL), Fenobarbital (6ug/mL), Primidona

(2,4ug/mL), Theofilina (4ug/mL), Tobramicina (1ug/mL), Acido Valproico (15ug/mL) y Vancomicina (8ug/mL). Se analizaron los dos estándares de saliva de concentración conocida con KIMS sin agregado y con agregado de los interferentes con un n= 10. Se aplicó el test t para muestras apareadas para el análisis de los resultados.

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

**RESULTADOS**

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

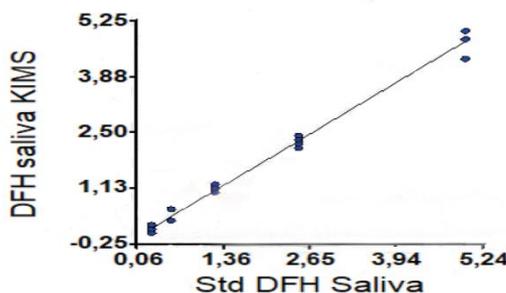


Figura N° 1. Linealidad del método KIMS para la determinación de DFH en saliva 0,41- 5  $y = 0,88x - 0,09$ ;  $R^2 = 0,99$ .

**Precisión:**

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

Tabla N°1: Datos del análisis de precisión.			
DFH (ug/mL)	X (ug/mL)	SD (ug/mL)	CV% (ug/mL)
0	0	0	
0,2	0,14	0,08	57,14
0,6	0,42	0,08	19,9
1,25	1,1	0,06	5,5
2,5	2,26	0,10	4,4
5,0	4,38	0,83	18,96

**Límite de Detección y Cuantificación:**

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

**Interferencia:**

Los resultados obtenidos, en la prueba t para muestras apareadas, demostraron que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de estándar de DFH con y sin el agregado de los interferentes

descriptos previamente tanto para el nivel de 1 como 2 µg/mL ( $p = 0,16$  y  $0,49$  respectivamente). (Tabla 2)

Tabla N°2: Datos de análisis de interferencia.

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

**Exactitud:**

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

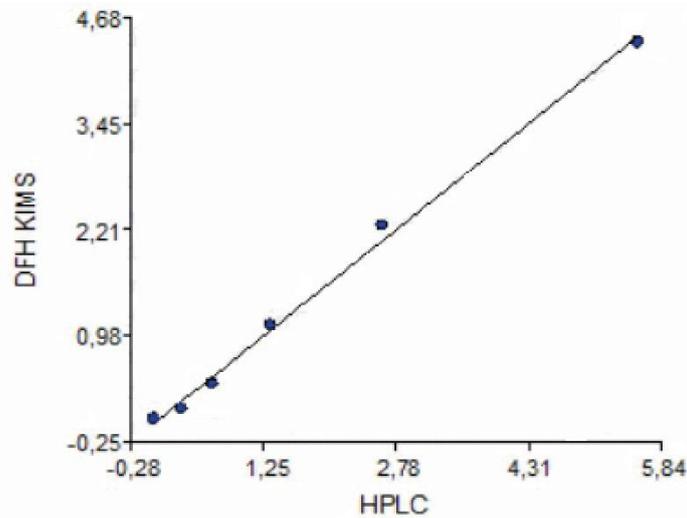


Figura N2: Comparación de métodos, KIMS vs HPLC-UV.  $y = 0,81x - 0,03$   $R^2 = 1,0$

**DISCUSIÓN**

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

La linealidad del método fue de 0,41 a 5,0 ug/mL, esto difiere con el de otros trabajos publicados en donde los rangos en general son más amplios e incluyen concentraciones mayores, de hasta 10 ug/mL. Sin embargo, el rango obtenido por KIMS es aceptable para realizar el TDM de DFH usando como matriz saliva ya que incluye las concentraciones de DFH que corresponden a los niveles de decisión médica (1-2 ug/mL) en esta matriz. Además, concentraciones de DFH superiores a 5 ug/mL en saliva, suponen concentraciones de DFH en suero de 50ug/mL que sobrepasa el rango terapéutico en esta matriz (10-

20 ug/mL) e indica una intoxicación, para lo cual la matriz saliva no sería la indicada para dosar DFH en este caso, sino el suero o plasma.

Respecto del límite de detección en el trabajo realizado por nuestro equipo de trabajo anteriormente, donde se validó el dosaje de DFH en saliva por el método inmunológico FPIA fue de 0,15ug/mL siendo el nuestro similar, 0,14ug/mL, cubriendo las mínimas concentraciones que se necesitan medir en esta matriz. (11)

Los ensayos de interferencia mostraron que no existe reacción cruzada o interferencia significativa

con las drogas que habitualmente se coadministra la DFH, como se ha observado en otros trabajos

## CONCLUSIONES

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

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Patsalos PN, Spencer EP, Berry DJ. Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs in Epilepsy: A 2018 Update. *Ther Drug Monit.* 2018 Oct;40(5):526-548. doi: 10.1097/FTD.0000000000000546.
- 2 McNamara J O. Capítulo 21: Farmacoterapia de las epilepsias. En: Brunton, Laurence L., Bruce A. Chabner, and Björn C. Knollmann. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw hill, 2019. p. 501-25.
- 3 López-Gonzalez R. Epilepsia, Tratamiento Farmacológico y su Monitoreo. *Revista Cúpula* 2016; 30 (2): 44-53.
- 4 Silvano CE, Terra VC, Twardowsky CA. CYP2C9 polymorphisms in epilepsy: influence on phenytoin treatment. *Pharmgenomics Pers Med.* 2018 Mar 29;11:51-58. doi: 10.2147/PGPM.S108113.
- 5 Guevara N, Maldonado C, Uría M, González R, Ibarra M, Alvariza S, Carozzi A, Azambuja C, Fagiolino P, Vázquez M. Role of CYP2C9, CYP2C19 and EPHX Polymorphism in the Pharmacokinetic of Phenytoin: A Study on Uruguayan Caucasian Subjects. *Pharmaceuticals (Basel).* 2017 Aug 18;10(3):73. doi: 10.3390/ph10030073.
- 6 Aldaz A, Ferriols R, Aumente D, Calvo MV, Farre MR, García B, Marqués R, Mas P, Porta B, Outeda M, Soy D; Grupo PK-gen de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. Pharmacokinetic monitoring of antiepileptic drugs. *Farm Hosp.* 2011 Nov-Dec;35(6):326-39. English, Spanish. doi: 10.1016/j.farma.2010.10.005.
- 7 Wu MF, Lim WH. Phenytoin: A Guide to Therapeutic Drug Monitoring. *Proceedings of Singapore Healthcare.* 2013;22(3):198-202. doi:10.1177/201010581302200307
- 8 Hutchinson L, Sinclair M, Reid B, Burnett K, Callan B. A descriptive systematic review of salivary therapeutic drug monitoring in neonates and infants. *Br J Clin Pharmacol.* 2018 Jun;84(6):1089-1108. doi: 10.1111/bcp.13553.
- 9 Liamsuwan S, Jaiweera wattana U. Correlation between serum and salivary phenytoin concentrations in Thai epileptic children. *J Med Assoc Thai.* 2011 Aug;94 Suppl 3: S172-7
- 10 Tennison M1, Ali I, Miles MV, D'Cruz O, Vaughn B, Greenwood R. Feasibility and acceptance of salivary monitoring of antiepileptic drugs via the US Postal Service. *Ther Drug Monit.* 2004 Jun;26(3):295-9. doi: 10.1097/00007691-200406000-00013.
- 11 Gonzalez I. I. R, Suarez H. A, Odierna E. R, Rivolta S. E, Hansen C. Fenitoína en Saliva: Cuantificación por FPIA y su aplicación en la Práctica Clínica. *Ciencia Forense Latinoamericana* 2016 (2) p.12-17 <http://www.tiaft.org/costarica2016/data/uploads/resumen-de-ponencias.pdf>
- 12 Paxton JW, Whiting B, Stephen KW. Phenytoin concentrations in mixed, parotid and submandibular saliva and serum measured by radioimmunoassay. *Br J Clin Pharmacol.* 1977 Apr;4(2):185-91. doi: 10.1111/j.1365-2125.1977.tb00692.x.
- 13 European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use. 21 July 2011. Disponible en: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)
- 14 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline- Second Edition. EP9-A2 Vol 22 N°19 Replaces EP9-A Vol15 N°17. 2002. Disponible en: [https://webstore.ansi.org/preview-pages/CLSI/preview\\_EP09-A2.pdf](https://webstore.ansi.org/preview-pages/CLSI/preview_EP09-A2.pdf)
- 15 Kabra PM, Nelson MA, Marton LJ. Simultaneous very fast liquid-chromatographic analysis of ethosuximide, primidone, phenobarbital, phenytoin, and carbamazepine in serum. *Clin Chem.* 1983 Mar;29(3):473-6.
- 16 Liu H, Delgado MR. Therapeutic drug concentration monitoring using saliva samples. Focus on anticonvulsants. *Clin Pharmacokinet.* 1999 Jun;36(6):453-70. doi: 10.2165/00003088-199936060-00006.
- 17 Tutor-Crespo MJ, Hermida J, Tutor JC. Phenytoin immunoassay measurements in serum samples from patients with renal insufficiency: comparison with high-performance liquid chromatography. *J Clin Lab Anal.* 2007;21(2):119-23. doi: 10.1002/jcla.20115.
- 18 Miles MV, Tennison MB, Greenwood RS, Benoit SE, Thorn MD, Messenheimer JA, Ehle AL. Evaluation of the Ames Seralyzer for the determination of carbamazepine, phenobarbital, and phenytoin concentrations in saliva. *Ther Drug Monit.* 1990 Sep;12(5):501-10. doi: 10.1097/00007691-199009000-00016.
- 19 Dolatabadi, R; Mohammadi, A; Nojavan, S.; Yaripour, S.; Tafakhori, A.; Shirangi, M. Electromembrane extraction-high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection of phenobarbital and phenytoin in human plasma, saliva, and urine. *Journal of the Chinese Chemical Society.* 2021; 68(8): 1522-30.

### Limitaciones de responsabilidad:

La responsabilidad del trabajo es exclusivamente de quienes colaboraron en la elaboración del mismo.

### Conflicto de interés:

Ninguno.

### Fuentes de apoyo:

La presente investigación no contó con fuentes de financiación

### Originalidad:

Este artículo es original y no ha sido enviado para su publicación a otro medio de difusión científica en forma completa ni parcialmente.

### Cesión de derechos:

Quienes participaron en la elaboración de este artículo, ceden los derechos de autor a la Universidad Nacional de Córdoba para publicar en la Revista de la Facultad de Ciencias Médicas y realizar las traducciones necesarias al idioma inglés.

### Contribución de los autores:

Quienes participaron en la elaboración de este artículo, han trabajado en la concepción del diseño, recolección de la información y elaboración del manuscrito, haciéndose públicamente responsables de su contenido y aprobando su versión final.