

Instruções de Uso

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

MassTox IMMUNOSUPPRESSANTS IN WHOLE BLOOD – ONE MINUTE TEST
(MassTox Imunossuppressores – Um minuto em sangue total)

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa de ciclosporina A, tacrolimus, everolimus e sirolimus em amostras de sangue total por LC-MS/MS.

Nº de lote, data de fabricação e validade: ver rótulos dos frascos e da embalagem.

Artigo	Apresentação
93900	Kit Reagente para análise da ciclosporina A, everolimus, sirolimus, e tacrolimus em sangue total – Um minuto por LC-MS/MS.

Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções Masstox Immunossuppressants in whole blood no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

O kit de reagentes MassTox® da Chromsystems de imunossuppressores em sangue total é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser usada em laboratórios clínicos para a detecção quantitativa de ciclosporina A, everolimus, sirolimus (rapamicina) e tacrolimus (FK-506) em amostras humanas de sangue total com EDTA via cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS). Ele é indicado como teste de monitoramento de pacientes tratados com imunossuppressores e como auxílio para garantir os níveis de drogas dentro da faixa terapêutica.

MÉTODO

Cromatografia líquida acoplada a espectrofotômetro de massa (LC-MS/MS).

PRINCÍPIO

O preparo manual da amostra se limita a um simples e efetivo processo de precipitação de proteínas. Os componentes são enriquecidos, e substâncias interferentes removidas via coluna trap. Na sequência é elaborada a separação cromatográfica via uma coluna analítica conectada a uma válvula de 6 portas e 2 posições, ou de 10 portas e 2 posições. O uso dos padrões internos deuterados garante a precisão e a robustez do método e compensa os efeitos de matriz (tais como a supressão de íons).

REAGENTES FORNECIDOS NO KIT

Componentes e Composições:

Componente	Composição	400 testes	1200 testes
Fase móvel A (Mobile Phase)	Metanol 25%	1000 mL	3 x 1000 mL
Fase móvel B (Mobile Phase)	Metanol 50-100%, Tetrahidrofurano ≤ 2,5%	1000 mL	3 x 1000 mL
Solução de Lavagem (Rinsing Solution)	Metanol 25-50%	1000 mL	2 x 1000 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Acetonitrila 50-100%	100 mL	3 x 100 mL
Tampão de extração (Extraction Buffer)	Metanol 10-25%	40 mL	3 x 40 mL

Internal Standard Set	IS (Ciclosporina A-d4; Everolimus-d4; Sirolimus-d3; Tacrolimus-13C d2) Tampão de reconstituição: propano-2-ol 25-50%; ácido acético 50-100%	1 conjunto (IS 4 x 2,5 ml + Tampão de reconstituição 1 x 10 ml)	3 conjuntos (IS 4 x 2,5 ml + Tampão de reconstituição 1 x 10 ml)
-----------------------	---	--	---

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada nos rótulos, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas.

Produto	Temperatura
Fase móvel A	+18 a +30°C
Fase móvel B	+18 a +30°C
Solução de lavagem	+18 a +30°C
Reagente de precipitação	+18 a +30°C
Tampão de Extração	+18 a +30°C
Padrão interno	Abaixo de -18°C

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Favor consultar a ficha de segurança dos reagentes e adotar as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto. As instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

DESCARTE

Reconstituição, o Padrão Interno reconstituído, o tampão de Extração e o Tuning Mix contém solventes orgânicos. Descarte os resíduos dos produtos em um contêiner para solventes orgânicos livres de halogênio. Os resíduos de amostras de pacientes e as amostras preparadas, assim como os controles e calibradores devem ser coletados e descartados como lixo potencialmente infeccioso. Descarte de acordo com as normas locais e nacionais.

PREPARO DOS REAGENTES

Fase Móvel A e Fase Móvel B: prontos para uso.

Solução de Lavagem: pronto para uso.

Reagente de Precipitação: pronto para uso.

Tampão de Extração: pronto para uso.

Padrão interno (liofilizado)

1. Descongelar um frasco de Padrão Interno liofilizado
2. Adicionar 2,5 mL de Tampão de reconstituição
3. Fechar com a tampa preta fornecida e deixar por cerca de 5 minutos à temperatura ambiente, agitar cuidadosamente e ocasionalmente até homogeneização do conteúdo.

Evitar a luz direta!

NOTA: O Tampão de Reconstituição contém aditivos estabilizadores. Para garantir a estabilidade do Padrão Interno, o Tampão de Reconstituição deve ser utilizado.

O Mix de Padrão Interno pode ficar um pouco turvo, mas isto não afeta a performance da análise. Favor não centrifugar o padrão interno em caso de turbidez, somente agite brevemente antes do uso.

Estabilidade do Padrão Interno reconstituído: o padrão interno reconstituído é estável por até 2 semanas se mantido bem fechado, refrigerado em temperatura entre 2 e 8°C e protegido da luz. Para períodos maiores de armazenamento (máximo 3 meses), alíquotar e conservar congelado (abaixo de -18°C).

MATERIAIS REQUERIDOS, NÃO FORNECIDOS NO KIT

Coluna analítica equilibrada (Chromsystems art. 93100).

Coluna Trap equilibrada (Chromsystems art. 93122).

Immunosuppressants whole blood control, Four-level (I + II + III + IV) (Chromsystems art. 0081).

6plus1 Multilevel Calibrator Set Immunosuppressants in Whole Blood (Chromsystems art. 28039/XL).

Placas de extração de 96 poços profundos (Chromsystems art. 93956).

Placas de coleta (Chromsystems art. 93058).

Selos adesivos perfuráveis (Chromsystems art. 93059).

Água tipo I ou grau HPLC.

Espectrômetro de massa em tandem com fonte ESI

Válvula de 6 portas de 2 posições, mínimo

Sistema HPLC gradiente com duas bombas, forno de coluna e sistema automático de amostragem

Pipetas e pontas de pipetas

Frascos para o sistema automático de amostragem e selos

Centrífuga de superfície de bancada

Vortex™

AMOSTRA

Deverão ser analisadas amostras de sangue total colhidas em EDTA.

Estabilidade da amostra: as amostras coletadas desta forma são estáveis por 7 dias se mantidas refrigeradas, em temperatura entre 2 e 8°C.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Ajustes de instrumento:

Volume de injeção:	5 – 50 µl (dependente do espectrômetro de massa)
Tempo de corrida:	dependente do espectrômetro de massa AB Sciex API 4000™/IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500): 1.5 min; Agilent 6460: 1.3 min; Waters ACQUITY® TQD: 1.7 min
Temperatura da coluna:	Coluna analítica: 65°C Coluna trap: temperatura ambiente (+20 a +25°C)
Solução de lavagem de agulhas para o injetor:	Solução de Lavagem (nº de pedido 93909)

Configurações de Coluna:

Na válvula configurada "Trap" (A), a amostra é carregada. Após alterar a posição da válvula para "MS/MS" (B), os analitos são eluídos da coluna trap para a coluna analítica, onde impurezas são separadas cromatograficamente. Simultaneamente, a coluna trap é equilibrada. As fases móveis são bombeadas com um fluxo isocrático de 2ml/min (Fase Móvel A) ou espectrômetro de massas dependente (Fase Móvel B). Tenha certeza de a fonte ESI utilizada é designada para o fluxo requerido.

Configuração de válvula	Tempo [min]		
	AB Sciex API 4000™/AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)	Agilent 6460	Waters ACQUITY®TQD
Trap	0.00	0.00	0.00
MS/MS	0.25	0.25	0.25
Trap	1.50	1.15	1.65

Procedimento de preparo de amostras:

Preparo manual de amostras

Reconstituir cada calibrador em sangue total multinível 6PLUS1® e controle em sangue total *MassCheck*® com 2.0 ml de água destilada, e o padrão interno com 2.5 ml de tampão de reconstituição.

1. Colocar 50 µl da amostra / calibrador / controle em um frasco de reação de 1.5 ml.
2. Adicionar 25 µl do padrão interno reconstituído.
3. Adicionar 100 µl do tampão de extração.
4. Adicionar 250 µl de reagente de precipitação e agitar por 1 minuto; incubar por 2 minutos à temperatura ambiente.
5. Centrifugar por 5 minutos a 15000 g.
6. Transferir a sobrenadante para um frasco de amostragem e injetar de 5 a 50 µl do sobrenadante no sistema HPLC-MS/MS.

Para determinar o volume de injeção ótimo, injetar volumes crescentes de 5 a 50 µl de um calibrador preparado 1 (28031) até que a intensidade de sinal necessária seja obtida. Então usar o calibrador 6 preparado (28036/XL) para garantir que todos os componentes ainda se encontram dentro da faixa de trabalho linear do sistema MS/MS.

Preparo automatizado de amostra

O preparo de amostras completo ou parcial usando um automatizador para laboratório é possível. Detalhes podem ser encontrados no manual de instruções.

Cuidado

O automatizador para laboratório deve ser equipado com características adequadas de detecção de coágulos. Sistema configurados para a monitoração de pressão tem mostrado vantagens práticas com relação a sistemas medidores de condutividade. Contate o fabricante do sistema, uma vez que a Chromsystems não pode ser responsável pela adequabilidade do sistema. O kit de reagentes Chromsystems não produz resultados confiáveis ao menos que seja garantido que a quantidade correta de amostras seja utilizada.

O preparo de amostras também pode ser realizado manualmente com o uso de placas de filtro de 96 poços e uma pipeta multicanal (Multi pipeta e/ou pipeta com pente).

Mantenha a ordem de pipetagem!

1. Pipete 50 µl de sangue total bem homogeneizado (calibrador, controles, amostras) em uma placa de extração de 96 poços
2. Adicione 25 µl de Padrão Interno
3. Adicione 100 µl de tampão de extração
4. Adicione 250 µl de reagente de precipitação
5. Agite por 3 min (1200 rpm)
6. Separe o precipitado por centrifugação (2000 x g, 3 min)
7. Transfira o supernadante para a placa de coleta
8. Sele a placa de coleta e transfira para o autosampler
9. Injete 5-50 µl do eluato no sistema de LC-MS/MS

A pipetagem do Padrão Interno, do Padrão de Extração e do Reagente de Precipitação é facilitada e acelerada pelo uso do modo de multipipetagem do sistema. A água ultrapura (0.055 µS/cm, 18.2 MΩ) é adequada para lavagem de agulhas.

Estabilidade das amostras preparadas

As amostras preparadas são estáveis por 2 dias à temperatura ambiente, refrigeradas (+2 a +8°C) ou no freezer (abaixo de -18°C) por pelo menos 7 dias (em frascos de vidro e protegidos da luz).

Nas placas de coleta, as amostras podem evaporar, e por isso elas devem ser medidas dentro de um dia. Se não for possível, os eluatos devem ser transferidos para um frasco de vidro e bem fechados. Protegidos da luz, elas são estáveis por 2 dias a temperatura ambiente, por 5 dias refrigeradas (+2 a +8°C) e por pelo menos 7 dias no freezer (abaixo de -18°C).

MRMs dos analitos e IS (padrão interno):

A tabela abaixo inclui todas as MRMs para os analitos e os padrões internos deuterados. Todas as substâncias são medidas em modo de ionização positivo. Como íon precursor é utilizado o adutor de amônio [M + NH₄]⁺.

Na medida do possível, outra transição de massa é mostrada para cada analito, que pode ser usada como qualificadora. Esta transição de massa não é validada.

Componente	Fórmula Molecular	Massa exata (g/mol)	MRM 1	MRM 2
Ciclosporina A	C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂	1201.8	1219.9 → 1202.8	1219.9 → 675.5
Ciclosporina A-d ₁₂	C ₆₂ H ₉₉ D ₁₂ N ₁₁ O ₁₂	1213.9	1231.9 → 1214.8	-
Everolimus	C ₅₃ H ₈₃ NO ₁₄	957.6	975.6 → 908.5	975.6 → 926.5
Everolimus-d ₄	C ₅₃ H ₇₉ D ₄ NO ₁₄	961.6	979.6 → 912.5	-
Sirolimus	C ₅₁ H ₇₉ NO ₁₃	913.6	931.6 → 864.5	931.6 → 882.5
Sirolimus-d ₃	C ₅₁ H ₇₉ NO ₁₃ D ₃	916.6	934.6 → 864.5	-
Tacrolimus	C ₄₄ H ₆₉ NO ₁₂	803.5	821.5 → 768.6	821.5 → 786.6
Tacrolimus- ¹³ Cd ₂	C ₄₃ ¹³ CH ₆₇ D ₂ NO ₁₂	806.5	824.5 → 771.6	-

As massas listadas acima servem somente como um guia. A posição exata do sinal máximo para cada pico de massa varia de sistema para sistema MS e deve ser determinada individualmente e otimizada, pelo menos com uma casa decimal.

CÁLCULOS

Para o cálculo manual, os seguintes dados são necessários:

$$\begin{aligned} \text{Área do pico do analito A no cromatograma MRM} &= A_{\text{amostra}} \\ \text{Área do pico do padrão interno (IS) no cromatograma MRM} &= IS_{\text{amostra}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Inclinação da curva de calibração} &= a \\ \text{Intercepção Y da curva de calibração} &= b \end{aligned}$$

A concentração do analito A na amostra C_{amostra} é calculado como abaixo:

$$C_{\text{amostra}} = \frac{(A_{\text{amostra}} / IS_{\text{amostra}}) - b}{a}$$

FATORES DE CONVERSÃO:

Analito	nmol/L para µg/L	µg/L para nmol/L
Ciclosporina A	x 1.202	x 0.832
Everolimus	x 0.958	x 1.044
Sirolimus	x 0.914	x 1.094
Tacrolimus	x 0.804	x 1.244

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos:

Produto	Apresentação
PLUS1 Multilevel Whole Blood Calibration Set - One Minute test	7 x 2 mL
Immunosuppressants Whole Blood Control, Four-level (I + II + III + IV)	4 x (2 x 2 mL)

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Validação com preparo manual de amostras

Para inspecionar a linearidade e para validar o método, os espécimes de sangue total foram fortificados com quantidades definidas de componentes. Múltiplas alíquotas destes preparados foram sujeitadas ao procedimento de preparo. As características da performance foram estabelecidas e validadas usando os seguintes instrumentos:

- espectrômetro de massas AB Sciex API 4000™
- espectrômetro de massas Agilent 6460 (com fonte de íons padrão ESI)
- espectrômetro de massas Waters ACQUITY® TQD

O uso do kit **MassTox**® (93900) em qualquer plataforma deverá ser validado pelo laboratório.

Taxa de recuperação:

A taxa de recuperação dos analitos fortificados foi determinada a partir da inclinação de curvas de calibração de múltiplas amostras fortificadas de sangue total e soluções padrão diluídas.

Analito	Taxa de Recuperação [%]		
	AB Sciex API 4000™	Agilent 6460	Waters ACQUITY® TQD
Ciclosporina A	107.5	97.7	103.5
Everolimus	100.3	103.4	97.8
Sirolimus	101.7	101.0	93.3
Tacrolimus	99.9	100.9	98.7

Linearidade e limite inferior da quantificação (LLOQ)

A linearidade foi determinada pela fortificação de amostras de sangue total com quantidades definidas de substâncias padrão. O limite inferior de quantificação (LLOQ) foi estabelecido por diluições definidas do calibrador 1 (28039/1) com o calibrador branco (28039/0).

Analito	Limite de quantificação [µg/l]			
	AB Sciex API 4000™	Agilent 6460	Waters ACQUITY® TQD	Faixa linear de pelo menos
Ciclosporina A	5	5	5	2000
Everolimus	0.5	1	1	80
Sirolimus	0.5	1	1	80
Tacrolimus	0.5	0.5	0.5	80

Precisão intra-ensaio:

A precisão intra-ensaio foi determinada para quatro concentrações diferentes através de múltiplos preparos (n = 10) do mesmo espécime:

Analito	CV em % (para uma concentração de µg/l)			
	AB Sciex API 4000™			
Ciclosporina A	4.1 (53.0)	3.6 (261)	2.4 (495)	1.4 (1140)
Everolimus	6.9 (2.8)	5.1 (5.0)	2.8 (9.9)	3.7 (33.5)
Sirolimus	5.1 (2.8)	4.2 (10.0)	2.9 (18.5)	4.0 (37.3)
Tacrolimus	3.8 (2.8)	5.2 (7.8)	3.8 (15.5)	2.9 (32.6)
Agilent 6460				
Ciclosporina A	2.6 (53.0)	3.2 (261)	2.9 (495)	3.6 (1140)
Everolimus	9.0 (2.8)	7.7 (5.0)	6.8 (9.9)	5.0 (33.5)
Sirolimus	8.8 (2.8)	9.8 (10.0)	4.9 (18.5)	7.7 (37.3)
Tacrolimus	5.9 (2.8)	4.9 (7.8)	5.0 (15.5)	3.8 (32.6)
Waters ACQUITY® TQD				
Ciclosporina A	2.3 (53.0)	2.5 (261)	2.8 (495)	3.0 (1140)
Everolimus	5.9 (2.8)	5.9 (5.0)	5.0 (9.9)	3.8 (33.5)
Sirolimus	6.6 (2.8)	3.1 (10.0)	3.5 (18.5)	5.4 (37.3)
Tacrolimus	3.6 (2.8)	2.7 (7.8)	4.8 (15.5)	3.5 (32.6)

Precisão inter-ensaio:

A precisão inter-ensaio foi determinada para quatro concentrações diferentes através de múltiplos preparos (n = 10) do mesmo espécime em dez dias diferentes:

Analito	CV em % (para uma concentração de µg/l)			
	AB Sciex API 4000™			
Ciclosporina A	6.4 (53.0)	6.6 (261)	6.3 (495)	7.6 (1140)
Everolimus	8.6 (2.8)	6.8 (5.0)	5.2 (8.8)	4.9 (33.5)
Sirolimus	9.1 (2.8)	5.9 (10.0)	5.2 (18.5)	5.3 (37.3)
Tacrolimus	9.5 (2.8)	6.6 (7.8)	5.8 (15.5)	5.3 (32.6)

	Agilent 6460			
	4.0 (53.0)	5.2 (261)	6.2 (495)	5.4 (1140)
Ciclosporina A	4.0 (53.0)	5.2 (261)	6.2 (495)	5.4 (1140)
Everolimus	12.0 (2.8)	11.0 (5.0)	8.7 (9.9)	8.7 (33.5)
Sirolimus	12.8 (2.8)	9.3 (10.0)	9.3 (18.5)	9.2 (37.3)
Tacrolimus	9.9 (2.8)	6.7 (7.8)	6.3 (15.5)	5.7 (32.6)
Waters ACQUITY® TQD				
Ciclosporina A	5.0 (53.0)	4.5 (261)	5.7 (495)	4.0 (1140)
Everolimus	7.5 (2.8)	5.7 (5.0)	5.4 (9.9)	3.8 (33.5)
Sirolimus	8.3 (2.8)	6.0 (10.0)	5.5 (18.5)	5.4 (37.3)
Tacrolimus	6.0 (2.8)	4.2 (7.8)	4.9 (15.5)	3.6 (32.6)

Estes dados foram determinados em nosso laboratório com os respectivos componentes do kit e somente com base em nossas obrigações regulatórias. Eles não contêm qualquer avaliação da performance geral dos espectrômetros de massa correspondentes, nem sugerem qualquer julgamento com relação aos espectrômetros de massa citados.

Desvio

O desvio foi determinado pela comparação das concentrações de todos os níveis de controle e com relação a todos os 4 componentes durante os 10 dias. Não foi observado desvio para a ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus e everolimus. Este teste foi elaborado para todos os três sistemas LC-MS/MS (API4000, TSQ Quantum Ultra e Waters TQDS).

Carry-over

O carry-over foi determinado pela medição do calibrador com o nível mais alto e diretamente após com o calibrador branco, e através da comparação da área do pico do nível branco proporcionalmente a área do calibrador. Este teste também foi elaborado com três sistemas LC-MS/MS (AB Sciex API 4000™, Agilent 6460 e Waters ACQUITY® TQD). Todos os quatro componentes foram testados e nenhum efeito especial com relação a carry-over foi observado. Em todas as determinações a concentração medida do calibrador branco se encontrava abaixo do limite da quantificação.

Validação com preparo automatizado de amostras

Para verificar a linearidade e para validar o método, os espécimes de sangue total foram fortificados com quantidades definidas de componentes. Múltiplas alíquotas destes preparos foram submetidas ao procedimento de preparo.

As características da performance foram estabelecidas e validadas usando os seguintes instrumentos:

- espectrômetro de massas AB Sciex API 4000™
- AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)

O preparo de amostras foi realizado com a seguinte ferramenta de manipulação de líquidos:

- Tecan Freedom EVO® 100 (para AB Sciex API 4000™)
- MassSTAR (para AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500))

O uso deste kit **MasTox**® (artigo 93900) em qualquer outra plataforma deve ser validado pelo laboratório.

Taxa de recuperação:

A taxa de recuperação dos analitos fortificados foi determinada a partir da inclinação das curvas de calibração de múltiplas amostras de sangue total fortificadas e soluções padrão diluídas.

Analito	Taxa de recuperação	
	AB Sciex API 4000™	AB Sciex IVD-MSTM Analyzer (Triple Quad™ 4500)
Ciclosporina A	104.1	98.7
Everolimus	103.8	96.1
Sirolimus	103.7	103.8
Tacrolimus	103.6	99.6

Linearidade e limite inferior da quantificação (LLOQ)

A linearidade foi determinada pela fortificação de amostras de sangue total com quantidades definidas de substâncias padrão. O limite inferior de quantificação (LLOQ) foi estabelecido por diluições definidas do calibrador 1 (28039/1) com o calibrador branco (28039/0).

Analito	LLOQ [µg/l]	Faixa linear de pelo menos [µg/l]
		AB Sciex API 4000™
Ciclosporina A	5	2000
Everolimus	1	80
Sirolimus	1	80
Tacrolimus	0.5	80
AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)		
Ciclosporina A	5	2000
Everolimus	0.5	100
Sirolimus	0.5	100
Tacrolimus	0.5	100

Precisão intra-ensaio:

A precisão intra-ensaio foi determinada para quatro concentrações diferentes através de múltiplos preparos (n = 10) do mesmo espécime:

Analito	CV em % (para uma concentração de µg/l)			
	AB Sciex API 4000™			
Ciclosporina A	3.2 (53.0)	3.4 (261)	3.7 (495)	3.9 (1140)
Everolimus	7.8 (2.8)	7.0 (5.0)	4.1 (9.9)	2.9 (33.5)
Sirolimus	4.9 (2.8)	4.4 (10.0)	3.7 (18.5)	4.9 (37.3)
Tacrolimus	4.5 (2.8)	3.5 (7.8)	3.7 (15.5)	4.7 (32.6)
AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)				
Ciclosporina A	3.1 (49.7)	5.1 (249)	5.7 (484)	4.4 (1116)
Everolimus	3.8 (2.7)	5.1 (4.8)	3.1 (9.4)	2.5 (33.1)
Sirolimus	4.3 (2.7)	2.4 (9.7)	4.0 (18.5)	2.6 (37.6)
Tacrolimus	3.4 (2.7)	2.1 (7.4)	2.7 (15.3)	1.4 (32.2)

Precisão inter-ensaio:

A precisão inter-ensaio foi determinada para quatro concentrações diferentes através de múltiplos preparos (n = 10) do mesmo espécime em dez dias diferentes:

Analito	CV em % (para uma concentração de µg/l)			
	AB Sciex API 4000™			
Ciclosporina A	5.7 (53.0)	5.0 (261)	5.8 (495)	3.7 (1140)
Everolimus	8.5 (2.8)	8.2 (5.0)	7.6 (9.9)	6.1 (33.5)
Sirolimus	11.4 (2.8)	7.1 (10.0)	7.7 (18.5)	6.0 (37.3)
Tacrolimus	6.7 (2.8)	7.3 (7.8)	6.6 (15.5)	5.9 (32.6)
AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)				
Ciclosporina A	7.7 (49.7)	6.0 (249)	6.6 (484)	6.2 (1116)
Everolimus	4.1 (2.7)	5.1 (4.8)	4.7 (9.4)	4.1 (33.1)
Sirolimus	5.8 (2.7)	4.2 (9.7)	4.2 (18.5)	3.6 (37.6)
Tacrolimus	4.3 (2.7)	3.7 (7.4)	4.1 (15.3)	3.6 (32.2)

Interferência de drogas

52 drogas comumente usadas foram testadas quanto a interferências através de sua fortificação em amostras de sangue (concentração: duas vezes a faixa terapêutica), e analisadas com um AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500).

Nenhuma interferência significativa:

Nenhum desvio significativo ($\leq 15\%$) de resultados quantitativos foram observados para nenhuma das seguintes drogas:

Acetazolamida, aciclovir, ampicacina, anfotericina B, ampicilina, azatioprina, captopril, carbamazepina, cloranfenicol, cimetidina, ciprofloxacina, digitoxina, digoxina, disopiramida, eritromicina, furosemida, ganciclovir, gentamicina, ibuprofeno, intralipid, itraconazol, canamicina, cetoconazol, lidocaína, metilicina, metilprednisolona, metoprolol, ácido micofenólico, N-acetilprocainamida, nadolol, neomicina, nifedipina, omeprazol, paracetamol, penicilina G, penicilina V, fenitoína, prazosina, prednisona, prednisolona, procainamida, propranolol, ranitidina, rifampicina, ácido salicílico, espectinomicina, estreptomomicina, tobramicina, triantereno, ácido valpróico, vancomicina, verapamil.

VALORES DE REFERÊNCIA

Ciclosporina A: Faixa terapêutica para o sangue total [µg/l] [2, 3]

	Terapia inicial	Terapia de Manutenção
Transplante de rim	150 - 225	100 - 150
Transplante de fígado	225 - 300	100 - 150
Transplante de coração	250 - 350	150 - 250

Everolimus: Faixa terapêutica para o sangue total [µg/l] [2, 3]

	Mínimo
Paciente de transplante de rim - terapia tripla com ciclosporina A, corticosteroides e everolimus.	3 - 8

Sirolimus: Faixa terapêutica para o sangue total [µg/l]

	Mínimo (µg/l)
Transplante de rim [2] <ul style="list-style-type: none">Combinação com esteroides e micofenolato de mofetil (MMF)Combinação com esteroides e sem micofenolato mofetil (MMF)	5 - 10 8 - 12
Transplante de rim [3] <ul style="list-style-type: none">Terapia tripla com ciclosporina A, corticosteroides e sirolimusTerapia dupla com corticosteroides e sirolimus	4-12 12-20
Transplante de fígado [3] <ul style="list-style-type: none">Terapia com ciclosporina A ou tacrolimus, sirolimus e, quando apropriado, corticosteroideTerapia com sirolimus e, quando apropriado, corticosteroides	3 - 6 5 - 8

Tacrolimus: Faixa terapêutica para o sangue total [µg/l]

	Terapia inicial		Terapia de Manutenção	
	[2]	[3]	[2]	[3]
Transplante de rim	10 - 15	9 - 13	5 - 10	4 - 9
Transplante de fígado	10 - 15	9 - 13	5 - 10	4 - 9
Transplante de coração	10 - 18	9 - 15	8 - 15	7 - 13

Observação / Alerta

Todas as faixas terapêuticas aqui listadas são propostas pela literatura. Não existem faixas terapêuticas universalmente estabelecidas para ciclosporina A, everolimus, sirolimus ou tacrolimus em sangue total. Os valores obtidos com diferentes métodos de ensaio não podem ser utilizados de modo intercambiável. Os laboratórios devem incluir a identificação do método usado no ensaio de modo a auxiliar na interpretação dos resultados.

Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência para adaptar o método às características do tratamento e da monitoração terapêutica.

LIMITAÇÕES CLÍNICAS

Não existem faixas terapêuticas universalmente estabelecidas para a ciclosporina A, everolimus, sirolimus ou tacrolimus em sangue total. Os valores obtidos com diferentes métodos de ensaio não podem ser utilizados de forma intercambiável. Os laboratórios deverão incluir a identificação do método usado no ensaio de modo a auxiliar na interpretação dos resultados.

Os resultados individuais não poderão ser usados como o único indicador para elaborar mudanças no regime de tratamento. Cada paciente deverá ser totalmente avaliado clinicamente antes de se elaborar ajustes no tratamento, e cada usuário deverá estabelecer as suas próprias faixas nestas avaliações clínicas. Recomenda-se o uso consistente de um ensaio para cada paciente individual. Não deverão ser utilizados fatores de conversão obtidos através de comparações de métodos de ensaio para prever os valores pertinentes a pacientes individuais.

A complexidade do estado clínico, das diferenças individuais referentes à sensibilidade aos imunossuppressores e efeitos nefrotóxicos da ciclosporina A, do sirolimus e tacrolimus, a co-administração de outros imunossuppressores, os tipos de transplante, tempos pós-transplante e um número de outros fatores contribuem com as diferentes exigências pertinentes aos níveis ótimos deste imunossuppressores em sangue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (eds): Allgemeine und spezifische Pharmakologie und Toxikologie, 9th Edition, Urban & Fischer Verlag / Elsevier GmbH München (2005).
2. Gressner AM, Arndt T (eds). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik, 2. Aufl, Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2013).
3. Thomas L (ed). Labor und Diagnose, 8. Aufl, Verlag TH-Books Frankfurt/Main (2012).

Símbolos Usados



Fabricado por: **Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH**
Importado e distribuído por: **BioSys Ltda**
Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói-RJ
CEP: 24020-112
CNPJ: 02.220.795/0001-79
MS – nº 10350840343
SAC: sac@biosys.com.br - (21) 3907-2534 – 0800 015 1414
www.biosys.com.br