

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 10350840243
 SAC: (21) 3907-2534 – sac@biosys.com.br
www.biosys.com.br

CHROMSYSTEMS
 DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

MassTox IMMUNOSUPPRESSANTS IN WHOLE BLOOD **(MassTox Imunossuppressores em sangue total)**

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa de ciclosporina A, tacrolimus, everolimus e sirolimus em amostras de sangue total em EDTA por LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa).

Somente para diagnóstico de uso *in vitro*.

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

| Artigo | Apresentação |
|--------------|--|
| 93000 | Kit Reagente por LC-MS/MS (Cromatografia líquida - espectrofotômetro de massa / espectrofotômetro de massa) para análise da ciclosporina A, everolimus, sirolimus, e tacrolimus no sangue total. |

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

SUMÁRIO

O kit é um dispositivo de diagnóstico *in vitro*, a ser utilizado nos laboratórios clínicos para a detecção quantitativa de ciclosporina A, everolimus, sirolimus e tacrolimus em sangue total (EDTA) por cromatografia líquida-espectrometria de massa. É indicado como um teste de acompanhamento em pacientes em tratamento com imunossuppressores e como uma ajuda para garantir os níveis das drogas dentro da faixa terapêutica.

MÉTODO

Cromatografia líquida – espectrofotômetro de massa / Espectrofotômetro de massa (LC-MS/MS).

PRINCÍPIO

A preparação manual da amostra é limitada a um simples e eficaz processo de precipitação de proteínas. Os analitos são enriquecidos, e as substâncias interferentes são removidas através de uma coluna de captura (Trap Column). A separação cromatográfica é então realizada por uma coluna de análise ligada a uma válvula de 6 portas na posição 2, ou de 10 portas na posição 2. O uso de padrões internos deuterados garante a precisão e a robustez do método e compensa os efeitos da matriz (tal 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%, Tetrahydrofurano ≤ 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 edético 50-100% | 1 conjunto (IS 4 x 2,5 ml + Tampão reconstituição 1 x 10 ml) | 3 conjuntos (IS 4 x 2,5 ml + Tampão reconstituição 1 x 10 ml) |
| Frascos de reação (Reaction vials) | - | 4 x 100 unidades | 12 x 100 unidades |

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 | Temperatura ambiente (18-30°C) |
| Fase móvel B | Temperatura ambiente (18-30°C) |
| Solução de lavagem | Temperatura ambiente (18-30°C) |
| Reagente de precipitação | Temperatura ambiente (18-30°C) |
| Tampão de Extração | Temperatura ambiente (18-30°C) |
| Padrão interno | Abaixo de -18°C |
| Frascos de reação | Temperatura ambiente (18-30°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

A fase móvel A e B, a solução de lavagem, o reagente de precipitação, o Internal Standard Set, o tampão de extração e os resíduos de preparação das amostras contêm solventes orgânicos e devem ser descartados como resíduos químicos livres de halogênio, de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.

PREPARAÇÃO 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.

Internal Standard (liofilizado)

1. Descongelar um frasco de Internal Standard liofilizado
2. Adicionar 2,5 ml de Tampão de reconstituição
3. Fechar com uma tampa preta fornecida e deixar por cerca de 5 minutos a temperatura ambiente, agitar cuidadosamente ocasionalmente até homogeneização do conteúdo. **Evitar a luz direta!**

NOTA: O Tampão de reconstituição contém aditivos de estabilização. Para garantir a estabilidade do Internal Standard, deve-se usar o Tampão de reconstituição.

Estabilidade do Internal Standard reconstituído: o IS 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), aliquotar e conservar congelado (abaixo de -18°C).

MATERIAIS REQUERIDOS, NÃO FORNECIDOS NO KIT

Coluna analítica equilibrada (Chromsystems art. 93100).
Coluna Trap equilibrada (Chromsystems art. 93110).
Immunosuppressants whole blood control, Four-level (I + II + III + IV) (Chromsystems art. 0081).
6plus1 Multilevel Calibrator Set Immunosuppressants in Whole Blood (Chromsystems art. 28039).
Água tipo I ou grau HPLC.

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 do instrumento:

Amostrador: Volume de injeção de 20µL,
tempo de corrida 20 min.
Detector UV: Comprimento de onda de 204 nm
Fluxo: 1,2 mL/min
Temperatura da Ambiente (aprox. 25 °C)
coluna:

Procedimento de preparação de amostras:

Utilizar os tubos de reação que acompanham o kit, para que as amostras sejam protegidas da exposição à luz ambiente.

1. Pipetar 50µl de amostra/calibrador/controle ao frasco de reação de 1,5 mL
2. Adicionar 25µl de Padrão Interno (IS) reconstituído.
3. Adicionar 100 µL de Tampão de extração e agitar em vortex por 10 segundos, incubar 2 minutos a temperatura ambiente

4. Adicionar 250 µL de reagente de precipitação e agitar em vortex por 1 minuto, incubar 2 minutos a temperatura ambiente
5. Centrifugar por 5 min a 15000 g.
6. Transferir o sobrenadante para um frasco do autosampler e injetar 5 a 25 µL do sobrenadante no sistema de HPLC-MS/MS.

Controles devem ser incluídos em todas as séries de análise para monitorar a exatidão e precisão do sistema.

Para determinar o volume de injeção ótimo, injetar volumes crescentes de 5 a 25 µL do calibrador 1 preparado até que a intensidade de sinal requerida seja obtida. Então usar o calibrador 6 preparado para ter certeza que todos os analitos estejam dentro da variação de trabalho linear do sistema MS/MS.

Estabilidade das amostras preparadas

As amostras preparadas podem ser mantidas por 2 dias a temperatura ambiente ou refrigeradas (2-8°C) por 5 dias (**em frasco de vidro protegidas da luz**).

Para períodos maiores de armazenamento (máximo de 6 semanas), congelar (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. É utilizado como precursor um íon amônio "adduct" [M + NH₄]⁺.

| analito | Fórmula molecular | Massa exata (g/mol) | MRM |
|---|--|---------------------|-------------------|
| Ciclosporina A | C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂ | 1201.8 | 1219.9 →1202.8 |
| Ciclosporina A-d ₄ | C ₆₂ H ₁₀₇ D ₄ N ₁₁ O ₁₂ | 1205.8 | 1223.9 →1206.8 |
| Everolimus | C ₅₃ H ₈₃ NO ₁₄ | 957.6 | 975.6 → 908.5 |
| 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 |
| Sirolimus-d ₃ | C ₅₁ H ₇₆ NO ₁₃ D ₃ | 916.6 | 934.6 → 864.5 |
| Tacrolimus | C ₄₄ H ₆₉ NO ₁₂ | 803.5 | 821.5 →768.6 |
| 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

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

Área/altura do pico do analito A no cromatograma MRM
= A_{amostra}

Área/altura do pico do padrão interno (IS) no cromatograma MRM
= IS_{amostra}

Inclinação da curva de calibração = a

Intercepção Y da curva de calibração = b

Fatores de conversão:

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

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos:

| Produto | Apresentação |
|--|----------------|
| 6plus1 Multilevel Calibrator Set Immunsuppressants in Whole Blood | 7 x 2 mL |
| Immunsuppressants Whole Blood Control, Four-level (I + II + III + IV) | 4 x (2 x 2 mL) |

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Linearidade e limite de detecção

Foram realizados testes para determinação da linearidade e limite inferior de quantificação (LLOQ) do produto utilizando-se amostras de sangue total sobrecarregadas com quantidades definidas dos analitos a determinar.

Os estudos foram realizados utilizando-se os seguintes espectrômetros de massa:

- AB Sciex API4000
- Waters TQDd
- Thermo TSQ Ultra

Recuperação

A recuperação analítica foi determinada a partir da inclinação das curvas de calibração de múltiplas amostras de sangue sobrecarregadas e soluções padrão diluídas. Os resultados obtidos foram:

| Analito | API 4000 (%) | TSQ Ultra (%) | Waters TQD (%) |
|----------------|--------------|---------------|----------------|
| Ciclosporina A | 95,2 | 89,5 | 96,9 |
| Everolimus | 100,6 | 94,7 | 97,8 |
| Sirolimus | 105,1 | 96,6 | 96,2 |
| Tacrolimus | 107,8 | 97,7 | 96,1 |

O método é linear do LLOQ até o limite superior indicado abaixo:

| Analito | API 4000 (ug/L) | TSQ Ultra (ug/L) | Waters TQD (ug/L) | Linearidade até (ug/L) |
|----------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------------|
| 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:

A determinação da precisão intra-ensaio e inter-ensaio foi realizada a partir da média de múltiplas amostras, analisadas em três diferentes concentrações.

API 4000

| Precisão intra-ensaio (n = 10) | CV % (Concentração µg/L) | | | |
|--------------------------------|--------------------------|------------|------------|------------|
| Ciclosporina A | 3.8 (69.4) | 2.5 (235) | 1.8 (522) | 1.9 (1190) |
| Everolimus | 4.6 (2.8) | 4.4 (5.0) | 3.9 (10.1) | 3.4 (34.9) |
| Sirolimus | 5.5 (3.3) | 2.1 (11.1) | 3.9 (21.4) | 3.0 (42.0) |
| Tacrolimus | 3.6 (2.7) | 2.5 (7.4) | 4.0 (15.6) | 2.8 (33.6) |
| Precisão inter-ensaio (n = 10) | CV % (Concentração µg/L) | | | |
| Ciclosporina A | 3.2 (69.4) | 2.9 (235) | 3.0 (522) | 2.8 (1190) |
| Everolimus | 7.1 (2.8) | 5.5 (5.0) | 5.4 (10.1) | 4.0 (34.9) |
| Sirolimus | 6.7 (3.3) | 4.5 (11.1) | 4.2 (21.4) | 4.0 (42.0) |
| Tacrolimus | 4.7 (2.7) | 3.5 (7.4) | 3.6 (15.6) | 3.3 (33.6) |

WATERS TQD

| Precisão intra-ensaio (n = 10) | CV % (Concentração µg/L) | | | |
|--------------------------------|--------------------------|------------|------------|------------|
| Ciclosporina A | 2.8 (53.2) | 1.3 (276) | 1.4 (522) | 1.1 (1190) |
| Everolimus | 8,8 (2.3) | 4.6 (4.4) | 3.6 (10.1) | 4.0 (34.9) |
| Sirolimus | 5.5 (2.9) | 6.5 (10.1) | 4.3 (21.4) | 2.9 (42.0) |
| Tacrolimus | 3.0 (2.6) | 3.6 (7.3) | 2.0 (15.6) | 2.7 (33.6) |
| Precisão inter-ensaio (n = 10) | CV % (Concentração µg/L) | | | |
| Ciclosporina A | 2.3 (53.2) | 2.0 (276) | 1.8 (522) | 1.9 (1190) |
| Everolimus | 11.0 (2.3) | 8.4 (4.4) | 5.3 (10.1) | 4.9 (34.9) |
| Sirolimus | 10.4 (2.9) | 5.5 (10.1) | 4.7 (21.4) | 4.8 (42.0) |
| Tacrolimus | 5.4 (2.6) | 4.0 (7.3) | 3.7 (15.6) | 3.1 (33.6) |

Interferentes endógenos

Amostras potencialmente problemáticas foram analisadas para verificar a interferência no testes por presença de hemólise, icterícia e lipemia.

Os experimentos foram realizados com concentrações dos analitos em níveis subterapêuticos. As amostras foram sobrecarregadas com concentrações conhecidas dos imunossuppressores nas seguintes concentrações:

Ciclosporina A : 42,6 ug/L

Tacrolimus: 1,3 ug/L

Sirolimus: 2,0 ug/L

Everolimus: 1,4 ug/L

Em muitos casos não houve influência significativa da matriz nos resultados quantitativos.

Apenas algumas amostras apresentaram desvios maiores que 15%.

| Analito | Número de amostras com desvio >15% (porcentagem com desvio >15%) | | |
|----------------|--|-----------------|-----------------|
| | hemolítica (n=25) | Lipêmica (n=25) | Ictérica (n=24) |
| Ciclosporina A | 4 (16%) | 7 (28%) | 2 (8%) |
| Everolimus | 1 (4%) | 4 (16%) | 4 (17%) |
| Sirolimus | 0 (0) | 0 (0) | 1 (4%) |
| Tacrolimus | 1 (4%) | 1 (4%) | 0 (0) |

Obs: exceto 2 amostras lipêmicas para ciclosporina A, nenhuma das demais amostras com desvio >15% foi >25%. Não se observou correlação entre as quantidades de bilirrubina, hemoglobina e lipídeos e os desvios observados (comparado a matriz livre) das drogas imunossupressoras testadas.

Interferência de drogas

Foram testadas 53 drogas comumente utilizadas na clínica. Amostras de sangue foram sobrecarregadas com as mesmas. Nenhum desvio >15% foi observado pela presença das drogas citadas abaixo nas concentrações relevantes das mesmas.

Não houve interferência a 1 mg/mL de:

Acetazolamida, aciclovir, ampicacina, anfotericina B, ampicilina, azatioprina, captopril, carbamazepina, cefasloprina, cloranfenicol, cimetidina, ciprofloxacino, digitoxina, digoxina, disopiramida, eritromicina, furosemida, ganciclovir, gentamicina, ibuprofeno, intralipídeo, itraconazol, kanamicina, cetoconazol, lidocaína, metilicina, metilprednisolona, metoprolol, ácido micofenólico, N-acetilprocainamida, badolol, neomicina, nifedipina, omeprazol, paracetamol, penicilina G, penicina V, fenitoína, prazosin, prednisona, prednisolona, procainamida, propranolol, ranitidina, ácido salicílico, espespectinomicina, estereptomicina, tobramicina, triamterene, ácido valpróico, vancomicina, verapamil.

Não houve interferência a 50 ug/mL de:
Gangciclovir

VALORES DE REFERÊNCIA

Ciclosporina A

| | Terapia Inicial (µg/L) | Manutenção da terapia (µg/L) |
|------------------------|-----------------------------------|---|
| Transplante renal | 150 - 225 | 100 - 150 |
| Transplante hepático | 225 - 300 | 100 - 150 |
| Transplante de coração | 250 - 350 | 150 - 250 |

Everolimus

| | Mínimo (µg/L) |
|---|--------------------------|
| Paciente com transplante de rim - terapia tripla com ciclosporina A, corticosteróides, e everolimus | 3 - 8 |

Sirolimus

| | Mínimo (µg/L) |
|--|--------------------------|
| Paciente com transplante de rim - terapia tripla com ciclosporina A, corticosteróides, e sirolimus | 4 - 12 |
| Paciente com transplante de rim - dupla terapia com corticosteroide e sirolimus | 12 - 20 |
| Paciente com transplante de fígado - Imunossupressão secundária | 3 - 6 |
| Paciente com transplante de fígado - sem insuficiência renal crônica | 5 - 8 |

Tacrolimus

| | Terapia Inicial (µg/L) | Manutenção da terapia (µg/L) |
|------------------------|-----------------------------------|---|
| Transplante renal | 10 - 15 | 5 - 10 |
| Transplante hepático | 10 - 15 | 5 - 10 |
| Transplante de coração | 10 - 18 | 8 - 15 |

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke: Allgemeine und spezifische Pharmakologie und Toxikologie, 9th Edition, Elsevier, Munich (2005)
2. Gressner A., Arndt, T.: Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik, volume 1: Klinische Chemie, 1st Edition, Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2007)
3. Thomas L.: Labor und Diagnose, 7th edition, Verlag TH-Books, Frankfurt/Main (2008).

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
D-82166 Gräfelfing
Munique, Alemanha
Fone: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-199
www.chromsystems.de