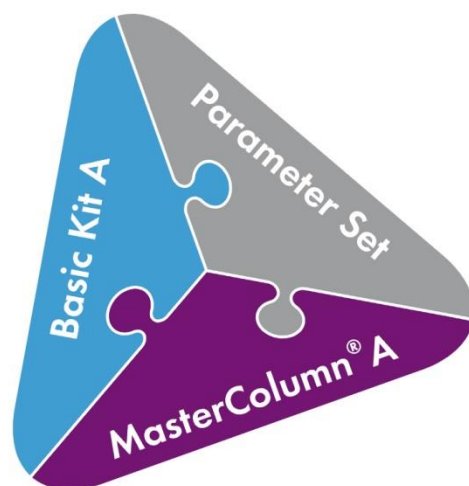


# CHROMSYSTEMS

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

## MassTox<sup>®</sup> TDM Series A



Manual de instruções para a análise por LC-MS/MS

**MassTox<sup>®</sup> TDM Series A**

PARAMETER Set

Drogas Antimicóticas em soro/plasma

Artigo 92922

CE IVD

Parâmetros:

- Fluconazol
- 5- Flucitosina
- Hidróxi-itraconazol
- Itraconazol
- Cetoconazol
- Posaconazol
- Voriconazol

## **MS 10350840346**

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH é certificada de acordo com DIN EM ISSO 9001, DIN EM ISSO 13485 e ISSO 13485 CMDR. Os produtos são produzidos e colocados em circulação de acordo com as diretrizes IVD 98/79/EC.

© Este documento é protegido por direitos autorais.  
Todos os direitos reservados.

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH  
Am Haag 12  
82166 Gräfelfing  
Germany

Phone: +49 89 18930-0  
Fax: +49 89 18930-299  
[www.chromsystems.com](http://www.chromsystems.com)

# Conteúdo

1	.....Informações Gerais .....	4
2	.....Introdução .....	5
3	.....Sistema LC-MS/MS .....	7
3.1	.... Otimizando os MRMs (tuning) .....	7
3.2	.... MRMs dos analitos e dos padrões internos .....	7
3.3	.... Gradientes do HPLC .....	8
3.4	.... Diluição e volumes de injeção .....	8
4	.....Amostras de pacientes e componentes liofilizados.....	9
4.1	.... Coleta e armazenamento de amostras de pacientes .....	9
4.2	.... Uso e estabilidade do mix de padrão interno.....	9
4.3	.... Reconstituição do calibrador em plasma .....	9
4.4	.... Reconstituição dos Controles em Plasma <b>MassCheck</b> ® .....	10
4.5	.... Estabilidade das amostras preparadas.....	11
5	.....Faixas Terapêuticas .....	11
6	.....Fatores de Conversão .....	12
7	.....Armazenamento e estabilidade dos reagentes .....	12
8	.....Descarte.....	12
9	.....Exemplo de Cromatograma .....	13
10	...Interferentes.....	13
11	...Literatura .....	15
	Apêndice I:.. Informações de Risco .....	17
	Apêndice II: . Validação .....	18
	Apêndice III: Declaração de conformidade .....	20

# 1 Informações Gerais

Artigo	Produto	
92922	<b>MassTox®</b> TDM Series A PARAMETER Set Drogas Antimicóticas em soro/plasma Conjunto de parâmetros para a determinação de: Fluconazol, 5-flucitosina, hidróxi-itraconazol, itraconazol, cetoconazol, posaconazol e voriconazol.	
	3PLUS1® Calibrador Multinível em Plasma Drogas antimóticas	4 x 1.0 ml (liof.)
	<b>MassCheck®</b> Controle de Drogas Antimicóticas Nível I	5 x 1.0 ml (liof.)
	<b>MassCheck®</b> Controle de Drogas Antimicóticas Nível II	5 x 1.0 ml (liof.)
	Mix de Padrão Interno	4 x 0.9 ml
92051	Componentes disponíveis separadamente: 3PLUS1® Calibrador Multinível em Plasma Drogas antimóticas	4 x 1.0 ml (liof.)
0253	<b>MassCheck®</b> Controle de Drogas Antimicóticas Nível I	5 x 1.0 ml (liof.)
0254	<b>MassCheck®</b> Controle de Drogas Antimicóticas Nível II	5 x 1.0 ml (liof.)
92644	Mix de Padrão Interno	4 x 0.9 ml
	Acessórios	
92039	Tuning Mix <b>MassTox®</b> Drogas Antimicótica	1 ml
0252	<b>MassCheck®</b> Controle de Drogas Antimicóticas Bi-nível (I+II)	2 x 5 x 1.0 ml (liof.)
92111/200	<b>MassTox®</b> TDM BASIC Kit A, para 200 análises	
92111/1000	<b>MassTox®</b> TDM BASIC Kit A, para 1000 análises	
92110	<b>MassTox®</b> TDM Master Column® Série A Coluna analítica (equilibrada, com cromatograma teste)	1 pc.

Com o objetivo de avaliar drogas antimicóticas, o kit **MassTox®** TDM BASIC Kit A e a coluna **MassTox®** TDM Master Column® Series A são requeridos como complemento do **MassTox®** TDM PARAMETER SET.

Favor verificar o manual de instruções separado do **MassTox®** TDM BASIC Kit A para informações de compras de fases móveis e reagentes para o preparo de amostras.

## 2 Introdução

Devido ao crescente número de pacientes imunocomprometidos, as micoses invasivas têm aumentado nos anos recentes. As causas da imunodeficiência são doenças como AIDS, o aumento comum de aplicações de drogas fortes como imunossupressores após transplantes, assim como quimioterapêuticos e radioterapia no tratamento de câncer.

As espécies patogênicas mais comuns para micoses são *Candida* e *Aspergillus* que entram o corpo pela inalação dos esporos do fungo ou através de danos na pele. No corpo, eles podem afetar vários órgãos internos ou sistemas inteiros (por exemplo, trato gastrointestinal), chamado de micose sistêmica. Devido a melhorias nos métodos de diagnóstico, doenças fúngicas que anteriormente eram raramente reconhecidas, como fusariose, scedosporiose e zigomicose se tornaram mais importantes.

Devido a sua relativamente boa tolerância, (particularmente itraconazol, posaconazol e voriconazol), e ao grande espectro de atividade, drogas antifúngicas da classe dos triazóis são adequadas para a profilaxia e para o tratamento terapêutico de micoses sistêmicas. O posaconazol fornece a oportunidade de uma terapia antifúngica oral contra a fusariose e zigomicose, o voriconazol é ativo contra espécies de *Fusarium* e *Scedosporium*, enquanto a aplicação do itraconazol é limitada a terapia de micoses causadas por leveduras (*Candida* spp.) e fungos filamentosos (*Aspergillus* spp.). Entretanto, drogas mais antigas como fluconazol (listada na Lista Modelo de Medicamentos Essenciais da OMS) e cetoconazol ainda são usados para o tratamento de infecções fúngicas.

O efeito antifúngico de todas as drogas antifúngicas triazóis não difere de outros azóis. O efeito é baseado na inibição da lanosterol-14- $\alpha$  desmetilase dependente da P450. A desmetilação do lanosterol é uma etapa intermediária na síntese do ergosterol que é essencial para a estrutura correta e muitas funções das membranas fúngicas. Além disso, alguns efeitos adversos como a acumulação de 14-metil-esterol, 3-cetoesroides e a síntese desordenada de quitina afetam a estabilidade das membranas dos fungos, a formação do septo primário da levedura e a atividade de enzimas ligadoras de membrana. Finalmente o fungo se torna susceptível a danos osmóticos. Isto leva a fagocitose pela célula hospedeira e finalmente a morte do fungo.

O efeito químico de todos os antifúngicos derivados de azóis no citocromo P450 depende da complexação do íon de ferro no sítio ativo da enzima fúngica no anel azólico. Uma vez que a afinidade ao citocromo do fungo é muito mais forte do que às enzimas humanas, a biossíntese fúngica do ergosterol reage com muito mais sensibilidade aos azóis do que a síntese humana de colesterol. Modificações na estrutura química geram diferentes espectros de atividade e potência. Assim, a atividade antifúngica do posaconazol é significativamente aumentada quando comparada com o itraconazol, que é quimicamente similar. O voriconazol, que é derivado do fluconazol, é, adicionalmente, ativo contra novas infecções fúngicas que são sensíveis somente a uma extensão limitada de outros antifúngicos.

Os triazóis mencionados são drogas lipofílicas e básicas fracas (pKa 3.7) que não são ionizadas em valores de pH fisiológico. Por esta razão o tipo de aplicação é muito importante para a biodisponibilidade. Devido a grande variabilidade na absorção e reações metabólicas (por formulação, co-medicação ou doença) entre os indivíduos, o monitoramento das concentrações de plasma é requerido em pacientes que possuam infecções fúngicas severas. Somente a aderência a faixa terapêutica garante um resultado positivo da terapia. Além disso, isto antagoniza a geração de resistência.

5-Flucitosina é uma substância ativa pertencente aos antifúngicos da classe pirimidina e também é listado na Lista Modelo de Medicamentos Essenciais da OMS. Seu espectro de atividade compreende micose por *Candida*, criptococose, cromoblastomicose e aspergilose. 5-Flucitosina é incorporado por uma citosina permeasse na célula fúngica como uma pró-droga e

é convertida pela citosina desaminase em 5-fluorouracil. Esta desaminação não ocorre em células de mamíferos, ou ocorre somente em uma pequena extensão. O 5-fluorouracil formado inibe a síntese de DNA e pode resultar na formação de RNA defeituoso, o que explica o efeito fungistático.

**Uso pretendido:**

O conjunto de parâmetros da Chromsystems MassTox® TDM Series A Drogas antimicóticas em Soro/Plasma é uma ferramenta de diagnóstico in vitro para ser utilizada em laboratórios clínicos para detecção quantitativa de fluconazol, 5-flucitosina, hidróxi-itraconazol, itraconazol, cetoconazol, posaconazol e voriconazol em amostras de soro ou plasma de pacientes através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Este kit é indicado como um teste de monitoramento para pacientes tratados com uma ou várias drogas antimicóticas listadas acima e com o objetivo de assegurar os níveis da droga dentro da faixa terapêutica.

**Princípio do kit de reagente:**

Este kit de reagentes da Chromsystems permite uma rápida determinação quantitativa de fluconazol, 5-flucitosina, hidróxi-itraconazol, itraconazol, cetoconazol, posaconazol e voriconazol em soro/plasma por LC-MS/MS. O uso de padrões internos estáveis isotopicamente marcados e co-eluentes garantem a confiabilidade e reprodutibilidade da quantificação dos analitos.

### 3 Sistema LC-MS/MS

**Atenção:**

Ao usar os reagentes, favor observar as informações de segurança recomendadas no apêndice I.

#### 3.1 Otimizando os MRMs (tuning)

É fortemente recomendado verificar a acurácia do sistema MS/MS antes de iniciar e de calibrar novamente caso seja necessário. Para este kit, os MRMs dos analitos podem ser ajustados como a seguir:

1. Dilua o Tuning Mix (artigo 92039) com a Fase Móvel 2 (artigo 92002) de acordo com o instrumento utilizado (API 4000 aprox. 1:20) Introduza o mix via conexão-T e bomba de infusão em 100% de Fase Móvel 2 fluindo a 0.6 ml/min.
2. Inicie uma varredura contínua em Q1 (MS scan). Otimize todos os parâmetros de fonte de íon, especialmente voltagem, temperatura, potencial de declínio e taxas de fluxo de gás. Assegure que o spray esteja estável e bem formado.
3. Alterne para o modo MRM. Para cada substância, otimize a energia de colisão e potencial de saída celular.
4. Os analitos com baixa sensibilidade devem ser otimizados novamente.

#### 3.2 MRMs dos analitos e dos padrões internos

A seguinte tabela inclui todos os MRMs recomendados para os analitos e os padrões internos correspondentes. Todas as substâncias são medidas no modo de ionização positivo. Sempre que possível, dois MRMs adicionais são estabelecidos, e podem ser usados para qualificação. Estes não são validados.

Analito	Padrão Interno correspondente (MRM 1)	MRM 1	MRM 2	MRM 3
Fluconazol	ISTD 2 (311 -> 223)	307 -> 220	307 -> 238	307 -> 169
5-Flucitosina	ISTD 1 (133 -> 115)	130 -> 113	130 -> 58	130 -> 85
Hidróxi-itraconazol	ISTD 7 (729 -> 400)	721 -> 392	721 -> 430	721 -> 408
Itraconazol	ISTD 6 (714 -> 401)	705 -> 392	705 -> 432	705 -> 335
Cetoconazol	ISTD 4 (539 -> 497)	531 -> 489	531 -> 82	531 -> 244
Posaconazol	ISTD 5 (706 -> 617)	701 -> 614	701 -> 683	701 -> 343
Voriconazol	ISTD 3 (353 -> 284)	350 -> 281	350 -> 224	350 -> 155

A seguinte tabela mostra as transições de massas dos padrões internos usados para o conjunto de parâmetros para drogas antimicóticas:

Padrão Interno (REF 92064)	MRM 1	MRM 2	MRM 3
ISTD 1	133 -> 115	133 -> 59	133 -> 87
ISTD 2	311 -> 223	311 -> 242	311 -> 172
ISTD 3	353 -> 284	353 -> 224	353 -> 155
ISTD 4	539 -> 497	539 -> 82	539 -> 244
ISTD 5	706 -> 617	706 -> 687	706 -> 345
ISTD 6	714 -> 401	714 -> 441	714 -> 344
ISTD 7	729 -> 400	729 -> 438	729 -> 416

As massas mencionadas acima servem somente como um guia para iniciar. A posição exata do sinal máximo para cada pico de massa varia de sistema MS para sistema MS e deve ser determinado e otimizado individualmente, pelo menos até uma casa decimal. Use o tuning mix apropriado (artigo 92039) para este propósito.

### 3.3 Gradientes do HPLC

A separação das drogas antimicóticas é feita com um gradiente de eluição; o perfil pode ter que ser ajustado devido aos diferentes volumes mortos dos sistemas de HPLC. O perfil de gradiente estabelecido deve ser visto como uma base para otimização.

Tempo [min.]	Fase Móvel A [%]	Fase Móvel B [%]
0.00	70	30
0.50	70	30
0.51	0	100
2.80	0	100
2.81	70	30
3.20	70	30

### 3.4 Diluição e volumes de injeção

Para evitar problemas de solubilidade de alguns analitos, as amostras preparadas não devem ser injetadas diluídas. Se for usado um espectrômetro de massas altamente sensível, é recomendado reduzir o volume padrão de injeção de 10 µl. Se uma diluição ainda for necessária, as amostras podem ser diluídas a no máximo 1:12 com o Tampão de Diluição 2 (artigo 92008).



## 4 Amostras de pacientes e componentes liofilizados

### Atenção:

Ao usar os reagentes, favor observar as informações de segurança recomendadas no apêndice I.

### 4.1 Coleta e armazenamento de amostras de pacientes

Para a análise são utilizados plasma ou soro. O tempo de armazenamento é de até 2 semana em temperatura ambiente, e por até 4 semana em +2 a +8°C. Para períodos maiores de armazenamento congele a temperaturas abaixo de -18°C por no máximo 3 meses. Estes dados de estabilidade foram estabelecidos a partir de amostras de plasma fortificadas. A estabilidade dos analitos nas amostras de pacientes podem variar destes resultados.

### Nota:

É de responsabilidade individual dos laboratórios usar todas as referências e/ou seus próprios estudos para determinar critérios específicos de estabilidade para seu laboratório.

### 4.2 Uso e estabilidade do mix de padrão interno

O Mix de Padrão Interno é adicionado a cada amostra em quantidades definidas e passa pelo processo de preparo de amostras inteiro. Para o preparo de amostras, pipete 800 µl do Mix de Padrão Interno (artigo 92644) em 12.0 ml do Reagente de Precipitação (artigo 92003).

### Estabilidade:

O Mix de Padrão Interno é estável abaixo de -18°C até a data de validade estipulada no rótulo. No Reagente de Precipitação, o Mix de Padrão Interno pode ser mantido por até 2 semanas se armazenado em frascos de vidros bem fechados e protegidos da luz em um local refrigerado (+2 a +8°C). Para períodos maiores de armazenamento (até no máximo 3 meses), congele em temperaturas abaixo de -18°C. Evite exposição direta à luz solar!

### 4.3 Reconstituição do calibrador em plasma

O Calibrador Multinível em Plasma 3PLUS1® (artigo 92051) é rastreável a substâncias de referência adquiridas de fornecedores certificados. Após a reconstituição, os calibradores são submetidos ao completo processo de preparo de amostra, de forma análoga aos espécimes de pacientes. Os padrões, assim preparados, são usados para calibrar o sistema LC-MS/MS. Para reconstituir o calibrador liofilizado pipete exatamente 1.0 ml de água destilada no frasco de vidro. Deixe os frascos em temperatura ambiente por aproximadamente 10-15 min, mexendo ocasionalmente e gentilmente até que o conteúdo dos frascos esteja homogêneo. As concentrações atuais dependem do lote e podem ser encontradas na bula de informações que acompanha os calibradores.

**Cuidado:**

Este produto foi fabricado a partir de um pool de plasma humano testado e encontrado não-reativos contra anticorpos HIV 1+2, HIV-, HCV- e HBV-DNA (PCR), antígeno HBs, anticorpos HbC, anticorpos HCV e por TPHA. Devido ao fato de não haver nenhuma metodologia de teste que dê segurança absoluta de que produtos contendo matérias de fonte de sangue humano serão livres de agentes infecciosos, um possível perigo de infecção deve ser levado em consideração. Este produto também pode conter agentes desconhecidos ou outros patógenos que não hajam testes aprovados. Portanto, nós recomendamos considerar todos os produtos contendo fontes de material humano como potencialmente infecciosos. Como consequência exercer o mesmo cuidado no manuseio deste produto como é exercido no manuseio de amostras potencialmente infecciosas de pacientes.

**Estabilidade do Calibrador Multinível em Plasma 3PLUS1® reconstituído:**

Os Padrões de Calibração Multiníveis 3PLUS1® reconstituídos são estáveis por até 3 semanas se armazenados em frascos de vidro bem fechados e protegidos da luz em refrigeração a +2 a +8°C. Para períodos maiores de armazenamento (até no máximo 3 meses), faça alíquotas e congele em temperaturas abaixo de -18°C. Após descongelar, homogeneíze bem.

#### 4.4 Reconstituição dos Controles em Plasma **MassCheck**®

Os controles **MassCheck**® (artigos 0253 e 0254) são submetidos ao mesmo processo de preparo de amostras de pacientes. Os controles preparados são incluídos em cada série de analitos para verificar se a análise foi realizada corretamente. Para reconstituir os controles liofilizados pipete exatamente 1.0 ml de água destilada em cada um dos frascos. Deixe os frascos em temperatura ambiente por aproximadamente 10-15 min, mexendo ocasionalmente e gentilmente até que o conteúdo dos frascos esteja homogêneo. As concentrações atuais dependem do lote e podem ser encontradas na bula de informações que acompanha os controles.

**Cuidado:**

Este produto foi fabricado a partir de um pool de plasma humano testado e encontrado não-reativos contra anticorpos HIV 1+2, HIV-, HCV- e HBV-DNA (PCR), antígeno HBs, anticorpos HbC, anticorpos HCV e por TPHA. Devido ao fato de não haver nenhuma metodologia de teste que dê segurança absoluta de que produtos contendo matérias de fonte de sangue humano serão livres de agentes infecciosos, um possível perigo de infecção deve ser levado em consideração. Este produto também pode conter agentes desconhecidos ou outros patógenos que não haja testes aprovados. Portanto, nós recomendamos considerar todos os produtos contendo fontes de material humano como potencialmente infecciosos. Como consequência exercer o mesmo cuidado no manuseio deste produto como é exercido no manuseio de amostras potencialmente infecciosas de pacientes.

**Estabilidade dos Controles em Plasma **MassCheck**® reconstituídos:**

Os Controles em Plasma **MassCheck**® reconstituídos são estáveis por até 3 semanas se armazenados em frascos de vidro bem fechados e protegidos da luz em refrigeração a +2 a +8°C. Para períodos maiores de armazenamento (até no máximo 3 meses), congele em temperaturas abaixo de -18°C. Após descongelar, homogeneíze bem.

## 4.5 Estabilidade das amostras preparadas

Após o preparo (ver capítulo 4 do manual do **MassTox**<sup>®</sup> TDM BASIC-Kit), as amostras – protegidas da luz e bem fechadas – possuem as seguintes estabilidades:

- Em temperatura ambiente (aprox. 25°C) por até 3 dias
- Refrigeradas (+2 a +8°C) por até 7 dias

É recomendado o uso de amostrador automático refrigerado.

Para períodos maiores de armazenamento, armazene as amostras abaixo de -18°C. Nestas condições, as amostras são estáveis por no máximo 2 semanas. As amostras descongeladas devem ser bem homogeneizadas antes da injeção.

## 5 Faixas Terapêuticas

Devido à rápida metabolização hepática do itraconazol no composto ativo hidróxi-itraconazol, sempre é necessário observar a concentração total do itraconazol (=∑itraconazol + metabólito-OH). Em equilíbrio, o itraconazol e o hidróxi-itraconazol podem ser encontrados no plasma numa taxa típica de 1:1 a 1:2.

As seguintes tabelas listam as faixas terapêuticas publicadas para cada droga neste kit [1-4]. Favor notar que sexo, idade, origem étnica e dosagem podem todos afetar a farmacocinética. Assim nós recomendamos que esta lista seja usada somente como um guia. Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência.

Análito	Faixa terapêutica [1]	Faixa terapêutica [2]	Faixa terapêutica [3]	Faixa terapêutica [4]
Fluconazol	-	-	1 – 5 mg/l	5 – 15 mg/l
5-Flucitosina	25 - 75 mg/l	20 – 50 mg/l	35 – 70 mg/l	25 - 50 mg/l
Itraconazol+Hidróxi-itraconazol	0.4 – 2 mg/l	0.5 – 2 mg/l	0.4 – 2 mg/l	1 – 4 mg/l
Cetoconazol	0.5 – 6 mg/l	-	1 – 3 mg/l	0.3 – 0.5 mg/l
Posaconazol	-	0.5 – 1.5 mg/l	> 0.7 mg/l*	-
Voriconazol	1 – 6 mg/l	0.5 – 6 mg/l	2 – 6 mg/l	0.5 – 5 mg/l

\*para aspergilose invasiva

## 6 Fatores de Conversão

A seguinte tabela lista os fatores de conversão entre massa e concentração molar.

Analito	$\mu\text{mol/l}$ para $\text{mg/l}$	$\text{mg/l}$ para $\mu\text{mol/l}$
Fluconazol	0.3063	3.2651
5-Flucitosina	0.1291	7.7465
Hidróxi-itraconazol	0.7216	1.3857
Itraconazol	0.7056	1.4172
Cetoconazol	0.5314	1.8817
Posaconazol	0.7008	1.4270
Voriconazol	0.3493	2.8629

## 7 Armazenamento e estabilidade dos reagentes

Reagentes fechados podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo, desde que as condições de armazenamento indicadas no rótulo sejam cumpridas.

Condições de armazenamento:

Produto	Condições de Armazenamento
Mix de Padrão Interno	Abaixo de $-18^{\circ}\text{C}$
Tuning Mix	Abaixo de $-18^{\circ}\text{C}$
Calibradores Multiníveis em Plasma 3PLUS1®	Abaixo de $-18^{\circ}\text{C}$
Controles em Plasma MassCheck®	Abaixo de $-18^{\circ}\text{C}$

Os reagentes devem ser bem fechados e apropriadamente armazenados imediatamente após o uso. Previsto que nada mais tenha sido estipulado, a estabilidade somaria um ano após a data de abertura, mas não excederá o prazo de validade. Maiores informações sobre a e estabilidade do padrão interno, calibradores e controles podem ser encontradas nos capítulos 4.2 a 4.4.

## 8 Descarte

O Mix de Padrão Interno, o Tuning Mix e resíduos de espécimes preparados contém solventes orgânicos. Descarte os resíduos dos produtos em um recipiente para solventes orgânicos livres de halogênio. As soluções mencionadas não devem ser descartadas junto com o lixo doméstico. Não circule no abastecimento principal de água. Descarte de acordo com a diretiva 2008/98/EC e de acordo com as exigências locais e nacionais. Os contêineres de lixo devem ser armazenados apropriadamente e o acesso só deve ser permitido a pessoas autorizadas.

## 9 Exemplo de Cromatograma

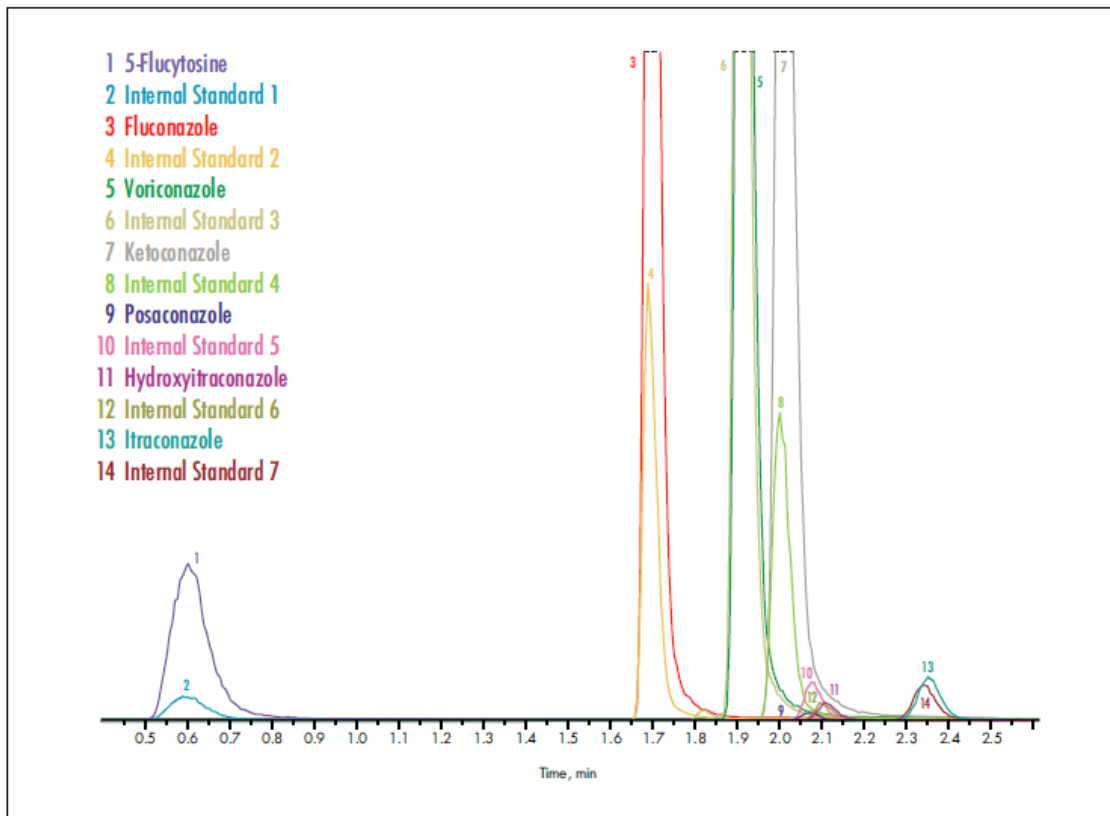


Fig. 1: Cromatograma de um Calibrador de Drogas Antimicóticas em Plasma

## 10 Interferentes

A droga para diabetes metformina (1,1-dimetilbiguanida) possui a mesma transição de massa MRM1 130 → 113 e MRM3 130 → 85 da 5-Flucitosina e não pode ser distinguida pelo seu tempo de retenção. Para uma identificação mais clara da 5-Flucitosina, o primeiro qualificador (MRM2 130 → 58) deve ser usado.

A droga anti-epilética vigabatrina interfere com a transição de massa MRM1 130 → 113 e MRM2 130 → 58 da 5-Flucitosina, ambas as substâncias não podem ser distinguidas pelos seus tempos de retenção. Para uma identificação mais clara da 5-Flucitosina, o primeiro qualificador (MRM2 130 → 58) deve ser usado.

Nos cromatogramas da 5-Flucitosina (MRM1 130 → 113 e MRM3 130 → 85) um pico adicional pode ser observado se amostra contiver o inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa entricitabina. As substâncias podem ser distinguidas pelos seus tempos de retenção (5-flucitosina elui antes do entricitabina,  $\Delta$  RT aprox. 0.2 min). Para uma identificação mais clara da 5-Flucitosina, o MRM2 130 → 58 específico pode ser usado.

A co-medicação do inibidor de protease atazanavir interfere com a transição de massa da substância itraconazol (para ambas as substâncias: MRM1 705 → 392 e MRM3 705 → 335), mas as substâncias podem ser distinguidas pelos seus tempos de retenção (atazanavir elui antes do itraconazol,  $\Delta$  RT aprox. 0.4 min). Para uma identificação mais clara do itraconazol o primeiro qualificador (MRM2 705 → 432) pode ser usado adicionalmente.

O inibidor de protease ritonavir pode produzir resultados falsos-positivos de hidróxi-itraconazol porque ambas as substâncias não podem ser distinguidas pelos seus tempos de retenção e formam fragmentos idênticos (MRM1 721 → 392 e MRM3 721 → 408). Para uma identificação mais clara do hidróxi-itraconazol a transição de massa (MRM2 721 → 430) pode ser usada adicionalmente.

Conclusão / Visão Geral:

Analito	Interferente	Δ RT	Transição de massa interferida	Transição de massa não interferida
5-Flucitosina	Metformina (1,1-dimetilbiguanida)	Coeluição	130 → 113 130 → 85	130 → 58
5-Flucitosina	Vigabatrina	Coeluição	130 → 113 130 → 58	130 → 85
5-Flucitosina	Entricitabina	Aprox. 0.2 min	130 → 113 130 → 85	130 → 58
Itraconazol	Atazanavir	Aprox. 0.4 min	705 → 392 705 → 335	705 → 432
Hidróxi-itraconazol	Ritonavir	Coeluição	721 → 392 721 → 408	721 → 430

Amostras em plasma foram fortificadas com as seguintes substâncias e analisadas; nenhuma interferência foi observada:

1-OH-midazolam, 10-OH-carbamazepina, 9-OH-risperidona, abacavir, paracetamol, ácido acetilsalicílico, adefovir, alprazolam, amiodarona, amisulprida, amitriptilina, amoxicilina, amphotericina B, amprenavir, aripripazol, atenolol, atomoxetina, boceprevir, bromazepam, brotizolam, carbamazepina, carbamazepina-diol, carbamazepina-epóxido, cloranfenicol, clordiazepóxido, clorpromazina, clorprotixeno, citalopram, clomipramina, clonazepam, clozapina, codeína, cortisona, darunavir, dasatinibe, desbutil dronedarone, didanosina, delavirdina, demoxepam, desalquilflurazepam, desetilamiodarona, desipramina, desmetilfluoxetina, desmetilmessuximida, desmetilolanzapina, desmetilsertralina, desmetilvenlafaxina, diazepam, diclofenaco, diltiazem, doxepina, dronedarona, duloxetina, efavirenz, elvitegravir, entecavir, etossuzimida, etravirine, felbamato, fenofibrato, flecinida, fosamprenavir, flunitrazepam, fluoxetina, flupentixol, flufenazina, flurazepam, flurazepóxido, fluvoxamina, gabapentina, ganciclovir, haloperidol, ibuprofeno, imatinibe, imipramina, indinavir, isoniacida, keppra, lacosamida, lamivudina, lamotrigina, levofloxacina, levomepromazina, lopinavir, lorazepam, lormetazepam, M8-nelfinavir, maprotilina, maravirox, medzepam, metamizol, metilfenidato, metoclopramida, mianserin, midazolam, mirtazapina, montelucaste, ácido micofenólico, ácido micofenólico glicuronídeo, nelfinavir, nevirapina, nilotinibe, nitrazepam, norclozabam, norclopiramina, norclozapina, nordiazepam, nordoxepina, norfludiazepam, norimatinibe, normapratilina, nortrimipramina, nortriptilina, olanzapina, omeprazol, oxazepam, oxcabazepina, paroxetina, PEMA, perazina, fenobarbital, fenitoína, pimozide, pipamperona, prazepam, prednisolona, predinisona, pregabalina, primidona, promazina, prometazina, protriptilina, pirimetamina, quetiapina, reboxetina, raltegravir, ribavirina, rifampicina, rilpivirina, risperidona, ácido ritalínico, rufinamida, ácido salicílico, saquinavir, sertralina, estavudina, estiripentol, sulfadiazina, sulfametoxazol, sultiame, suxibuzona, temazepam, telaprevir, tenofovir, tetrazepam, teofilina, tiagabina, tilidina, tipranavir, topiramato, trazodona, triazolam, trifluoperazina, trimetropim, trimipramina, ácido valpróico, venlafaxina, verapamil, varfarina, zalcitabina, zaleplon, zidovudine, ziprasidona, zolpidem, zonisamida, zopiclona.

Para questões referentes a possíveis interferentes, favor contatar seu representante local da Chromsystems ou nossa linha em Munique (telefone: +49 89 18930-300; e-mail: [mailbox@chromsystems.com](mailto:mailbox@chromsystems.com)).

## 11 Literatura

1. Ludewig R, Regenthal R (Hrsg). Akute Vergiftungen und Arzneimittelüberdosierungen. 10. Aufl, WVG Stuttgart, (2007).
2. Andes D, Pascual A, Marchetti O. (2009) Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother* 53(1): 24-34.
3. Schulz M, Iwersen-Bergmann S, Andresen H, Schmoldt A. (2012) Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Crit Care* 16(4): R136. Published online 2012 July 26. doi: 10.1186/cc11441
4. TIAFT reference blood level list of therapeutic and toxic substances. September 2004
5. Smith J, Andes D. (2008) Therapeutic drug monitoring of antifungals: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Ther Drug Monit* 30(2): 167-72.
6. Oppermann M. (2007) Posaconazol (Noxafil®) - ein neues Azolantimykotikum. Bedeutung für die Behandlung von invasiven Mykosen. *Fortbildungstelegramm Pharmazie* 1: 32-8.
7. Willems L, van der Geest R, de Beule K. (2001) Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Clin Pharm Ther* 26(3): 159-69.
8. Hahn C, Borg-von Zeppelin M, Groll AH, Lampe D, Schuler U, Seibold M, Glasmacher A. (2003) Standortbestimmung von Antimykotika: Itraconazol. *Chemother J* 11: 85-92.
9. Buchkowsky SS, Partovi N, Ensom MHH. (2005) Clinical pharmacokinetic monitoring of itraconazole is warranted in only a subset of patients. *Ther Drug Monit* 27(3): 322-33.
10. Manavathu EK, Cutright JL, Chandrasekar PH. (1998) Organism-dependent fungicidal activities of azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 42(11): 3018-21.
11. Conte JE, Golden JA, Kipps J, McIver M, Zurlinden E. (2004) Intrapulmonary pharmacokinetics and pharmacodynamics of itraconazole and 14-hydroxyitraconazole at steady state. *Antimicrob Agents Chemother* 48(10): 3823-7.
12. Dismukes WE. (2000) Introduction to antifungal drugs. *Clin Infect Dis* 30(4): 653-7.
13. Ducharme MP, Slaughter RL, Warbasse LH, Chandrasekar PH, van de Velde V, Mannens G, Edwards DJ. (1995) Itraconazole and hydroxyitraconazole serum concentrations are reduced more than tenfold by phenytoin. *Clin Pharmacol Ther* 58(6): 617-24.
14. Boogaerts M, Winston DJ, Bow EJ, Garber G, Reboli AC, Schwarzer AP, Novitzky N, Boehme A, Chwezo E, de Beule K. (2001) Intravenous and oral itraconazole versus intravenous amphotericin B deoxycholate as empirical antifungal therapy for persistent fever in neutropenic patients with cancer who are receiving broad-spectrum antibacterial therapy. *Ann Intern Med* 135(6): 412-22.
15. Kratzer C, Graninger W, Presterl E. (2007) Posaconazol. Ein neues Breitspektrum-Antimykotikum. *Chemother J* 16(4):113-22.

16. Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, Perfect J, Ullmann AJ, Walsh TJ, Helfgott D, Holowiecki J, Stockelberg D, Goh YT, Petrini M, Hardalo C, Suresh R, Angulo-Gonzalez D. (2007) Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 356(4): 348-59.
17. Groll AH, Ritter J. Diagnose und Therapie von Pilzinfektionen und der Pneumozystis-Pneumonie bei Kindern und Jugendlichen mit neoplastischen Erkrankungen. In *Klinische Pädiatrie*. Thieme Verlag Stuttgart (2005) Vol. 217: 37-66.
18. Ullmann AJ, Cornely OA, Burchardt A, Hachem R, Kontoyiannis DP, Töpelt K, Courtney R, Wexler D, Krishna G, Martinho M, Corcoran G, Raad I. (2006) Pharmacokinetics, safety, and efficacy of posaconazole in patients with persistent febrile neutropenia or refractory fungal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 50(2): 658-66.



## Apêndice I: Informações de Risco

As seguintes informações devem ser observadas e as medidas de segurança relevantes devem ser tomadas. Mais informações podem ser obtidas a partir das respectivas fichas de segurança. Elas estão disponíveis por requisição ou podem ser obtidas no nosso site.

Produto	Risco
Mix de Padrão Interno (artigo 92644)	<p>Perigo</p>   <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis.  H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele.  H319 Causa sérios danos aos olhos.</p> <p>P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face.  P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar.  P241 Usar equipamentos elétricos/de ventilação/iluminação à prova de explosão.  P243 Tomar medidas de precaução contra descarga estática.</p>
Tuning Mix (artigo 92039)	<p>Perigo</p>    <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis.  H301+H311+H331 Tóxico se ingerido, em contato com a pele, ou inalado.  H370 Causa danos aos órgãos.</p> <p>P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face.  P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar.  P301+P310 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico.  P302+P352 Em caso de contato com a pele: lave abundantemente com sabão e água.  P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.</p>
<p>Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia:</p> <p>Calibrador Multinível em Plasma 3PLUS1® (artigo 92051)  Controles em Plasma <b>MassCheck</b>® (artigos 0252, 0253, 0254)</p>	

## Apêndice II: Validação

Para os testes de linearidade e validação, amostras de soro e plasma foram fortificadas com quantidades definidas das substâncias puras e múltiplos preparos. Os resultados foram gerados em um espectrômetro de massas Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra. A ionização foi feita por Electrospray Ionisation (ESI) para todos os espectrômetros de massas.

### Taxas de recuperação:

A recuperação analítica foi determinada a partir da inclinação da curva de calibração de múltiplas amostras de soro e plasma fortificadas e soluções padrões diluídas. As taxas de recuperação das substâncias individuais são mostradas na tabela a seguir:

Analito	Recuperação em Plasma (%)	Recuperação em Soro (%)
Fluconazol	97	96
5-Flucitosina	111	95
Hidróxi-itraconazol	102	100
Itraconazol	101	97
Cetoconazol	99	95
Posaconazol	105	99
Voriconazol	98	88

### Limite inferior de quantificação (LLOQ) e linearidade:

A linearidade foi determinada pelas médias de múltiplas diluições de amostras preparadas de plasma com a matriz branca idêntica. O limite de quantificação foi determinado por uma diluição definida do calibrador 1 (92051/1) com o calibrador branco (92051/0). O método é linear a partir do limite de quantificação designado até, pelo menos, o limite superior estabelecido.

Analito	Limite de quantificação* (mg/l)	Faixa linear* até (mg/l)
Fluconazol	0.05	50
5-Flucitosina	2.00	250
Hidróxi-itraconazol	0.08	10
Itraconazol	0.02	10
Cetoconazol	0.01	25
Posaconazol	0.05	10
Voriconazol	0.02	15

\*O limite de quantificação e a faixa linear dependem do sistema LC-MS/MS usado.

Precisão intra-ensaio:

Os coeficientes de variação foram determinados para duas concentrações diferentes pelas médias de múltiplos preparos (n=10) da mesma amostra:

Analito	Limite de quantificação* (mg/l)	Faixa linear* até (mg/l)
Fluconazol	1.7 (2.07)	3.6 (12.4)
5-Flucitosina	4.9 (17.8)	3.1 (86.8)
Hidróxi-itraconazol	4.0 (0.46)	4.4 (1.80)
Itraconazol	3.4 (0.37)	4.3 (1.44)
Cetoconazol	1.7 (1.24)	3.2 (9.24)
Posaconazol	3.2 (0.64)	4.3 (3.68)
Voriconazol	2.5 (0.86)	3.0 (4.02)

Precisão inter-ensaio:

A precisão inter-ensaio foi determinada para duas concentrações diferentes pelas médias de múltiplos preparos (n=10) da mesma amostra em 10 dias diferentes:

Analito	CV (%) (concentração em mg/l)	
Fluconazol	3.7 (2.07)	3.7 (12.4)
5-Flucitosina	4.8 (17.8)	4.9 (86.8)
Hidróxi-itraconazol	5.1 (0.46)	4.1 (1.80)
Itraconazol	4.1 (0.37)	4.0 (1.44)
Cetoconazol	3.6 (1.24)	3.7 (9.24)
Posaconazol	5.3 (0.64)	4.7 (3.68)
Voriconazol	3.7 (0.86)	3.7 (4.02)

Copy

## EC-Declaration of Conformity

according to directive 98/79 EC on in vitro diagnostic medical devices

We, as manufacturer

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH  
Am Haag 12  
D-82166 Gräfelfing, Germany

declare on our own responsibility, that herein after called in vitro diagnostic medical devices for the LC-MS/MS determination of:

Nomenclature term: Other Other Clinical Chemistry Reagents  
Nomenclature code: 11-90-01-90-00  
Classification: other product

Product name: **MassTox® TDM Serie A PARAMETER-Set  
Antimycotic Drugs in Serum/Plasma**

Controls: **MassCheck® Antimycotic Drugs Plasma Control**

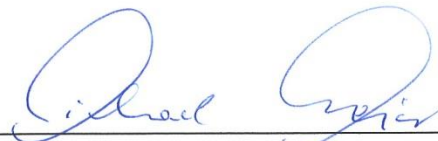
meets all applicable requirements of the directive 98/79/EC

Conformity assessment procedure:  
Annex III of the directive 98/79/EC

Applied harmonized standards:  
EN ISO 9001, EN ISO 13485, EN ISO 14971, EN 18113-2, EN 980, EN 23640,  
EN 13641

Notified body: -

Munich, December 03, 2012



Michael Meier  
General Manager

Vers. 1.0