

MYCOPHENOLIC ACID IN SERUM/PLASMA - HPLC ÁCIDO MICOFENÓLICO EM SORO/PLASMA POR HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de ácido micofenólico em plasma/soro por HPLC.

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

Artigo	Apresentação
46000	Kit Reagente para Análise de Ácido Micofenólico em soro/plasma, 100 testes

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Ácido Micofenólico em soro/plasma por HPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

O kit de reagentes da Chromsystems de Ácido Micofenólico em soro/plasma é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser utilizada em laboratórios clínicos para a detecção quantitativa de ácido micofenólico em amostras de soro ou plasma de pacientes através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Este kit é um teste de monitoramento de pacientes tratados com micofenolato de mofetil ou micofenolato de sódio com o objetivo de garantir que os níveis de droga sejam mantidos dentro da faixa terapêutica.

MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV.

PRINCÍPIO

O kit de reagentes Chromsystems é designado para uma determinação segura e confiável do ácido micofenólico, a forma ativa do imunossupressor micofenolato de mofetil em plasma/soro. Por meio de uma extração de fase-sólida seletiva, componentes interferentes, assim como o ineficaz MPAG, são removidos da amostra. O analito é quantificado pela inclusão de um padrão interno para compensar perdas durante o preparo de amostras.

REAGENTES

Componentes e composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase Móvel, alta resolução (Mobile Phase, High Resolution)	Acetonitrila 25-50%	1000 ml
Tampão de Equilíbrio 1 (Equilibration Buffer 1)	Metanol 50-100%	100 ml
Tampão de Equilíbrio 2 (Equilibration Buffer 2)	Metanol 3-10%	100 ml
Tampão de Lavagem (Wash buffer)	Metanol 3-10%	200 ml
Tampão de Eluição (Elution buffer)	Metanol 50-100%	40 ml

Reagente necessário, fornecido separadamente

Padrão Interno (Internal Standard)	Acetonitrila 2,5-10% Ácido acético 0,1-2,5%	25 mL
------------------------------------	--	-------

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada no rótulo, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas. A tabela abaixo mostra a temperatura de armazenagem para os reagentes do kit, e para os demais reagentes Chromsystems utilizados na realização da análise.

Produto	Armazenamento
Fase Móvel, Alta Resolução	+18 a +30°C
Tampão de Equilíbrio 1	+18 a +30°C
Tampão de Equilíbrio 2	+18 a +30°C
Tampão de Lavagem	+18 a +30°C
Tampão de Eluição	+18 a +30°C
Colunas de Preparo de Amostra	+18 a +30°C

Padrão Interno	+2 a +8°C
----------------	-----------

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Por favor, consulte a ficha de segurança dos reagentes e tome as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto e 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

Fase Móvel, Padrão Interno, Tampão de Equilíbrio 1, Tampão de Equilíbrio 2, Tampão de Lavagem, Tampão de Eluição, e os resíduos das amostras preparadas contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos dos produtos em um recipiente para solventes orgânicos livres de halogênio. Eles não devem ser descartados com o lixo doméstico. Não circule no fornecimento de água. Descarte de acordo com as normas locais e nacionais. Os reservatórios de lixo devem ser armazenados apropriadamente e o acesso só deve ser permitido a pessoas autorizadas.

PREPARO DOS REAGENTES

Fase Móvel A: pronto para uso.

Padrão Interno: pronto para uso.

Tampão de Equilíbrio 1: pronto para uso.

Tampão de Equilíbrio 2: pronto para uso.

Tampão de Lavagem: pronto para uso.

Tampão de Eluição: pronto para uso.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS NO KIT

Sistema HPLC

Água tipo I ou HPLC.

Metanol grau HPLC.

Material Geral de Laboratório.

Coluna Cromatográfica equilibrada (Chromsystems art.46110/HR)

Controles e Calibradores

3PLUS1 Multilevel Plasma Calibrator Set (MS: 10350840344)

Plasma Control, Level I ((MS: 10350840344).)

Plasma Control, Level II ((MS: 10350840344)

Plasma Control, Bi-level (I + II) (MS: 10350840344)

AMOSTRAS

O material utilizado é soro ou plasma. As amostras devem ser transportadas refrigeradas.

Estabilidade das amostras: Proteger as amostras da luz. As amostras são estáveis por 4 semanas entre +2 a +8°C. Para períodos maiores de armazenamento (pelo menos três meses) as amostras devem ser mantidas abaixo de -18 °C.

Estabilidade das amostras preparadas: Os eluatos/amostras preparadas podem ser mantidas por 3 dias a temperatura ambiente ou refrigerados (+2 a +8°C) por aproximadamente 1 semana (em um frasco de vidro protegido da luz). Para períodos maiores de armazenamento, congele as amostras a -18°C.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador: Volume de injeção 20-40 µl
Tempo de Corrida: 8-9 min.,
Razão de fluxo: 1.0 ml/min
Temperatura da coluna: Temperatura ambiente (aprox. 25°C)
Detector UV: Comprimento de onda 215 nm
Limpeza da agulha: Água/metanol =70/30 (injetor)

Procedimento de Preparo das Amostras:

Centrifugue os espécimes antes do preparo de amostras (10 min a 2800 x g)!

1. Padrão Interno:
Misture 250 µl de plasma/soro com 250 µl de Padrão Interno num frasco de reação etiquetado (vortex)
2. Condicionamento das Colunas de Preparo de Amostras:
Etiquete as Colunas de Preparo de Amostra, e então aplique 1 ml do Tampão de Equilíbrio 1 e centrifugue (190 x g por aprox. 30-60 s) ou use sucção para extrair o tampão pela coluna. Repita com 1 ml do Tampão de Equilíbrio 2; A coluna **não** deve correr seca!
3. Aplicando o espécimen:
Aplique o plasma/soro (misturados com o Padrão Interno) às Colunas de Preparo de Amostras condicionadas e faça a extração por centrifugação (1 min a 190 x g; verificar cada coluna para a corrida completa!) ou sucção. Descarte o efluente.
4. Lavagem:
Aplique 2 x 1 ml do Tampão de Lavagem às Colunas de Preparo de Amostras, extraia por centrifugação (1 min a 190 x g) ou sucção, descarte o efluente. Após a segunda etapa de lavagem a coluna deve ser centrifugada (2 min a 1100 x g) ou sugada seca.
5. Eluição:

Troque o frasco de coleta (vidro!), aplique 400µl do Tampão de Eluição à coluna, extraia completamente por centrifugação (1 min a 190 x g, então 1 min a 1100 x g) ou sucção. Misture os eluatos brevemente antes da injeção.

6. Injeção:

Injete 20-40 µl do eluato no sistema de HPLC.

7. Controle de Qualidade:

Precisão e acurácia das análises devem ser monitoradas pela inclusão de controles adicionais em cada corrida analítica.

Gradiente: Isocrático

Estabilidade das amostras preparadas

Os eluatos/amostras preparadas devem ser mantidas por 3 dias a temperatura ambiente ou refrigeradas (entre +2 e +8°C) por aproximadamente 1 semana (em frasco de vidro e protegido da luz). Para períodos maiores de armazenamento, mantenha a amostra congelada abaixo de -18°C.

Tempo de Retenção Esperado (fluxo de 1.0 ml/min):

Analito	Tempo de Retenção (min. aprox.)
Padrão Interno	6.1
Ácido Micofenólico	7.2

CÁLCULOS

$$C_{\text{Amostra}} \text{ (mg/L)} = \frac{A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Calibrador}}} \times \frac{C_{\text{Calibrador}}}{I_{\text{Amostra}}}$$

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

Área/altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = A_{Calibrador}

Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = I_{Amostra}

Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = I_{Calibrador}

A concentração C do analito A no calibrador = C_{Calibrador}

Fatores de conversão:

Analito	nmol/l para µg/l	µg/l para nmol/l
Ácido Micofenólico	x 0.3203	x 3.1217

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Linearidade e limite de quantificação:

O método é linear a partir do limite de quantificação designado por toda a faixa terapêutica de cada analito até pelo menos o limite superior indicado.

Analito	Limite de quantificação (µg/l)	Faixa de linearidade de pelo menos (µg/l)
Ácido Micofenólico	0.1	30

Recuperação:

A recuperação analítica foi determinada a partir da inclinação da curva de calibração de amostras de plasma e soluções padrão diluídas.

	Recuperação (%)
Ácido Micofenólico	99
Padrão Interno	107

Precisão intra-ensaio:

A precisão intra-ensaio foi determinada em várias concentrações pela média múltipla de preparações de mesmo espécime.

Análito	Coeficiente de variação [%] (concentração em µg /l)		
	n = 10		
Ácido Micofenólico	1.0 (1.93)	0.7 (5.78)	1.2 (4.04)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir de 3 concentrações diferentes por múltiplas preparações (n = 10) de uma mesma amostra em 10 dias diferentes:

Análito	Coeficiente de variação [%] (concentração em µg /l)		
	n = 10		
Ácido Micofenólico	3.0 (1.89)	3.3 (5.60)	3.1 (3.95)

VALORES DE REFERÊNCIA

Substância	Valores de referência [mg/l]
Ácido micofenólico em plasma	2.5 – 4.5

LITERATURA

1. Meiser BM, Pfeiffer M, Schmidt D, Reichenspurner H, Ueberfuhr P, Paulus D, von Scheidt W, Kreuzer E, Seidel D, Reichart B. (1999) Combination therapy with tacrolimus and mycophenolate mofetil following cardiac transplantation: importance of mycophenolic acid therapeutic drug monitoring. *J Heart Lung Transplant* **18**(2): 143-9.
2. Kaufman DB, Leventhal JR, Stuart J, Abecasses MM, Fryer JP, Stuart FP. (1999) Mycophenolate mofetil and tacrolimus as primary maintenance immunosuppression in simultaneous pancreas-kidney transplantation: initial experience in 50 consecutive cases. *Transplantation* **67**(4): 586-93.
3. Weir MR, Anderson L, Fink JC, Gabregiorgish K, Schweitzer EJ, Hoehn-Saric E, Klassen DK, Cangro CB, Johnson LB, Kuo PC, Lim JY, Bartlett ST. (1997) A novel approach to the treatment of chronic allograft nephropathy. *Transplantation* **64**(12): 1706-10.
4. Neurath MF, Wanitschke R, Peters M, Krummenauer F, Meyer zum Büschenfelde KH, Schlaak JF. (1999) Randomised trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine for treatment of chronic active Crohn's disease. *Gut* **44**(5):625-8.
5. Zuckermann A, Klepetko W, Birsan T, Taghavi S, Artemiou O, Wissner W, Dekan G, Wolner E. (1999) Comparison between mycophenolate mofetil- and azathioprine-based immunosuppressions in clinical lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* **18**(5):432-40.
6. Korecha M, Nikolic D, van Breemen RB, Shaw LM. (1999) The apparent inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase by mycophenolic acid glucuronide is attributable to the presence of trace quantities of mycophenolic acid. *Clin Chem* **45**(7):1047-50.

Símbolos Usados



Fabricante



Limites de temperatura



Diagnóstico in vitro



Cuidado, consulte documentos anexos



Consulte instruções de uso



Material Reciclável



Não rejeitar diretamente para o ambiente



Lote



Data de Fabricação



Validade



Risco Biológico



Altamente tóxico



Corrosivo



Nocivo

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 10350840344

SAC: sac@biosys.com.br – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414

www.biosys.com.br