

Instruções de Uso

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

ITRACONAZOLE, POSACONAZOLE, VORICONAZOLE IN SERUM/PLASMA (Itraconazol, Posaconazol e Voriconazol em soro/plasma)

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa de Itraconazol, Posaconazol e Voriconazol em amostras de soro/plasma por HPLC.

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

Artigo	Apresentação
27037	Kit Reagente por HPLC para análise de Itraconazol, Posaconazol e Voriconazol em soro/plasma - 100 testes

Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para Itraconazole, Posaconazole, Voriconazole in Serum/Plasma no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Itraconazol (por exemplo, SEMPERA®), Posaconazol (NOXAFIL®) e Voriconazol (por exemplo, VFEND®) são fármacos antimicóticos triazóis sintéticos com um amplo espectro de atividade antifúngica e tendo poucos efeitos secundários. Estes benefícios os tornam adequados para a prevenção e terapia de infecções fúngicas sistêmicas.

O efeito antimicótico baseia-se na inibição do citocromo P450 dependente do lanosterol-14-ademetilase. A demetilação de lanosterol é um passo intermediário na síntese do ergosterol, que é essencial para a estrutura correta e muitas funções das membranas fúngicas. Além disso, alguns efeitos secundários, como acumulação de 14-metil-esterol, 3-cetoesteróides e a síntese descoordenada de quitina afetam a estabilidade das membranas fúngicas, a formação de septos primários de levedura e a atividade de enzimas. Finalmente, os fungos tornam-se susceptíveis a danos osmóticos. Isto leva à fagocitose pela célula hospedeira e finalmente à morte dos fungos.

O efeito químico de todos os derivados azóis antifúngicos no citocromo P450 depende da complexação do íon ferro no centro ativo da enzima fúngica e do anel azol. Uma vez que a afinidade para o citocromo fúngico é muito mais forte do que para as enzimas humanas, a biossíntese de ergosterol fúngica reage muito mais sensivelmente sobre os azóis do que a síntese de colesterol humano. Modificações da estrutura química levam a diferentes espectros de atividade e potência. Assim, a atividade antifúngica do posaconazol é significativamente melhorada em comparação com o itraconazol quimicamente semelhante. O voriconazol, que é derivado do fluconazol, é adicionalmente ativo contra novas infecções fúngicas que são apenas sensíveis a uma extensão limitada de outros antimicóticos.

Os triazóis mencionados são fármacos básicos fracos lipofílicos (pKa 3,7) que não são ionizados a valores de pH fisiológicos. Devido à grande variabilidade interindividual na absorção e na reação metabólica (devido à formulação, co-medicação ou doença), a monitorização da concentração plasmática é justificada em doentes com infecções fúngicas graves. Apenas a adesão ao intervalo terapêutico garante um resultado positivo da terapia. Além disso, antagoniza a formação de resistências.

MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

PRINCÍPIO

Este kit reagente é designado para a determinação cromatográfica confiável de itraconazol (incluindo o metabólito ativo hidroxí-itraconazol), posaconazol e voriconazol em um sistema HPLC simples, isocrático com detecção de fluorescência. Na preparação da amostra duas etapas de preparação eficientes fornecem eluatos limpos e estáveis. Para quantificação segura, um padrão interno feito sob medida é incluído no método.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Acetonitrila 25-50%; propan-2-ol 2,5-10%	1x1000 mL
Reagente de Precipitação 1 (Precipitation Reagent1)	Sulfato de zinco (anidro) 2,5-10%	2,5 mL
Reagente de Precipitação 2 (Precipitation Reagent2)	Acetonitrila 50-100%	20 mL
Frascos de reação (Reaction vials)	-	100 unidades

Reagente necessário, fornecido separadamente (MS: 10350840304)

Padrão Interno (Internal Standard)	Acetonitrila 50-100%; derivado halogenado de voriconazol <0,1%	2,5 mL
------------------------------------	---	--------

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM 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. A tabela abaixo mostra a temperatura de armazenamento para os reagentes do kit:

Produto	Temperatura
Fase móvel	+18 a +30°C
Padrão Interno	+2 a +8°C
Reagente de precipitação 1	+18 a +30°C
Reagente de precipitação 2	+18 a +30°C
Frascos de reação	+18 a +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, o padrão interno, o reagente de precipitação 2 e resíduos do preparado de amostras contêm solventes orgânicos. Descartar os resíduos do produto em um recipiente para solventes orgânicos livres de halogênio. O reagente de precipitação 1 contém uma substância ambientalmente perigosa. Descartar os resíduos do produto em um recipiente para soluções salinas. As soluções mencionadas não devem ser descartadas junto ao descarte doméstico. Não circular no abastecimento principal de água. Descartar de acordo com a Directiva 2008/98/EC em descarte e regulamentos locais e nacionais. Os recipientes com os descartes devem ser armazenados corretamente e apenas com acesso permitido às partes autorizadas.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Reagente de Precipitação 1: pronto para uso.

Reagente de Precipitação 2: pronto para uso.

Padrão Interno: pronto para uso.

MATERIAIS REQUERIDOS, NÃO FORNECIDOS NO KIT

Sistema HPLC (cromatografia líquida de alta pressão)
Coluna HPLC
Centrífuga para microtubos

Materiais de uso em laboratório:

Pipetas
Centrífuga para eppendorf
Material Geral de Laboratório.

Controles e Calibradores

Plasma Calibration Standard (MS: 10350840304)
3PLUS1 Multilevel Plasma Calibrator Set (MS: 10350840304)
Plasma Control, Level I (MS: 10350840304)
Plasma Control, Level II (MS: 10350840304)
Plasma Control, Level III (MS: 10350840304)
Plasma Control, Tri-level (I + II + III) (MS: 10350840304)

AMOSTRAS

Amostras de Soro e Plasma.

Estabilidade da amostra: as amostras coletadas são estáveis por até 2 semanas a temperatura ambiente, entre 2 e 8°C por até 4 semanas. Para períodos maiores de armazenamento conservar abaixo de -18°C (máximo de 3 meses).

PROCEDIMENTO DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Volume de injeção: 20 µL (10-30 µL)
Tempo de corrida: 13 min.
Para análise de posaconazol/voriconazol: 8 min
Fluxo: 1.2 ml/min (1.0 – 1.4 ml/min)
Temperatura da coluna: Ambiente (25°C)
Detector de Fluorescência: EX261 nm, EM366 nm
Solução de Lavagem para injetor: 80% água, 20% acetonitrila, + 0,2% ácido fosfórico (85%)

Procedimento de preparação de amostras (soro/plasma):

Em um frasco de reação.

1. Pipetar 100 µl de plasma/soro (ou controles ou calibradores reconstituídos)
+ 25 µl Padrão Interno
+ 25 µl Reagente de Precipitação 1

2. Homogeneizar por 5 s (vortex)
3. Adicionar 200 µl do Reagente de Precipitação 2, homogeneizar por 30 s (vortex)
4. Centrifugar 5 min a 15000 x g

5. Transferir o sobrenadante para um frasco de vidro e vedá-lo.
6. Injetar 20 µl da amostra preparada em um sistema HPLC.
7. A Precisão e exatidão dos analitos devem ser monitorados pela inclusão adicional de controles em cada corrida analítica.

Importante:

A amostra preparada contém altas concentrações de solventes orgânicos. Para evitar a evaporação e a possibilidade de formação de precipitados dentro da amostra, é necessário vedar os frascos do amostrador corretamente. Portanto, o uso de tampas com selos de teflon (ou vedações revestidas de teflon) são preferíveis, uma vez que o uso de vedações de borracha butílica pura pode causar interferência nos picos do cromatograma devido a solventes orgânicos.

No caso de utilização de amostrador com uma função de resfriamento, certifique-se de desativar esta função. Baixas temperaturas (abaixo de +15°C) precipitará os analitos nas amostras preparadas. Isto pode causar resultados falsos. Não congelar as amostras preparadas.

Estabilidade das amostras preparadas

As amostras/eluatos preparados podem ser mantidos em frasco de vidro vedado por 1 semana entre +18 e +30°C e por 2 semanas entre +2 e +8°C. Não armazenar a amostra refrigerada.

Tempos de retenção esperados:

Analito	Tempo de retenção aprox. em minutos
Voriconazol	3.6
Posaconazol	4.2
Hidroxi-Itraconazol	4.9
Padrão interno	7.0
Itraconazol	11.5

CÁLCULOS

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

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

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = Calibrador

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = IS_{Amostra}

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = IS_{Calibrador}

Concentração C do analito A no calibrador = *C_{Calibrador}

Fatores de conversão:

Analito	mg/l para µmol/l	µmol/l para mg/l
Itraconazol	x 1,417	x 0,706
Hidroxi-Itraconazol	x 1,386	x 0,722
Posaconazol	x 1,427	x 0,701
Voriconazol	x 2,863	x 0,349

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Linearidade e limite de detecção

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 [mg/L] ca.	Faixa linear até pelo menos [mg/L]
Itraconazol	0,03	10
Hidroxi-itraconazol	0,03	10
Posaconazol	0,02	10
Voriconazol	0,2	20

Recuperação

A recuperação analítica foi determinada a partir da inclinação das curvas de calibração de amostras de plasma e soro enriquecidas e soluções padrão diluídas. A recuperação de todas as substâncias testadas e do padrão interno foi:

Analito	Taxa de recuperação em plasma (%)	Taxa de recuperação em soro (%)
Itraconazol	102	101
Hidroxi-Itraconazol	102	101
Posaconazol	105	101
Voriconazol	105	101
Padrão Interno	100	101

Precisão intra-ensaio:

A precisão intra-ensaio foi determinada em três concentrações pela média múltipla (n=10) de mesmo espécime.

	CV % (Concentração mg/l)		
	n=10		
Itraconazol	3,7 (0,27)	1,2 (1,7)	1,4 (1,7)
Hidroxi-Itraconazol	3,7 (0,41)	1,1 (2,5)	1,4 (2,5)
Posaconazol	3,3 (0,54)	1,1 (4,9)	2,2 (5,0)
Voriconazol	4,4 (1,0)	1,2 (5,2)	1,1 (5,0)

Precisão inter-ensaio:

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

	CV % (Concentração mg/L)	
	n=100	
Itraconazol	3,5 (0,27)	2,4 (1,6)
Hidroxi-Itraconazol	2,8 (0,40)	2,5 (2,4)
Posaconazol	3,5 (0,53)	3,0 (4,7)
Voriconazol	5,2 (1,1)	2,7 (5,1)

Interferências conhecidas

Após a administração de levofloxacino como antibiótico de último recurso, a conversão do composto de partida produz reações, incluindo a formação do metabólito desmetil-levofloxacino. Isto pode interferir na cromatografia em relação ao tempo de retenção de voriconazol em função da concentração. A interferência é observada apenas com concentrações de metabólitos no plasma de 1 µg/ml ou superiores. Contudo, com base nas referências da literatura, desde que a metabolização do levofloxacino não exceda aproximadamente 5%, esta concentração só é alcançada em associação com doses tóxicas do composto original.

É também importante notar que os testes em uma amostra de um paciente que recebe a mistura de fármacos tipicamente administrados em ambiente de cuidados intensivos (clindamicina, fosamprenavir, pirimetamina, piperacilina, sulfametoxazol, tazobactam e trimetoprim) também exibiram uma interferência menor na faixa do voriconazol. A verificação dos resultados da cromatografia na presença de substâncias puras não revelou interferências mesmo em concentrações mais elevadas. As interferências observadas são provavelmente causadas pela metabolização dos fármacos administrados ao paciente. Nestes casos específicos, e em pacientes de cuidados intensivos em geral, a análise dos antimicóticos aqui estipulados deve ser sempre verificada e/ou confirmada por espectrometria de massa em tandem.

Além disso, as seguintes substâncias foram testadas com este kit e podem causar picos adicionais no cromatograma e, em alguns casos, atrapalhar a análise (ver tabela seguinte):

Composto	TR	Comentário
Amprenavir	5,0	Interfere com hidroxi-itraconazol
Desipramina	4,5	Elui após posaconazol
Efavirenz	18,1	-
Etravirina	18,7	-
Flecainide	3,6	Interfere om voriconazol
Imipramina	4,5	Elui após posaconazol
Cetoconazol	3,2	Elui antes do voriconazol
M8-Nelfinavir	4,0	Elui antes do posaconazol, detecção iniciando a partir de concentrações tóxicas
Ácido micofenólico	4,2	Interfere com posaconazol, sinal de 6 mg/l MPA corresponde a 0.04 mg/l de posaconazol
Nelfinavir	7,8	Elui após o PI, detecção iniciando a partir de concentrações tóxicas
Paroxetina	3,9	Elui entre voriconazol e posaconazol
Propritiolina	4,2	Interfere com posaconazol
Saquinavir	7,5	Elui após o PI, detecção iniciando a partir de concentrações tóxicas
Trimipramina	5,4	Elui após hidrohitraconazol
Valsartan	7,0	Interfere com PI
Varfarina	6,6	Elui antes do PI

*TR = Tempo de Retenção em minutos

LITERATURA

1. 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.
2. Hahn C, Borg-von Zepelin M, Groll AH, Lampe D, Schuler U, Seibold M, Glasmacher A. (2003) Standortbestimmung von Antimykotika: Itraconazol. *Chemother J* 11: 85-92.
3. 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.
4. Manavathu EK, Cutright JL, Chandrasekar PH. (1998) Organism-dependent fungicidal activities of azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 42(11): 3018-21.
5. 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.
6. Dismukes WE. (2000) Introduction to antifungal drugs. *Clin Infect Dis* 30(4): 653-7.
7. 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.
8. Boogaerts M, Winston DJ, Bow EJ, Garber G, Rebol 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.
9. Kratzer C, Graninger W, Presterl E. (2007) Posaconazol. Ein neues Breitspektrum-Antimykotikum. *Chemother J* 16(4): 113-22.
10. 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.
11. 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.
12. Ullmann AJ, Cornely OA, Burchardt A, Hachem R, Kontoyannis 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.

13. Oppermann M. (2007) Posaconazol (Noxafil®) - ein neues Azolantimykotikum. Bedeutung für die Behandlung von invasiven Mykosen. Fortbildungstelegramm Pharmazie 1: 32-8.
14. Ludewig R, Regenthal R (Hrsg.). Akute Vergiftungen und Arzneimittelüberdosierungen. 10. Aufl, WVG Stuttgart, (2007).
15. Andes D, Pascual A, Marchetti O. (2009) Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. Antimicrob Agents Chemother 53(1): 24-34.
16. 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
17. TIAFT reference blood level list of therapeutic and toxic substances. September 2004.

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 10350840304
SAC: sac@biosys.com.br – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414
www.biosys.com.br