

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).

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 acoplada a espectrometria 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 Imunossuppressants in whole blood no site www.biosys.com.br.

FINALIDADE DE USO

O kit é um dispositivo de diagnóstico *in vitro*, a ser utilizado para a detecção quantitativa de ciclosporina A, everolimus, sirolimus e tacrolimus em sangue total (EDTA) por cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS/MS). É indicado como 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 acoplada a espectrofotometria de massa (LC-MS/MS).

PRINCÍPIO

A preparação manual da amostra é limitada a um processo simples e eficaz 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 Ácido fórmico	1000 mL	3 x 1000 mL
Fase móvel B (Mobile Phase)	Metanol Ácido fórmico	1000 mL	3 x 1000 mL
Solução de Lavagem (Rinsing Solution)	Metanol	1000 mL	2 x 1000 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Acetonitrila	100 mL	3 x 100 mL
Tampão de extração (Extraction Buffer)	Metanol Sulfato de zinco	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	1 conjunto (IS 4 x 2,5 ml + Tampão reconstituição 1x10 ml)	3 conjuntos (IS 4 x 2,5 ml + Tampão reconstituição 1x10 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	+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
Conjunto de Padrão interno:	
• IS (Padrão interno)	Abaixo de -18°C
• Tampão de reconstituição	Abaixo de -18°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 A e B, a Solução de Lavagem, o Reagente de Precipitação, o Padrão Interno reconstituído e o Tampão de Extração contêm solventes orgânicos e devem ser descartados como resíduos químicos livres de halogênio.

Os resíduos das amostras preparadas, assim como de controles e calibradores devem ser descartados como lixo potencialmente infeccioso.

Descarte de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.

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 (93004) liofilizado
2. Adicionar 2,5 ml de Tampão de reconstituição (93006)
3. Fechar com uma tampa preta fornecida e deixar por cerca de 5 minutos à 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 Padrão Interno, deve-se usar o Tampão de reconstituição fornecido.

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. 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)
- Espectrômetro de massa tandem com fonte ESI
- Sistema HPLC
- Pipetas e ponteiras
- Frascos autosampler
- Vórtex
- Centrífuga

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 [2].

PROCEDIMENTO DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Volume de injeção:	5 – 25 µl (depende do equipamento)
Tempo de corrida:	4,5 min
Temperatura da coluna:	70°C (forno para coluna)
	Coluna Trap: +20 a +25°C
Solução de lavagem do injetor:	Solução de lavagem (93009)

Fluxo de gradiente:

Tempo (min)	Concentração de Fase Móvel B (%)	Fluxo (ml/min)	Posição da válvula
0,00	0	1,0	Trap
1,00	0		
1,01	55	0,6	MS/MS
1,75	55		
1,76	98		
3,25	98		
3,50	0		

Procedimento de preparo de amostras:

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

1. Pipetar 50 µl de amostra/calibrador/controle ao frasco de reação de 1,5 mL
2. Adicionar 25 µl de Padrão Interno (IS) reconstituído.
3. Adicionar 100 µL de Tampão de extração e agitar em vortex por 10 segundos, incubar 2 minutos à temperatura ambiente
4. Adicionar 250 µL de reagente de precipitação e agitar em vortex por 1 minuto, incubar por 2 minutos à temperatura ambiente
5. Centrifugar por 5 min a 15000 g.
6. Transferir o sobrenadante para um frasco amostrador (autosampler) e injetar 5 a 25 µL do sobrenadante no sistema 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, recomenda-se utilizar o calibrador 6plus1 Multilevel Calibrator Set Immunosuppressants in Whole Blood (Chromsystems art. 28039). Para isso, injetar volumes crescentes de 5 a 25 µL do calibrador 1 (28031) preparado até que a intensidade de sinal requerida seja obtida. Então usar o calibrador 6 (28036) preparado para ter certeza de 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 (+20 a +25°C) ou refrigeradas (+2 a +8°C) por 5 dias (**em frasco de vidro protegidos 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 Immunosuppressants in Whole Blood	7 x 2 mL
Immunosuppressants Whole Blood Control, Four-level (I + II + III + IV)	4 x (2 x 2 mL)

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

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

- AB Sciex API4000
- Waters TQD
- Thermo TSQ Ultra

O uso do kit em outras plataformas deve ser validado pelo próprio laboratório.

Recuperação

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

Linearidade e limite de detecção

O método é linear do LLOQ até os limites superiores indicados abaixo:

Analito	API 4000 (µg/L)	TSQ Ultra (µg/L)	Waters TQD (µg/L)	Linear até (µg/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

Analito	SCIEX 4500 (µg/L)	Linear até (µg/L)
Ciclosporina A	5.13	2000
Everolimus	1.04	100
Sirolimus	0,50	100
Tacrolimus	0,56	100

Precisão intra-ensaio:

A determinação da precisão intra-ensaio foi determinada para 4 concentrações diferentes pelas médias de múltiplos preparos (n=10) da mesma amostra:

API 4000

Analito	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)

TSQ Quantum Ultra

Analito	CV % (Concentração µg/L)			
Ciclosporina A	2,9 (53,2)	2,1 (276)	1,9 (514)	1,5 (1111)
Everolimus	5,6 (2,3)	4,1 (4,4)	4,2 (8,5)	1,8 (28,8)
Sirolimus	6,0 (2,9)	4,4 (10,1)	2,9 (20,4)	2,9 (38,5)
Tacrolimus	3,5 (2,6)	3,4 (7,3)	2,5 (16,7)	1,6 (34,2)

WATERS TQD

Analito	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:

A precisão inter-ensaio foi determinada para 4 concentrações diferentes pelas médias de múltiplos preparos (n=10) da mesma amostra em 10 dias diferentes:

API 4000

Analito	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)

TSQ Quantum Ultra

Analito	CV % (Concentração µg/L)			
Ciclosporina A	5,6 (53,2)	6,1 (276)	6,0 (514)	5,2 (1111)
Everolimus	8,3 (2,3)	5,1 (4,4)	5,1 (8,5)	4,8 (28,8)
Sirolimus	7,8 (2,9)	5,2 (10,1)	4,8 (20,4)	4,8 (38,5)
Tacrolimus	5,5 (2,6)	3,8 (7,3)	3,7 (16,7)	2,6 (34,2)

WATERS TQD

Analito	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

Interferentes endógenos

As seguintes amostras simuladas foram realizadas:

Hemólise:

Amostras de sangue total coletadas recentemente foram bemolizadas por congelamento e descongelamento, e as concentrações dos analitos foram comparadas com a amostra original. Não houve influência nos resultados quantitativos obtidos (desvio: ≤ 15%).

Icterícia:

Amostras de sangue total foram enriquecidas com bilirrubina não conjugada e conjugada, e as concentrações do analito foram comparadas com a amostra original. Não houve influência nos resultados quantitativos obtidos (desvio: ≤ 15%).

Lipemia:

Amostras de sangue total foram enriquecidas com diferentes concentrações de uma emulsão gordurosa e as concentrações do analito foram comparadas com a amostra original. No caso da ciclosporina A, os resultados quantitativos não foram influenciados. No caso de everolimus, sirolimus e tacrolimus, os resultados quantitativos foram influenciados (desvio > 15%); d.

Todos os testes foram realizados com um espectrômetro de massa SCIEX 4500™.

Interferência de drogas

Amostras de sangue total processadas foram enriquecidas com as seguintes substâncias nas concentrações mais altas esperadas sem interferência significativa; os resultados quantitativos não foram influenciados (desvio: ≤ 15%):

Acetazolamida, acetilcisteína, ácido acetilsalicílico, aciclovir, alopurinol, ampicilina, amlodipina, amoxicilina, ampicilina, azatioprina, azitromicina, bisoprolol, captopril, carbamazepina, carbamazepina-10, 11-epóxido, cefradina, cloranfenicol, clordiazepóxido, cimetidina, ciprofloxacina, clari tromicina, dexametasona, diazepam, diclofenaco, digitoxina, digoxina, diidrocodeína, disopiramide, enalaprilato, eritromicina,

furosemda, ganciclovir, gentamicina, hidroclorotiazida, ibuprofeno, isossorbidinitrato, itraconazol, cetoconazol, levofloxacina, levotiroxina, lidocaína, lorazepam, metformina, metilprednisolona, metilcilina, metoclopramida, metoprolol, ácido micofenólico, ácido micofenólico glicuronídeo, n-acetilprocainamida, nadolol, fluoreto de sódio, n-desmetildiazepam, neomicina, nifedipina, norverapamil, omeprazol, oxazepam, oxipurinol, paracetamol, penicilina G, penicilina V, prazosina, prednisolona, prednisona, (±) - propranolol, procainamida, ranitidina, rifampicina, risperidona, salbutamol, ácido salicílico, estreptomina, sulfametoxazol, tramadol, triantereno, trimetoprima, ácido valpróico, vancomicina, verapamil.

Os metabólitos foram adicionados nas mais altas concentrações esperadas em amostras de sangue total sem interferência significativa; os resultados quantitativos não foram influenciados (desvio: ≤15%): 7-O-DeMetil sirolimus

LIMITAÇÕES CLÍNICAS

Não há valores universais estabelecidos para ciclosporina A, everolimus, sirolimus e tacrolimus em sangue total. Valores obtidos com diferentes métodos de ensaio não podem ser usados de forma intercambiável. Os laboratórios devem incluir a identificação do método utilizado para o ensaio com o objetivo de auxiliar a interpretação dos resultados.

Valores individuais não podem ser usados como únicos indicadores para realizar mudanças no regime de tratamento. Cada paciente deve ser completamente avaliado clinicamente antes de serem feitos ajustes no tratamento, e cada usuário deve estabelecer seus ou suas faixas, baseado em avaliações clínicas. É recomendado o uso consistente de um ensaio para pacientes individuais. Fatores de conversão obtidos de comparações entre métodos de ensaios não devem ser utilizados para prever valores individuais dos pacientes.

A complexidade do estado clínico, diferenças individuais em sensibilidade aos imunossuppressores e efeitos nefrotóxicos da ciclosporina A, everolimus, sirolimus e tacrolimus, a coadministração de outros imunossuppressores, o tipo de transplante, o tempo pós-transplante e um número de outros fatores contribuem para diferentes exigências para níveis sanguíneos ótimos desses imunossuppressores.

VALORES DE REFERÊNCIA

Ciclosporina A: faixa terapêutica para sangue total (µg/L) [2, 3]

	Terapia inicial (µg/L)	Terapia de manutenção (µg/L)
Transplante renal	150 - 225	100 - 150
Transplante de fígado	225 - 300	100 - 150
Transplante de coração	250 - 350	150 - 250

Everolimus: faixa terapêutica para sangue total (µg/L) [2, 3]

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

Sirolimus: faixa terapêutica para sangue total (µg/L)

	Mínimo (µg/L)
Transplante de rim [2]	
• Combinação de esteroides e micofenolato de mofetil (MMF)	5 - 10
• Combinação de esteroides sem micofenolato de mofetil (MMF)	8 - 12
Transplante de rim [3]	
• Terapia tripla com ciclosporina A, corticosteróides e sirolimus	4 - 12
• Terapia dupla com corticosteróides e sirolimus	12 - 20
Transplante de fígado [3]	
• Terapia com ciclosporina A ou tacrolimus, sirolimus, e, quando apropriado, corticosteróides	3 - 6

• Terapia com sirolimus e, quando apropriado, corticosteróides	5 - 8
--	-------

Tacrolimus: faixa terapêutica para sangue total (µg/L)














	Terapia inicial (µg/L)		Terapia de manutenção (µg/L)	
	[2]	[3]	[2]	[3]
Transplante renal	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

Todas as faixas terapêuticas listada aqui são retiradas da literatura. Entretanto, não há valores universais estabelecidos para ciclosporina A, everolimus, sirolimus e tacrolimus em sangue total. Valores obtidos com diferentes métodos de ensaio não podem ser usados de forma intercambiável. Os laboratórios devem incluir a identificação do método utilizado para o ensaio com o objetivo de auxiliar a interpretação dos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Símbolos utilizados:

	Fabricante
	Número de catálogo
	Quantidade suficiente para <n> ensaios
	Código do lote
	Validade
	Limite de temperatura
	Consultar as instruções para utilização
	Produto para a saúde para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Cuidado
	Risco biológico
	Altamente tóxico
	Corrosivo
	Atenção
	Este produto cumpre as exigências da Diretiva 98/79/CE relativa aos dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i>

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