

CHROMSYSTEMS

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

THERAPEUTISCHES DRUG MONITORING
THERAPEUTIC DRUG MONITORING
SUIVI THÉRAPEUTIQUE DE MÉDICAMENTS
MONITORAGGIO DEI FARMACI
MONITORIZACIÓN DE FÁRMACOS



Manual de instruções para a análise por HPLC de

Ácido micofenólico em plasma/soro

somente para diagnóstico *in vitro*

Nº de artigo 46000

A Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH está certificada de acordo com ISO 9001 e ISO 13485 (incluindo MDSAP). Os produtos são produzidos e colocados em circulação de acordo com a Normativa 98/79/CE relativa a dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*.

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

Importado e Distribuído por: BioSys Ltda.

Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
CEP: 24020-112
CNPJ: 02.220.795/0001-79

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

Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH

Am Haag 12
82166 Gräfelfing
Alemanha

Telefone: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-299
www.chromsystems.com

Conteúdo	Página
1 Informações para Requisição	4
2 Introdução	5
2.1 Informação Básica	5
2.2 Finalidade pretendida	6
2.3 Princípio do kit de reagentes	6
3 Sistema LC-MS/MS	6
3.1 Equipamento e parâmetros do instrumento.....	6
3.2 Coluna de HPLC	6
3.3 Pausas no funcionamento	7
4 Separação cromatográfica	7
5 Preparo de amostra	8
5.1 Coleta e armazenamento de amostras de pacientes.....	8
5.2 Reconstituição dos calibradores	8
5.3 Reconstituição dos controles	9
5.4 Procedimento de preparo de amostra	10
5.5 Estabilidade das amostras preparadas.....	10
6 Equipamento adicional necessário	11
7 Aquisição de dados e avaliação	11
7.1 Calibração do sistema de cálculo	11
7.2 Cálculo quantitativo com padrão interno.....	11
8 Controle de qualidade	12
9 Valores de referência	12
10 Fatores de conversão	12
11 Armazenamento e estabilidade dos reagentes	12
12 Descarte de resíduos	13
13 Exemplos de cromatogramas	13
14 Teste para Interferências	14
15 Limitações clínicas	15
16 Problemas e Soluções	16
17 Literatura	17
Apêndice I: Informações de Riscos	18
Apêndice II: Cálculo manual	20
Apêndice III: Dados de desempenho	21
Apêndice IV: Símbolos	23

1 Informações para Requisição

Artigo no.	Produto	
46000	Kit de reagentes HPLC Ácido Micofenólico em plasma/soro Conteúdo para 100 análises: Fase Móvel, HIGH RESOLUTION Padrão de Calibração em Plasma Padrão Interno Tampão de Equilíbrio 1 Tampão de Equilíbrio 2 Tampão de Lavagem Tampão de Eluição Colunas de Lavagem de Amostra	1000 mL 5 x 1,0 mL (liof.) 25 mL 100 mL 100 mL 200 mL 40 mL 2 x 50 unidades
	Componentes individuais	
46001/HR	Fase Móvel, HIGH RESOLUTION	1000 mL
46003	Padrão de Calibração em Plasma	5 x 1,0 mL (liof.)
46004	Padrão Interno	25 mL
46005	Tampão de Equilíbrio 1	100 mL
46006	Tampão de Equilíbrio 2	100 mL
46007	Tampão de Lavagem	200 mL
46009	Tampão de Eluição	40 mL
46008	Colunas de Lavagem de Amostra	50 unidades
	Acessórios	
46110/HR	Coluna HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)	1 unidade
15009	Pré-filtro em PEEK, 5 µm	5 unidades
15010	Suporte do pré-filtro em PEEK	1 unidade
17001	Carcaça do Cartucho de Pré-coluna	1 unidade
17046	Cartucho de Pré-coluna	1 unidade
	Padrão de calibração e controles da Chromsystems para Ácido Micofenólico em plasma/soro	
46029	3PLUS1® Conjunto de Calibração Multinível em Plasma	4 x 1,0 mL (liof.)
46003	Padrão de Calibração em Plasma	5 x 1,0 mL (liof.)
0041	Controle Bi-Nível (I+II) em Plasma	2 x 5 x 2,0 mL (liof.)
0042	Controle Nível I em Plasma	10 x 2,0 mL (liof.)
0043	Controle Nível II em Plasma	10 x 2,0 mL (liof.)

2 Introdução

2.1 Informação Básica

O ácido micofenólico (ingl. Mycophenolic acid, MPA) é o metabolito ativo do imunossupressor micofenolato mofetil (MMF).

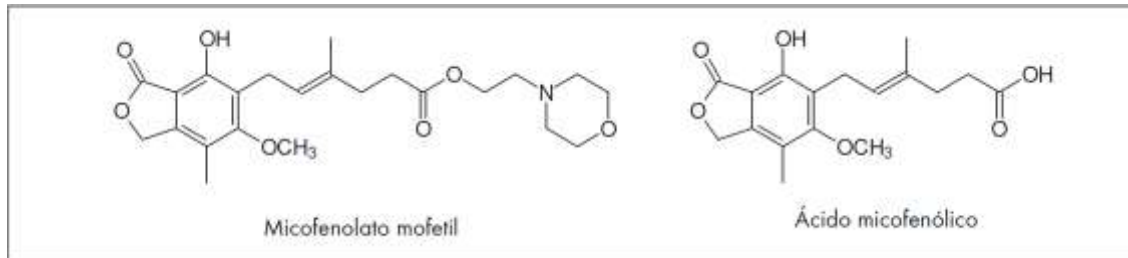


Figura 1: Fórmula estrutural do micofenolato mofetil e de seu metabolito ativo ácido micofenólico

Este medicamento se emprega, cada vez com mais frequência, para evitar as reações de rejeição tissular agudas depois de transplantes de órgãos. Na EU concedeu-se a autorização aos transplantes de rim em 1996, aos de coração em 1998. Ao mesmo tempo, realizaram-se ensaios clínicos bem-sucedidos em MMF para o tratamento de enfermidades autoimunes com estados inflamatórios crônicos na pele, os olhos ou o trato digestivo (doença de Crohn, entre outros). O uso de MMF costuma ser em combinação com ciclosporina, tacrolimus ou corticosteroides; aqui substitui à azatioprina, que apresenta mais efeitos secundários.

O micofenolato mofetil é o 2-(-4-morfolino) etilester do ácido micofenólico e, por si só, não tem efeito imunossupressor. Depois da aplicação oral e a absorção, o composto é dividido no metabolito ativo ácido micofenólico rapidamente por esterases no plasma e nos tecidos, de forma tal que o medicamento só é localizável no sangue durante um tempo breve, após uma administração intravenosa. O mecanismo de ação do ácido micofenólico se baseia na inibição reversível da enzima inosin monofosfato desidrogenase (IMPDH). Desta forma se bloqueia a biossíntese do nucleotídeo da guanosina nos linfócitos B e T, e freia-se em grande medida sua taxa de divisão e reprodução celular, o que leva a uma regulação à baixa da reposta imunológica do corpo.

No sangue, o ácido micofenólico está presente em grandes quantidades ligado não especificamente à albumina plasmática. Seu metabolismo se produz no fígado, seu metabolito principal é o 7-O-glucoronida fenólico (MPAG), carente de ação imunossupressora e que é eliminado através da urina. Especialmente em pacientes com falhas renais agudas, a concentração de MPAG pode ser superior à do ácido micofenólico, pelo qual, para obter uma quantificação exata é muito importante o diferenciar com certeza o ácido micofenólico da glucoronida inativa. O risco de uma rejeição tissular permanece para sempre nos pacientes de transplantes, por isso, a administração profilática de imunossupressores se mantém frequentemente durante anos. Embora haja uma boa tolerância, uma overdose de ácido micofenólico pode provocar efeitos secundários desconfortáveis, como náuseas, transtornos digestivos e mudanças no hemograma. Mediante o controle e uma regulação ótima do nível de MPA em plasma pode-se melhorar a adesão do paciente ao tratamento e garantir um êxito terapêutico máximo.

2.2 Finalidade pretendida

O kit de reagentes da Chromsystems Ácido Micofenólico em plasma/soro é um produto de diagnóstico *in vitro* para seu uso em laboratórios clínicos que serve para a análise quantitativa de ácido micofenólico em amostras humanas de plasma ou soro por HPLC (cromatográfica líquida de alta performance). O kit é usado como teste em pacientes tratados com micofenolato mofetilo ou micofenolato sódico, para controlar seu nível de medicamentos no sangue e ajustá-lo ao intervalo terapêutico.

2.3 Princípio do kit de reagentes

Com este kit de reagentes da Chromsystems pode-se analisar de forma específica e simples o ácido micofenólico em plasma/soro, como metabólito ativo do imunossupressor micofenolato mofetil. O preparo de amostras se realiza por meio de uma extração de fase sólida seletiva, na que o MPAG não ativo é separado com segurança. Através da adição do padrão interno são compensadas as perdas no preparo de amostras.

3 Sistema LC-MS/MS

Atenção:

Quando usar os reagentes, verifique a informação de precauções no Apêndice I.

3.1 Equipamento e parâmetros do instrumento

Para a análise do ácido micofenólico é necessário um sistema isocrático com bomba de HPLC, injetor e detector UV. Não usar um degaseificador (de vácuo), já que pode provocar alterações na composição da fase móvel! Manter a fase móvel mais fechada ou tampada possível também durante o funcionamento. Com o uso de forno de colunas se evitam flutuações na temperatura e se otimiza a estabilidade e reprodutibilidade da separação cromatográfica.

Configurações do instrumento:

Volume de injeção:	10-40 µL
Fluído da lavagem de agulha:	Água/metanol 70/30
Tempo de corrida:	8-9 min
Velocidade do fluxo:	1,0 mL/min
Temperatura de coluna:	+20 até +25 °C
Detector UV: Comprimento de onda de medição:	215 nm

3.2 Coluna de HPLC

A coluna de HPLC para a analítica do ácido micofenólico é enviada equilibrada e testada, pronta para o uso. **Somente pode ser lavada com Fase Móvel (nº do artigo 46012/HR).** Com uma velocidade de fluxo de 1,0 mL/min, a contrapressão de uma coluna nova é de 50 até 70 bar aprox., e pode

umentar com o tempo. Enquanto as separações forem satisfatórias, o aumento da pressão não é relevante.

É obrigatório usar uma pré-coluna (nº de artigo 17001 e 17046) para esta separação de alta resolução.

Se a capacidade de separação piora ou a contrapressão da coluna é alto demais, troque o cartucho da pré-coluna. Recomenda-se o uso de um pré-filtro PEEK adicional (nº de ordem 15009 e nº 15010) para proteger a pré-coluna.

Antes de iniciar uma série de análises, prepare o sistema HPLC como se indica a seguir:

1. Antes de montar a coluna de HPLC, lavar o equipamento com uns 30 mL de fase móvel, com uma velocidade de fluxo de 1,5 mL/min
2. A seguir, montar a coluna e equilibrar o sistema durante 15 – 20 min com uma velocidade de fluxo de 1,0 mL/min, até que se estabilize a linha de base.
3. Injetar depois várias vezes o padrão de calibração processado até que os dois cromatogramas sejam idênticos em seus tempos de retenção e alturas de pico.

A seguir, a fase móvel pode ser recirculada.

3.3 Pausas no funcionamento

Se o equipamento não vai ser usado durante um período máximo de três dias, deve-se deixar fluir a fase móvel a pouca velocidade (0,2 mL/min), para evitar a cristalização de sais nas tubulações do êmbolo da bomba de HPLC. A coluna de HPLC permanece conectada ao sistema. Para a conservação da lâmpada desconectar o detector.

Para pausas no funcionamento mais prolongadas, desmontar a coluna de HPLC. Não é necessário realizar um procedimento de conservação ou de lavagem para a coluna. Conserve a coluna na fase móvel (**temperatura ambiente**). No lugar da coluna, montar-se-á uma peça de conexão. Lavar então o sistema de HPLC com aprox. 50 mL de água/metanol = 80/20.

4 Separação cromatográfica

A seguinte tabela inclui os tempos de retenção aproximados do ácido micofenólico e do padrão interno a uma velocidade de fluxo de 1,0 mL/min.

Tabela 1: Tempos de retenção

Substância	Tempo de retenção (aprox.)
Padrão interno	6,1 min
Ácido micofenólico	7,2 min

A duração da separação cromatográfica é de 8-9 min aproximadamente, com uma velocidade de fluxo de 1,0 mL/min. Os tempos de retenção podem variar ligeiramente, por exemplo se muda a

temperatura ambiente, ao usar um novo lote de fase móvel ou ao trocar a coluna HPLC. Portanto, estabeleça os valores atuais através de um cromatograma de calibração.

5 Preparo de amostra

Cuidado:

Quando usar os reagentes, verifique as precauções recomendadas no Apêndice I.

5.1 Coleta e armazenamento de amostras de pacientes

O material investigado é soro ou plasma. As amostras devem ser enviadas refrigeradas. A durabilidade, se for conservada a +2 até +8°C, é de até quatro semanas. Em caso de armazenamento mais prolongado, as amostras devem ser conservadas por debaixo de -18 °C, conservando-se assim ao menos até três meses.

Por favor, tenha em conta o seguinte:

Os sistemas de extração de sangue que contêm um tampão de citrato não são aptos para a análise. Assim mesmo, recomenda-se não usar tubos de extração de sangue com gel separador. Alguns géis podem absorver parte dos analitos, resultando com isso valores analíticos erroneamente baixos. Além disso, alguns géis provocam interferências que podem influenciar na separação cromatográfica.

Nota:

É de responsabilidade de cada laboratório usar todas as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinar critérios específicos de estabilidade para o laboratório.

5.2 Reconstituição dos calibradores

Antes do preparo de amostra, reconstitua os calibradores em plasma (artigo no. 46003, 46029) da seguinte maneira:

1. Pipete 1,0 mL de água destilada no frasco original
2. Reconstitua de 10 a 15 min de +20 a +25°C, agite repetidamente

Verifique que o conteúdo do frasco esteja homogêneo. Se substâncias não dissolvidas estiverem visíveis, estenda o tempo de reconstituição. Evitar a luz do sol direta.

Os níveis de calibrador são rastreáveis aos pesos iniciais de substâncias puras. As concentrações de analito no calibrador são dependentes de lote. Níveis individuais são fornecidos no folheto do calibrador.

Atenção:

Este produto é fabricado a partir de um *pool* de plasma humano que foi testado pelo fabricante e é negativo para infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus da hepatite B (HBV), o vírus da hepatite C (HCV) e a bactéria *Treponema pallidum*. No entanto, um risco potencial de infecção não pode ser totalmente excluído. Considere todos os produtos contendo materiais de fonte

humana como potencialmente infecciosos e exerça o mesmo cuidado no manuseio deste produto assim como no manuseio de amostras de pacientes potencialmente infectantes.

Tempo de armazenamento após reconstituição:

Os calibradores dissolvidos em água têm os seguintes tempos de armazenamento:

Tabela 2: Estabilidade dos calibradores após reconstituição

Temperatura de armazenamento	Tempo de armazenamento	Outras condições de armazenamento
+2 a +8° C	1 semana	Proteção da luz, bem fechado
abaixo de -18 °C	3 meses	Proteção da luz, bem fechado

5.3 Reconstituição dos controles

Antes do preparo da amostra, reconstitua os controles em plasma (artigo no. 0042, 0043) da seguinte maneira:

1. Pipete 2,0 mL de água destilada no frasco original
2. Reconstitua de 10 a 15 min de +20 a +25 °C, agite repetidamente

Verifique que o conteúdo do frasco está homogêneo. Se substâncias não dissolvidas ainda estiverem visíveis, estenda o tempo de reconstituição. Evitar a luz do sol direta.

As concentrações do analito nos controles são dependentes de lote. Níveis individuais são fornecidos no folheto que acompanha cada controle.

Atenção:

Este produto é fabricado a partir de um pool de soro humano que foi testado pelo fabricante e é negativo para infecções pelo vírus de imunodeficiência humana (HIV), o vírus da hepatite B (HBV), o vírus da hepatite C (HCV) e a bactéria *Treponema pallidum*. No entanto, o risco potencial de infecção não pode ser inteiramente excluído. Considere todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infecciosos e exerça o mesmo cuidado no manuseio deste produto assim como no manuseio de amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Tempo de armazenamento dos controles após reconstituição:

Controles dissolvidos em água têm os seguintes tempos de armazenamento:

Tabela 3: Estabilidade dos controles após reconstituição

Temperatura de armazenamento	Tempo de armazenamento	Outras condições de armazenamento
+2 a +8° C	1 semana	Proteção da luz, bem fechado
abaixo de -18 °C	3 meses	Proteção da luz, bem fechado

5.4 Procedimento de preparo de amostra

Para preparar amostras de pacientes, controles e calibradores para análise, trabalhe seguindo os seguintes passos na ordem fornecida:

Deve-se centrifugar as amostras antes de processá-las (2800 x g, 10 min)!

1. Padrão Interno:

Misturar em um frasco etiquetado 250 µL de plasma/soro com 250 µL de Padrão Interno (vórtex).

2. Condicionamento da coluna de preparo de amostras:

Verter na coluna de preparo de amostras etiquetada: primeiro 1 mL de Tampão de Equilíbrio 1, a seguir, 1 mL de Tampão de Equilíbrio 2, extrair respectivamente centrifugando (190 x g, 30-60 s aprox.) ou aspirando. A coluna não deve secar!

3. Introdução da amostra:

Introduzir a amostra misturada com o padrão interno na coluna de preparo de amostras condicionada e extrair centrifugando (190 x g, 1 min aprox., comprovar que a extração tenha sido completada em cada coluna!) ou aspirando, eliminar os resíduos.

4. Lavagem:

Verter 2 x 1 mL de Tampão de Lavagem na coluna de preparo de amostras, extrair centrifugando (190 x g, 1 min) ou aspirando, eliminar os resíduos; depois do segundo passo de lavagem, centrifugar (1100 x g, 2 min) ou aspirar até secar.

5. Eluição:

Trocar os tubos de recolhida (**crystal!**), adicionar 400 µL de Tampão de Eluição na coluna, esvaziá-la completamente centrifugando (190 x g, 1 min; a seguir 1100 x g, 1 min) ou aspirando. Misturar brevemente os eluatos antes da injeção.

6. Injeção:

Injetar 20-40 µL do eluato no sistema de HPLC.

Controle de qualidade:

Em cada série de análises deve-se realizar controles para documentar a precisão e exatidão.

5.5 Estabilidade das amostras preparadas

Amostras preparadas para análise como indicado na seção 5.4 têm a seguinte estabilidade:

Tabela 4: Estabilidade das amostras preparadas

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	3 dias	Protegido da luz, fechado hermeticamente, frascos de vidro
+2 a +8 °C	1 semana	Protegido da luz, fechado hermeticamente, frascos de vidro

6 Equipamento adicional necessário

Para a determinação por HPLC do ácido micofenólico em plasma/soro é necessário também o seguinte equipamento, não incluído no kit de reagentes:

- Sistema de HPLC isocrático
- Autoinjeter
- Detector UV
- Agitador (ex. Vortex™)
- Centrífuga (min 2800 x g)

7 Aquisição de dados e avaliação

7.1 Calibração do sistema de cálculo

Para calibrar seu sistema de cálculo e comprovar a capacidade de separação do sistema de HPLC, antes de analisar as amostras dos pacientes, realize uma análise teste. Utilize para isso o padrão de calibração de plasma (nº de artigo 46003) ou os padrões de calibração **3PLUS1®**-Multinível (nº de artigo 46029). A concentração dos analitos em dito padrão de calibração depende do lote. Encontrará os valores exatos no folheto de informação adjunto.

Se é usado um calibrador pontual (nº de artigo 46003), injete, de forma repetida, uma alíquota do padrão de calibração processado até que dois cromatogramas consecutivos sejam praticamente idênticos em seus tempos de retenção, resolução de pico e alturas ou áreas de pico. Use o cromatograma da última injeção de teste para calibrar o sistema de cálculo (software, integrador).

Se é usado um calibrador multiponto (nº de artigo 46029), introduza os quocientes das áreas de pico (analito/ISTD) no eixo y e as concentrações dos calibradores no eixo x e gere a seguir uma curva de calibração por regressão linear.

Para comprovar se as condições de HPLC (tempos de retenção, parâmetros da calibração) se mantêm constantes durante toda a a determinação, injete um calibrador ou um controle processado novamente durante e ao final de uma série de amostras. Para a calibração, escolher no sistema o cálculo o “método padrão interno”.

7.2 Cálculo quantitativo com padrão interno

Com ajuda do padrão interno se compensam as perdas que possam ocorrer durante o preparo de amostras. Para isto se adiciona a mesma quantidade de padrão interno a todas as amostras, assim como ao padrão de calibração e aos controles. No software definir-se-á o pico correspondente ao padrão interno partindo do cromatograma de calibração (ver cromatogramas no capítulo 13). Dado que são adicionadas quantidades idênticas de padrão interno ao padrão de calibração e às amostras, como concentração do padrão interno pode-se introduzir o valor << 1 >>.

8 Controle de qualidade

Monitore a precisão e acurácia das análises incluindo controles adicionais (artigo no. 0042, 0043) em cada corrida analítica. Se a análise desses controles traz valores fora do intervalo fornecido no folheto de informação, verifique o sistema. Se a discrepância continuar, recalibre o sistema.

9 Valores de referência

Os valores de referência declarados são guias baseados na literatura [1]. Eles podem ser diferentes de outros dados publicados. Dado que os valores variam dependendo do coletivo de pacientes e do método de análise, estabeleça valores de referência específicos para seu laboratório. Ao estabelecê-los, tenha também em conta as regulações nacionais.

Tabela 5: Valores de referência

Substância	Valor de referência [2]
Ácido micofenólico em plasma	2,5-4,5 mg/L

10 Fatores de conversão

A seguinte tabela lista os fatores de conversão entre as concentrações de massa e molar e vice-versa.

Tabela 6: Fatores de conversão

Substância	µg/L a nmol/L	nmol/L a µg/L
Ácido micofenólico em plasma	x 3,1217	x 0,3203

11 Armazenamento e estabilidade dos reagentes

Fechados e se as condições de transporte e armazenamento forem cumpridas, os reagentes são estáveis até a data de validade declarada no rótulo. Transporte e armazene os reagentes sob as seguintes condições:

Tabela 7: Condições de armazenamento dos reagentes:

Produto	Temperatura de transporte
Fase Móvel (nº de artigo 46012/HR)	+18 a +30 °C
Padrão Interno (nº de artigo 46004)	+2 a +8 °C

Tampão de Equilíbrio 1 (nº de artigo 46005)	+18 a +30 °C
Tampão de Equilíbrio 2 (nº de artigo 46006)	+18 a +30 °C
Tampão de Lavagem (nº de artigo 46007)	+18 a +30 °C
Tampão de Eluição (nº de artigo 46009)	+18 a +30 °C
Colunas de Lavagem de Amostra (nº de artigo 46008)	+18 a +30 °C
Padrões de calibração de plasma (nº de artigo 46003, 46029)	+2 a +8 °C
Controles de plasma (nº de artigo 0041, 0042, 0043)	+2 a +8 °C

Imediatamente depois de seu uso, feche os reagentes e armazene-os à temperatura indicada. Uma vez abertos, se mantêm estáveis durante um ano após a data de abertura, mas nunca além da data de validade indicada. Encontrará dados sobre a estabilidade dos padrões de calibração e controles reconstituídos nos capítulos 5.2 e 5.3.

12 Descarte de resíduos

A Fase Móvel, o Padrão Interno, Tampão de Equilíbrio 1, Tampão de Equilíbrio 2, Tampão de Lavagem e Tampão de Eluição contêm solventes orgânicos. Verter os restos no contêiner para dissolventes orgânicos não halogenados.

Resíduos de amostras de paciente e amostras preparadas, assim como os controles e calibradores devem ser coletados e descartados como resíduos potencialmente infectantes.

As soluções mencionadas não devem ser descartadas junto com lixo doméstico. Não despeje na fonte de fornecimento de água. Descarte de acordo com a Diretriz 2008/98/EC e com as ordenanças nacionais e locais. Os contêineres de resíduos devem ser armazenados apropriadamente e o acesso só deve ser permitido a pessoas autorizadas.

13 Exemplos de cromatogramas

Os seguintes gráficos fornecem diversos exemplos de cromatogramas criados usando este método.

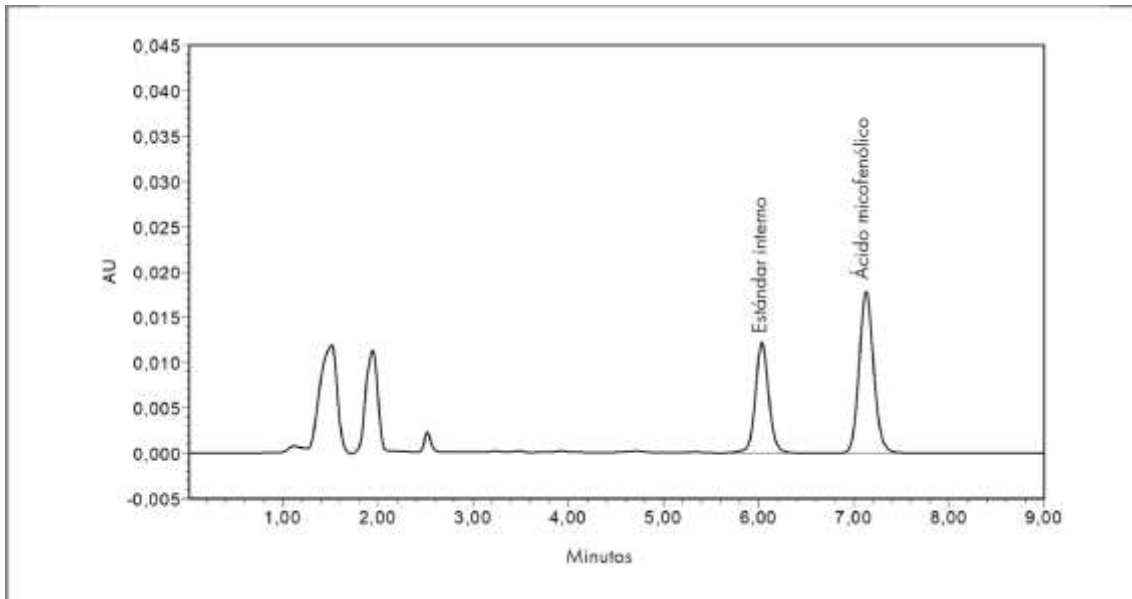


Figura 2: Cromatograma de um padrão de calibração

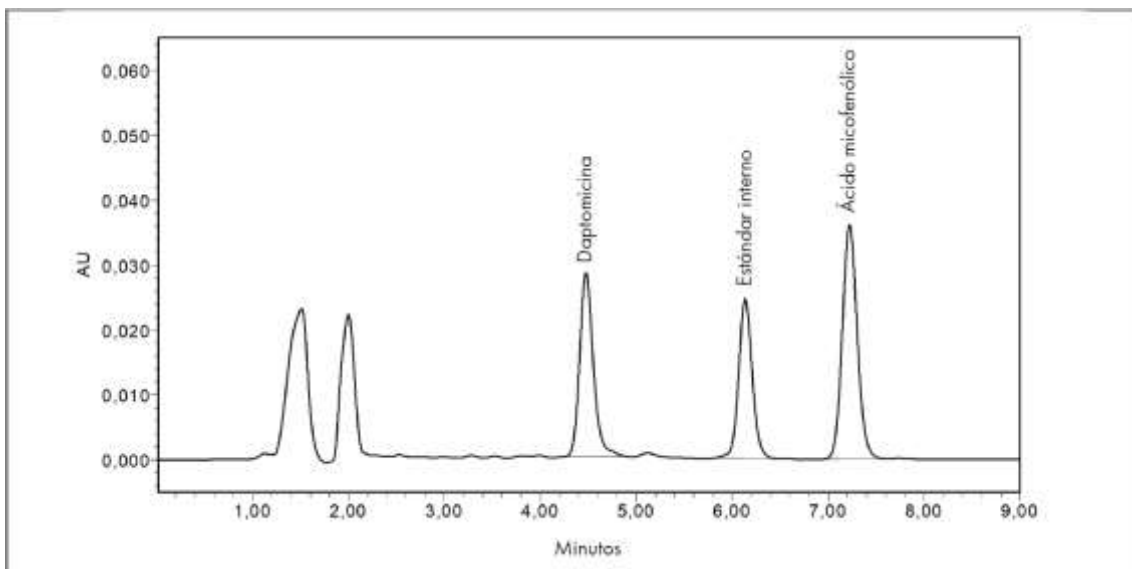


Figura 3: Cromatograma da amostra de um paciente com comedição com daptomicina
Concentração do analito: Ácido micofenólico: 3,9 mg/L

14 Teste para Interferências

Foram adicionadas às amostras de plasma metabólitos e medicamentos em suas concentrações máximas esperadas e se testaram as possíveis interferências.

As seguintes substâncias foram testadas e tiveram uma influência negligenciável nos resultados quantitativos (desvio $\leq 15\%$)

Acetazolamida, acetilcisteína, ácido acetilsalicílico, aciclovir, aldosterona, alopurinol, ampicilina, amlodipina, amoxicilina, ampicilina, androstenediona, azatioprina, azitromicina,

bisoprolol, captopril, carbamazepina, carbamazepina-10,11-epóxido, cefepima, ceftazidima, cefradina, cloranfenicol, clordiazepóxido, cimetidina, ciprofloxacina, claritromicina, corticosterona, cortisol, cortisona, ciclosporina A, dexametasona, 11-desoxicorticosterona, 11-desoxicortisol, 21-desoxicortisol, DHEA, DHEAS, diazepam, diclofenaco, digitoxina, digoxina, dihidrocodeína, diidrotestosterona, disopiramida, enalaprilato, eritromicina, estradiol, everolimus, fluconazol, 5-flucitosina, furosemida, ganciclovir, gentamicina, hidroclorotiazida, hidroxiitraconazol, 17-hidroxiprogesterona, ibuprofeno, isossorbidinitrato, itraconazol, cetoconazol, levofloxacina, levotiroxina, lidocaína, linezolid, lorazepam, meropenem, metformina, meticilina, metilprednisolona, metoclopramida, metoprolol, ácido micofenólico – glicuronídeo, n-acetil-procainamida, nadolol, fluoreto de sódio, n-desmetildiazepam, neomicina, nifedipina, norverapamil, omeprazol, oxazepam, oxipurinol, paracetamol, penicilina g, penicilina v, fenitoína, piperacilina, posaconazol, prazosina, prednisolona, prednisona, procainamida, progesterona, propranolol, ranitidina, rifampicina, risperidona, salbutamol, ácido salicílico, sirolimus, estreptomicina, sulbactam, sulfametoxazol, tacrolimus, tazobactam, testosterona, tramadol, triantereno, trimetoprima, ácido valpróico, vancomicina, verapamil.

Na presença das seguintes substâncias interferências puderam ser observadas:

O antimicótico voriconazol, em sua concentração terapêutica máxima, interferiu com o padrão interno, dando como resultado concentrações de ácido micofenólico ao redor de 33% mais baixas. Avalie essas amostras não através da área, senão através de sua altura. Dessa forma se minimiza o efeito da interferência, embora não se elimine por completo.

Se você tiver questões concernentes a interferentes, contate seu representante local Chromsystems, ligue para nosso telefone em Munique (telefone: +49 89 18930-111) ou envie um e-mail para nosso suporte Chromsystems: support@chromsystems.com.

15 Limitações clínicas

Não há valores de referência universalmente aplicáveis para o ácido micofenólico em plasma/soro. Não é possível comparar valores obtidos mediante métodos de análises diferentes. Os laboratórios deverão indicar o método empregado na análise para uma correta interpretação dos resultados.

O regime de tratamento não deve modificar-se por motivo de resultados isolados. Antes de adaptar a terapia, há que avaliar minuciosamente o diagnóstico clínico dos pacientes, cada usuário deverá estabelecer seus próprios valores de referência baseados nas avaliações clínicas. Não se devem empregar fatores de conversão entre os diferentes métodos de análise para prever os valores de um paciente.

A complexidade do estado clínico, a reação de cada um aos imunossuppressores, a comedicação com outros imunossuppressores, o tipo de transplante, o tempo transcorrido após o mesmo e outros fatores conduzem à diferenciação dos níveis ótimos do ácido micofenólico no sangue segundo o paciente.

16 Problemas e Soluções

Tabela 8: Problemas e soluções

Problema	Possível causa	Solução
A linha de base varia	A lâmpada do detector ainda está fria	Esperar
	Lâmpada do detector gasta	Trocar a lâmpada
	O sistema ainda não está equilibrado	Injetar várias vezes o padrão de calibração, até obter dois cromatogramas consecutivos idênticos
	Variação da temperatura	Usar um forno para colunas
	A velocidade do fluxo não é constante	Verificar a bomba
Linha de base irregular	Bomba de HPLC	Verifique a bomba (ar, estanqueidade)
	Ar no sistema	Degaseificar (purgar) o equipamento de HPLC
	Célula do detector suja	Limpar a célula do detector
Picos parasitas	Ar no sistema	Degaseificar (purgar) o equipamento de HPLC
	Impurezas no injetor	Purgar o injetor
	Agulhas do autoinjeter sujas	Usar agulhas novas
	Sistema de injeção sujo	Lavar com metanol, ou injetar 10 vezes Fase Móvel
Picos largos, caudas	Coluna de HPLC gasta	Trocar a coluna
Picos duplos	Volumes mortos nas conexões	Trocar as conexões
	Volume morto na coluna de HPLC	Trocar a coluna
Não há picos	O injetor tem vazamentos	Verificar o injetor
Baixa sensibilidade	Lâmpada do detector gasta	Trocar a lâmpada
	Célula do detector suja	Limpar a célula
	Válvula do injetor defeituosa	Verificar o injetor
Tempos de retenção modificados	Variação da temperatura	Usar um forno para colunas
	Velocidade do fluxo irregular	Verificar a bomba de HPLC e ajustar a velocidade de fluxo
	O sistema ainda não está equilibrado	Bombear durante 15 min aprox. a Fase Móvel no sistema; injetar repetidamente o padrão de calibração.
Não há sinal	Conexão inexistente ou defeituosa com o integrador/registrator	Verificar o cabo do sinal e a conexão
	Lâmpada do detector	Verificar a alimentação da tomada; caso necessário, trocar a lâmpada

Se tiver dúvidas sobre como consertar avarias, contate o nosso serviço externo ou diretamente ao serviço de atenção ao cliente da Chromsystems, tanto ligando a nossa linha direta no +49 89 18930-111 como enviando um correio eletrônico a support@chromsystems.com.

17 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, Abecassis 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, Wisser 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. Korecka 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.

Apêndice I: Informações de Riscos

Quando usar os reagentes, verifique as seguintes informações de segurança e tome as devidas medidas de precaução. Mais informação pode ser obtida de nossas fichas de segurança. Elas podem ser baixadas de nosso site www.chromsystems.com ou disponíveis mediante pedido.

Tabela 9: Risco e medidas de precaução

Pictogramas	Risco e Medidas de precaução
Fase Móvel, HIGH RESOLUTION (nº de artigo 46012/HR)	
	<p>Perigo</p> <p>H225 Líquido e vapor muito inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa sérios danos aos olhos.</p> <p>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 estatística. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face.</p>
Padrão Interno (nº de artigo 46004)	
	<p>Perigo</p> <p>H226 Líquido e vapores inflamáveis.</p> <p>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 estatística. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face.</p>
Tampão de Equilíbrio I (artigo no. 46005)	
	<p>Perigo</p> <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico se ingerido, em contato com a pele ou se inalado. H370 Causa sérios danos aos órgãos.</p> <p>P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P310 SE INGERIDO: Ligue imediatamente para um CENTRO DE ENVENENAMENTO/médico. P302+P352 EM CONTATO COM A PELE: Lave com muito sabão e água. P403+P233 Armazene em um local bem ventilado. Mantenha o lugar bem fechado.</p>

Pictogramas	Risco e Medidas de precaução
Tampão de Equilíbrio 2 (nº de artigo 46006)	
	<p>Atenção</p> <p>H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H371 Pode provocar danos nos órgãos.</p> <p>P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P312 SE INGERIDO: Ligue para um CENTRO DE ENVENENAMENTO/médico se a pessoa estiver com mal-estar. P302+P352 EM CONTATO COM A PELE: Lave com muito sabão e água. P403+P233 Armazene em um local bem ventilado. Mantenha o lugar bem fechado.</p>
Tampão de Lavagem (artigo no. 46007)	
	<p>Atenção</p> <p>H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H371 Pode provocar danos nos órgãos.</p> <p>P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P312 SE INGERIDO: Ligue para um CENTRO DE ENVENENAMENTO/médico se a pessoa estiver com mal-estar. P302+P352 EM CONTATO COM A PELE: Lave com muito sabão e água. P403+P233 Armazene em um local bem ventilado. Mantenha o lugar bem fechado.</p>
Tampão de Eluição (artigo no. 46009)	
	<p>Perigo</p> <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico se ingerido, em contato com a pele ou se inalado. H370 Causa sérios danos aos órgãos.</p> <p>P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P310 SE INGERIDO: Ligue imediatamente para um CENTRO DE ENVENENAMENTO/médico. P302+P352 EM CONTATO COM A PELE: Lave com muito sabão e água. P403+P233 Armazene em um local bem ventilado. Mantenha o lugar bem fechado.</p>
<p>Estes componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da EU:</p>	
<p>3PLUS1_r Set Calibrador Multinível em Plasma (nº de artigo 46029) Padrão de Calibração em Plasma (nº de artigo 46003) Controles em Plasma (nº de artigo 0041, 0042, 0043)</p>	

Apêndice II: Cálculo manual

Cálculo usando o Padrão de Calibração em Plasma

Para cálculo manual dos resultados da análise usando o Padrão de Calibração em Plasma (nº de artigo 46003) os seguintes dados são necessários.

- Área/altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = $A_{amostra}$
- Área/altura do pico do analito A no cromatograma do padrão de calibração = $A_{padrão}$
- Área/altura do padrão interno no cromatograma da amostra = $IS_{amostra}$
- Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma do padrão de calibração = $IS_{padrão}$
- Concentração C do analito A no padrão de calibração = $C_{padrão}$

Calcule a concentração do analito A na amostra $C_{amostra}$ da seguinte maneira:

$$C_{amostra} = \frac{A_{amostra} \times IS_{padrão}}{A_{padrão} \times IS_{amostra}} \times C_{padrão}$$

Cálculo usando o 3PLUS1® Set de Calibração Multinível em Plasma

Para o cálculo manual usando o 3PLUS1® Set de Calibração Multinível em Plasma (nº de artigo 46029) representar-se-ão os quocientes das alturas de pico dos analitos e altura de pico do padrão interno frente às concentrações de analito correspondentes. A equação da reta de calibração, através da que calcula a concentração do analito correspondente da amostra, se obtém através de regressão linear.

Para o cálculo manual dos resultados das análises os seguintes dados são necessários:

- Altura ou área de pico da substância A no cromatograma da amostra = $A_{amostra}$
- Altura ou área de pico do padrão interno no cromatograma da amostra = $IS_{amostra}$
- Pendente da reta de calibração = a
- Eixo Y da reta de calibração = b

Calcule a concentração da substância A na amostra ($C_{amostra}$) da seguinte maneira:

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

Apêndice III: Dados de desempenho

Dentro do marco da comprovação de linearidade e da validação, foram adicionadas às amostras de plasma sem processar, quantidades definidas de ácido micofenólico e foram processadas várias vezes.

Recuperação:

Recuperação analítica foi determinada a partir da inclinação das linhas de calibração de várias amostras de plasma e diluições de soluções padrão aquosas.

Tabela 10: Taxa de recuperação

Substância	Taxa de recuperação
Ácido micofenólico	99 %
Padrão Interno	107 %

Limite inferior de quantificação (LLOQ) e linearidade (limite superior de quantificação):
O método é linear desde o limite inferior de quantificação (LLOQ) até o limite superior de quantificação declarado (faixa linear).

Tabela 11: Linearidade e limite de quantificação da análise

Substância	LLOQ	Faixa linear até pelo menos
Ácido micofenólico	0,1 mg/L	30 mg/L

Precisão Intra-ensaio:

A reprodutibilidade intra-ensaio do método foi calculada com várias concentrações diferentes, processando várias vezes a mesma amostra:

Tabela 12: Reprodutibilidade Intra-ensaio, n = 10

Substância	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
Ácido micofenólico	1,0 %	0,7 %	1,2 %
	(1,93 mg/L)	(5,78 mg/L)	(4,04 mg/L)

Precisão inter-ensaio:

Os quocientes de variação foram calculados através de um processamento múltiplo (n =10) da mesma amostra de plasma em 10 dias diferentes para três concentrações diferentes:

Tabela 13: Reprodutibilidade Inter-ensaio, n = 100

Substância	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
Ácido micofenólico	3,0 %	3,3 %	3,1 %
	(1,89 mg/L)	(5,60 mg/L)	(3,95 mg/L)

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
82166 Gräfelfing, Germany

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

GMDN Code 64465, term "Mycophenolate therapeutic drug monitoring IVD, kit, liquid chromatography"

EDMA Nomenclature term: Mycophenolate
EDMA Nomenclature code: 12-08-06-05-00
IVDD Classification: other product

Product name: **46000 – Mycophenolic Acid in plasma/serum**
Calibrator: **46003 – Plasma Calibration Standard**
46029 – 3PLUS1® Multilevel Plasma Calibrator Set
Controls: **0041 – Plasma Control Bi-Level (I+II)**
0042 – Plasma Control Level I
0043 – Plasma Control Level II

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 13485, EN 13612, EN 13641, EN ISO 14971, EN 18113-1, EN 18113-2, EN 15223-1, EN 17511, EN 23640

Notified body: -

Gräfelfing, October 02ⁿ, 2019



Michael Meier, Managing Director

EC declaration valid until May 26ⁿ, 2022

Vers. 3.0

Apêndice IV: Símbolos

Nós usamos símbolos EN ISSO 15223-1 em nossos rótulos, especificações e pacotes. Os significados de cada símbolo são detalhados na tabela abaixo:

Tabela 14: Símbolos

Símbolo	Significado
	Fabricante
	Data da fabricação
	Data de validade
	Número do artigo
	Suficiente para <n> aplicações
	Lote/código do lote
	Ver instruções para uso
	Limite máximo de temperatura: Armazene abaixo de determinada temperatura
	Limite de temperatura: Armazene dentro de determinado intervalo de temperatura
	Dispositivo médico de diagnóstico in-vitro
	Número de série