QMS® Everolimus (EVER)

thermo scientific

IVD **Wyłącznie do stosowania w diagnostyce in vitro**

REF **0373852**

Przed użyciem należy uważnie przeczytać ulotkę informacyjną dołączoną do opakowania systemu Quantitative Microsphere System (QMS — mikrosfery do oznaczania ilościowego). Należy przestrzegać instrukcji zawartych w ulotce. W przypadku nieprzestrzegania instrukcji zawartych w ulotce dołączonej do opakowania produktu nie można zagwarantować wiarygodności wyników testów.

Przeznaczenie

Test QMS® Everolimus służy do oznaczania stężenia everolimusu w ludzkiej krwi pełnej przy użyciu automatycznych analizatorów z zakresu chemii klinicznej.

Test QMS Everolimus jest przeznaczony do stosowania jako pomoc w zarządzaniu terapią z wykorzystaniem everolimusu u pacjentów poddanych przeszczepowi organów wskazanych w tabeli dla poszczególnych krajów. Symbol „X" w poniższej tabeli oznacza uzyskanie zezwolenia na sprzedaż produktu w przypadku określonego typu przeszczepu.

Kraj	Typ przeszczepu			Kraj	Typ przeszczepu		
	Nerka	Serce	Wątroba		Nerka	Serce	Wątroba
Argentyna	X	X	X	Liban	X	X	X
Australia	X	X		Litwa	X	X	X
Austria	X	X	X	Luksemburg	X	X	X
Bahrajn	X	X	X	Malezja	X	X	
Belgia	X	X	X	Malta	X	X	X
Brazylia	X	X	X	Holandia	X	X	X
Bułgaria	X	X	X	Nowa Zelandia	X	X	X
Kanada	X			Norwegia	X	X	X
Chile	X	X	X	Oman	X	X	X
Kolumbia	X	X		Peru	X	X	
Kostaryka	X	X	X	Filipiny	X	X	X
Cypr	X	X	X	Polska	X	X	X
Czechy	X	X	X	Portugalia	X	X	X
Dania	X	X	X	Katar	X	X	
Dominikana	X	X		Rumunia	X	X	X
Ekwador	X	X		Rosja	X	X	
Egipt	X	X	X	Arabia Saudyjska	X	X	X
Estonia	X	X	X	Singapur	X	X	X
Finlandia	X	X	X	Słowacja	X	X	X
Francja	X	X	X	Słowenia	X	X	X
Niemcy	X	X	X	RPA	X	X	X
Grecja	X	X	X	Korea Południowa	X	X	X
Hongkong	X	X	X	Hiszpania	X	X	X
Węgry	X	X	X	Szwecja	X	X	X
Islandia	X	X	X	Szwajcaria	X	X	X
Indie	X	X		Tajwan	X	X	X
Włochy	X	X	X	Tajlandia	X	X	X
Jordania	X	X		Turcja	X	X	X
Kuwejt	X	X		Wenezuela	X	X	
Łotwa	X	X	X				

Podstawowe informacje i wyjaśnienie działania testu

Everolimus (pochodna rapamycyny będącej produktem naturalnym) jest lekiem z grupy makrolidów o działaniu immunosupresyjnym. Rapamycyna jest wytwarzana przez niektóre szczepy bakterii Streptomyces hygroscopicus.[1]

Celem strategii w ramach terapii immunosupresyjnych jest zapobieganie aktywacji i/lub proliferacji limfocytów T. Everolimus jest inhibitorem sygnału proliferacji. Na poziomie komórki everolimus hamuje proliferację komórek zależnych od czynników wzrostu bez względu na pochodzenie komórek czy aktywny czynnik wzrostu. Proces ten jest odwracalny ze względu na fakt, że everolimus nie jest związkiem chemicznym o działaniu cytotoksycznym. Everolimus hamuje reakcję limfocytów T na czynniki wzrostu oraz powstrzymuje ekspansję klonalną aktywowanych limfocytów T, hamując fazy cyklu komórkowego od G1 do S.[2] Inhibitory kalcyneuryny, cyklosporyna (CsA) oraz takrolimus uniemożliwiają aktywację limfocytów T, hamując przejście z fazy cyklu komórkowego G0 do G1. Różne sposoby działania w przypadku everolimusu i inhibitorów kalcyneuryny, np. cyklosporyny, są wystarczającym powodem dla wystąpienia synergizmu farmakodynamicznego.[1-3]

Zaleca się monitorowanie stężenia everolimusu we krwi podczas jego stosowania w praktyce klinicznej.[4,5] Preferowany jest pomiar stężenia we krwi pełnej ze względu na fakt, iż w stężeniu leczniczym związek ten w przeważającej części przenika do erytrocytów. Do pomiaru stężenia everolimusu we krwi używa się chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas.[6-8]

Zasady postępowania

QMS Everolimus wykonuje badanie homogeniczną metodą immunoturbidymetryczną (particle-enhanced turbidimetric immunoassay, PETIA). Działanie testu jest oparte na współzawodnictwie o miejsca wiążące w odczynniku zawierającym przeciwciała przeciwko everolimusowi pomiędzy lekiem obecnym w próbce a lekiem naniesionym na mikrocząstkę. Przy braku współzawodniczącego leku w próbce odczynnik zawierający mikrocząstki pokryte everolimusem aglutynuje w sposób nagły w obecności odczynnika zawierającego przeciwciała przeciwko everolimusowi. Współczynnik absorpcji jest mierzony metodą fotometryczną. Po dodaniu próbki zawierającej everolimus następuje częściowe zahamowanie aglutynacji, spowalniające zmianę współczynnika absorpcji. Krzywą zahamowania zależną od stężenia everolimusu można uzyskać, uwzględniając maksymalny współczynnik aglutynacji przy najniższym stężeniu everolimusu i najniższy współczynnik aglutynacji przy najwyższym stężeniu everolimusu.

Odczynniki

QMS Everolimus jest dostarczany w postaci płynnej jako gotowy do użycia zestaw trzech odczynników zawierający:

REF	0373852	
	Odczynnik 1	1 x 22 ml
	Odczynnik 2	1 x 8 ml
PRE	Odczynnik strącający	1 x 8 ml

Wymagane materiały, które nie zostały dołączone

REF	**Opis zestawu**
0373860	QMS Everolimus — kalibratory CAL A-F: 1 x 3,0 ml
0373878	QMS Everolimus — materiały kontrolne, poziom 1-3: 1 x 3,0 ml
	Metanol (klasa przydatności do chromatografii HPLC)

Składniki biorące udział w reakcji

INGRED	**Składnik**	Stężenie
Odczynnik 1	Antysurowice anty-IgM (kozie)	≤3,5%
	Albumina surowicy ludzkiej (HSA)	≤1,0%
	Przeciwciało poliklonalne skierowane przeciwko everolimusowi (królik)	<1,0%
	Azydek sodu	≤0,09%
Odczynnik 2	Mikrocząsteczki pokryte everolimusem	<0,6%
	Azydek sodu	≤0,09%
PRE	Miedź (II)	≤6,4%
	Azydek sodu	≤0,09%

Postępowanie z odczynnikami i warunki ich przechowywania

- Odczynnik 1, Odczynnik 2 i **PRE** — gotowe do użycia.
- Przed użyciem należy kilkakrotnie odwrócić, nie dopuszczając do wytworzenia się pęcherzyków.
- Jeśli we wkładzie zawierającym odczynnik znajdują się pęcherzyki powietrza, należy je usunąć, używając nowego aplikatora. Ewentualnie można pozostawić odczynnik w zalecanej temperaturze i odczekać aż pęcherzyki znikną. Aby ograniczyć do minimum ilość utraconego płynu, do usuwania pęcherzyków powietrza nie należy używać pipety jednomiarowej.
- W przypadku opróżnienia wkładu zawierającego odczynnik Odczynnik 1 lub Odczynnik 2 należy wymienić obydwa wkłady, a następnie sprawdzić kalibrację, używając co najmniej dwóch poziomów materiałów kontrolnych zgodnie z obowiązującymi w laboratorium zasadami dotyczącymi kontroli jakości. Jeśli uzyskane wyniki nie mieszczą się w wymaganym zakresie, konieczne jest przeprowadzenie ponownej kalibracji.
- Informacje na temat okresu trwałości odczynników używanych w analizatorze oraz inne informacje dotyczące systemu można znaleźć na karcie Parametry systemu analitycznego.
- W razie przypadkowego rozlania należy posprzątać i zutylizować materiał zgodnie ze standardową procedurą operacyjną obowiązującą w danym laboratorium oraz lokalnymi przepisami.
- W przypadku otrzymania uszkodzonego opakowania należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem pomocy technicznej (dane kontaktowe znajdują się na odwrocie niniejszej ulotki dołączonej do opakowania).

⚠ **PRZESTROGA:** Obecne w odczynniku pęcherzyki powietrza mogą uniemożliwić prawidłowe wykrycie poziomu odczynnika znajdującego się we wkładzie i powodować niewystarczające zasysanie, co z kolei może być przyczyną uzyskania nieprawidłowych wyników.

2°C 8°C Zamknięty fabrycznie produkt zachowuje trwałość do daty ważności określonej na opakowaniu, jeśli jest przechowywany w temperaturze od 2 °C do 8 °C.

Nie wolno zamrażać odczynników ani wystawiać ich na działanie temperatur przekraczających 32 °C.

Światło może wpływać na trwałość odczynnika Odczynnik 2 Odczynniki należy przechowywać w ciemnym miejscu.

⚠ Ostrzeżenia i przestrogi

Do stosowania w diagnostyce in vitro. Nie należy mieszać materiałów o różnych numerach partii. Do przeprowadzenia testu nie należy używać niepełnych próbek. Podwyższona ilość antykoagulantu może być przyczyną uzyskania błędnych wyników.

PRZESTROGA: Niniejszy produkt zawiera materiał źródłowy pozyskany od człowieka i/lub potencjalnie zakaźny. Składniki pozyskiwane z ludzkiej krwi zostały przebadane metodami zatwierdzonymi przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, Food and Drug Administration). Wykazano brak reaktywności dla antygenu HBsAg oraz przeciwciał przeciwko wirusom HIV 1/2 i HCV. Żadna metoda testu nie może dać całkowitej pewności, że produkty uzyskane z materiału ludzkiego lub nieaktywnych mikroorganizmów nie przenoszą infekcji. Dlatego zaleca się traktować produkty uzyskane z materiału ludzkiego jako potencjalnie zakaźne. Podczas stosowania ich należy przestrzegać odpowiednich praktyk w zakresie zapewniania bezpieczeństwa biologicznego.

NIEBEZPIECZEŃSTWO: QMS Everolimus Odczynnik 1 zawiera ≤3,5% antysurowicy anty-IgM (kozie) i ≤1,0% króliczych przeciwciał poliklonalnych.
H317 - Może powodować reakcję alergiczną skóry.
H334 - Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.

Unikać wdychania mgły lub par. Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wynosić poza miejsce pracy. Stosować rękawice ochronne/ochronę oczu/ochronę twarzy. W przypadku niedostatecznej wentylacji stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. W przypadku kontaktu ze skórą: Umyć dużą ilością wody z mydłem. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: W przypadku trudności z oddychaniem, wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie. W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: Skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem. Wyprać zanieczyszczoną odzież przed ponownym użyciem. Zawartość/pojemnik usuwać zgodnie z przepisami lokalnymi/regionalnymi/krajowymi/międzynarodowymi.

OSTRZEŻENIE: QMS Everolimus REF zawiera ≤6,4% siarczanu miedzi (II) i ≤0,09% azydku sodu.
H400 - Działa bardzo toskycznie na organizmy wodne.
H410 - Działa bardzo toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

Należy unikać uwalniania do środowiska. Zebrać wyciek. Zawartość/pojemnik usuwać zgodnie z przepisami lokalnymi/regionalnymi/krajowymi/międzynarodowymi.

Odczynniki stanowiące składniki testu zawierają azydek sodu w stężeniu ≤0,09%. Należy unikać kontaktu ze skórą i błonami śluzowymi. Dodatkowe środki ostrożności, instrukcje dotyczące obchodzenia się z odczynnikami i postępowanie w razie przypadkowego narażenia opisano w karcie charakterystyki.

Pobieranie próbek i postępowanie z nimi

Do przeprowadzenia testu QMS Everolimus można używać następujących probówek:

	Szklane	Plastikowe
Probówki do pobierania krwi pełnej	EDTA (K_3)	EDTA (K_2)

Nie potwierdzono użyteczności innych probówek do pobierania próbek do przeprowadzenia testu QMS Everolimus. W przypadku wszystkich rodzajów probówek należy przestrzegać instrukcji dostarczonych przez producenta.

Użycie niepełnych próbek do przeprowadzenia testu może dać błędne wyniki. Próbki można przechowywać maksymalnie przez trzy dni w temperaturze od 2 °C do 8 °C. Jeśli test ma być przeprowadzony po upływie 3 dni, należy przechowywać próbki w zamrażarce (-20 ± 5 °C) przez maksymalnie 28 dni. Światło może mieć wpływ na trwałość próbek. Należy przechowywać je w ciemnym miejscu. Próbki przeznaczone do przeprowadzenia testu QMS Everolimus należy pobrać bezpośrednio przed podaniem dawki (poziom minimalny), aby upewnić się, że została przepisana odpowiednia dawka. Najniższe stężenie pozwala uzyskać najbardziej odpowiednie informacje na temat terapeutycznego poziomu leku[2].

Procedura

Procedura ekstrakcji próbek, kalibratorów i materiałów kontrolnych

Ekstrakty należy wykorzystać bezpośrednio po ekstrakcji.

1. Przygotować probówki Eppendorfa do ekstrakcji próbek, kalibratorów i materiałów kontrolnych.
2. Przed ekstrakcją upewnić się, że kalibratory, materiały kontrolne i próbki są całkowicie rozmrożone i mają temperaturę pokojową. Starannie wymieszać próbki, kalibratory i materiały kontrolne, odwracając pojemniki.
3. Odmierzyć pipetą dokładnie 300 µl każdego kalibratora, materiału kontrolnego lub próbki do odpowiedniej probówki Eppendorfa w celu przeprowadzenia oznaczenia.
4. Odmierzyć dokładnie 350 µl metanolu do każdej probówki Eppendorfa.
5. Do każdej probówki Eppendorfa odmierzyć pipetą dokładnie 50 µl odczynnika strącającego w celu przeprowadzenia testu QMS Everolimus.
6. Natychmiast zatkać korkiem każdą probówkę Eppendorfa, aby nie dopuścić do parowania płynu, a następnie energicznie wymieszać/odwirować probówkę z maksymalną prędkością przez co najmniej 35 sekund. Uwaga: aby upewnić się, że zawartość probówki jest dobrze wymieszana, może być konieczne jej odwrócenie i ponowne wymieszanie. Po wymieszaniu kolor próbki powinien zmienić się z czerwonego na brązowy.
7. Umieścić probówki w mikrowirówce i wirować przez co najmniej 8 minut z prędkością 13 400 x g.
8. Po odwirowaniu przelać supernatant do odpowiednich pojemników na próbki. Nie przelewać cząstek stałych ani spienionej cieczy. Umieścić pojemniki w urządzeniu.
9. Uruchomić natychmiast kalibrację analizatora lub proces oznaczania, aby do minimum ograniczyć parowanie próbki.
10. Po zakończeniu analizy wylać ekstrakty. Aby powtórzyć test, należy ponownie wykonać ekstrakcję.

Wykorzystanie kodu paskowego

Na etykietach odczynników znajduje się dedykowany systemowy kod paskowy, który większość analizatorów zignoruje w przypadku nierozpoznania. Jeśli analizator zwróci kod błędu, na kodzie paskowym należy umieścić taśmę w jednolitym kolorze. Jeśli potrzebna jest pomoc, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej.

Procedura wykonania testu

Test wykonuje się przy długości fali 700 nm. Szczegółowy opis przeprowadzenia i skalibrowania testu zawiera podręcznik obsługi urządzenia.

Procedura rozcieńczania próbek

Używając kalibratora QMS Everolimus CAL A (0,0 ng/ml), ręcznie rozcieńczyć próbki będące poza zakresem liniowości testu.

Protokół ręcznego rozcieńczania

Ręczne rozcieńczanie można przeprowadzić w przypadku próbek, w których stwierdzono stężenie ewerolimusu o wartości powyżej 20 ng/ml. Należy sporządzić roztwór próbki z kalibratorem QMS Everolimus CAL A (0,0 ng/ml) 1:1 przed przeprowadzeniem ekstrakcji próbki. Rozcieńczenie ma na celu uzyskanie wyników wyższych niż czułość testu (1,5 ng/ml). Aby otrzymać ostateczną wartość stężenia, uzyskaną wartość stężenia należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia ręcznego.

$$\text{Ostateczne stężenie ewerolimusu w próbce} = \text{Wykazane stężenie} \times \text{Współczynnik ręcznego rozcieńczenia}$$

$$\text{Współczynnik ręcznego rozcieńczenia} = \frac{\text{(Objętość próbki + Objętość kalibratora CAL A)}}{\text{Objętość próbki}}$$

Kalibracja

Test QMS Everolimus należy skalibrować, używając pełnej (6-punktowej) procedury kalibracji. Aby przeprowadzić pełną kalibrację, należy dwukrotnie przetestować kalibratory QMS Everolimus A,B,C,D,E. Kalibracja jest konieczna w przypadku każdego nowego numeru partii. Zweryfikować krzywą kalibracji, używając co najmniej dwóch poziomów materiałów kontrolnych zgodnie z obowiązującymi w laboratorium zasadami dotyczącymi kontroli jakości. Jeśli uzyskane wyniki nie mieszczą się w wymaganym zakresie, konieczne jest wykonanie procedury korygującej.

Uwaga: Everolimus CAL A jest kalibratorem próby ślepej dla omawianego testu.

Kontrola jakości

Dodatkowe wymagania i opis ewentualnych działań korekcyjnych mogą znajdować się w standardowej procedurze operacyjnej i/lub planach zapewnienia jakości sporządzonych dla laboratorium. Wszystkie wymogi z zakresu kontroli jakości muszą być zgodne z obowiązującymi na danym terenie przepisami lub wymogami, po spełnieniu których laboratorium otrzymało akredytację. Każde laboratorium powinno zdefiniować własne zakresy kontrolne oraz częstotliwość przeprowadzania kalibracji.

Zalecenia dotyczące materiałów kontrolnych dla testu QMS Everolimus:

- Należy używać przynajmniej dwóch poziomów materiałów kontrolnych w zakresie zalecanego stężenia tak często, jak to konieczne w celu kontrolowania partii zawierających ekstrakty.
- Jeśli konieczne jest częstsze monitorowanie materiałów kontrolnych, należy przestrzegać procedur kontroli jakości obowiązujących w laboratorium.
- Jeśli wyniki przeprowadzonej kontroli jakości nie mieszczą się w zdefiniowanym zakresie, można podejrzewać nieprawidłowe wyniki pacjenta. W takiej sytuacji należy podjąć działania korekcyjne.

Wyniki

Wyniki testu QMS Everolimus są podawane w ng/ml.

Podobnie jak ma to miejsce w przypadku oznaczania wszystkich analitów, wartość ewerolimusu należy łączyć z informacjami uzyskanymi w wyniku przeprowadzonej oceny klinicznej i innych procedur diagnostycznych.

Wyniki — kody błędów

Niektóre wyniki mogą zawierać kody błędów. Opisy kodów można znaleźć w podręczniku dotyczącym określonego urządzenia.

Ograniczenia przeprowadzanej procedury

Test QMS Everolimus zaprojektowano w celu dokładnego oszacowania odzysku z próbek klinicznych pobranych od pacjentów, a nie sztucznych próbek o znanym stężeniu analitu.

Wraz z testem QMS Everolimus należy używać wyłącznie kalibratorów i materiałów kontrolnych QMS Everolimus. Nie jest możliwe szczegółowe określenie stężenia ewerolimusu, jeśli podczas kalibracji testu QMS Everoilmus nie zastosowano zestawu kalibratorów QMS Everolimus REF (0373860).

Nie należy wykonywać testu u pacjentów, którzy niedawno przyjmowali sirolimus (do momentu całkowitego wydalenia sirolimusu i jego metabolitów), ponieważ spowoduje to wystąpienie reakcji krzyżowej z sirolimusem i jego metabolitami.

W ogólnej populacji występuje niewielka ilość przeciwciał heterofilnych. W rzadkich przypadkach próbki pobrane od pacjentów mogą zawierać przeciwciała heterofilne. Mogą one powodować samoistną aglutynację odczynnika zawierającego mikrocząsteczki, dając błędnie niskie wyniki, które nie są wykrywane.

Na potrzeby diagnostyki wyniki testów należy zawsze analizować w połączeniu z historią medyczną pacjenta, wynikami badań klinicznych oraz innymi posiadanymi informacjami.

Więcej informacji można znaleźć w częściach Pobieranie próbek i postępowanie z nimi oraz Szczegółowa charakterystyka działania w niniejszej ulotce informacyjnej.

Oczekiwane wartości

Ogólny terapeutyczny zakres stężenia ewerolimusu we krwi pełnej wynosi 3–8 ng/ml. Stan kliniczny pacjenta, indywidualne różnice we wrażliwości na działanie immunosupresyjne i nefrotoksyczność ewerolimusu, przyjmowanie innych immunosupresantów, rodzaj przeszczepu, czas, jaki upłynął od operacji przeszczepu, a także szereg innych czynników wpływają na zróżnicowanie wymogów w zakresie optymalnego stężenia ewerolimusu we krwi. Dlatego nie można kierować się jedynie wartościami stężenia ewerolimusu jako jedynego wskaźnika sugerującego konieczność zmiany leczenia. Wymagane jest przeprowadzenie szczegółowej oceny stanu każdego pacjenta przed wprowadzeniem zmian w leczeniu. Każdy użytkownik testu musi zdefiniować wymagane zakresy na podstawie swojego doświadczenia klinicznego. Zakresy stężeń terapeutycznych różnią się w zależności od użytej metody, dlatego należy ustalać je oddzielnie dla każdej z nich. Wartości uzyskanych w wyniku zastosowania różnych metod nie można używać zamiennie ze względu na różnice pomiędzy metodami, a także występowanie reakcji krzyżowych z metabolitami. Nie należy stosować także współczynników korekcji. Dlatego zaleca się konsekwentne korzystanie z jednej metody oznaczania dla każdego pacjenta. Optymalną dawkę należy ustalać na podstawie więcej niż jednej próbki o najniższym stężeniu leku.

Szczegółowa charakterystyka działania

Poniżej przedstawiono reprezentatywne wyniki działania uzyskane na ogólnodostępnym automatycznym analizatorze chemicznym na potrzeby kliniczne wykorzystującym turbidimetryczną analizę ilościową.

Zrzeczenie się odpowiedzialności: Nie wszystkie populacje pacjentów poddanych przeszczepowi organów zostały zatwierdzone we wszystkich krajach objętych regulacjami. Informacje na temat zastosowań w poszczególnych krajach zawiera tabela w sekcji Przeznaczenie.

Czułość

Dolną granicę oznaczeń (LOQ) dla testu QMS Everolimus zdefiniowano jako najniższe stężenie, dla którego stwierdzono akceptowalną dokładność pomiędzy testami oraz odzysk (często o współczynniku zmienności ≤20% i odzysku ±15%). Przyjęto wartość LOQ 1,3 ng/ml.

Zakres wyników uzyskiwanych przy użyciu testu
Uzyskiwany zakres wynosi od 1,5 do 20 ng/ml.

Dokładność
Przeprowadzono badania liniowości wyników pomiarowych, rozcieńczając próbkę pobraną od pacjenta zawierającą wysokie stężenie analitu do wartości mieszczących się w zakresie testowym. Rozcieńczeniu poddawano hemolizat krwi pełnej. Liniowość dla wybranych rozcieńczeń uznawano za akceptowalną, jeśli procentowa wartość odzysku wynosiła 100 ± 10.

Liniowość

Stężenie teoretyczne (ng/ml)	Średnia z 12 powtórzeń	Współczynnik zmienności (CV) (%)	Odzysk (%)
0,00	0,33	-	0,00
1,12	1,29	17,28	114,70
2,23	2,36	8,36	105,17
4,46	4,34	5,25	96,53
6,70	6,24	3,03	92,51
8,93	8,60	2,55	95,64
11,16	11,14	3,72	99,11
13,39	13,21	2,63	97,94
15,63	15,85	3,17	100,72
17,86	17,88	6,73	99,42
20,09	19,88	3,83	98,24
22,48	22,32	7,82	99,30

Porównanie metod
Przeprowadzono badanie korelacyjne 150 próbek od pacjentów, u których dokonano przeszczepu nerek. Wyniki testów QMS Everolimus porównano z wynikami uzyskanymi w wyniku przeprowadzenia chromatografii cieczowej i spektrometrii mas. Poniżej przedstawiono wyniki analizy w oparciu o metodę regresji Passing-Bablok[9].

Nachylenie krzywej	1,11
Przesunięcia na osi Y	-0,005
Współczynnik korelacji (R)	0,96
Liczba próbek	150

Przeprowadzono drugie badanie korelacyjne 41 próbek od pacjentów, u których dokonano przeszczepu serca. Wyniki testów QMS Everolimus porównano z wynikami uzyskanymi w wyniku przeprowadzenia chromatografii cieczowej i spektrometrii mas. Poniżej przedstawiono wyniki analizy w oparciu o metodę regresji Passing-Bablok.

Nachylenie krzywej	1,00
Przesunięcia na osi Y	-0,15
Współczynnik korelacji (R)	0,96
Liczba próbek	41

Przeprowadzono trzecie badanie korelacyjne 111 próbek od pacjentów, u których dokonano przeszczepu wątroby. Wyniki testów QMS Everolimus porównano z wynikami uzyskanymi w wyniku przeprowadzenia chromatografii cieczowej i spektrometrii mas. Poniżej przedstawiono wyniki analizy w oparciu o metodę regresji Passing-Bablok.

Nachylenie krzywej	0,98
Przesunięcia na osi Y	-0,06
Współczynnik korelacji (R)	0,93
Liczba próbek	111

Dokładność
Dokładność oszacowano w sposób opisany w protokole NCCLS EP5-A2.[10]

Na potrzeby badania wykorzystano trzypoziomowy materiał kontrolny na bazie krwi ludzkiej zawierający ewerolimus oraz trzypoziomową pulę próbek pobranych od pacjentów. Każdy poziom testowano dwukrotnie w ciągu dnia (po 2 próby) przez okres 20 dni. Odstęp pomiędzy poszczególnymi testami wykonywanymi w jednym dniu wynosił co najmniej 2 godziny. Obliczono średnie, a także standardowe odchylenie i współczynnik zmienności (%) pomiędzy kolejnymi dniami, w ramach pojedynczego testu oraz całkowite. Poniżej przedstawiono reprezentatywne wyniki.

			W ramach testu		Pomiędzy poszczególnymi dniami		Całkowite	
Materiał kontrolny	N	Średnie (ng/ml)	SD (odchylenie standardowe)	Współczynnik zmienności (CV) (%)	SD	Współczynnik zmienności (CV) (%)	SD	Współczynnik zmienności (CV) (%)
1	80	3,93	0,13	3,21	0,22	5,65	0,28	7,19
2	80	8,20	0,25	3,01	0,33	4,05	0,51	6,16
3	80	14,90	0,83	5,57	0,68	4,55	1,11	7,47
Pule próbek pacjentów								
1	80	3,87	0,28	7,31	0,18	4,59	0,37	9,45
2	80	8,73	0,18	2,11	0,46	5,24	0,64	7,27
3	80	12,07	0,43	3,59	0,32	2,67	0,80	6,62

Substancje wpływające na wynik testu
Specyficzność
Badania wpływu substancji na wynik testu przeprowadzono zgodnie z protokołem NCCLS EP7-A.[11,12] Reakcje krzyżowe przebadano dla najważniejszych dostępnych metabolitów ewerolimusu. Przebadano również inne leki rutynowo przepisywane wraz z ewerolimusem i substancjami endogenicznymi w celu ustalenia, czy te związki chemiczne mają wpływ na kwantyfikację stężeń ewerolimusu przy użyciu testu QMS Everolimus.

Metabolity
Przeprowadzono badania w celu przeanalizowania reakcji krzyżowych pomiędzy antysurowicą w teście QMS Everolimus z najważniejszymi metabolitami ewerolimusu. Testowane związki chemiczne dodawano w dwóch stężeniach do hemolizatu krwi ludzkiej zawierającego 5 ng/ml ewerolimusu i przeprowadzano oznaczenia przy użyciu testu QMS Everolimus. Następnie obliczano procentową wartość reaktywności krzyżowej. Poniżej przedstawiono wyniki badań:

Testowany związek chemiczny	Stężenie testowane (ng/ml)	Odzysk — stężenie (ng/ml)	% wartość reaktywności krzyżowej
RAD SA	5	6,08	7
RAD SA	20	6,07	2
RAD PSA	5	6,33	12
RAD PSA	20	9,00	16
RAD PC	5	8,86	63
RAD PC	20	17,61	59
45/46 OH RAD	5	5,82	NW
45/46 OH RAD	20	6,13	2
24 OH RAD	5	6,23	9
24 OH RAD	20	6,81	5
25 OH RAD	5	6,56	15
25 OH RAD	20	10,24	22

NW = nie wykryto

Ponadto przeprowadzono badania w celu przeanalizowania reakcji krzyżowych pomiędzy antyserum obecnym w teście QMS Everolimus z sirolimusem i jego najważniejszymi metabolitami. Testowane związki chemiczne dodawano do hemolizatu krwi ludzkiej zawierającego 5,5 ng/ml ewerolimusu i przeprowadzano oznaczenia przy użyciu testu QMS Everolimus. Następnie obliczano procentową wartość reaktywności krzyżowej. Poniżej przedstawiono wyniki badań.

Sirolimus i jego metabolity			
Testowany związek chemiczny	Testowane stężenie (ng/ml)	Stężenie odzysku (ng/ml)	% wartość reaktywności krzyżowej
Sirolimus	10	9,94	46
Trihydroxy-sirolimus; 7,41-O-didesmethyl sirolimus	90	9,34	4
41-O-desmethyl-hydroxy sirolimus	90	8,55	3
41-O-desmethyl-hydroxy sirolimus; 7-O-desmethyl sirolimus	90	7,29	2
11-hydroxy sirolimus	90	16,43	12
11-hydroxy sirolimus — izomer	90	11,00	6
Hydroxy sirolimus	90	6,96	2
N-tlenkowy sirolimus	90	12,10	7
Hydroxyl sirolimus lub N-tlenkowy sirolimus — izomer	90	6,71	1
41-O-desmethyl sirolimus; 32-O-desmethyl sirolimus	30	18,32	45

Substancje endogeniczne

Poniższe związki chemiczne oznaczane przy użyciu testu QMS Everolimus we wskazanych stężeniach powodowały błąd wykrywanej wartości ewerolimusu poniżej 10%. Poniżej przedstawiono wyniki badań.

Substancja wpływająca na wynik testu	Stężenie substancji wpływającej na wynik testu	N	Ewerolimus (ng/ml)	Odzysk (%)
Bilirubina	60 mg/dL	10	4,45	95,86
Cholesterol	347 mg/dL	3	4,22	101,10
Kreatynina	5 mg/dL	3	5,40	99,60
Gamma-globulina	12 g/dL	3	4,06	92,86
HAMA typ 1*	Normalny poziom w organizmie ludzkim	3	4,22	102,92
HAMA typ 2*	Normalny poziom w organizmie ludzkim	3	4,22	95,02
Hematokryt	60%	10	4,18	101,89
Czynnik reumatoidalny	1 350 IU	3	4,22	101,42
Całkowita zawartość białka	12 g/dL	3	4,06	105,17
Trójglicerydy	1 500 mg/dL	3	4,22	100,60
Kwas moczowy	40 mg/dL	3	4,22	99,53

*HAMA = ludzkie przeciwciała przeciwko antygenom mysim

Reaktywność krzyżowa leku

Przebadano reaktywność krzyżową z lekami rutynowo przepisywanymi wraz z ewerolimusem. Związki wchodzące w reakcje krzyżowe przeanalizowano po dodaniu ich do hemolizatu o znanej zawartości ewerolimusu (5–6 ng/ml). Przetestowano następujące związki chemiczne.

Związek chemiczny	Stężenie poddane testom (µg/ml)	% wartość reaktywności krzyżowej
Paracetamol	200	NW
N-Acetylprocainamid	120	NW
Acyclovir	1 000	0,0
Albuterol	0,18	NW
Allopurinol	60	NW
Amikacin	150	0,0
Amfoterycyna B	100	0,0
Kwas askorbinowy	30	NW
Atenolol	40	NW
Azothioprene	10	NW
Bactrim (5:1 Sulfametoksazol: Trimetoprim)	525 Sulfamethoksazol 45 Trimetoprim	0,0
Kofeina	100	NW
Kaptopryl	50	0,0
Karbamazepina	120	0,0
Cefaclor	230	NW
Chloramfenikol	250	NW
Cymetydyna	100	NW
Ciprofloksacyna	250	0,0
Cyklosporyna A	1	NW
Digoksyna	0,01	-2,0
Dizopiramid	30	0,0
Erytromycyna	200	0,0
Etanol	3 500	NW
Flukonazol	75	0,0
Fluorocytozyna	300	0,0
Kwas foliowy	0,01	NW
Furosemid	100	NW
Gancyklowir	1 000	NW
Gemfibrozyl	75	NW
Gentamycyna	20	NW

Tabela — c.d.

Związek chemiczny	Stężenie poddane testom (µg/ml)	% wartość reaktywności krzyżowej
Glipizyd	60	NW
Gliburyd	40	NW
Heparyna	16	0,0
Hydralazyna	32	NW
Hydrochlorotiazyd	40	NW
Ibuprofen	400	NW
Insulina	0,0167	1,0
Intralipid	15 000	NW
Izoniazyd	70	NW
Izoproterenol HCl	0,06	NW
Itrakonazol	17	NW
Kanamycyna A	100	NW
Kanamycyna B	100	NW
Ketokonazol	10	NW
Labetalol	200	NW
Lidokaina	100	NW
Lit	22,2	NW
Lowastatyna	4	0,0
Metformina HCl	5 100	NW
Metycylina	240	NW
Metotreksat	910	NW
Metoklopramid	4	NW
Mizoprostol	0,015	NW
Siarczan morfiny	6	NW
Kwas mykofenolowy	250	NW
Nadolol	333	NW
Naproksen	1 000	0,0
Niacyna	800	NW
Nifedypina	120	0,0
Omeprazol	14	NW
Pantoprazol sodu	15	0,0
Penicylina G	100	0,0
Fenobarbital	150	NW
Fenytoina	100	0,0
Piperacylina	8	NW
Prazosyna	25	NW
Prednizon	12	NW
Prednizolon	12	NW
Prymidon	100	0,0
Prokainamid	25	NW
Propanolol	0,5	NW
Chinidyna	100	NW
Ranitydyna	200	NW
Rifampina	50	0,0
Kwas salicylowy	500	NW
Sotrastauryna	40	0,0
Spektynomycyna	100	NW
Sulfametoksazol	400	0,0
Takrolimus	0,04	1,0
Teofilina	250	NW

Tabela — c.d.

Związek chemiczny	Stężenie poddane testom (µg/ml)	% wartość reaktywności krzyżowej
Tobramycyna	20	NW
Triamteren	600	0,0
Trimetoprim	20	NW
Walgancyklowir HCl	36	0,0
Kwas walproinowy	1 000	0,0
Wankomycyna	630	NW
Werapamil	10	NW

NW = nie wykryto. Reaktywność krzyżową uznaje się za niewykrywalną, jeśli różnica między próbką o znanej zawartości substancji a próbą kontrolną jest mniejsza niż odchylenie standardowe dla powtórzeń próby kontrolnej.

Bibliografia

1. Certican (Everolimus) dispersible tablets proposed labeling. Novartis NDA No. 21-561 and 26-628. December 19, 2002.
2. Kovarik JM, Kaplan B, Silva HT, et al. Exposure-response relationships for everolimus in de novo kidney transplantation: defining a therapeutic range. Transplantation 2002;73(6):920-5.
3. Nashan B. The role of Certican (Everolimus, Rad) in the many pathways of chronic rejection. Transplant Proc 2001; 33:3215-20.
4. Holt DW. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs in kidney transplantation. Curr Opin Nephrol Hypertens 2002;11(6):657-63.
5. Kahan BD, Keown P, Levy GA, et al. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. Clin Ther 2002;24(3):330-50.
6. McMahon LM, Luo S, Hayes M, et al. High-throughput analysis of everolimus (RAD001) and cyclosporine A (CsA) in whole blood by liquid chromatography/mass spectrometry using a semi-automated 96-well solid-phase extraction system. Rapid Commun Mass Spectrom 2000;14:1965-71.
7. Brignol N, McMahon LM, Luo S, etal. High-throughput semi-automated 96-well liquid/liquid extraction and liquid chromatography/mass spectrometric analysis of everolimus (RAD001) and cyclosporine A (CsA) in whole blood. Rapid Commun Mass Spectrom 2002;15:1-10.
8. Streit F, Armstrong VW, Oellerich M, et al. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus, and cyclosporine A in whole blood. Clin Chem 2002;48(6):955-8.
9. Bablok W, Passing H, Bender R, Schneider B. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part III J Clin Chem Clin Biochem 1988;26(11):783-90.
10. Tholen DW, Kallner A, Kennedy JW, et al. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-Second Edition (EP5-A2). Wayne, PA: The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004.
11. Powers DM, Boyd JC, Glick MR, et al. Interference Testing in Clinical Chemistry (EP7-A) Villanova, PA. The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1986.
12. McEnroe RJ, Burritt MF, Powers DM, et al. Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline-Second Edition (EP7-A2). Wayne, PA: The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005.

Słowniczek:
http://www.thermofisher.com/symbols-glossary

Microgenics Corporation
46500 Kato Road
Fremont, CA 94538 USA
Pomoc techniczna
i obsługa klienta (USA):
1-800-232-3342

EC REP
B·R·A·H·M·S GmbH
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, Germany

Aktualną wersję ulotki można pobrać z witryny:
www.thermofisher.com/diagnostics

Inne kraje:
Prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielem firmy Thermo Fisher Scientific.

© 2019 Thermo Fisher Scientific Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Certican® jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Novartis®. Wszelkie inne znaki towarowe stanowią własność firmy Thermo Fisher Scientific i jej spółek zależnych.

0160060-3-PL
2024 01

thermo scientific