

Rx Only

REF 10015556

Solo per uso *diagnostico in vitro*

Leggere attentamente questo foglietto illustrativo relativo al sistema Quantitative Microsphere System (QMS) (Sistema quantitativo a microsferine) prima dell'uso. Attenersi rigorosamente alle istruzioni contenute nel foglietto illustrativo. Non è possibile garantire l'attendibilità dei risultati del dosaggio in caso di deviazioni dalle istruzioni contenute nel presente foglietto illustrativo.

USO PREVISTO

L'immunosaggio QMS per il tacrolimus è concepito per la determinazione quantitativa di tacrolimus nel sangue umano intero su analizzatori chimico-clinici automatizzati. I risultati ottenuti vengono utilizzati come ausilio nella gestione di pazienti sottoposti a trapianto di rene, fegato e cuore in terapia con tacrolimus. Questo dispositivo diagnostico *in vitro* è concepito esclusivamente per l'uso nei laboratori clinici.

RIEPILOGO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il tacrolimus (FK506, PROGRAF[®]) è un antibiotico macrolide di origine fungina, *Streptomyces tsukubaensis*, con una potente funzione immunosoppressiva, prescritto per i pazienti sottoposti a trapianto di rene e fegato.¹ Il tacrolimus è un inibitore della calcineurina, una proteina con attività fosfataseica che attiva la proliferazione delle cellule T.²⁻⁴ Negli eventi cellulari, il tacrolimus si unisce a una famiglia di proteine leganti denominate FKBP (proteine leganti FK506) e forma un complesso pentamerico che comprende tacrolimus, FKBP, calcineurina A e B e calmodulina.²⁻⁵ La formazione pentamerica determina l'inibizione dell'attività fosfataseica della calcineurina, necessaria per attivare i fattori trascrizionali per il trasporto nel nucleo delle cellule. Quindi, l'espressione dei geni dei linfociti T è compromessa soprattutto per le citochine quali IL-2 e provoca un effetto immunosoppressivo nei pazienti.²⁻⁵

La distribuzione di tacrolimus tra sangue intero e plasma dipende da diversi fattori, quali ematocrito, concentrazione di farmaco e concentrazione proteica nel plasma. Il rapporto di concentrazione sangue intero-plasma si attesta mediamente su 35 (intervallo compreso tra 12 e 67).⁶⁻⁷ Il tacrolimus viene ampiamente metabolizzato dal sistema del citocromo P-450, principalmente CYP3A.⁸⁻¹¹ Il farmaco viene metabolizzato in almeno 8 metaboliti (M-I - M-VIII) tramite dimetilazione e idrossilazione.¹² L'emivita media del tacrolimus in vivo è stimata in 48 ore.^{8,11} È stata anche segnalata una grande variabilità intra-paziente nonché una variabilità inter-paziente nelle concentrazioni di tacrolimus nel sangue intero.¹³ Si consiglia di monitorare il tacrolimus attentamente e con frequenza.¹⁴

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

L'immunosaggio QMS Tacrolimus è un dosaggio immunoturbidimetrico a particelle omogenee. Il dosaggio si basa sulla competizione tra il farmaco presente nel campione e il farmaco presente nel rivestimento di microparticelle per i siti di legame anticorporeale dell'agente contenente l'anticorpo anti-tacrolimus. Il reagente contenente le microparticelle rivestite di tacrolimus viene rapidamente agglutinato in presenza del reagente contenente l'anticorpo anti-tacrolimus e in assenza di farmaci antagonisti nel campione. La velocità della variazione di assorbanza viene misurata tramite fotometria a 700 nm. Quando viene aggiunto un campione contenente tacrolimus, la reazione di agglutinazione risulta parzialmente inibita, rallentando la velocità della variazione di assorbanza. È possibile ottenere una classica curva di inibizione dell'agglutinazione concentrazione-dipendente con tasso massimo di agglutinazione alla concentrazione minima di tacrolimus e tasso minimo di agglutinazione alla concentrazione massima di tacrolimus.

REAGENTI

Kit reagenti

QMS Tacrolimus, **REF** 10015556, è fornito come kit composto da tre reagenti allo stato liquido pronti per l'uso, che contiene:

REAGENT 1 1 x 18 ml

REAGENT 2 1 x 12 ml

EXT Reagente di estrazione 1 x 50 ml (soluzione operativa richiesta, vedere p. 2, Preparazione della soluzione di estrazione)

Ingredienti reattivi

INGRED	Ingrediente	Concentrazione
REAGENT 1	Anticorpo monoclonale anti-tacrolimus (coniglio)	< 1,0%
	Sodio azide	0,09%
REAGENT 2	Microparticelle rivestite di tacrolimus	< 0,3%
	Sodio azide	0,09%
EXT	Sodio azide	0,09%

MANIPOLAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

- **REAGENT 1**, **REAGENT 2** e **EXT** (Reagente di estrazione) sono pronti per l'uso.
- Prima dell'uso, capovolgere più volte evitando la formazione di bollicine.

- Se presenti nella cartuccia reagenti, rimuovere le bollicine d'aria. In alternativa, lasciare riposare il reagente alla temperatura di conservazione corretta in modo da consentire la dissipazione delle bollicine. Per ridurre al minimo lo spreco di volume, non usare una pipetta di trasferimento per rimuovere le bollicine.
- Quando la cartuccia di **REAGENT 1** o **REAGENT 2** si esaurisce, sostituire entrambe le cartucce e verificare la calibrazione con almeno un campione per ogni livello di controlli in base ai requisiti relativi al controllo di qualità stabiliti dal laboratorio. Se i risultati del controllo non rientrano nei limiti dell'intervallo di accettabilità, potrebbe essere necessario eseguire nuovamente la calibrazione.
- Per informazioni specifiche sul sistema, consultare la scheda dei parametri del sistema di analisi specifico dell'analizzatore.
- In caso di fuoriuscite accidentali, pulire e smaltire il materiale in conformità alle SOP del laboratorio e alle normative vigenti.
- Se la confezione arriva danneggiata, contattare il rappresentante locale dell'assistenza tecnica (fare riferimento al retro di questo foglietto illustrativo).

⚠ ATTENZIONE: eventuali bollicine nel reagente possono interferire con il corretto rilevamento del livello di reagente nella cartuccia, provocando l'aspirazione di una quantità di reagente insufficiente con un possibile effetto negativo sui risultati. Se conservati a una temperatura compresa fra 2 e 8 °C, i reagenti non aperti rimangono stabili fino alla data di scadenza indicata.

Non congelare i reagenti né esporli a temperature superiori a 32 °C.

⚠ AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Solo per uso diagnostico *in vitro*. Osservare le normali precauzioni per la manipolazione di tutti i reagenti di laboratorio.
- Non mescolare materiali provenienti da kit con numeri di lotto diversi.
- Non utilizzare i kit reagenti dopo la data di scadenza.

PERICOLO: L'immunosaggio QMS Tacrolimus contiene ≤3,0% di albumina sierica umana (HSA) e ≤1,0% di anticorpi farmaco-specifici (coniglio).

Il reagente di estrazione del QMS Tacrolimus contiene ≤9,0% di solfato di zinco (ZnSO₄).

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

H334 - Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.

H318 - Provoca gravi lesioni oculari.

H411 - Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

Evitare di respirare la polvere o i vapori. Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro. Indossare guanti protettivi/Proteggere gli occhi/ il viso. In caso di ventilazione insufficiente utilizzare un apparecchio respiratorio. In caso di contatto con la pelle: lavare abbondantemente con acqua e sapone. **IN CASO DI INALAZIONE:** se la respirazione è difficile, trasportare l'fortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente. Smaltire il prodotto/recipiente nelle apposite aree in conformità alla regolamentazione locale/regionale/nazionale/internazionale.

Non disperdere nell'ambiente. Indossare guanti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. **IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI:** sciacquare accuratamente con acqua per molti minuti. Se si indossano lenti a contatto di facile rimozione, toglierle. Continuare a risciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Raccogliere eventuali perdite. Smaltire il prodotto/recipiente nelle apposite aree in conformità alla regolamentazione locale/regionale/nazionale/internazionale.

⚠ ATTENZIONE: i materiali di origine umana sono stati testati per l'HIV1 e 2, i virus dell'epatite B e dell'epatite C mediante un metodo approvato dalla FDA con risultati negativi. Tuttavia, dal momento che nessun test può escludere completamente il rischio potenziale di infezione con assoluta certezza, il materiale deve essere trattato con la stessa attenzione dovuta al campione di un paziente. In caso di esposizione, seguire le direttive delle autorità sanitarie competenti.

I reagenti utilizzati nei componenti del dosaggio contengono una quantità inferiore o uguale allo 0,9% di sodio azide. Evitare il contatto con la pelle e con le membrane mucose. Per ulteriori precauzioni, istruzioni relative alla manipolazione e informazioni sul trattamento in caso di esposizione accidentale, fare riferimento alla scheda di sicurezza.

PRELIEVO E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

- Utilizzare solo campioni di sangue intero prelevati con provette EDTA. Per tutte le provette per il prelievo dei campioni, attenersi alle istruzioni per il trattamento fornite dai rispettivi produttori. Prestare attenzione a salvaguardare l'integrità del campione dal momento del prelievo fino all'esecuzione dell'analisi. I campioni devono essere etichettati con l'ora e la data sia del prelievo del sangue che dell'ultima somministrazione del farmaco.
- I campioni devono essere conservati in fiale chiuse e analizzati entro 7 giorni, se conservati a 2-8 °C, o entro 6 mesi, se conservati a una temperatura ≤ -20 °C.^{5,10-11} Evitare di congelare e scongelare ripetutamente i campioni. Evitare che si formi schiuma nei campioni.

PROCEDURA

Materiali forniti

- Kit reagenti QMS Tacrolimus, [REF] 10015556

Materiali necessari ma non forniti

- Calibratori QMS Tacrolimus, [REF] 10015573, CAL A: 1 x 4 ml, CAL B-F: 1 x 2 ml ciascuno
- Prodotti per il controllo di qualità
 - Materiali consigliati:
 - Controlli Rap/Tac/CsA MORE Diagnostics, BASSO, 280-Q: 4 x 4 ml ciascuno
 - MEDIO, 280-1: 4 x 4 ml ciascuno
 - ALTO, 280-2: 4 x 4 ml ciascuno
 - Per gli altri prodotti per il controllo di qualità disponibili, chiamare l'assistenza tecnica di Thermo Fisher Scientific
- Metanolo di grado HPLC (purezza ≥ 99,8%)
- Provette con fondo arrotondato per microcentrifuga
- Analizzatore chimico-clinico automatizzato

Preparazione dei campioni

Nota: per i controlli, attenersi alle istruzioni e alle raccomandazioni di manipolazione specifiche del fornitore eventualmente riportate sul foglietto illustrativo.

Prima dell'estrazione, consentire ai calibratori e ai campioni prelevati dai pazienti di equilibrarsi a temperatura ambiente. I calibratori devono essere mescolati per almeno 15-20 minuti e i campioni prelevati dai pazienti devono essere mescolati a fondo a temperatura ambiente prima dell'uso. Mescolare bene i calibratori e i campioni prelevati dai pazienti capovolgendoli delicatamente (meglio se con un agitatore meccanico). Evitare la formazione di bollicine.

Preparazione della soluzione di estrazione

1. Aggiungere esattamente 10 ml di reagente di estrazione a temperatura ambiente in un flacone pulito, asciutto e chiuso ermeticamente.
2. Aggiungere esattamente 40 ml di metanolo di grado HPLC con purezza ≥ 99,8% nel flacone e mescolare con delicatezza. Etichettare il tutto come "Soluzione di estrazione operativa per tacrolimus". Annotare la data attuale e la data di scadenza (2 settimane dalla data di produzione) sull'etichetta. Conservare a temperatura ambiente.

Procedura di estrazione di campioni, calibratori e controlli

PER OTTENERE RISULTATI OTTIMALI, SEGUIRE PASSO PER PASSO LE ISTRUZIONI RIPORTATE DI SEGUITO. GLI ESTRATTI DEVONO ESSERE SOTTOPOSTI AD ANALISI SUBITO DOPO L'ESTRAZIONE.

1. Preparare ed etichettare le provette con fondo arrotondato per microcentrifuga per l'estrazione dei campioni, dei calibratori e dei controlli. Preparare una provetta per microcentrifuga per ogni campione.
2. Pipettare esattamente 200 µl del campione, del calibratore o del controllo nella provetta per microcentrifuga etichettata. Aspirare il campione con la pipetta, strofinare delicatamente la punta della pipetta sul bordo della provetta del campione per rimuovere il campione in eccesso, quindi erogare il campione nella parete interna della provetta per microcentrifuga.
Nota: controllare la punta della pipetta per assicurarsi che non contenga bollicine d'aria. La presenza di aria nella punta potrebbe compromettere la precisione.
3. Pipettare esattamente 200 µl della soluzione di estrazione nella provetta per microcentrifuga. Quando si preparano più campioni, si consiglia di utilizzare una pipetta a ripetizione per aspirare ed erogare la soluzione di estrazione. Rimuovere le bollicine d'aria dalla punta della pipetta prima di erogare la soluzione di estrazione.
4. Tappare e agitare subito mediante vortex la provetta per microcentrifuga alla velocità massima per 15-30 secondi. Controllare ogni provetta per assicurarsi che la miscela sia omogenea. Se si rileva un campione non mescolato, staccare la parte non mescolata e sottoporla di nuovo ad agitazione mediante vortex.
5. Lasciare riposare la miscela nella provetta per microcentrifuga a temperatura ambiente per 5-7 minuti.
6. Collocare la provetta per microcentrifuga in una centrifuga e centrifugare per 5 minuti a un valore di giri/min equivalente a 15.000 - 16.000 xg.
7. Lasciare decantare il surnatante in una vaschetta per campioni (evitare la formazione di bollicine) e avviare immediatamente la misurazione per ridurre al minimo l'evaporazione del campione. Quando si dà un colpo alla vaschetta per rilasciare l'ultima goccia, fare attenzione a non disturbare il pellet.
8. Dopo l'analisi smaltire gli estratti rimasti. La rianalisi dei campioni richiede estrazioni fresche.

Nota: per ulteriori suggerimenti e consigli sull'estrazione di campioni per l'immunodosaggio QMS Tacrolimus, si può anche contattare l'assistenza tecnica di Thermo Fisher Scientific.

Procedura di dosaggio

Per una descrizione dettagliata delle modalità di esecuzione e di calibrazione del dosaggio, consultare il manuale d'uso specifico dello strumento utilizzato.

Procedura di diluizione dei campioni

Usare il calibratore QMS Tacrolimus A (0,0 ng/ml) per diluire manualmente i campioni che eccedono la linearità del dosaggio.

Protocollo di diluizione manuale

I campioni dei pazienti contenenti concentrazioni di tacrolimus superiori a 30 ng/ml possono essere diluiti manualmente mediante una diluizione 1:1 del campione con il calibratore QMS Tacrolimus A (0,0 ng/ml) prima di eseguirne l'estrazione. La diluizione deve essere eseguita in modo che i risultati del test del campione diluito siano superiori alla soglia di sensibilità del dosaggio pari a 1 ng/ml. Per ottenere la concentrazione finale del campione, la concentrazione refertata deve essere successivamente moltiplicata per il fattore di diluizione manuale.

Concentrazione finale del campione = Concentrazione refertata x Fattore di diluizione manuale

Fattore di diluizione manuale = (Volume del campione + Volume del CAL A) ÷ Volume del campione

CALIBRAZIONE

L'immunodosaggio QMS Tacrolimus deve essere calibrato usando una procedura di calibrazione completa (a 6 punti). Per eseguire una calibrazione completa, analizzare i calibratori QMS Tacrolimus A, B, C, D, E ed F. Con l'immunodosaggio QMS Tacrolimus devono essere utilizzati soltanto calibratori QMS Tacrolimus. Non è possibile ottenere una determinazione quantitativa accurata del tacrolimus se nella calibrazione dell'immunodosaggio QMS Tacrolimus non viene usata la serie di calibratori QMS Tacrolimus [REF] 10015573.

La calibrazione è necessaria per tutti i numeri di lotto nuovi. Verificare la curva di calibrazione con almeno un campione per ogni livello di controlli in base ai requisiti relativi al controllo di qualità stabiliti dal laboratorio. Se i risultati del controllo non rientrano negli intervalli di accettabilità, intraprendere un'azione correttiva.

Frequenza di calibrazione

Si raccomanda di ripetere la calibrazione:

- Dopo ogni cambio del lotto del calibratore o del reagente (kit)
- Dopo la manutenzione mensile degli strumenti
- Se necessario, dopo procedure di controllo di qualità

CONTROLLO DI QUALITÀ

Tutti i requisiti di controllo di qualità devono essere soddisfatti in conformità alle normative vigenti o ai requisiti per l'accreditamento.

Per gli ulteriori requisiti del controllo di qualità e le possibili azioni correttive, consultare le procedure operative standard e/o il programma di garanzia di qualità vigenti nel laboratorio.

Requisiti consigliati per i controlli dell'immunodosaggio QMS Tacrolimus:

- Occorre prelevare almeno un campione per ogni livello di controlli ogni volta che si estraggono e analizzano i campioni dei pazienti.
- Se è necessario effettuare un monitoraggio di controllo più frequente, attenersi alle procedure relative al controllo di qualità del laboratorio.
- Occorre soddisfare tutti i requisiti del controllo di qualità, conformemente alle linee guida locali o nazionali.
- Se i risultati del controllo di qualità non rientrano nell'intervallo di accettabilità definito dal laboratorio, i valori dei pazienti possono non essere affidabili e non devono essere refertati. È necessario intraprendere azioni correttive.

RISULTATI

I risultati dell'immunodosaggio QMS Tacrolimus vengono refertati in ng/ml.

Refertazione dei risultati: i laboratori devono indicare nel referto che i risultati sono stati ottenuti con il metodo QMS Tacrolimus.

Codici di errore dei risultati:

È possibile che alcuni risultati possano riportare codici di errore. Per la descrizione dei codici di errore, consultare il manuale d'uso specifico dello strumento utilizzato.

LIMITI DELLA PROCEDURA

- Le concentrazioni di tacrolimus in un campione specifico determinate con i dosaggi di produttori diversi possono variare a causa dei differenti metodi di dosaggio e della diversa specificità dei reagenti. Si consiglia di eseguire il monitoraggio usando sempre lo stesso tipo di dosaggio.
- **Gli immunodosaggi sono non-specifici e presentano reattività crociata con i metaboliti. Per questo motivo, gli immunodosaggi possono sovrastimare la concentrazione di tacrolimus (vedere la sezione "Confronto tra metodi"). Quando non è possibile eliminare il tacrolimus, si può verificare un maggiore accumulo di metaboliti e, di conseguenza, una maggiore sovrastima. In questi casi è opportuno considerare l'utilizzo di un dosaggio specifico (ad esempio, il metodo cromatografico).**
- Gli anticorpi eterofili interferenti presentano una bassa frequenza nella popolazione. Questi anticorpi possono dare luogo a risultati errati (inclusi risultati erroneamente bassi causati dall'autoagglutinazione del reagente contenente le microparticelle).
- I risultati dell'analisi devono sempre essere valutati nel contesto dell'anamnesi del paziente, degli esiti degli esami e di altri risultati clinici. Quando i risultati sono in contrasto con i dati clinici, si devono eseguire ulteriori analisi per confermarli.

- Consultare il foglietto illustrativo PROGRAF per gli effetti di farmaci somministrati congiuntamente e per i farmaci che possono aumentare o ridurre le concentrazioni di tacrolimus.¹⁴

VALORI ATTESI

L'intervallo terapeutico ottimale per il tacrolimus nel sangue intero non è stato stabilito con questo dosaggio. Gli intervalli terapeutici per il tacrolimus possono variare in base a fattori clinici e alla metodologia utilizzata.

Data l'eterogeneità dello stato clinico del paziente, i medici devono stabilire un intervallo per il trattamento terapeutico desiderato in base alla propria esperienza e alle esigenze cliniche del paziente. Non usare i valori di tacrolimus come unico criterio per la modifica di un regime di trattamento. Le differenze individuali in fatto di sensibilità agli effetti immunosoppressori e nefrotossici del tacrolimus, la somministrazione concomitante di altri immunosoppressori, il tipo di trapianto, il periodo di tempo trascorso dal trapianto e altri fattori contribuiscono a determinare requisiti diversi per livelli ematici ottimali di tacrolimus.

Gli intervalli ottimali possono variare in base al test usato e vanno quindi stabiliti per ciascun test disponibile in commercio. I valori ottenuti con metodi di dosaggio diversi non possono essere usati in modo intercambiabile a causa delle differenze nella metodologia e nella reattività crociata. Inoltre, non possono essere applicati fattori di correzione. Si consiglia di usare sempre lo stesso tipo di dosaggio per lo stesso paziente.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PRESTAZIONI

Di seguito sono riportati i risultati rappresentativi delle prestazioni ottenute mediante un analizzatore chimico-clinico automatizzato disponibile in commercio e basato sull'analisi quantitativa turbidimetrica. Salvo altrimenti indicato, tutti i dosaggi sono stati condotti secondo la procedura di analisi qui descritta con l'analizzatore Beckman AU680. I risultati ottenuti in singoli laboratori possono differire da questi dati. Per ulteriori dati sulle prestazioni specifiche dell'analizzatore, consultare il protocollo dell'applicazione specifica dell'analizzatore o chiamare l'assistenza tecnica di Thermo Fisher Scientific per assistenza.

Intervallo refertabile

L'intervallo refertabile per l'immunodosaggio QMS Tacrolimus è compreso tra 1,0 ng/ml (valore minimo refertabile basato sulla sensibilità funzionale) e 30 ng/ml di tacrolimus.

Sensibilità funzionale (limite di quantificazione)

La sensibilità funzionale rappresenta la concentrazione minima di tacrolimus che può essere misurata con una precisione inter-dosaggio in base a un CV del 20%. Lo studio è stato condotto utilizzando campioni di sangue intero addizionati con tacrolimus in quantità comprese tra 0,5 e 5,0 ng/ml per una misurazione per ciascuna analisi, due volte al giorno, per 30 giorni con un totale di 60 punti di dati. Al limite superiore dell'intervallo di confidenza del 95%, il limite di quantificazione è stato calcolato come pari a 0,9 ng/ml, valore che supporta il limite di dosaggio inferiore di 1,0 ng/ml. Il recupero percentuale osservato a 0,9 ng/ml è del 102,0%.

Linearità della diluizione

È stato condotto uno studio di linearità diluendo un campione con elevata concentrazione di tacrolimus con il calibratore QMS Tacrolimus A a concentrazioni equamente distribuite nell'intervallo del dosaggio. Il recupero percentuale è stato determinato dividendo la concentrazione di tacrolimus misurata per la concentrazione attesa. Le concentrazioni attese sono state determinate moltiplicando l'elevata concentrazione analizzata per un fattore di diluizione.

% campione elevato	Concentrazione attesa (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)	Recupero (%)
100,0%	29,9	29,9	100,0%
90,0%	26,9	26,0	96,8%
80,0%	23,9	22,8	95,4%
70,0%	20,9	19,2	91,8%
60,0%	17,9	17,2	96,1%
50,0%	14,9	14,7	98,6%
40,0%	12,0	11,1	92,7%
30,0%	9,0	8,6	95,7%
20,0%	6,0	6,0	100,0%
10,0%	3,0	3,1	102,9%
5,0%	1,5	1,5	100,4%
3,3%	1,0	1,0	101,4%
2,8%	0,8	0,8	99,6%
0,0%	0,0	0,0	N/A

Concentrazione attesa = % campione elevato x Concentrazione misurata elevata

Recupero (%) = (Concentrazione misurata ÷ Concentrazione attesa) x 100

Recupero

Campioni di sangue intero negativo sono stati addizionati con quantità note di tacrolimus alle concentrazioni dell'intervallo del dosaggio. Le concentrazioni di tacrolimus su questi campioni sono state verificate con LC-MS/MS e analizzate con l'immunodosaggio QMS Tacrolimus. I risultati sono riportati qui di seguito.

ID campione	n	Concentrazione attesa (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)	Recupero (%)
Campione 1	21	2,7	2,7	101,8
Campione 2	21	9,8	10,8	109,4
Campione 3	21	18,0	17,7	98,2
Campione 4	21	19,8	21,3	107,5
Campione 5	21	27,0	27,1	100,4

Recupero (%) = (Concentrazione misurata ÷ Concentrazione attesa) x 100

Precisione

La precisione è stata valutata con campioni di sangue intero di paziente e addizionati raggruppati. Lo studio è stato condotto come descritto nel protocollo EP5-A2 CLSI.¹⁵ Ogni campione è stato analizzato in duplicati per ciascuna analisi, due volte al giorno per 20 giorni. Sono stati calcolati i valori medi e intra-analisi, la deviazione standard totale dell'analisi e il CV (%). I risultati rappresentativi sono riportati qui di seguito.

Campioni	n	Media (ng/ml)	Intra-analisi		Analisi totale	
			DS	CV (%)	DS	CV (%)
Campione addizionato A	80	3,0	0,2	4,9%	0,2	7,1%
Campione addizionato B	80	10,0	0,2	1,9%	0,4	3,6%
Campione addizionato C	80	20,9	0,4	1,9%	1,1	5,0%
Campione paziente A	80	3,2	0,1	4,1%	0,2	6,2%
Campione paziente B	80	10,4	0,2	2,2%	0,4	3,6%
Campione paziente C	80	24,2	0,5	2,1%	1,1	4,6%

Confronto tra metodi

Sono stati condotti studi di correlazione per confrontare l'immunodosaggio QMS Tacrolimus con due metodi LC-MS/MS (Sistema 1 e Sistema 2) e con il dosaggio Abbott ARCHITECT® Tacrolimus. Gli studi sono stati condotti con campioni di sangue intero prelevati con provette EDTA da pazienti sottoposti a trapianto di rene, fegato e cuore in terapia a base di tacrolimus. Tutti i campioni analizzati erano campioni pre-dose provenienti principalmente da pazienti adulti con un periodo di tempo trascorso dal trapianto per i campioni in genere > 9 mesi. I pazienti esaminati sono stati sottoposti a trattamento con tacrolimus da solo o in associazione con altri farmaci immunosoppressori, in particolare con micofenolato mofetile (MMF), acido micofenolico (MPA) o corticosteroidi. I risultati dell'analisi della regressione di Deming¹⁶ tra i vari metodi sono riportati nella tabella sottostante.

Metodo di confronto	n	Pendenza (IC* al 95%)	Intercetta (IC al 95%)	Coefficiente di correlazione (R)
LC-MS/MS Sistema 1	383	1,111 (da 1,084 a 1,137)	0,53 (da 0,31 a 0,76)	0,972
LC-MS/MS Sistema 2	232	1,130 (da 1,092 a 1,167)	0,71 (da 0,42 a 1,01)	0,967
Dosaggio Abbott ARCHITECT Tacrolimus	208	1,126 (da 1,071 a 1,181)	-0,03 (da -0,63 a 0,56)	0,937

*Intervallo di confidenza (IC)

Intervallo del campione QMS Tacrolimus: da 1,0 a 30,8 ng/ml

Intervallo del campione LC-MS/MS: da 0,8 a 29,5 ng/ml

Intervallo del campione ARCHITECT Tacrolimus: da 2,4 a 28,1 ng/ml

Grafico di dispersione dei risultati ottenuti con QMS Tacrolimus e LC-MS/MS Sistema 1 per campioni di pazienti sottoposti a trapianto combinato di rene, fegato e cuore.

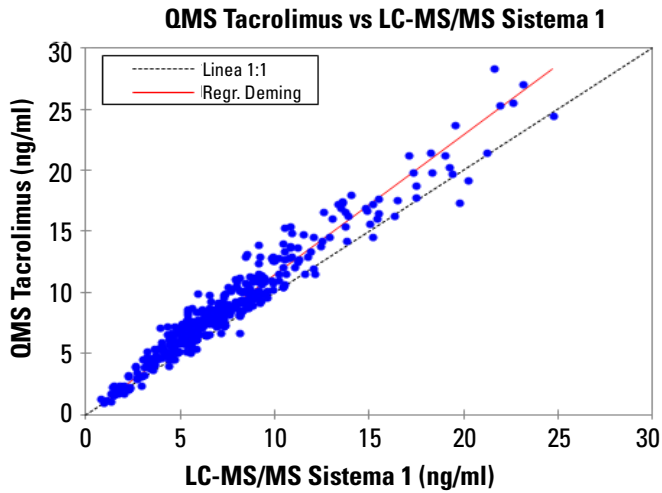


Grafico di Bland e Altman¹⁷ dei risultati ottenuti con QMS Tacrolimus e LC-MS/MS Sistema 1 per campioni di pazienti sottoposti a trapianto combinato di rene, fegato e cuore. L'errore medio viene calcolato come la differenza media tra i risultati dell'immunodosaggio QMS Tacrolimus e di LC-MS/MS Sistema 1.

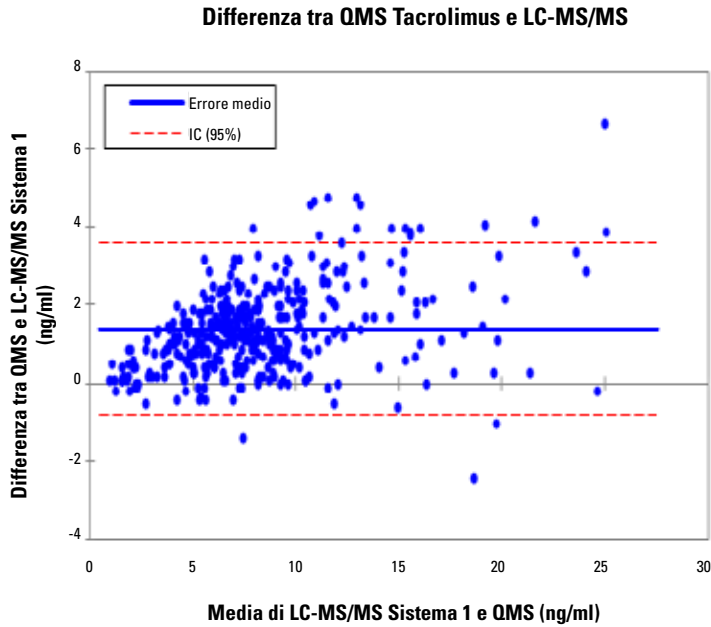


Grafico di dispersione dei risultati ottenuti con QMS Tacrolimus e Abbott ARCHITECT Tacrolimus per campioni di pazienti sottoposti a trapianto combinato di rene e fegato.

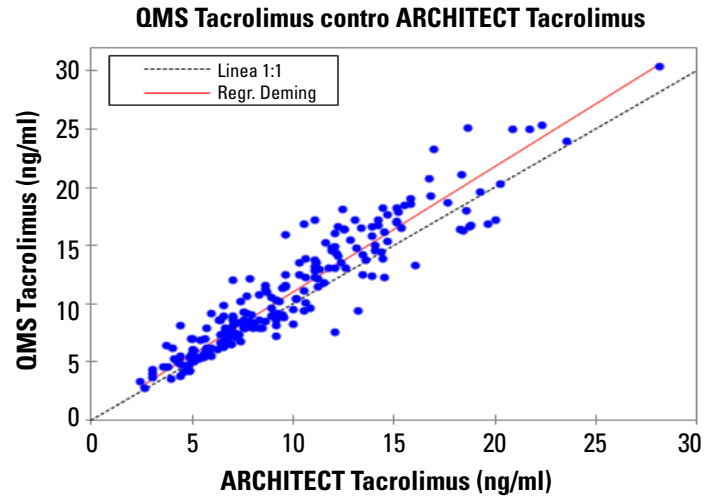
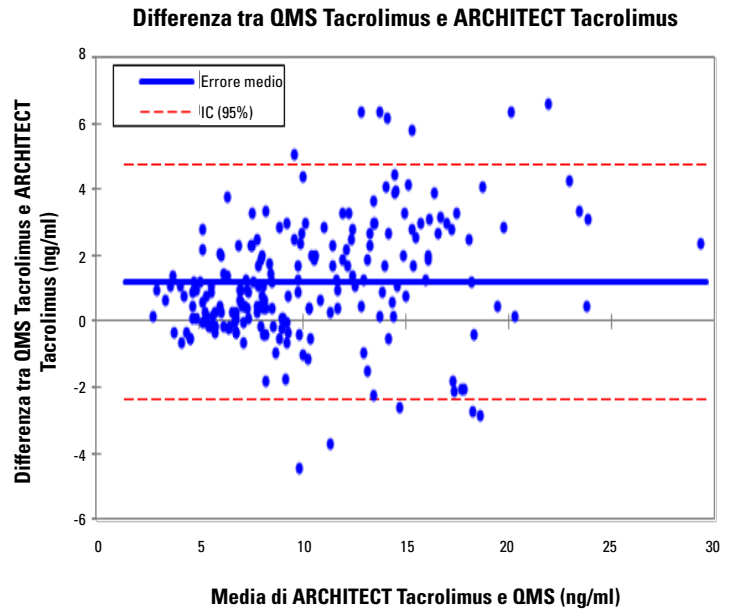


Grafico di Bland e Altman¹⁷ dei risultati ottenuti con i dosaggi QMS Tacrolimus e Abbott ARCHITECT Tacrolimus per campioni di pazienti sottoposti a trapianto combinato di rene e fegato. L'errore medio viene calcolato come la differenza media tra i risultati dell'immunodosaggio QMS Tacrolimus e del dosaggio ARCHITECT Tacrolimus.



Specificità

Sono stati condotti studi di specificità utilizzando il protocollo EP7-A2 CLSI come linea guida.¹⁸ La reattività crociata è stata analizzata per i principali metaboliti del tacrolimus. Sono stati analizzati anche altri farmaci contenenti tacrolimus e somministrati regolarmente, allo scopo di stabilire se tali composti influiscono sulla quantificazione del tacrolimus mediante l'immunodosaggio QMS Tacrolimus.

La reattività crociata dei metaboliti è stata calcolata con la formula:

$$\text{Reattività crociata (\%)} = \frac{\text{Concentrazione misurata} - \text{Concentrazione attesa}}{\text{Concentrazione di sostanze con potenziale reattività crociata}} \times 100$$

Reattività crociata con i metaboliti del tacrolimus

La reattività crociata dell'immunodosaggio QMS Tacrolimus con i principali metaboliti del tacrolimus è illustrata nella tabella sottostante. I composti analizzati sono stati aggiunti a campioni di sangue umano intero contenenti due concentrazioni di tacrolimus e sono stati analizzati in replicati di tre. È stata calcolata la reattività crociata percentuale.

Metaboliti del tacrolimus	Concentrazione del metabolita (ng/ml)	Concentrazione attesa (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)	Recupero (%)	Reattività crociata (%)
M-I (13-O-demetile)	20	5,8	7,6	131,0	9,2
	20	13,3	14,8	111,3	7,7
M-II (31-O-demetile)	20	5,7	5,9	103,5	0,7
	20	13,2	13,1	99,2	-0,5
M-III (15-O-demetile)	20	5,3	6,0	113,2	3,8
	20	12,4	13,0	104,8	2,7
M-IV (12-idrossi)	3,5	14,6	18,7	128,1	117,1
	3,3	21,2	27,0	127,4	174,8
	20	5,0	6,1	122,0	5,7
	20	12,0	14,1	117,5	10,5
M-VII (13,15-O-didemetile)	20	5,4	7,3	135,2	9,3
	20	13,4	14,7	109,7	6,7
M-VII (13,15-O-didemetile) + M-VI (13,31-O-didemetile)	20	5,4	5,8	107,4	2,2
	20	13,4	13,8	103,0	2,0

Recupero (%) = (Concentrazione misurata ÷ Concentrazione attesa) x 100

Per il metabolita M-IV del tacrolimus è stata osservata una reattività crociata ≤ 174,8%. I metaboliti M-V ed M-VIII del tacrolimus non sono stati valutati per determinarne l'eventuale reattività crociata.

Con circa il 6% di M-I, il 15% di M-II, il 6% di M-III e quantità quasi irrilevanti di M-IV, i campioni di pazienti in terapia a base di tacrolimus contengono basse concentrazioni di metaboliti del tacrolimus in confronto al farmaco originario.^{9,12,19}

Sostanze interferenti

Gli studi di interferenza sono stati svolti in base alle linee guida del protocollo CLSI EP7-A2.¹⁸ L'immunodosaggio QMS Tacrolimus è stato analizzato con farmaci somministrati congiuntamente al tacrolimus e altri farmaci comuni per cercare potenziali interferenze. I composti analizzati sono stati aggiunti a campioni di sangue umano intero contenenti circa 5 e 12 ng/ml di tacrolimus e sono stati analizzati mediante l'immunodosaggio QMS Tacrolimus. Si è ritenuto che un recupero della concentrazione di tacrolimus superiore a un errore del 10% interferisse con il dosaggio. I composti analizzati alle concentrazioni riportate nella tabella sottostante non interferiscono con il dosaggio. Il recupero percentuale medio di tacrolimus si è attestato tra il 91% e il 109%.

Composto	Concentrazione (ng/ml)	Composto	Concentrazione (ng/ml)
Acetaminofene	200.000	Kanamicina B solfato	100.000
Acicloguanosina / Aciclovir	1.000.000	Ketoconazolo	100.000
Allopurinolo	50.000	Labetalolo	17.100
Amikacina solfato	150.000	Lidocaina	100.000
Amfotericina B	100.000	Litio	35.000
Ampicillina	100.000	Lovastatina	20.000
Apresolina / Idralazina	100.000	Metilprednisolone	100.000
Atenololo	40.000	Metoclopramide	100.000
Azatioprina	100.000	Minoxidil	60.000
Azitromicina	5.000	Solfato di morfina	100.000
Bromocriptina / 2-Bromo-α-ergocriptina	8.000	Acido micofenolico	100.000
Carbamazepina	120.000	N-Acetilprocainamide	120.000

Tabella (continua)

Composto	Concentrazione (ng/ml)	Composto	Concentrazione (ng/ml)
Cefazolina	150.000	Nadololo	1.200
Ceftriaxone	500.000	Naproxene	100.000
Cefalosporina C	100.000	Nicardipina	500
Clorpromazina	50.000	Nicotina	20.000
Cloramfenicolo	250.000	Nifedipina	100.000
Clordiazepossido	20.000	Penicillina G	100.000
Cloroquina	1.500	Pentobarbital	100.000
Cimetidina	100.000	Fenobarbital	150.000
Ciprofloxacina	7.400	Fenitoina	100.000
Clarithromicina	5.000	Prazosina	100.000
Clonidina	100	Prednisolone	100.000
Colchicina	90	Prednisone	100.000
Cortisone	1.200	Primidone	100.000
Ciclosporina / Ciclosporina A	10.000	Probucool	600.000
Diazepam	20.000	Procainamide	100.000
Digitossina	100.000	Propossifene	4.000
Digossina	10.000	Propranololo	40.000
Diltiazem	60.000	Chinidina	100.000
Disopiramide	100.000	Ranitidina	200.000
Eritromicina	200.000	Rifampina / Rifampicina	100.000
Etosuccimide	300.000	Acido salicilico	500.000
Everolimus	100	Sirolimus (rapamicina)	300
Famotidina	10.000	Spectinomocina	100.000
Fluconazolo	100.000	Streptomocina	100.000
Flucitosina / 5-fluorocitosina	40.000	Sulfametossazolo	150.000
Furosemide	100.000	Teofillina	250.000
Ganciclovir	1.000.000	Ticlopidina	150.000
Gemfibrozil	100.000	Tobramicina	100.000
Gentamicina	120.000	Triamterene	100.000
Idroclorotiazide	40.000	Trimetoprim	40.000
Idrocortisolo	100.000	Acido valproico	500.000
Ibuprofene	400.000	Vancomicina	100.000
Itraconazolo	100.000	Verapamil	100.000
Kanamicina A solfato	100.000		

Le seguenti sostanze endogene potenzialmente interferenti, analizzate con l'immunodosaggio QMS Tacrolimus alle concentrazioni indicate, hanno presentato un recupero dal 92% al 108%.

Sostanza potenzialmente interferente	Concentrazione
Albumina	12 g/dl
Bilirubina	60 mg/dl
Colesterolo	500 mg/dl
Creatinina	5 mg/dl
Trigliceridi	1.500 mg/dl
Acido urico	20 mg/dl
Gammaglobuline IgG	12 g/dl
Fattore reumatoide	500 IU/ml
HAMA*	400 ng/ml
Ematocrito	12% - 64%

*HAMA = anticorpi umani antimurini

BIBLIOGRAFIA

1. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomycetes II. Immunosuppressive effect of FK-506 *in vitro*. *J Antibiotics* 1987; 40:1256-1265.
2. Bierer BE, Jin YJ, Fruman DA, et al. FK506 and rapamycin: molecular probes of T-lymphocyte activation. *Transplant Proc* 1991;23:2850-2855.
3. Schreiber SL. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 1991;251:283-287.
4. Thomson AW, Bonham CA, and Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* 1995;17:584-591.
5. Griffith JP, Kim JL, Kim EE, et al. X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 1995;82:507-522.
6. Jusko WJ, Thomson AW, Fung J, et al. Consensus document; therapeutic monitoring of tacrolimus (FK-506). *Ther Drug Monit* 1995;17:606-614.
7. Physicians' Desk Reference, 58th ed. Thomson PDR at Montvale, NJ. 2004; PROGRAF®: 1323-1327.
8. Lhoest GJ, Maton N, Latinne D, et al. 15-desmethyl FK-506 and 15,31-desmethyl FK-506 from human liver microsomes: isolation, identification (by fast atom bombardment mass spectrometry and NMR), and evaluation of *in vitro* immunosuppressive activity. *Clin chem.* 1994;40:740-744.
9. Gonschior AK, Christians U, Winkler M, et al. Tacrolimus (FK506) metabolite patterns in blood from liver and kidney transplant patients. *Clin Chem.* 1996;42:1426-1432.
10. Alak AM. Measurement of tacrolimus (FK506) and its metabolites: a review of assay development and application in therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. *Ther Drug Monit.* 1997;19:338-351.
11. Jusko WJ. Analysis of tacrolimus (FK506) in relation to therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 1995;17:596-601.
12. Christians U, Pokaiyavanichkul T, Chan L, Tacrolimus, Applied Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Principals of Therapeutic Drug Monitoring. 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA 2005: 529-562.
13. Staatz CE, Willis C, Taylor PJ, and Tett SE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72:660-669.
14. PROGRAF® [package insert]. Deerfield, IL: Astellas Pharma US, Inc.; 2012.
15. Tholen DW, Kallner A, Kennedy JW, et al. NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Quantative Measurement Methods; Approved Guideline-Second Edition. NCCLS document EP5-A2 [ISBN 1-56238-542-9]. NCCLS, Wayne, PA, 2004.
16. Deming WE. Statistical adjustment of data. New York: Wiley, 1943. (Dover Publications edition, 1985; Dover Publications, New York)
17. Bland JM, Altman DG. "Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement". *Lancet* 327 (8476) 1986: 307-310.
18. McEnroe RJ, Burritt MF, Powers DM, et al. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document EP7-A2 [ISBN 1-56238-584-4]. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2005.
19. Mancinelli LM, Frassetto L, Floren LC, Dressler D, Carrier S, Bekersky I, Benet L, and Christians U. The pharmacokinetics and metabolic disposition of tacrolimus: A comparison across ethnic groups. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69:24-31.

Glossario:

<http://www.thermofisher.com/symbols-glossary>



Produttore:

Microgenics Corporation
46500 Kato Road
Fremont, CA 94538 USA
Numero gratuito negli USA: 800-626-0690



Rappresentante autorizzato nell'UE:
B-R-A-H-M-S GmbH
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, Germany

Assistenza clienti

Numero gratuito negli USA: 1-800-232-3342
Altri paesi: rivolgersi al rappresentante Microgenics locale.

Bio-Rad Lyphocheck® è un marchio registrato di Bio-Rad®.
MORE Diagnostics Controls sono di proprietà di MORE Diagnostics, Inc.
ARCHITECT è un marchio registrato di Abbott Laboratories®.
Tutti gli altri marchi sono di proprietà di Thermo Fisher Scientific Inc. e delle sue consociate.
© 2018 Thermo Fisher Scientific Inc. Tutti i diritti riservati.



Per aggiornamenti del foglietto illustrativo, andare all'indirizzo:
www.thermofisher.com/diagnostics

10015557-12-IT
2021 01

thermo
scientific