

Rx Only

REF 10015556

Wyłącznie do stosowania w diagnostyce *in vitro*

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

PRZEZNACZENIE

Test immunologiczny QMS Tacrolimus służy do ilościowego oznaczania stężenia takrolimusu w ludzkiej krwi pełnej przy użyciu automatycznych analizatorów z zakresu chemii klinicznej. Wyniki przeprowadzonego testu są pomocne w zarządzaniu terapią z wykorzystaniem takrolimusu u pacjentów poddanych przeszczepowi nerek, wątroby i serca. Niniejsze narzędzie stosowane w diagnostyce *in vitro* jest przeznaczone wyłącznie do stosowania w klinicznych warunkach laboratoryjnych.

PODSTAWOWE INFORMACJE I WYJAŚNIENIE DZIAŁANIA TESTU

Takrolimus (FK506, PROGRAF[®]) to antybiotyk z grupy makrolidów pochodzenia grzybowego, z rodzaju *Streptomyces tsukubaensis*, o silnym działaniu immunosupresyjnym stosowany u pacjentów po transplantacjach nerek i wątroby.¹ Takrolimus jest inhibitorem kalcyneuryny, która jest w naturze fosfatazą i aktywuje namnażanie limfocytów T.²⁻⁴ W procesach komórkowych takrolimus wiąże się z grupą wiążących białek zwanych FKBP (białka wiążące FK506), a następnie tworzy kompleks w kształcie pentameru zawierający takrolimus, FKBP, kalcyneuryny A i B oraz kalmodulinę.²⁻⁵ Formowanie pentameru powoduje zahamowanie aktywności fosfatazy kalcyneuryny, co jest niezbędne w celu aktywacji czynników transkrypcyjnych przemieszczających się w jądrze komórkowym. W ten sposób ekspresja genów limfocytów T jest zahamowana w szczególności w przypadku cytokinów takich jak IL-2 i skutkuje działaniem immunosupresyjnym u pacjentów.²⁻⁵

Rozdział takrolimusu między krwią pełną a osoczem zależy od kilku czynników, takich jak zawartość hematokrytu, stężenie leku i stężenie białka w osoczu. Stosunek stężenia krwi pełnej do osocza wynosi średnio 35 (zakres od 12 do 67).^{6,7} Takrolimus jest w dużym stopniu metabolizowany przez cytochrom P-450, głównie przez CYP3A.⁸⁻¹¹ Lek jest metabolizowany w procesach demetylacji i hydroksylacji do co najmniej 8 metabolitów (M-I – M-VIII).¹² W próbach *in vivo* średni okres półtrwania takrolimusu szacuje się na 48 godzin.⁸⁻¹¹ Zanotowano również dużą zmienność w poziomach stężenia takrolimusu w krwi pełnej między pacjentami oraz u tego samego pacjenta.¹³ Zaleca się dokładne i częste monitorowanie poziomu takrolimusu.¹⁴

ZASADY POSTĘPOWANIA

Test immunologiczny QMS Tacrolimus to badanie homogeniczną metodą immunoturbidymetryczną (particle-enhanced turbidimetric immunoassay, PETIA). Działanie testu jest oparte na współzawodnictwie o miejsce wiążące w odczynniku zawierającym przeciwciała przeciwko takrolimusowi pomiędzy lekiem obecnym w próbce a lekiem naniesionym na mikrocząstkę. Przy braku współzawodniczącego leku w próbce odczynnik zawierający mikrocząstkę pokryte takrolimusem aglutynuje w sposób nagły w obecności odczynnika zawierającego przeciwciała przeciwko takrolimusowi. Szybkość zmiany absorbancji jest mierzona metodą fotometryczną przy długości fali 700 nm. Po dodaniu próbki zawierającej takrolimus następuje częściowe zahamowanie aglutynacji, spowalniające zmianę współczynnika absorpcji. Krzywą zahamowania zależną od stężenia takrolimusu można uzyskać, uwzględniając maksymalny współczynnik aglutynacji przy najniższym stężeniu takrolimusu i najniższy współczynnik aglutynacji przy najwyższym stężeniu takrolimusu.

ODCZYNNIKI

Zestaw odczynników

Test QMS Tacrolimus, **REF** 10015556, jest dostarczany w postaci płynnej jako gotowy do użycia zestaw trzech odczynników zawierający:

REAGENT 1 1 × 18 ml

REAGENT 2 1 × 12 ml

EXT Odczynnik do ekstrakcji 1 × 50 ml (potrzebny roztwór roboczy, patrz str. 2, „Przygotowanie roztworu do ekstrakcji”)

Składniki biorące udział w reakcji

INGRED	Składnik	Stężenie
REAGENT 1	Przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko takrolimusowi (królicze) Azydek sodu	< 1,0% 0,09%
REAGENT 2	Mikrocząsteczki pokryte takrolimusem Azydek sodu	< 0,3% 0,09%
EXT	Azydek sodu	0,09%

POSTĘPOWANIE Z ODCZYNNIKAMI I WARUNKI ICH PRZECHOWYWANIA

- Odczynniki **REAGENT 1**, **REAGENT 2** i **EXT** (odczynnik do ekstrakcji) są gotowe do użycia.
- Przed użyciem kilkakrotnie odwrócić, nie dopuszczając do wytworzenia się pęcherzyków powietrza.
- Jeśli we wkładzie zawierającym odczynnik znajdują się pęcherzyki powietrza, należy je usunąć. 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 jednoramiennej.

- W przypadku opróżnienia wkładu zawierającego odczynnik **REAGENT 1** lub **REAGENT 2** należy wymienić obydwie wkłady, a następnie sprawdzić kalibrację, używając co najmniej jednej próbki dla każdego poziomu materiałów kontrolnych zgodnie z obowiązującymi w laboratorium zasadami dotyczącymi kontroli jakości. Jeśli uzyskane wyniki nie mieszczą się w akceptowalnych zakresach, konieczne może być przeprowadzenie ponownej kalibracji.
- Informacje dotyczące konkretnego systemu można znaleźć na karcie „Parametry systemu testowego” dla danego analizatora.
- 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 zakłócać prawidłowe wykrywanie poziomu odczynnika znajdującego się we wkładzie, powodując pobieranie niewystarczającej objętości odczynnika, co z kolei może przekładać się na wyniki testu.

Odczynniki w nieotwartych folkach zachowują stabilność do daty ważności określonej na opakowaniu, jeśli są przechowywane w temperaturze od 2°C do 8°C.

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



OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Wyłącznie do stosowania w diagnostyce *in vitro*. Stosować standardowe środki ostrożności wskazane przy postępowaniu z wszystkimi odczynniki laboratoryjnymi.
- Nie należy mieszać materiałów o różnych numerach partii.
- Nie należy używać zestawu odczynników po upływie daty ważności.

NIEBEZPIECZEŃSTWO: Materiał QMS do oznaczeń immunologicznych takrolimusu zawiera ≤3,0% albuminy surowicy ludzkiej (HSA) oraz ≤1,0% przeciwciał (króliczych) swoistych dla leku.

Odczynnik QMS do ekstrakcji takrolimusu zawiera ≤9,0% siarczanu (VI) cynku (ZnSO4).

H317 – Może powodować reakcję alergiczną skóry.

H334 – Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.

H318 – Powoduje poważne uszkodzenia oczu.

H411 – Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

Unikać wdychania mgły lub par. Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wyciągać 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 ZATRUCI lub lekarzem. Wyprać zanieczyszczoną odzież przed ponownym użyciem. Zawartość/pojemnik usuwać zgodnie z przepisami lokalnymi/regionalnymi/krajowymi/międzynarodowymi.

Unikać uwolnienia do środowiska. Stosować rękawice ochronne/ochronę oczu/ochronę twarzy. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z ośrodkiem zatruc lub lekarzem. Usunąć wyciek. Zawartość/pojemnik usuwać zgodnie z przepisami lokalnymi/regionalnymi/krajowymi/międzynarodowymi.



PRZESTROGA: Materiały pochodzenia ludzkiego zostały sprawdzone przy użyciu metod zatwierdzonych przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, Food and Drug Administration) pod kątem występowania wirusów HIV 1 i 2 oraz zapalenia wątroby typu B i C i uzyskane wyniki były negatywne. Jednak z uwagi na fakt, że żadna metoda badawcza nie pozwala całkowicie wykluczyć możliwości zakażenia, z materiałem należy postępować równie ostrożnie, jak z próbą pobraną od pacjenta. W przypadku kontaktu z materiałem należy postępować zgodnie z zaleceniami odpowiedniego urzędu ds. ochrony zdrowia.

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 odczynnikiami i postępowanie w razie przypadkowego narażenia opisano w karcie charakterystyki.

POBIERANIE PRÓBEK I POSTĘPOWANIE Z NIMI

- Należy korzystać wyłącznie z próbek z krwi pełnej pobranych do próbek z EDTA. W przypadku wszystkich rodzajów próbek należy przestrzegać instrukcji dostarczonych przez producenta. Należy zadbać, aby zachować integralność próbki od momentu pobrania próbki do chwili przeprowadzenia testu. Na próbkach należy zaznaczyć zarówno godzinę pobrania krwi, jak i godzinę ostatniego podania leku.
- Próbki powinny być szczelnie zamknięte i zostać poddane testowi w ciągu 7 dni, jeśli są przechowywane w temperaturze 2–8°C, lub w ciągu 6 miesięcy, jeśli są przechowywane w temperaturze ≤ -20°C.^{6,10-11} Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i ponownego zamrażania. Należy unikać spieniania próbek.

PROCEDURA

Materiały dostarczone

- Zestaw odczynników QMS Tacrolimus, [REF] 10015556

Materiały wymagane, ale niedostarczone

- Kalibratory QMS Tacrolimus, [REF] 10015573, CAL A: 1 × 4 ml, CAL B-F: po 1 × 2 ml

- Produkty do kontroli jakości

Materiały zalecane:

- Materiały kontrolne MORE Diagnostics Rap/Tac/CsA,

Poziom NISKI, 280-Q: po 4 × 4 ml

Poziom ŚREDNI, 280-1: po 4 × 4 ml

Poziom WYSOKI, 280-2: po 4 × 4 ml

- Aby dowiedzieć się więcej o innych dostępnych na rynku produktach do kontroli jakości, należy skontaktować się telefonicznie z działem wsparcia technicznego firmy Thermo Fisher Scientific.

- Metanol, klasa przydatności do chromatografii HPLC (czystość ≥ 99,8%)

- Probówki Eppendorfa

- Automatyczny analizator do chemii klinicznej

Przygotowanie próbek

Uwaga: W przypadku materiałów kontrolnych należy postępować zgodnie z instrukcjami i zaleceniami dotyczącymi postępowania zawartymi w ulotce informacyjnej opracowanej przez producenta danego materiału (jeśli jest dołączona).

Przed ekstrakcją należy poczekać, aż kalibratory i próbki pacjenta osiągną temperaturę pokojową. Kalibratory należy mieszać przez co najmniej 15–20 minut, a próbki pacjenta należy przed użyciem dokładnie wymieszać w temperaturze pokojowej. Kalibratory i próbki pacjenta należy starannie wymieszać, delikatnie odwracając pojemniki (zalecane jest użycie kotycki). Uważa, aby nie tworzyły się pęcherzyki powietrza.

Przygotowanie roztworu do ekstrakcji

- Dodać dokładnie 10 ml odczynnika do ekstrakcji o temperaturze pokojowej do czystej, suchej i hermetycznej butelki.
- Do butelki dodać dokładnie 40 ml metanolu o klasie przydatności do chromatografii HPLC (czystość ≥ 99,8%) i delikatnie wymieszać. Oznaczyć jako „Roztwór roboczy do ekstrakcji z użyciem takrolimusu”. Na etykiecie wpisać aktualną datę i datę ważności (2 tygodnie od dnia przygotowania). Przechowywać w temperaturze pokojowej.

Procedura ekstrakcji próbek, kalibratorów i materiałów kontrolnych

ABY UZYSKAĆ OPTIMALNE WYNIKI, NALEŻY DOKŁADNIE WYKONAĆ PONIŻSZE CZYNNOŚCI. EKSTRAKTY NALEŻY WYKORZYSTAĆ BEZPOŚREDNIO PO EKSTRAKCIJ.

- Przygotować i oznaczyć probówki Eppendorfa do ekstrakcji próbek, kalibratorów i materiałów kontrolnych. Dla każdej próbki przygotować jedną probówkę Eppendorfa.
- Odmierzyć pipetą dokładnie 200 µl każdej próbki, kalibratora lub materiału kontrolnego do odpowiednio oznaczonej probówki Eppendorfa. Zassać próbkę pipetą, delikatnie wytrzeć końcówkę pipety nad krawędzią probówki z próbką, usuwając nadmiar próbki, a następnie umieścić próbkę na wewnętrznej ściance probówki Eppendorfa.
Uwaga: Upewnić się, że w końcówce pipety nie znajdują się pęcherzyki powietrza. Powietrze w tym miejscu może być potencjalnie źródłem nieprecyzyjnych wyników.
- Odmierzyć pipetą dokładnie 200 µl roztworu do ekstrakcji do probówki Eppendorfa. Przy przygotowywaniu wielu próbek zaleca się stosowanie pipety powtarzalnej w celu zasysania i dozowania roztworu do ekstrakcji. Przed dozowaniem roztworu do ekstrakcji należy usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza z końcówki pipety.
- Niezwłocznie założyć zatyczkę i odwirować probówkę Eppendorfa z maksymalną prędkością przez 15–30 sekund. Sprawdzić, czy mieszanina w każdej probówce jest homogeniczna. W przypadku wykrycia niewymieszanej próbki usunąć niewymieszaną porcję i ponownie odwirować.
- Pozostawić mieszaninę w probówce Eppendorfa w temperaturze pokojowej przez 5–7 minut.
- Umieścić probówkę Eppendorfa w wirówce i wirować przez 5 minut z prędkością obrotową równoważną 15 000–16 000 × g.
- Przelać supernatant do pojemnika na próbki (nie dopuścić do wytworzenia się pęcherzyków powietrza) i natychmiast przeprowadzić pomiar, aby do minimum ograniczyć parowanie próbki. Nie uderzać w pojemnik w celu uwolnienia ostatniej kropli w sposób, który może spowodować naruszenie peletki.
- Po zakończeniu analizy wylać ekstrakty. Aby powtórzyć test, należy ponownie wykonać ekstrakcję.

Uwaga: Dodatkowe wskazówki i zalecenia dotyczące ekstrakcji próbek w celu wykonania testu immunologicznego QMS Tacrolimus są również dostępne w dziale wsparcia technicznego firmy Thermo Fisher Scientific.

Procedura wykonania testu

Szczegółowy opis przeprowadzania i kalibrowania testu zamieszczono w podręczniku obsługi danego urządzenia.

Procedura rozcieńczenia próbek

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

Protokół ręcznego rozcieńczenia

Ręczne rozcieńczenie można przeprowadzić w przypadku próbek, w których stwierdzono stężenie takrolimusu o wartości powyżej 30 ng/ml. Należy sporządzić roztwór próbki z kalibratorem QMS Tacrolimus CAL A (0,0 ng/ml) 1:1 przed przeprowadzeniem ekstrakcji próbki. Rozcieńczenie ma na celu uzyskanie wyników wyższych niż czułość testu (1 ng/ml). Aby otrzymać ostateczną wartość stężenia, zapisaną wartość stężenia należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia ręcznego.

ostateczne stężenie w próbce = zapisane stężenie x współczynnik ręcznego rozcieńczenia

współczynnik ręcznego rozcieńczenia = (objętość próbki + objętość kalibratora CAL A) ÷ objętość próbki

KALIBRACJA

Test immunologiczny QMS Tacrolimus należy skalibrować, używając pełnej (6-punktowej) procedury kalibracji. Aby wykonać pełną kalibrację, należy wykonać test z użyciem kalibratorów QMS Tacrolimus A, B, C, D, E i F. Do testów immunologicznych QMS Tacrolimus należy używać wyłącznie kalibratorów QMS Tacrolimus. Nie jest możliwe szczegółowe określenie stężenia takrolimusu, jeśli podczas kalibracji testu immunologicznego QMS Tacrolimus nie zastosowano zestawu kalibratorów QMS Tacrolimus, [REF] 10015573.

Kalibracja jest konieczna w przypadku każdego nowego numeru partii. Należy zweryfikować krzywą kalibracji, używając co najmniej jednej próbki dla każdego poziomu materiałów kontrolnych zgodnie z obowiązującymi w danym laboratorium wymaganiami dotyczącymi kontroli jakości. Jeśli uzyskane wyniki kontroli nie mieszczą się w akceptowalnych zakresach, należy podjąć działania korygujące.

Częstość kalibracji

Zaleca się przeprowadzenie ponownej kalibracji:

- po zmianie partii kalibratorów lub odczynników (zestawu),
- po przeprowadzeniu comiesięcznej konserwacji urządzeń,
- zgodnie z wymaganiami procedur kontroli jakości.

KONTROLA JAKOŚCI

Wszystkie wymagania z zakresu kontroli jakości muszą być zgodne z przepisami lokalnymi i/lub krajowymi oraz wymogami akredytacyjnymi.

Jeśli ma to zastosowanie, należy sprawdzić dodatkowe wymagania dotyczące kontroli jakości i opis ewentualnych działań korygujących w standardowych procedurach operacyjnych i/lub planach zapewnienia jakości sporządzonych dla danego laboratorium.

Zalecenia dotyczące materiałów kontrolnych dla testu immunologicznego QMS Tacrolimus:

- Każdorazowo przy pobieraniu próbek od pacjenta i ich testowaniu należy wykonać test co najmniej jednej próbki dla każdego poziomu materiałów kontrolnych.
- Jeśli konieczne jest częstsze monitorowanie materiałów kontrolnych, należy przestrzegać procedur kontroli jakości obowiązujących w danym laboratorium.
- Wszystkie wymagania z zakresu kontroli jakości muszą być zgodne z przepisami lokalnymi i/lub krajowymi.
- Jeśli wyniki przeprowadzonej kontroli jakości nie mieszczą się w zakresie akceptowalnym w danym laboratorium, można podejrzewać, że wyniki pacjentów są nieprawidłowe i nie należy ich zapisywać. W takiej sytuacji należy podjąć działania korygujące.

WYNIKI

Wyniki testu immunologicznego QMS Tacrolimus są zapisywane w ng/ml.

Zapisywanie wyników: Pracownicy laboratoriów powinni zapisywać, że wyniki są uzyskiwane metodą QMS Tacrolimus.

Wyniki — kody błędów:

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

OGRANICZENIA PROCEDURY

- Stężenie takrolimusu w danej próbce określone z użyciem testów innych producentów może się różnić w zależności od metod oznaczania i swoistości odczynników. Zaleca się monitorowanie wyników konsekwentnie przy użyciu jednego testu.
- Testy immunologiczne są nieswoiste i reagują krzyżowo z metabolitami. Z tego powodu testy immunologiczne mogą powodować przeszacowanie stężenia takrolimusu (patrz część „Porównanie metod”). Jeśli eliminacja takrolimusu jest zaburzona, metabolity mogą odkładać się w większym stopniu, co prowadzi do przeszacowania. W takich sytuacjach należy rozważyć zastosowanie testu swoistego (np. metody chromatograficznej).**
- W populacji występuje niewielka ilość przeciwciał heterofilnych wpływających na wynik testu. Te przeciwciała mogą być przyczyną błędnych wyników (w tym zanizonych wyników spowodowanych aglutynacją mikrocząstek odczynnika).
- Wyniki testów należy zawsze analizować w połączeniu z wywiadem chorobowym pacjenta, wynikami badań klinicznych oraz innymi posiadanymi informacjami. Jeśli wyniki nie są spójne z posiadanymi informacjami klinicznymi, należy wykonać dodatkowe testy w celu potwierdzenia wyników.
- Informacje na temat wpływu podawanych w skojarzeniu leków i leków, które mogą powodować wzrost lub spadek stężenia takrolimusu, znajdują się w ulotce informacyjnej PROGRAF.¹⁴

WARTOŚCI OCZEKIWANE

Optymalny zakres stężeń terapeutycznych takrolimisu w krwi pełnej nie został ustalony dla tego testu. Zakresy stężeń terapeutycznych takrolimisu mogą być różne w zależności od czynników klinicznych i zastosowanej metodologii.

Biorąc pod uwagę heterogeniczność stanu klinicznego pacjenta, lekarze powinni ustalać żądany zakres do postępowania terapeutycznego na podstawie własnego doświadczenia oraz wymagań klinicznych każdego pacjenta. Decyzji o zmianach w schemacie leczenia nie należy opierać wyłącznie na wartościach takrolimisu. Różnice we wrażliwości na działanie immunosupresyjne i nefrotoksyczność takrolimisu, równoczesne przyjmowanie innych immunosupresantów, rodzaj przeszczepu, czas, jaki upłynął od operacji przeszczepu, a także szereg innych czynników wpływają na różnicowanie wymogów w zakresie optymalnego stężenia takrolimisu we krwi.

Optymalne zakresy stężeń mogą różnić się w zależności od użytego testu, dlatego należy ustalać je oddzielnie dla każdego z dostępnych na rynku testów. Wartości uzyskanych w wyniku zastosowania różnych metod testowania nie można używać zamiennie ze względu na różnice w metodologii i reaktywności krzyżowej. Nie należy stosować także współczynników korekcji. Zaleca się konsekwentne korzystanie z jednej metody oznaczania dla każdego pacjenta.

SZCZEGÓŁOWA CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA

Poniżej przedstawiono reprezentatywne wyniki działania uzyskane w dostępnym na rynku automatycznym analizatorze chemicznym na potrzeby kliniczne wykorzystującym turbidymetryczną analizę ilościową. Jeśli nie określono inaczej, wszystkie testy wykonano zgodnie z procedurą opisaną w niniejszym dokumencie przy użyciu analizatora Beckman AU680. Wyniki uzyskane w poszczególnych laboratoriach mogą się różnić od tych danych. Aby uzyskać więcej informacji o właściwościach konkretnego analizatora, należy zapoznać się z protokołem zastosowań konkretnego analizatora lub zadzwonić do działu wsparcia technicznego firmy Thermo Fisher Scientific.

Zakres pomiaru

Zakres pomiaru testu immunologicznego QMS Tacrolimus wynosi od 1 ng/ml (minimalna wartość pomiaru wynikająca z funkcjonalnej czułości testu) do 30 ng/ml takrolimisu.

Czułość funkcjonalna testu (granica oznaczalności)

Czułość funkcjonalna testu odnosi się do najniższej wartości stężenia takrolimisu, dla której stwierdzono akceptowalne poziomy precyzji pomiędzy testami ze współczynnikiem zmienności równym 20%. Badanie zostało przeprowadzone z użyciem próbek krwi pełnej z dodatkiem takrolimisu o stężeniu od 0,5 do 5,0 ng/ml dla jednego pomiaru na test, dwa razy dziennie przez 30 dni, co dało 60 punktów pomiaru. Przy górnej granicy ufności wynoszącej 95% dolna granica oznaczalności ilościowej (LoQ) została oszacowana na 0,9 ng/ml, co potwierdza dolną granicę przyjętą dla testu wynoszącą 1,0 ng/ml. Stwierdzony procentowy odzysk przy stężeniu 0,9 ng/ml wynosi 102,0%.

Liniowość metodą rozcieńczania

Przeprowadzono badanie liniowości wyników pomiarowych, rozcieńczając próbkę o wysokim stężeniu takrolimisu przy użyciu kalibratora QMS Tacrolimus A do wartości stężeń równomiernie rozmieszczonych w zakresie testowym. Procentową wartość odzysku określono przez podzielenie wartości zmierzonego stężenia takrolimisu przez oczekiwaną wartość stężenia. Oczekiwana wartość stężenia określono przez pomnożenie testowanej wysokiej wartości stężenia przez współczynnik rozcieńczenia.

Próbka wysoka (%)	Oczekiwane stężenie (ng/ml)	Zmierzone stężenie (ng/ml)	Odzysk (%)
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	nie dotyczy

oczekiwane stężenie = próbka wysoka (%) x wysokie zmierzone stężenie

odzysk (%) = (zmierzone stężenie ÷ oczekiwane stężenie) x 100

Odzysk

Do próbek krwi pełnej niezawierających takrolimisu dodano znane wartości takrolimisu o stężeniach odpowiadających zakresowi testu. Wartości stężeń takrolimisu w tych próbkach zostały sprawdzone przy użyciu chromatografii cieczowej i spektrometrii mas (LC-MS/MS) oraz testu immunologicznego QMS Tacrolimus. Uzyskane wyniki przedstawiono poniżej.

ID próbki	n	Oczekiwane stężenie (ng/ml)	Zmierzone stężenie (ng/ml)	Odzysk (%)
Próbka 1	21	2,7	2,7	101,8
Próbka 2	21	9,8	10,8	109,4
Próbka 3	21	18,0	17,7	98,2
Próbka 4	21	19,8	21,3	107,5
Próbka 5	21	27,0	27,1	100,4

odzysk (%) = (zmierzone stężenie ÷ oczekiwane stężenie) x 100

Precyzja

Precyzję oszacowano przy użyciu puli krwi pełnej pobranej od pacjenta oraz próbek ze znanym stężeniem. Badanie przeprowadzono zgodnie z protokołem CLSI EP5-A2.¹⁵ Każdą próbkę przetestowano w dwóch powtórzeniach na test, dwa razy dziennie przez 20 dni. Obliczono średnią oraz odchylenie standardowe (SD) i procentowy współczynnik zmienności (CV) w ramach pojedynczego testu i całkowite. Poniżej przedstawiono reprezentatywne wyniki.

Próbki	n	Średnia (ng/ml)	W ramach testu		Całkowite	
			SD	%CV	SD	%CV
Próbka A o znanym stężeniu	80	3,0	0,2	4,9%	0,2	7,1%
Próbka B o znanym stężeniu	80	10,0	0,2	1,9%	0,4	3,6%
Próbka C o znanym stężeniu	80	20,9	0,4	1,9%	1,1	5,0%
Próbka A pacjenta	80	3,2	0,1	4,1%	0,2	6,2%
Próbka B pacjenta	80	10,4	0,2	2,2%	0,4	3,6%
Próbka C pacjenta	80	24,2	0,5	2,1%	1,1	4,6%

Porównanie metod

W celu porównania testu immunologicznego QMS Tacrolimus z dwiema metodami chromatografii cieczowej i spektrometrii mas (System 1 i System 2) oraz testem Abbott ARCHITECT[®] przeprowadzono badania korelacji. W badaniach wykorzystano próbki ludzkiej krwi pełnej z EDTA uzyskane od pacjentów po przeszczepie nerki, wątroby i serca, przyjmujących takrolimus. Wszystkie badane próbki zostały pobrane głównie od dorosłych pacjentów, a okres między wykonaniem przeszczepu a pobraniem próbek wynosił zazwyczaj > 9 miesięcy. Badani pacjenci otrzymywali dawki takrolimisu w monoterapii lub w skojarzeniu z innymi lekami immunosupresyjnymi, głównie z mykofenolanem mofetylu (MMF), kwas mykofenolowy (MPA) lub kortykosteroidy. W poniższej tabeli przedstawiono wyniki analizy regresji według Deminga¹⁶ będące porównaniem różnych metod.

Metoda porównawcza	n	Nachylenie krzywej (95% CI*)	Punkt przecięcia z osią (95% CI)	Współczynnik korelacji (R)
LC-MS/MS System 1	383	1,111 (od 1,084 do 1,137)	0,53 (od 0,31 do 0,76)	0,972
LC-MS/MS System 2	232	1,130 (od 1,092 do 1,167)	0,71 (od 0,42 do 1,01)	0,967
Test Abbott ARCHITECT Tacrolimus	208	1,126 (od 1,071 do 1,181)	-0,03 (od -0,63 do 0,56)	0,937

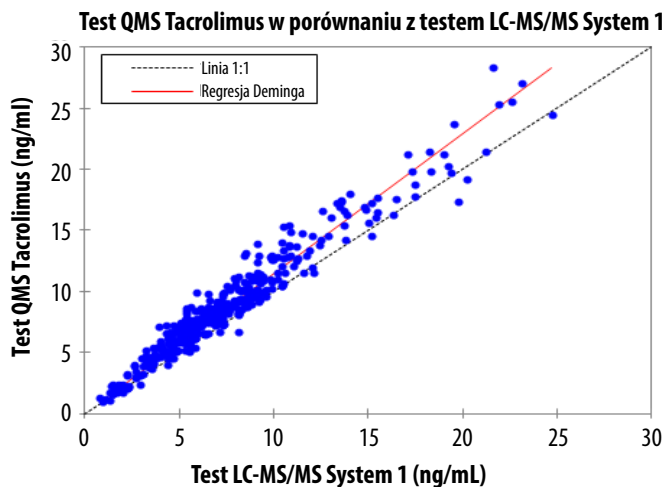
* Przedział ufności (CI, Confidence Interval)

Zakres próbki testu QMS Tacrolimus: od 1,0 do 30,8 ng/ml

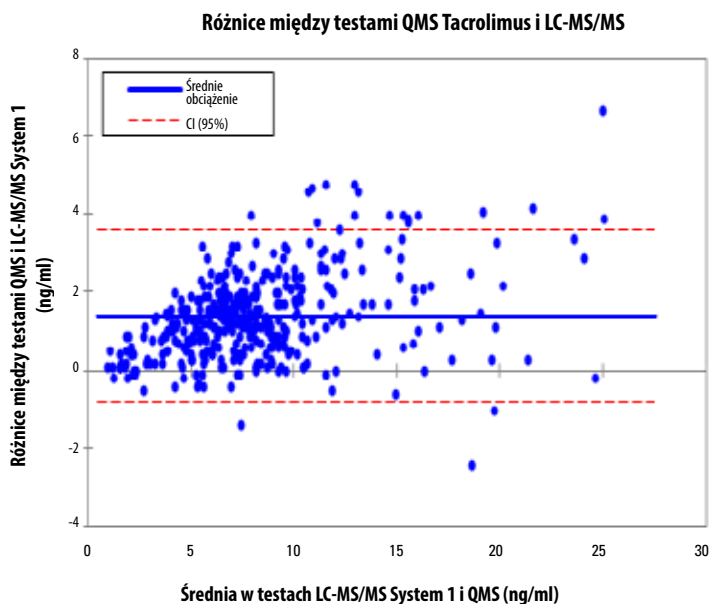
Zakres próbki testów LC-MS/MS: od 0,8 do 29,5 ng/ml

Zakres próbki testu ARCHITECT Tacrolimus: od 2,4 do 28,1 ng/ml

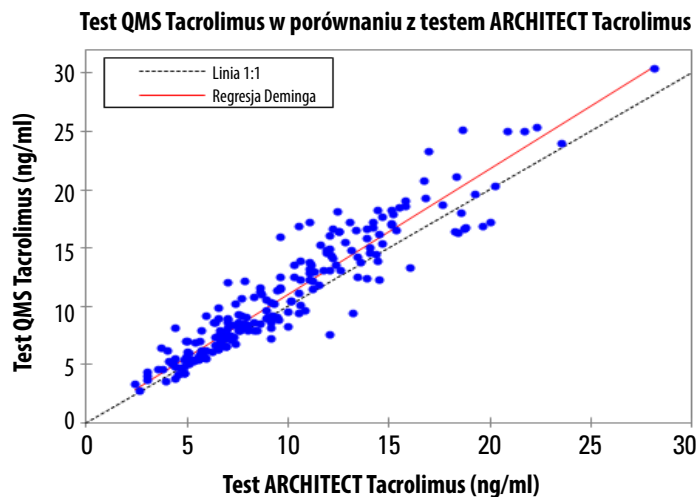
Wykres rozproszenia wyników testu QMS Tacrolimus w porównaniu z metodą LC-MS/MS System 1 dla wszystkich próbek pobranych z przeszczepionych nerek, wątroby i serca.



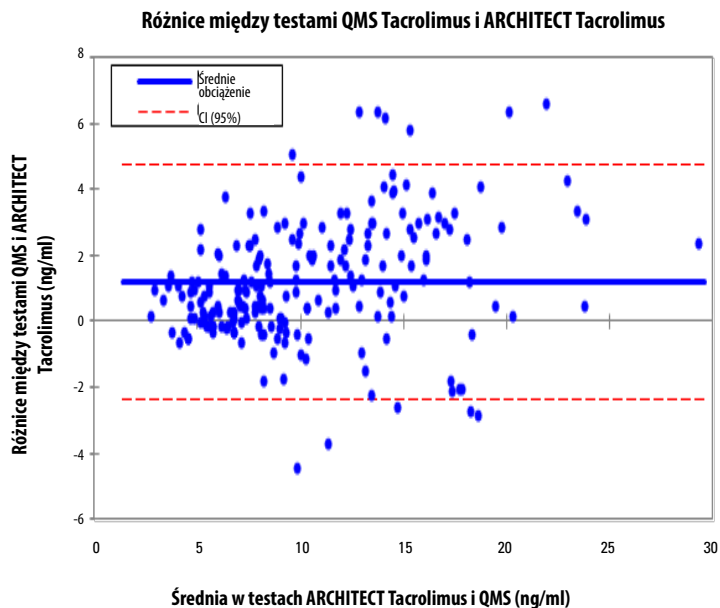
Wykres rozrzutu Blanda-Altmana¹⁷ przedstawiający wyniki testu QMS Tacrolimus w porównaniu z metodą LC-MS/MS System 1 dla wszystkich próbek pobranych z przeszczepionych nerek, wątroby i serca. Średnie obciążenie jest szacowane jako średnia różnica między wynikami testu immunologicznego QMS Tacrolimus a wynikami uzyskanymi w teście LC-MS/MS System 1.



Wykres rozproszenia wyników testu QMS Tacrolimus w porównaniu z testem Abbott ARCHITECT Tacrolimus dla wszystkich próbek pobranych z przeszczepionych nerek i wątroby.



Wykres rozrzutu Blanda-Altmana¹⁷ przedstawiający wyniki testu QMS Tacrolimus w porównaniu z testem Abbott ARCHITECT Tacrolimus dla wszystkich próbek pobranych z przeszczepionych nerek i wątroby. Średnie obciążenie jest szacowane jako średnia różnica między wynikami testu immunologicznego QMS Tacrolimus a wynikami uzyskanymi w teście ARCHITECT Tacrolimus.



Swoistość

Badania swoistości przeprowadzono zgodnie z protokołem CLSI EP7-A2.¹⁸ Reaktywność krzyżową przebadano dla najważniejszych dostępnych metabolitów takrolimusu. Przebadano inne leki rutynowo podawane wraz z takrolimusem w celu ustalenia, czy związki te mają wpływ na ilościowe oznaczenie stężeń takrolimusu w teście immunologicznym QMS Tacrolimus.

Reaktywność krzyżową metabolitów obliczono na podstawie poniższego równania:

$$\text{reaktywność krzyżowa (\%)} = \frac{\text{zmierzone stężenie} - \text{oczekiwane stężenie}}{\text{stężenie związku wchodzącego w reakcję krzyżową}} \times 100$$

Reaktywność krzyżowa z metabolitami takrolimusu

W poniższej tabeli przedstawiono reaktywność krzyżową w teście QMS Tacrolimus dla najważniejszych metabolitów takrolimusu. Testowane związki chemiczne dodawano do próbek ludzkiej krwi pełnej zawierającej dwa stężenia takrolimusu i oznaczano w trzech powtórzeniach. Następnie obliczano procentową wartość reaktywności krzyżowej.

Metabolity takrolimusu	Stężenie metabolitu (ng/ml)	Oczekiwane stężenie (ng/ml)	Zmierzone stężenie (ng/ml)	Odzysk (%)	Reaktywność krzyżowa (%)
M-I (13-0-demethyl)	20	5,8	7,6	131,0	9,2
	20	13,3	14,8	111,3	7,7
M-II (31-0-demethyl)	20	5,7	5,9	103,5	0,7
	20	13,2	13,1	99,2	-0,5
M-III (15-0-demethyl)	20	5,3	6,0	113,2	3,8
	20	12,4	13,0	104,8	2,7
M-IV (12-hydroxy)	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 (13,15-0-didemethyl)	20	5,4	7,3	135,2	9,3
	20	13,4	14,7	109,7	6,7
M-VII (13,15-0-didemethyl) + M-VI (13,31-0-didemethyl)	20	5,4	5,8	107,4	2,2
	20	13,4	13,8	103,0	2,0

Odzysk (%) = (zmierzone stężenie ÷ oczekiwane stężenie) x 100

Zaobserwowana reaktywność krzyżowa z metabolitami takrolimusu M-IV miała wartość ≤ 174,8%. Metabolity takrolimusu M-V i M-VIII nie zostały sprawdzone pod kątem możliwych reakcji krzyżowych.

Próbki pobrane od pacjentów przyjmujących takrolimus zawierały niskie, w porównaniu z lekiem macierzystym, stężenia metabolitów takrolimusu wynoszące około 6% metabolitu M-I, 15% metabolitu M-II, 6% metabolitu M-III i niemal niewykrywalne wartości metabolitu M-IV.^{9,12,19}

Substancje wpływające na wynik testu

Badania wpływu substancji zakłócających przebieg testu przeprowadzono zgodnie z protokołem CLSI EP7-A2.¹⁸ Test immunologiczny QMS Tacrolimus został sprawdzony pod kątem ewentualnego wpływu leków podawanych razem z takrolimusem oraz powszechnie stosowanych leków. Testowane związki chemiczne dodawano do próbek ludzkiej krwi pełnej zawierającej około 5 i 12 ng/ml takrolimusu i przeprowadzono oznaczenia przy użyciu testu immunologicznego QMS Tacrolimus. Odzysk dla stężenia takrolimusu przekraczający 10% błędu wykrywanej wartości został uznany za potwierdzenie wpływu substancji na wynik testu. Związki oraz ich stężenia wymienione w tabeli poniżej nie wywierają wpływu na wynik testu. Średni procentowy odzysk takrolimusu mieścił się w przedziale od 91% do 109%.

Związek chemiczny	Stężenie (ng/ml)	Związek chemiczny	Stężenie (ng/ml)
Acetaminofen	200 000	Siarczan kanamycyny B	100 000
Acykloguanozyna/acyklowir	1 000 000	Ketokonazol	100 000
Allopurinol	50 000	Labetalol	17 100
Siarczan amikacyny	150 000	Lidokaina	100 000
Amfoterycyna B	100 000	Lit	35 000
Ampicylina	100 000	Lowastatyna	20 000
Apresolina/hydralazyna	100 000	Metylprednizolon	100 000
Atenolol	40 000	Metoklopramid	100 000
Azatiopryna	100 000	Minoksidil	60 000
Azytromycyna	5 000	Siarczan morfiny	100 000
Bromokryptyna/2-bromo- α -ergokryptyna	8 000	Kwas mykofenolowy	100 000
Karbamazepina	120 000	N-acetyloprokainamid	120 000

Tabela — ciąg dalszy

Związek chemiczny	Stężenie (ng/ml)	Związek chemiczny	Stężenie (ng/ml)
Cefazolina	150 000	Nadolol	1 200
Ceftriakson	500 000	Naprosken	100 000
Cefalosporyna C	100 000	Nikardypina	500
Chlorpromazyna	50 000	Nikotyna	20 000
Chloramfenikol	250 000	Nifedypina	100 000
Chlordiazepoksyd	20 000	Penicylina G	100 000
Chlorokwina	1 500	Pentobarbital	100 000
Cymetydyna	100 000	Fenobarbital	150 000
Ciprofloksacyna	7 400	Fenytoina	100 000
Klarytromycyna	5 000	Prazosyna	100 000
Klonidyna	100	Prednizolon	100 000
Kolchicyna	90	Prednizon	100 000
Kortyzon	1 200	Prymidon	100 000
Cyklosporyna/cyklosporyna A	10 000	Probucol	600 000
Diazepam	20 000	Prokainamid	100 000
Digitoksyna	100 000	Propoxyfen	4 000
Digoksyna	10 000	Propranolol	40 000
Diltiazem	60 000	Chinidyna	100 000
Dizopiramid	100 000	Ranitydyna	200 000
Erytromycyna	200 000	Ryfampicyna	100 000
Etosuksymid	300 000	Kwas salicylowy	500 000
Ewerolimus	100	Sirolimus (rapamcyna)	300
Famotydyna	10 000	Spektynomycyna	100 000
Flukonazol	100 000	Streptomycyna	100 000
Flucytozyna/5-fluorocytozyna	40 000	Sulfametoksazol	150 000
Furosemid	100 000	Teofilina	250 000
Gancyklowir	1 000 000	Tiklopidyna	150 000
Gemfibrozyl	100 000	Tobramycyna	100 000
Gentamycyna	120 000	Triamteren	100 000
Hydrochlorotiazyd	40 000	Trimetoprim	40 000
Hydrokortyzon	100 000	Kwas walproinowy	500 000
Ibuprofen	400 000	Wankomycyna	100 000
Itrakonazol	100 000	Werapamil	100 000
Siarczan kanamycyny A	100 000		

Odzysk poniższych endogennych substancji potencjalnie wpływających na wynik testu oznaczonych przy użyciu testu immunologicznego QMS Tacrolimus we wskazanych stężeniach mieścił się w przedziale od 92% do 108%.

Substancja potencjalnie wpływająca na wynik testu	Stężenie
Albumina	12 g/dl
Bilirubina	60 mg/dl
Cholesterol	500 mg/dl
Kreatynina	5 mg/dl
Trójglicerydy	1 500 mg/dl
Kwas moczowy	20 mg/dl
Gamma-globulina IgG	12 g/dl
Czynnik reumatoidalny	500 j.m./ml
HAMA*	400 ng/ml
Hematokryt	12%–64%

* HAMA = ludzkie przeciwciała przeciwko antygenom mysim

BIBLIOGRAPHY

1. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomyces 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.

Słowniczek:

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



Producent:
Microgenics Corporation
46500 Kato Road
Fremont, CA 94538 USA
Bezpłatna infolinia w USA: 800-626-0690



Autoryzowany przedstawiciel w UE:
B-R-A-H-M-S GmbH
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, Germany

Obsługa klienta

Bezpłatna infolinia w USA: 1-800-232-3342
Inne kraje: Należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Microgenics.

Bio-Rad Lyphocheck® jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Bio-Rad®.
Materiały kontrolne MORE Diagnostics stanowią własność firmy MORE Diagnostics, Inc.
ARCHITECT jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Abbott Laboratories®.
Wszelkie inne znaki towarowe stanowią własność firmy Thermo Fisher Scientific Inc. i jej spółek zależnych.
© 2018 Thermo Fisher Scientific Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.



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

10015557-12-PL
2021 01

thermo
scientific