

Rx Only

REF 10015556

Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*

Leia atentamente este folheto informativo, referente ao sistema de microesferas quantitativo (QMS, Quantitative Microsphere System), antes da utilização. As instruções do folheto informativo devem ser cumpridas. A fiabilidade dos resultados do ensaio não está garantida, caso haja discrepâncias em relação às instruções deste folheto.

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O imunoensaio QMS Tacrolimus destina-se à determinação quantitativa de tacrolimus em sangue total humano em analisadores automáticos de química clínica. Os resultados obtidos são utilizados como auxiliar na gestão de doentes submetidos a transplantes renais, hepáticos e cardíacos que recebem terapêutica com tacrolimus. Este dispositivo de diagnóstico *in vitro* foi concebido para ser utilizado apenas em laboratórios clínicos.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O tacrolimus (FK506, PROGRAF[®]) é um antibiótico macrolídeo de origem fúngica, *Streptomyces tsukubaensis*, com uma potente acção imunossupressora quando prescrito a doentes submetidos a transplantes renais e hepáticos.¹ O tacrolimus é um inibidor de calcineurina, uma fosfatase que activa a proliferação das células T.^{2,4} Nas células, o tacrolimus liga-se a uma família de proteínas de ligação denominada FKBP (proteínas de ligação FK506), formando um complexo pentamérico que inclui o tacrolimus, a FKBP, as calcineurinas A e B e calmodulina.^{2,5} A formação do pentâmero resulta na inibição da actividade de fosfatase da calcineurina, que é necessária para a activação dos factores de transcrição com vista ao transporte para o núcleo celular. Assim, a expressão genética dos linfócitos T é comprometida, especialmente para citocinas como a IL-2, resultando num efeito imunossupressor nos doentes.²⁻⁵

A distribuição do tacrolimus entre o sangue total e o plasma depende de vários factores, tais como o hematócrito, a concentração do fármaco e a concentração de proteínas plasmáticas. A razão entre a concentração no sangue e no plasma apresentou uma média de 35 (com uma variação de 12 a 67).^{6,7} O tacrolimus é largamente metabolizado pelo sistema do citocromo P-450, principalmente pela CYP3A.⁸⁻¹¹ O fármaco é metabolizado em 8 metabolitos (M-I a M-VIII) através de desmetilação e hidroxilação.¹² Estima-se que a semivida média do tacrolimus *in vivo* seja de 48 horas.⁸⁻¹¹ Foi igualmente descrita uma grande variabilidade nas concentrações de tacrolimus no sangue total de cada doente, bem como entre diferentes doentes.¹³ Recomenda-se uma monitorização do tacrolimus cuidada e atenta.¹⁴

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O imunoensaio QMS Tacrolimus é um imunoensaio turbidimétrico homogéneo melhorado por partículas. O ensaio baseia-se na concorrência por locais de ligação de anticorpos do reagente do anticorpo de tacrolimus entre o fármaco na amostra e o fármaco a cobrir uma micropartícula. O reagente da micropartícula revestida por tacrolimus é rapidamente aglutinado na presença do reagente do anticorpo anti-tacrolimus e na ausência de qualquer fármaco concorrente na amostra. A alteração da taxa de absorvância é medida por fotometria a 700 nm. Quando é adicionada uma amostra contendo tacrolimus, a reacção de aglutinação é parcialmente inibida, abrandando a taxa de alteração de absorvância. É possível obter uma curva clássica de inibição de aglutinação dependente de concentração com a taxa máxima de aglutinação com a concentração mais baixa de tacrolimus ou com a taxa de aglutinação mais baixa e a concentração mais elevada de tacrolimus.

REAGENTES

Kit de reagentes

O QMS Tacrolimus, **REF** 10015556, é fornecido sob a forma de um kit líquido de três reagentes pronto a utilizar que contém:

REAGENT 1 1 x 18 ml

REAGENT 2 1 x 12 ml

EXT Reagente de extracção 1 x 50 ml (solução activa necessária, ver p. 2, Preparação da solução de extracção)

Ingredientes reativos

INGRED	Ingrediente	Concentração
REAGENT 1	Anticorpo monoclonal anti-tacrolimus (coelho) Azida de sódio	<1,0% 0,09%
REAGENT 2	Micropartículas revestidas de tacrolimus Azida de sódio	<0,3% 0,09%
EXT	Azida de sódio	0,09%

MANUSEAMENTO E ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES

- **REAGENT 1**, **REAGENT 2**, e **EXT** (Reagente de Extracção) pronto a utilizar
- Antes de utilizar, inverta diversas vezes, evitando a formação de bolhas.
- Retire as bolhas de ar, se presentes no cartucho do reagente. Em alternativa, deixe o reagente repousar à temperatura de armazenamento adequada para permitir que as bolhas dissipem. Para minimizar a redução de volume, não utilize uma pipeta de transferência para retirar as bolhas.

- Quando o cartucho do reagente **REAGENT 1** ou o **REAGENT 2** cartucho ficar vazio, substitua ambos os cartuchos e verifique a calibração com um mínimo de uma amostra para cada nível de controlo, segundo os requisitos de Controlo de qualidade estabelecidos para o seu laboratório. Se os resultados de controlo saírem dos limites aceitáveis, pode ser necessária a recalibração.
- Consulte, na folha de Parâmetros do sistema de ensaios específica do analisador, informações específicas do sistema.
- No caso de derrame accidental, limpe e elimine o material de acordo com os Procedimentos Operativos Normalizados (PON) do laboratório e os regulamentos locais e estatais.
- No caso de receber uma embalagem danificada, contacte o representante de apoio ao cliente (consulte o verso deste folheto).



⚠ CUIDADO: As bolhas do reagente podem interferir com a deteção adequada do nível do reagente no cartucho, levando a uma aspiração insuficiente de reagente, que pode alterar os resultados.

 Os reagentes por abrir são estáveis até à data de validade se armazenados a 2 - 8 °C.

Não congele reagentes nem os exponha a temperaturas superiores a 32 °C.



PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

- Apenas para utilização em diagnóstico *In Vitro*. Utilize as precauções habituais referentes à manipulação de todos os reagentes laboratoriais.
- Não misture materiais com diferentes números de lote do kit.
- Não utilize os kits de reagente depois do fim do prazo de validade.

PERIGO: O Imunoensaio QMS Tacrolimus contém ≤ 3,0% de soro-albumina humano (HSA) e ≤ 1,0% de anticorpo específico contra o fármaco (coelho).

O reagente de extracção QMS Tacrolimus contém ≤ 9,0% de sulfato de zinco (ZnSO₄).

H317 - Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.

H334 - Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia, de asma ou dificuldades respiratórias.

H318 - Provoca danos oculares graves.

H411 - Tóxico para a vida aquática com efeitos duradouros.

Evitar respirar névoas ou vapores. A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho. Usar luvas de protecção/protecção ocular/protecção facial. Em caso de ventilação inadequada, usar protecção respiratória. Se entrar em contacto com a pele: lavar com sabão e água abundantes. EM CASO DE INALAÇÃO: em caso de dificuldade respiratória, retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração. Em caso de irritação cutânea ou prurido: consultar um médico. Em caso de sintomas respiratórios: contactar um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Lavar a roupa contaminada antes de a voltar a usar. Eliminar o conteúdo/recipiente em local conforme os regulamentos locais/regionais/nacionais/internacionais.

Evitar libertação para o meio ambiente. Usar luvas de protecção/protecção ocular/protecção facial. EM CASO DE CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se as usar e for fácil fazê-lo, remover as lentes de contacto. Continuar a enxaguar. Contactar imediatamente um Centro de Informação Antivenenos ou um médico. Recolher derrames. Eliminar o conteúdo/recipiente em local conforme os regulamentos locais/regionais/nacionais/internacionais.



⚠ CUIDADO: Os materiais de origem humana foram testados relativamente ao VIH 1 e 2, e aos vírus da hepatite B e hepatite C, por um método aprovado pela FDA, tendo sido obtidos resultados negativos. No entanto, como nenhum método de teste pode excluir de forma absoluta o possível risco de infecção, o material deve ser manipulado de forma tão cuidadosa quanto uma amostra de um doente. Em caso de exposição, deverá cumprir as directivas das autoridades de saúde responsáveis.

Os reagentes utilizados nos componentes do ensaio contêm ≤ 0,09% de azida de sódio. Evite o contacto com a pele e membranas mucosas. Consulte a ficha de segurança para ver precauções adicionais, instruções de manuseamento e o tratamento para exposições accidentais.

RECOLHA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

- Podem ser apenas utilizadas amostras de sangue total em tubos EDTA. Siga as instruções de processamento do fabricante para todos os tubos de recolha. Deve-se tomar todas as precauções para preservar a integridade da amostra desde o momento da recolha até à execução da análise. As amostras devem ser etiquetadas com a data e hora da recolha de sangue e da última toma de medicamentos.
- As amostras devem ser fechadas e analisadas no prazo de 7 dias, quando armazenadas a 2-8 °C ou no prazo de 6 meses quando armazenadas a ≤ -20 °C.^{6,10-11} Evite a congelação e descongelação repetida. Não provoque a formação de espuma das amostras.

PROCEDIMENTO

Material fornecido

- Kit de reagente QMS Tacrolímus, [REF] 10015556

Materiais necessários mas não fornecidos

- Calibradores QMS Tacrolímus, [REF] 10015573, CAL A: 1 x 4 ml, CAL B-F: 1 x 2 ml cada
- Produtos de controlo de qualidade
Materiais recomendados:
 - Controlos Rap/Tac/CsA da MORE Diagnostics,
BAIXO, 280-Q: 4 x 4 ml cada
MÉDIO, 280-1: 4 x 4 ml cada
ALTO, 280-2: 4 x 4 ml cada
 - Para outros produtos de controlo de qualidade comercialmente disponíveis, contacte a Assistência Técnica da Thermo Fisher Scientific
- Metanol, grau HPLC (pureza de $\geq 99,8\%$)
- Tubo de microcentrifugação de fundo redondo
- Analisador químico clínico automatizado

Preparação da amostra

Nota: Siga as instruções do folheto informativo específicas do vendedor e as recomendações de manuseamento, caso sejam fornecidas, relativas aos controlos.

Deixe os calibradores e as amostras dos doentes atingirem a temperatura ambiente antes da extracção. Os calibradores misture durante um mínimo de 15 a 20 minutos e as amostras do doente deve ser devidamente misturadas a temperatura ambiente antes da utilização. Misture bem os calibradores e as amostras do doente, invertendo suavemente (é preferível a utilização de um agitador). Evite a formação de bolhas.

Preparação da solução de extracção

1. Adicione exactamente 10 ml de Reagente de extracção à temperatura ambiente a um frasco limpo, seco e hermeticamente fechado.
2. Adicione exactamente 40 ml de Metanol Grau HPLC ($\geq 99,8\%$ de pureza) ao frasco e misture suavemente. Etiquete como "Solução de extracção de trabalho Tacrolímus". Registe na etiqueta a data actual e a data de validade (2 semanas a partir da data de preparação). Conserve à temperatura ambiente.

Procedimento de extracção para amostras, calibradores e controlos

PARA OS MELHORES RESULTADOS, SIGA PRECISAMENTE OS PASSOS ABAIXO. OS EXTRATOS DEVEM SER EXECUTADOS IMEDIATAMENTE APÓS A EXTRAÇÃO.

1. Prepare e etiquete tubos de microcentrifugação de fundo redondo para a extracção de amostras, calibradores e controlos. Prepare um tubo de microcentrifugação para cada amostra.
2. Utilize uma pipeta para medir com precisão 200 μ L dos materiais de amostra, calibrador ou controlo para o tubo de microcentrifugação etiquetado. Aspire a amostra com a pipeta, limpe suavemente a ponta da mesma na extremidade do frasco da amostra para remover qualquer excesso de amostra e coloque a amostra dentro da parede do tubo de microcentrifugação.
Nota: Verifique a ponta da pipeta para garantir que não há bolhas de ar. O ar na ponta é uma potencial fonte de imprecisão.
3. Utilize a pipeta para medir com precisão 200 μ L da solução de extracção para o tubo de microcentrifugação. Ao preparar várias amostras, recomenda-se uma nova pipeta para a aspiração e colocação da solução de extracção. Remova todas as bolhas de ar na ponta da pipeta antes de colocar a solução de extracção.
4. Imediatamente, tape e submeta a um agitador de vórtex o tubo de microcentrifugação a uma velocidade máxima de 15-30 segundos. Inspeccione cada um dos tubos para um mistura homogénea. Caso seja detectada uma mistura não homogénea, desloque a porção não misturada e volta a submeter a um agitador de vórtex.
5. Deixe a mistura respirar no tubo de microcentrifugação à temperatura ambiente durante 5-7 minutos.
6. Coloque o tubo de microcentrifugação numa centrífuga e centrifugue durante 5 minutos a RPM equivalentes a 15.000 – 16.000 xg.
7. Decante o sobrenadante para um copo de amostra (evite a formação de bolhas) e imediatamente execute a medição de modo a minimizar a evaporação da amostra. Não bata no copo de modo a soltar a última gota de tal maneira que perturba a bolinha.
8. Elimine os extratos após a análise. Para repetir os testes às amostras são necessárias novas extracções.

Nota: Para mais dicas e recomendações dos passos de extracção de amostra para o Imunoensaio QMS Tacrolímus contacte a Assistência Técnica da Thermo Fisher Scientific.

Procedimento do ensaio

Para obter uma descrição detalhada de como executar e calibrar um ensaio, consulte o manual de funcionamento específico do aparelho.

Procedimento de diluição das amostras

Utilize QMS Tacrolímus CAL A (0.0 ng/ml) para diluir manualmente as amostras fora da linearidade do ensaio.

Protocolo de diluição manual

É possível efetuar uma diluição manual das amostras de doentes com concentrações de tacrolímus declaradas superiores a 30 ng/ml fazendo uma diluição 1:1 da amostra com o QMS Tacrolímus CAL A (0,0 ng/ml) antes de extrair a amostra. A diluição deve ser efetuada de forma que o resultado do teste diluído seja superior à sensibilidade do ensaio de 1 ng/ml. A concentração declarada deve ser multiplicada pelo fator de diluição manual para obter a concentração final da amostra.

Concentração da amostra final = Concentração declarada x Fator de diluição manual

Fator de diluição manual = (Volume da amostra + Volume de CAL A) ÷ Volume da amostra

CALIBRAÇÃO

O Imunoensaio QMS Tacrolímus deve ser calibrado com um procedimento de calibração completo (6 pontos). Para uma calibração completa, teste os Calibradores QMS Tacrolímus A, B, C, D, E e F. Com o Imunoensaio QMS Tacrolímus, deve-se apenas utilizar Calibradores QMS Tacrolímus. Não é possível obter a determinação quantitativa precisa de tacrolímus se não for utilizado o conjunto de calibradores QMS Tacrolímus, [REF] 10015573, na calibração do Imunoensaio QMS Tacrolímus.

A calibração é necessária com cada novo número de lote. Verifique a curva de calibração com um mínimo de uma amostra de cada nível de controlos, segundo os requisitos de Controlo de qualidade estabelecidos para o seu laboratório. Se os resultados de controlo saírem dos limites aceitáveis, devem ser tomadas ações corretivas.

Frequência da calibração

A recalibração é recomendada

- Após a mudança do lote do calibrador ou do reagente (kit)
- Após a manutenção mensal do instrumento
- Conforme necessário, no seguimento de procedimentos de controlo de qualidade

CONTROLO DE QUALIDADE

Todos os requisitos de controlo de qualidade deverão ser realizados em conformidade com as regulamentações locais, estatais e/ou federais ou requisitos de acreditação.

Conforme adequado, consulte os Procedimentos de Funcionamento Padrão e/ou o Plano de Garantia de Qualidade do seu laboratório para saber quais os requisitos de controlo de qualidade adicionais e potenciais ações corretivas.

Requisitos de controlo recomendados para o Imunoensaio QMS Tacrolímus:

- Sempre que as amostras do doente são extraídas e analisadas, deve-se executar no mínimo uma amostra de cada nível de controlos.
- Se for necessária uma monitorização de controlo mais frequente, siga os procedimentos de Controlo de Qualidade estabelecidos para o seu laboratório.
- Todos os requisitos de controlo de qualidade devem ser realizados em conformidade com as diretrizes locais, estatais e/ou federais.
- Se os resultados do controlo de qualidade não estiverem dentro de um intervalo aceitável definido pelo seu laboratório, os valores dos doentes podem ser suspeitos e não devem ser comunicados. Devem ser tomadas ações correctivas.

RESULTADOS

As unidades de resultado para o Imunoensaio QMS Tacrolímus são declaradas em ng/ml.

Comunicar resultados: Os laboratórios devem comunicar que os resultados são obtidos pelo método QMS Tacrolímus.

Códigos de erro do resultado:

Alguns resultados podem conter Códigos de erro do resultado. Consulte o manual de funcionamento específico do aparelho para ver a descrição dos códigos de erro.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- As concentrações de tacrolímus numa dada amostra determinada com ensaios de diferentes fabricantes podem variar devido a diferenças nos métodos de ensaios e na especificidade do reagente. Recomenda-se a monitorização consistente de um ensaio.
- **Os imunoensaios são não específicos e têm reatividade cruzada com metabolitos. Porque estes imunoensaios podem atribuir um valor exagerado à concentração de tacrolímus (ver a secção Comparação do método). Quando a eliminação do tacrolímus é comprometida, os metabolitos podem acumular em demasia originando uma maior atribuição de um valor exagerado. Nesses casos, deve-se considerar a utilização de um ensaio específico (p. ex. o método cromatográfico).**
- Ocorrem anticorpos heterófilos com interferência a uma frequência mais baixa na população. Estes anticorpos podem originar resultados erróneos (incluindo resultados erroneamente baixos causadas pela aglutinação do reagente das micropartículas).

- As descobertas dos testes devem sempre ser avaliadas em conjunto com o historial médico do doente, exames clínicos e outras descobertas. Deve-se executar testes adicionais para confirmar os resultados quando estes são inconsistentes com as evidências clínicas.
- Consulte o folheto PROGRAF para mais informações sobre os efeitos dos fármacos administrados em concomitância e dos fármacos que podem aumentar ou diminuir as concentrações de tacrolímus.¹⁴

VALORES ESPERADOS

O intervalo terapêutico óptimo para o tacrolímus no sangue total não foi ainda estabelecido para este ensaio. Os intervalos terapêuticos para tacrolímus podem variar de acordo com os factores clínicos e da metodologia aplicada.

Dada a heterogeneidade do estado clínico do doente, os médicos devem estabelecer um intervalo terapêutico desejado com base na sua própria experiência, bem como nas necessidades clínicas individuais de cada doente. As alterações no regime de tratamento não devem ser baseadas apenas nos valores de tacrolímus. As diferenças na sensibilidade aos efeitos imunossupressores e nefrotóxicos do tacrolímus, coadministração de outros imunossupressores, tipo de transplante, tempo após o transplante e diversos outros factores contribuem para os diferentes requisitos para a optimização dos níveis de sangue do tacrolímus.

Os intervalos óptimos podem variar de acordo com o teste utilizado, devendo por isso ser estabelecidos para cada teste comercial. Os valores obtidos com diferentes métodos de ensaio não podem ser utilizados alternadamente, devido às diferenças entre os métodos e à reatividade, nem devem ser aplicados factores de correção. Recomenda-se a utilização consistente de um ensaio por cada doente individual.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DO DESEMPENHO

São apresentados abaixo os resultados de desempenho representativos obtidos num analisador químico clínico automatizado disponível no mercado que aplica a análise quantitativa turbidimétrica. Excepto quando estiver indicado, todos os ensaios foram realizados de acordo com o procedimento de ensaio descrito no presente documento e usando o analisador Beckman AU680. Os resultados obtidos em laboratórios individuais poderão diferir destes dados. Para obter mais dados sobre o desempenho específico do analisador, consulte o protocolo de aplicação específico do analisador ou contacte a Assistência Técnica da Thermo Fisher Scientific para obter ajuda.

Intervalo relatável

O intervalo relatável para o Imunoensaio QMS Tacrolímus Immunoassay situa-se entre 1 ng/ml (valor relatável mínimo com base na Sensibilidade Funcional) e 30 ng/ml de tacrolímus.

Sensibilidade funcional (Limite de quantificação)

A sensibilidade funcional representa a mais baixa concentração de tacrolímus que pode ser medida com uma precisão entre ensaios a 20% CV. O estudo foi concebido utilizando amostras de sangue total com adição de tacrolímus variando de 0,5 a 5,0 ng/ml por uma medição por vez, duas vezes por dia, durante 30 dias com um total de 60 dados. No limite de confiança superior de 95%, o LoQ foi calculado para ser 0,9 ng/ml, que suporta o limite inferior do ensaio de 1,0 ng/ml. A percentagem de recuperação observada a 0,9 ng/ml é de 102,0%.

Linearidade da diluição

Um estudo de linearidade foi realizado diluindo uma amostra de tacrolímus de alta concentração com o Calibrador A QMS Tacrolímus para concentrações distribuídas uniformemente pelo intervalo do ensaio. A percentagem de recuperação foi determinada dividindo a concentração medida de tacrolímus pela concentração esperada. As concentrações esperadas foram determinadas, utilizando a concentração elevada testada multiplicada por um factor de diluição.

% da amostra elevada	Concentração esperada (ng/ml)	Concentração medida (ng/ml)	Recuperação (%)
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%

Continuação da tabela

% da amostra elevada	Concentração esperada (ng/ml)	Concentração medida (ng/ml)	Recuperação (%)
2,8%	0,8	0,8	99,6%
0,0%	0,0	0,0	N/A

Concentração esperada = % de amostra elevada x Concentração de medição elevada

Recuperação (%) = (Concentração medida ÷ Concentração esperada) x 100

Recuperação

As amostras de sangue total negativo foram adicionadas com concentrações conhecidas de tacrolímus com concentrações em todo o intervalo do ensaio. As concentrações de tacrolímus destas amostras foram verificadas por um LC-MS/MS e testadas com o Imunoensaio QMS Tacrolímus. Os resultados são apresentados abaixo.

ID da amostra	n	Concentração esperada (ng/ml)	Concentração medida (ng/ml)	Recuperação (%)
Amostra 1	21	2,7	2,7	101,8
Amostra 2	21	9,8	10,8	109,4
Amostra 3	21	18,0	17,7	98,2
Amostra 4	21	19,8	21,3	107,5
Amostra 5	21	27,0	27,1	100,4

Recuperação (%) = (Concentração medida ÷ Concentração esperada) x 100

Precisão

A precisão foi avaliada utilizando amostras conjuntas adicionadas com sangue total. O estudo foi conduzido tal como descrito no protocolo CLSI EP5-A2.¹⁵ Cada uma das amostras foi analisada em duplicado de cada vez, duas vezes por dia durante 20 dias. Foram calculados os DP e CV (%) médios na mesma determinação e totais. Os resultados representativos são apresentados abaixo.

Amostras	n	Média (ng/ml)	Na mesma determinação		Determinação total	
			DP	%CV	DP	%CV
Amostra adicionada A	80	3,0	0,2	4,9%	0,2	7,1%
Amostra adicionada B	80	10,0	0,2	1,9%	0,4	3,6%
Amostra adicionada C	80	20,9	0,4	1,9%	1,1	5,0%
Amostra de doente A	80	3,2	0,1	4,1%	0,2	6,2%
Amostra de doente B	80	10,4	0,2	2,2%	0,4	3,6%
Amostra de doente C	80	24,2	0,5	2,1%	1,1	4,6%

Comparação do método

Foram realizados estudos de correlação para comparar o Imunoensaio QMS Tacrolímus a dois métodos LC-MS/MS (Sistema 1 e Sistema 2) e o Abbott ARCHITECT® Tacrolímus Assay. Os estudos utilizaram amostras EDTA de sangue total humano obtidas de doentes transplantados de rim, fígado e coração que recebem terapêutica com tacrolímus. Todas as amostras testadas eram amostras ao nível mais baixo de, principalmente, pacientes adultos com tempo após o transplante para as amostras de, geralmente, > 9 meses. Os pacientes testados receberam tratamentos medicamentosos de apenas Tacrolímus ou em concomitância com outros imunossupressores, principalmente Micofenolato de mofetil (MMF), Ácido micofenólico (MPA) ou Corticosteróides. São apresentados no quadro abaixo os resultados da análise de regressão Deming¹⁶ entre os diferentes métodos.

Método comparativo	n	Inclinação (95% CI*)	Interceção (95% CI)	Coefficiente de correlação (R)
Sistema LC-MS/MS 1	383	1,111 (1,084 a 1,137)	0,53 (0,31 a 0,76)	0,972
Sistema LC-MS/MS 2	232	1,130 (1,092 a 1,167)	0,71 (0,42 a 1,01)	0,967
Ensaio Abbott ARCHITECT Tacrolímus	208	1,126 (1,071 a 1,181)	-0,03 (-0,63 a 0,56)	0,937

*Intervalo de confiança (CI)

Intervalo da amostra QMS Tacrolímus: 1,0 a 30,8 ng/ml

Intervalo da amostra LC-MS/MS: 0,8 a 29,5 ng/ml

Intervalo da amostra ARCHITECT Tacrolímus: 2,4 a 28,1 ng/ml

Gráfico de dispersão para os resultados do QMS Tacrolimus vs LC-MS/MS System 1 para amostras combinadas de transplantes de fígado, rim e coração.

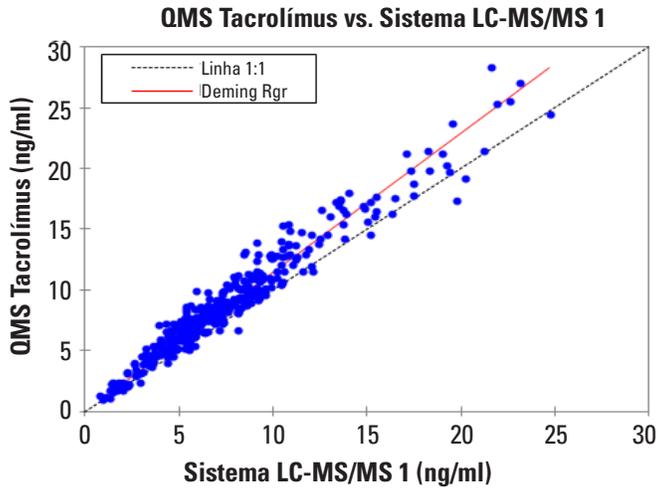
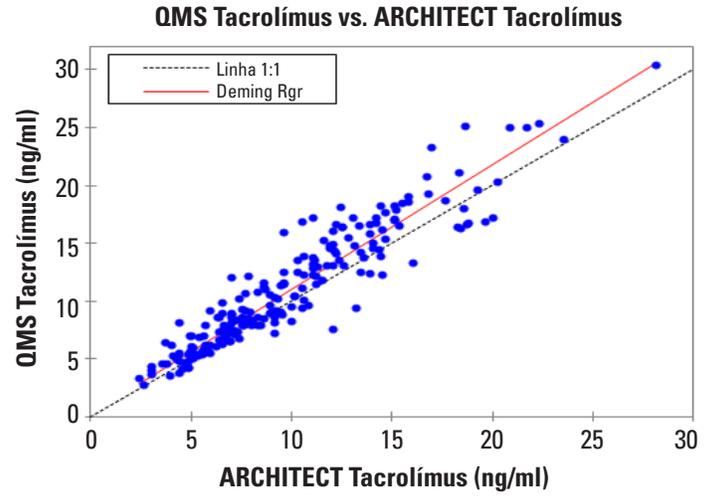
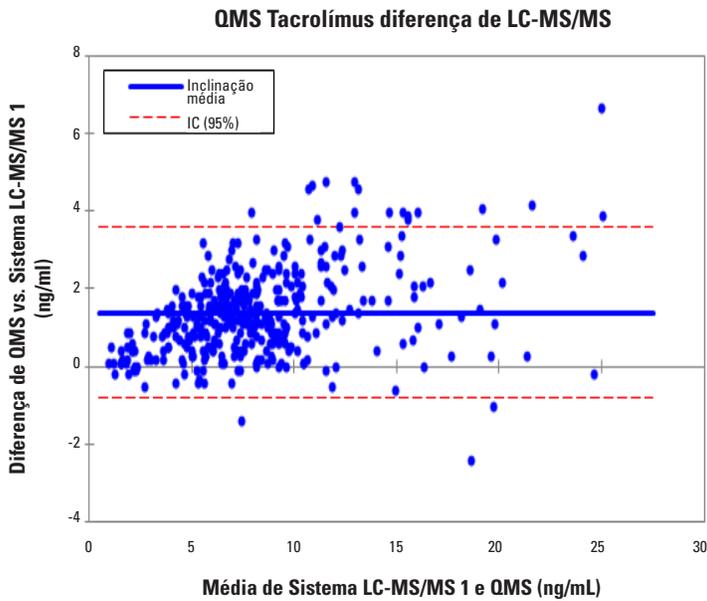


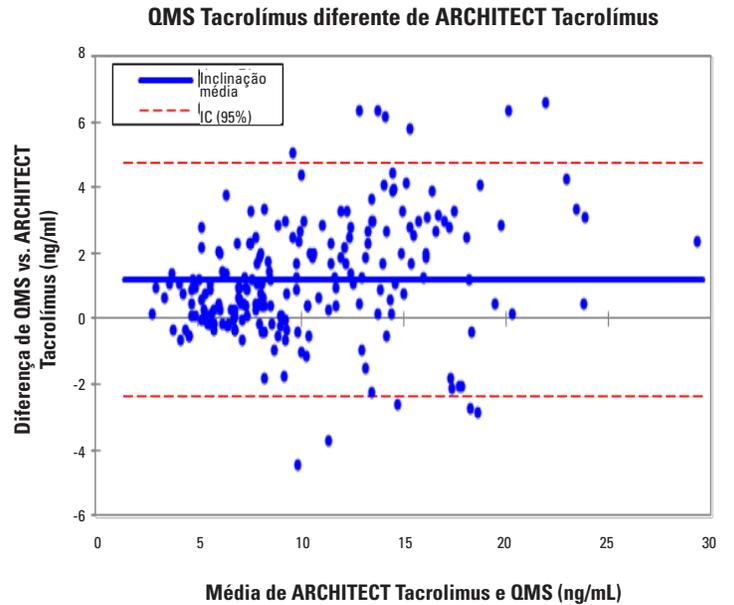
Gráfico de dispersão para os resultados do QMS Tacrolimus vs Abbott ARCHITECT Tacrolimus para amostras combinadas de transplantes de fígado e rim.



Método de Bland-Altman¹⁷ para os resultados do QMS Tacrolimus vs LC-MS/MS System 1 para amostras combinadas de transplantes de fígado, rim e coração. O Mean Bias é calculado como a diferença média entre os resultados do Imunoensaio QMS Tacrolimus e do LC-MS/MS System 1.



Método de Bland-Altman¹⁷ para os resultados do QMS Tacrolimus vs ensaio Abbott ARCHITECT Tacrolimus para amostras combinadas de transplantes de fígado e rim. O Mean Bias é calculado como a diferença média entre os resultados do Imunoensaio QMS Tacrolimus e do ARCHITECT Tacrolimus.



Especificidade

Foram efetuados estudos de especificidade com o protocolo CLSI EP7-A2 como diretiva.¹⁸ Foi testada a reatividade cruzada relativamente aos principais metabolitos disponíveis do tacrolímus. Também foram testados outros medicamentos administrados por rotina com o tacrolímus para determinar se estes compostos afetam a quantificação das concentrações de tacrolímus com o Imunoensaio QMS Tacrolímus.

A reatividade cruzada dos metabolitos foi calculada com a fórmula:

$$\text{Reactividade cruzada (\%)} = \frac{\text{Concentração medida} - \text{Concentração esperada}}{\text{Concentração do reagente cruzado}} \times 100$$

Reatividade cruzada com metabolitos do tacrolímus.

É apresentada na seguinte tabela a reatividade cruzada do Imunoensaio QMS Tacrolímus relativamente aos principais metabolitos do tacrolímus. Os compostos testados foram adicionados a amostras de sangue humano total com duas concentrações de fármaco de tacrolímus e testados em réplicas de três. Foi calculada a reatividade cruzada percentual.

Metabolitos de tacrolímus	Concentração do metabolito (ng/ml)	Concentração esperada (ng/ml)	Concentração medida (ng/ml)	Recuperação (%)	Reatividade cruzada (%)
M-I (13-O-dimetil)	20	5,8	7,6	131,0	9,2
	20	13,3	14,8	111,3	7,7
M-II (31-O-dimetil)	20	5,7	5,9	103,5	0,7
	20	13,2	13,1	99,2	-0,5
M-III (15-O-dimetil)	20	5,3	6,0	113,2	3,8
	20	12,4	13,0	104,8	2,7
M-IV (12-hidróxi)	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-didimetil)	20	5,4	7,3	135,2	9,3
	20	13,4	14,7	109,7	6,7
M-VII (13,15-O-didimetil) + M-VI (13,31-O-didimetil)	20	5,4	5,8	107,4	2,2
	20	13,4	13,8	103,0	2,0

Recuperação (%) = (Concentração medida ÷ Concentração esperada) x 100

A reatividade cruzada observada do Metabolito de Tacrolímus M-IV foi de ≤ 174,8%. O Metabolito de Tacrolímus M-V e M-VIII não foi avaliado para determinar uma possível reatividade cruzada.

As amostras do paciente tacrolímus contêm baixas concentrações de metabolitos de tacrolímus em comparação com o fármaco intacto, com cerca de 6% de M-I, 15% de M-II, 6% de M-III e uma quantidade de M-IV quase indetetável.^{9,12,19}

Substâncias com interferência

Foram efetuados estudos de interferência utilizando o protocolo CLSI EP7-A2 como diretiva.¹⁸ O Imunoensaio QMS Tacrolímus foi testado com fármacos administrados em concomitância com o tacrolímus e fármacos comuns para testar potenciais interferências. Os compostos testados foram adicionados a amostras de sangue total com cerca de 5 e 12 ng/ml de fármaco de tacrolímus e testados com o Imunoensaio QMS Tacrolímus. A recuperação da concentração de tacrolímus superior a 10% de erro foi considerada como tendo uma interferência no ensaio. Os compostos e as concentrações testadas apresentados na tabela abaixo não apresentaram nenhuma interferência com o ensaio. A percentagem média de recuperação do tacrolímus varia de 91% a 109%.

Composto	recuperada (ng/ml)	Composto	recuperada (ng/ml)
Acetaminofeno	200.000	Sulfato de canamicina B	100.000
Acicloguanosina / Aciclovir	1.000.000	Cetoconazol	100.000
Alopurinol	50.000	Labetalol	17.100
Sulfato de amicacina	150.000	Lidocaína	100.000
Anfotericina B	100.000	Lítio	35.000
Ampicilina	100.000	Lovastatina	20.000
Apresolina / Hidralazina	100.000	Metilprednisolona	100.000
Atenolol	40.000	Metoclopramida	100.000
Azatioprina	100.000	Minoxidil	60.000
Azitromicina	5.000	Sulfato de morfina	100.000
Bromocriptina / 2-Bromo- α -ergocriptina	8.000	Ácido micofenólico	100.000
Carbamazepina	120.000	N-acetilprocainamida	120.000

Continuação da tabela

Composto	recuperada (ng/ml)	Composto	recuperada (ng/ml)
Cefazolina	150.000	Nadolol	1.200
Ceftriaxona	500.000	Naproxeno	100.000
Cefalosporina C	100.000	Nicardipina	500
Clorpromazina	50.000	Nicotina	20.000
Cloranfenicol	250.000	Nifedipina	100.000
Clordiazepóxido	20.000	Penicilina G	100.000
Cloroquino	1.500	Pentobarbital	100.000
Cimetidina	100.000	Fenobarbital	150.000
Ciprofloxacina	7.400	Fenitoína	100.000
Clarithromicina	5.000	Prazosina	100.000
Clonidina	100	Prednisolona	100.000
Colquicina	90	Prednisona	100.000
Cortisona	1.200	Primidona	100.000
Ciclosporina / Ciclosporina A	10.000	Probucol	600.000
Diazepam	20.000	Procainamida	100.000
Digitoxina	100.000	Propoxifeno	4.000
Digoxina	10.000	Propranolol	40.000
Diltiazem	60.000	Quinidina	100.000
Disopiramida	100.000	Ranitidina	200.000
Eritromicina	200.000	Rifampina / Rifampicina	100.000
Etossuximida	300.000	Ácido salicílico	500.000
Everolímus	100	Sirolímus (Rapamicina)	300
Famotidina	10.000	Espectinomicina	100.000
Fluconazol	100.000	Estreptomicina	100.000
Flucitossina / 5-Fluorocitosina	40.000	Sulfametoxazol	150.000
Furosemida	100.000	Teofilina	250.000
Ganciclovir	1.000.000	Ticlopidina	150.000
Gemfibrozil	100.000	Tobramicina	100.000
Gentamicina	120.000	Triamtereno	100.000
Hydroclorotiazida	40.000	Trimetoprim	40.000
Hydrocortisol	100.000	Ácido valproico	500.000
Ibuprofeno	400.000	Vancomicina	100.000
Itraconazol	100.000	Verapamil	100.000
Sulfato de canamicina A	100.000		

As seguintes substâncias endógenas com interferência potencial nas concentrações indicadas exibiram 92% a 108% de recuperação.

Substância com interferência potencial	Concentração
Albumina	12 g/dl
Bilirrubina	60 mg/dl
Colesterol	500 mg/dl
Creatinina	5 mg/dl
Triglicéridos	1.500 mg/dl
Ácido úrico	20 mg/dl
IgG Gama globulina	12 g/dl
Fator reumatóide	500 IU/ml
HAMA*	400 ng/ml
Hematócrito	12% - 64%

*HAMA = anticorpos humanos antirratro

BIBLIOGRAPHY

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.

Glossário:

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



Fabricante:

Microgenics Corporation
46500 Kato Road
Fremont, CA 94538 USA
Chamada gratuita dos EUA: 800-626-0690



Representante autorizado na UE:

B-R-A-H-M-S GmbH
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, Germany

Assistência técnica

Chamada gratuita dos EUA: 1-800-232-3342
Outros países: Contacte o seu representante local da Microgenics.

Bio-Rad Lyphocheck® é uma marca registada da Bio-Rad®.
MORE Diagnostics Controls é propriedade de MORE Diagnostics, Inc.
ARCHITECT é uma marca comercial registada da Abbott Laboratories®.
Todas as outras marcas comerciais são propriedade da Thermo Fisher Scientific Inc. e respetivas filiais.
© 2018 Thermo Fisher Scientific Inc. Todos os direitos reservados.



Poderá obter actualizações do folheto em:
www.thermofisher.com/diagnostics

10015557-15-PT
2023 12

thermo
scientific