

Rx Only

REF 10015556

Len na diagnostické použitie *in vitro*

Pred použitím systému Quantitative Microsphere System (QMS) si pozorne prečítajte tento príbalový leták. Návod uvedený v príbalovom letáku je potrebné dodržiavať. Ak dôjde k akýmkoľvek odchýlkam od návodu uvedeného v tomto príbalovom letáku, nemožno zaručiť presnosť výsledkov testu.

PLÁNOVANÉ POUŽITIE

Takrolimový imunologický test QMS je určený na kvantitatívne stanovenie takrolimu v plnej ľudskej krvi pomocou automatických klinických chemických analyzátorov. Získané výsledky sa používajú ako pomôcka pri manažmente pacientov po transplantácii obličky, pečene alebo srdca, ktorí dostávajú takrolimovú liečbu. Táto diagnostická pomôcka *in vitro* je určená len na klinické laboratórne použitie.

SÚHRN A VYSVETLENIE TESTU

Takrolimus (FK506, PROGRAF[®]) je makrolidové antibiotikum plesňového pôvodu, *Streptomyces tsukubaensis*, s potentnou imunosupresívnou funkciou, ktoré sa predpisuje pacientom po transplantácii obličky a pečene.¹ Takrolimus je inhibítor kalcineurínu, čo je prírodná fosfatáza, a aktivuje proliferáciu T buniek.²⁻⁴ Pri bunkových udalostiach takrolimus viaže rodinu väzbových proteínov nazývaných FKBP (väzbové proteíny FK506) a následne vytvára pentamérový komplex vrátane takrolimu, FKBP, kalcineurínu A a B a kalmodulínu.²⁻⁵ Vytvorenie pentaméru vedie k inhibícii fosfatázovej aktivity kalcineurínu, ktorá je potrebná na aktiváciu transkripčných faktorov na prenos do bunkového jadra. Tým sa narušá génová expresia T-lymfocytov, najmä pre cytokíny ako IL-2, a u pacientov dochádza k imunosupresívnemu účinku.²⁻⁵

Distribúcia takrolimu medzi plnou krvou a plazmou závisí od niekoľkých faktorov, napríklad od hematokritu, koncentrácie lieku a koncentrácie proteínov v plazme. Pomer plnej krvi k plazmatickej koncentrácii je v priemere 35 (v rozsahu 12 až 67).⁶⁻⁷ Takrolimus sa do značnej miery metabolizuje systémom cytochrómu P-450, najmä CYP3A.⁸⁻¹¹ Liek sa metabolizuje do najmenej 8 metabolitov (M-I – M-VIII) demetyláciou a hydroxyláciou.¹² Priemerný polčas života takrolimu *in vivo* sa odhaduje na 48 hodín.⁸⁻¹¹ Zaznamenala sa tiež veľká interindividuálna a intraindividuálna variabilita koncentrácií takrolimu v plnej krvi.¹³ Odporúča sa dôsledné a časté monitorovanie takrolimu.¹⁴

PRINCÍPY POSTUPU

Takrolimový imunologický test QMS je homogénny turbidimetrický imunologický test s časticovou intenzifikáciou. Tento test je založený na súťažení medzi liekom vo vzorke a liekom naneseným na mikročasticu o miesta viazania protilátok takrolimového protilátkového činidla. Činidlo vo forme mikročastíc s povlakom takrolimu sa v prítomnosti antitakrolimového protilátkového činidla a v neprítomnosti konkurenčného liečiva vo vzorke rýchlo aglutinuje. Rýchlosť zmeny absorpcie sa meria fotometricky pri vlnovej dĺžke 700 nm. Po pridaní vzorky obsahujúcej takrolimus sa aglutinačná reakcia čiastočne inhibuje, čím sa spomalí rýchlosť zmeny absorpcie. Možno získať koncentračne závislú klasickú aglutinačnú inhibičnú krivku s maximálnou rýchlosťou aglutinácie pri najnižšej koncentrácii takrolimu a s najvyššou rýchlosťou aglutinácie pri najvyššej koncentrácii takrolimu.

ČINIDLÁ

Súprava činidiel

Takrolimus QMS, **REF** 10015556, sa dodáva ako súprava troch kvapalných činidiel pripravených na použitie, ktorá obsahuje:

REAGENT 1 1 x 18 ml

REAGENT 2 1 x 12 ml

EXT Extraktčné činidlo 1 x 50 ml (je potrebný pracovný roztok, pozrite si str. 2 Príprava extraktčného roztoku)

Reaktívne zložky

INGRED	Zložka	Koncentrácia
REAGENT 1	Antitakrolimová monoklonálna protilátka (králik) Azid sodný	< 1,0 % 0,09 %
REAGENT 2	Mikročastice s povlakom takrolimu Azid sodný	< 0,3 % 0,09 %
EXT	Azid sodný	0,09 %

MANIPULÁCIA S ČINIDLAMI A ICH SKLADOVANIE

- **REAGENT 1**, **REAGENT 2** a **EXT** (Extraktčné činidlo) pripravené na použitie
- Pred použitím niekoľkokrát prevráťte, aby sa netvorili bubliny.
- Ak sa v zásobníku činidla nachádzajú vzduchové bubliny, odstráňte ich. Môžete tiež nechať činidlo postáť pri vhodnej skladovacej teplote, aby sa bubliny rozptýlili. Na odstraňovanie bublín nepoužívajte pipetu, aby nedošlo k úbytku objemu.
- Keď sa zásobník s činidlom **REAGENT 1** alebo **REAGENT 2** vyprázdni, vymeňte oba zásobníky a overte kalibráciu pomocou najmenej jednej vzorky každej úrovne kontrol podľa stanovených požiadaviek na kontrolu kvality používaných vo vašom laboratóriu. Ak budú výsledky kontroly mimo prijateľných rozmedzí, možno bude potrebná opätovná kalibrácia.
- Informácie špecifické pre tento systém si pozrite v karte parametrov testovacieho systému priloženej k analyzátoru.
- V prípade náhodného rozliatia miesto vyčistite a materiál zlikvidujte podľa štandardných prevádzkových predpisov laboratória, miestnych, štátnych predpisov.
- V prípade, že pri dodaní zistíte poškodenie obalu, obráťte sa na svojho zástupcu technickej podpory (pozrite si zadnú stranu tohto príbalového letáka).

⚠ UPOZORNENIE: Bubliny v činidle môžu ovplyvniť správnu detekciu hladiny činidla v zásobníku a spôsobiť nedostatočné nasatie činidla, čo môže skresliť výsledky.

⚠ Pri skladovaní pri teplote 2 až 8 °C sú neotvorené činidlá stabilné až do dátumu expirácie.

Činidlá nezmrázujte a nevystavujte ich pôsobeniu teplôt nad 32 °C.

⚠ UPOZORNENIA A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA

- Len na diagnostické použitie *in vitro*. Dodržiavajte bežné bezpečnostné opatrenia pre manipuláciu so všetkými laboratórnymi činidlami.
- Nemiešajte materiály zo súprav s rôznymi číslami šarží.
- Nepoužívajte súpravy s činidlami po uplynutí dátumu expirácie.

NEBEZPEČENSTVO: Imunologický test Takrolimus QMS obsahuje ≤ 3,0 % albumínu z ľudského séra (HSA) a ≤ 1,0 % protilátky špecifickej pre liek (králik).

Extraktčné činidlo QMS Takrolimus obsahuje ≤ 9,0 % síranu zinočnatého (ZnSO₄).

H317 – Môže na pokožke spôsobiť alergickú reakciu.

H334 – V prípade vdýchnutia môže spôsobiť astmu, vyvolať symptómy astmy alebo spôsobiť problémy s dýchaním.

H318 – Môže spôsobiť vážne poškodenie zraku.

H411 – Jedovatý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.

Vyhýbajte sa vdýchnutiu aerosólu alebo výparov. Na pracovisku sa nesmie nachádzať kontaminovaný pracovný odev. Používajte ochranné rukavice/ochranu očí/ochranu tváre. V prípade nedostatočného vetrania nosite ochranu dýchacích ciest. V prípade kontaktu s pokožkou: umyte množstvom mydla a vody. V PRÍPADE VDÝCHNUTIA: v prípade problémov s dýchaním vyveďte postihnutú osobu na čerstvý vzduch a nechajte ju odpočívať v pohodlnej polohe, v ktorej sa jej dobre dýcha. V prípade podráždenia pokožky alebo výskytu vyrážky: vyhľadajte lekársku radu/pomoc. V prípade symptómov týkajúcich sa dýchacích ciest: obráťte sa na TOXIKOLOGICKÉ STREDISKO alebo lekára. Kontaminované oblečenie je pred opakovaným použitím nutné vyprať. Obsah/nádobu zlikvidujte na príslušnom mieste v súlade so všetkými miestnymi, regionálnymi, národnými a medzinárodnými nariadeniami.

Produkt sa nesmie dostať do prostredia. Používajte ochranné rukavice/ochranu očí/ochranu tváre. PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: oči niekoľko minút opatrne vyplachujte vodou. Ak nosíte kontaktné šošovky, vyberte ich, ak to môžete jednoducho spraviť. Pokračujte vo vyplachovaní. Ihneď sa obráťte na toxikologické stredisko alebo lekára. Pozbierajte rozliaty materiál. Obsah/nádobu zlikvidujte na príslušnom mieste v súlade so všetkými miestnymi, regionálnymi, národnými a medzinárodnými nariadeniami.

⚠ UPOZORNENIE: Materiály ľudského pôvodu sa testovali na prítomnosť vírusu HIV1 a 2 a hepatitídy B a C metódou, ktorú schválil úrad FDA, a zistenia boli negatívne. Žiadna testovacia metóda však nemôže s úplnou istotou vylúčiť potenciálne riziko infekcie, preto treba s materiálom manipulovať rovnako opatrne ako so vzorkou pacienta. V prípade vystavenia sa má postupovať podľa predpisov príslušných zdravotníckych orgánov.

Činidlá použité v zložkách testu obsahujú ≤ 0,09 % azidu sodného. Zabráňte styku s pokožkou a sliznicami. Ďalšie bezpečnostné upozornenia, pokyny na manipuláciu a ošetrenie pri náhodnom vystavení si pozrite v SDS.

ODBER VZORIEK A MANIPULÁCIA S NIMI

- Možno použiť len vzorky z plnej krvi odoberaté do skúmaviek EDTA. Dodržiavajte návod výrobcu na spracovanie všetkých skúmaviek na odber vzoriek. Od začiatku odberu až po výkon testu treba postupovať opatrne, aby sa zachovala integrita vzorky. Vzorky sa majú označiť časom odberu krvi, ako aj časom posledného podania lieku.
- Vzorky sa majú zavrieť a testovať do 7 dní pri skladovaní pri teplote 2 – 8 °C alebo do 6 mesiacov pri skladovaní pri teplote ≤ –20 °C.^{6, 10-11} Opätovne nezmrázujte ani nezmrázujte. Vzorky nepeňte.

POSTUP

Dodávané materiály

- Súprava činidiel Takrolimus QMS, [REF] 10015556

Potrebné materiály, ktoré nie sú súčasťou súpravy

- Takrolimové kalibrátory QMS, [REF] 10015573, CAL A: 1 x 4 ml, CAL B – F: 1 x 2 ml každý
- Produkty kontroly kvality
 - Odporúčané materiály:
 - Kontroly Rap/Tac/CsA spoločnosti MORE Diagnostics,
 - NÍZKA, 280 – Q: 4 x 4 ml každá
 - STREDNÁ, 280 – 1: 4 x 4 ml každá
 - VYSOKÁ, 280 – 2: 4 x 4 ml každá
 - Pre ďalšie informácie o komerčne dostupných produktoch kontroly kvality sa obráťte na technickú podporu spoločnosti Thermo Fisher Scientific
 - Metanol, kvalita HPLC ($\geq 99,8\%$ čistota)
 - Mikrocentrifugačné skúmavky s okrúhlym dnom
 - Automatický klinický chemický analyzátor

Príprava vzoriek

Poznámka: Postupujte podľa pokynov a odporúčaní na manipuláciu s kontrolnými prípravkami uvedených v príbalovom letáku príslušného dodávateľa, ak je k dispozícii.

Pred extrakciou nechajte kalibrátory a vzorky pacientov ekvilibrovať pri izbovej teplote. Kalibrátory sa pred použitím majú miešať najmenej 15 – 20 minút a vzorky pacientov sa majú dôkladne premiešať pri izbovej teplote. Kalibrátory a vzorky pacientov dobre premiešajte ich obrácaním (ako pomôcku môžete použiť vahadlo). Dávajte pozor, aby sa nevytvorili bubliny.

Príprava extrakčného roztoku

1. Pridajte presne 10 ml extrakčného činidla izbovej teploty do čistej, suchej, vzduchotesnej fľaštičky.
2. Do fľaštičky ďalej pridajte presne 40 ml metanolu kvality HPLC ($\geq 99,8\%$ čistota) a jemne premiešajte. Fľaštičku označte ako „Pracovné takrolimové extrakčné činidlo“. Na štítko zaznamenajte aktuálny dátum a dátum expirácie (2 týždne od dátumu prípravy). Skladujte pri izbovej teplote.

Postup extrakcie vzoriek, kalibrátorov a kontrolných prípravkov

PRE OPTIMÁLNE VÝSLEDKY POSTUPUJTE PRESNE PODĽA NIŽŠIE UVEDENÉHO POSTUPU. EXTRAKTY SA MUSIA ANALYZOVAŤ BEZPROSTREDNE PO EXTRAKCII.

1. Pripravte si mikrocentrifugačné skúmavky s okrúhlym dnom na extrakciu vzoriek, kalibrátorov a kontrolných prípravkov a označte ich. Pripravte jednu mikrocentrifugačnú skúmavku pre každú vzorku.
2. Pomocou pipety odoberte presne 200 μ l vzorky, kalibrátora alebo kontrolných materiálov do označenej mikrocentrifugačnej skúmavky. Nasajte vzorku pipetou, jemne otrite špičku pipety o okraj liekovky so vzorkou, aby ste odstránili nadbytočnú vzorku, a následne vzorku nalejte na vnútornú stenu mikrocentrifugačnej skúmavky.
Poznámka: Skontrolujte špičku pipety, aby ste sa uistili, že v nej nie sú vzduchové bubliny. Vzduch v špičke je potenciálnym zdrojom nepresností.
3. Pomocou pipety odoberte presne 200 μ l extrakčného činidla do mikrocentrifugačnej skúmavky. Pri príprave viacerých vzoriek sa na nasatie a naliatie extrakčného činidla odporúča použitie opakovacej pipety. Pred odobratím extrakčného činidla odstráňte vzduchové bubliny v pipete.
4. Zatvorte mikrocentrifugačnú skúmavku a ihneď rozvrite pri najvyššej rýchlosti počas 15 – 30 sekúnd. Skontrolujte, či každá skúmavka obsahuje homogénnu zmes. Ak nájdete nepremiešanú vzorku, uvoľnite nepremiešanú časť a opätovne rozvrite.
5. Nechajte zmes v mikrocentrifugačnej skúmavke poštáť pri izbovej teplote počas 5 – 7 minút.
6. Vložte mikrocentrifugačnú skúmavku do centrifúgy a odstredíte ju 5 minút rýchlosťou otáčok/min. zodpovedajúcou rýchlosti 15 000 – 16 000 x g.
7. Odlejte supernatant do pohárika na vzorku (dávajte pozor, aby sa nevytvorili bubliny) a ihneď vykonajte meranie, aby ste minimalizovali vyparovanie vzoriek. Pri odstraňovaní poslednej kvapky na pohárik neklepte, aby ste nepoškodili pelet.
8. Extrakty po analýze zlikvidujte. Na opakované testovanie vzoriek je potrebná čerstvá extrakcia.

Poznámka: Pre ďalšie tipy a odporúčania na postup extrakcie vzoriek pri takrolimovom imunologickom teste QMS sa obráťte na technickú podporu Thermo Fisher Scientific.

Postup testu

Podrobný opis vykonania a kalibrácie testu nájdete v návode na používanie príslušného prístroja.

Postup riedenia vzoriek

Na manuálne riedenie vzoriek mimo linearity testu použite takrolimový kalibrátor QMS CAL A (0,0 ng/ml).

Protokol manuálneho riedenia

Manuálne riedenie možno uskutočniť na vzorkách pacientov s udávanými koncentraciami takrolimu vyššími ako 30,0 ng/ml zriedením vzorky takrolimovým kalibrátorom QMS CAL A (0,0 ng/ml) v pomere 1 : 1 pred extrahovaním vzorky. Riedenie sa musí uskutočniť tak, aby bola hodnota výsledku testu zriedenej vzorky vyššia ako citlivosť testu 1 ng/ml. Udávanú koncentráciu treba vynásobiť faktorom manuálneho zriedenia, čím sa získa konečná koncentrácia vzorky.

Konečná koncentrácia vzorky = Udávaná koncentrácia x Faktor manuálneho zriedenia

Faktor manuálneho zriedenia = (Objem vzorky + Objem kalibrátora CAL A) \div Objem vzorky

KALIBRÁCIA

Takrolimový imunologický test QMS sa musí kalibrovať úplným kalibračným (6-bodovým) postupom. Úplná kalibrácia sa uskutočňuje testovaním takrolimových kalibrátorov QMS CAL A, B, C, D, E a F. V rámci takrolimového imunologického testu QMS sa musia používať len takrolimové kalibrátory QMS. Presné kvantitatívne stanovenie takrolimu sa nepodarí získať, ak sa pri kalibrácii v rámci takrolimového imunologického testu QMS nepoužije takrolimová kalibračná súprava QMS, [REF] 10015573.

Kalibrácia je nutná pri každom novom čísle šarže. Overté kalibračnú krivku pomocou najmenej jednej vzorky každej úrovne kontrol podľa stanovených požiadaviek na kontrolu kvality používaných vo vašom laboratóriu. Ak budú výsledky kontroly mimo prijateľných rozmedzí, musí sa prijať nápravné opatrenie.

Frekvencia kalibrácie

Rekalibrácia sa odporúča

- Po zmene šarže (súpravy) kalibrátorov alebo činidiel
- Po vykonaní mesačnej údržby prístroja
- Podľa potreby po postupoch kontroly kvality

KONTROLA KVALITY

Všetky požiadavky na kontrolu kvality sa musia uplatňovať v súlade s miestnymi, štátnymi a vládny nariadeniami alebo akreditačnými požiadavkami.

Ďalšie požiadavky na kontrolu kvality a potenciálne nápravné opatrenia nájdete v štandardných prevádzkových predpisoch a pláne zabezpečenia kvality vášho laboratória.

Odporúčané požiadavky na kontrolu pre takrolimový imunologický test QMS:

- Pri extrakcii a testovaní vzoriek pacientov sa má vždy analyzovať najmenej jedna vzorka každej úrovne kontrol.
- Ak je potrebné častejšie kontrolné monitorovanie, postupujte podľa zavedených postupov kontroly kvality používaných vo vašom laboratóriu.
- Všetky požiadavky na kontrolu kvality sa musia uplatňovať v súlade s miestnymi, štátnymi a vládny nariadeniami.
- Ak výsledky kontroly kvality nespádajú do prijateľného rozmedzia určeného vašim laboratóriom, hodnoty pacientov môžu byť podozrivé a nesmú sa uvádzať. Musí sa prijať nápravné opatrenie.

VÝSLEDKY

Výsledky takrolimového imunologického testu QMS sa udávajú v jednotkách ng/ml.

Uvádzanie výsledkov: Laboratória by mali uvádzať, že výsledky sa získali metódou takrolimového imunologického testu QMS.

Kódy chýb výsledkov:

Niektoré výsledky môžu obsahovať kódy chýb výsledkov. Opis kódov chýb nájdete v návode na používanie príslušného prístroja.

OBMEDZENIA POSTUPU

- Koncentrácie takrolimu v danej vzorke určené testami od rôznych výrobcov sa môžu odlišovať z dôvodu rozdielov testovacích metód a špecifickosti činidla. Dôrazne sa odporúča monitorovanie pomocou jedného testu.
- **Imunologické testy sú nešpecifické a vykazujú skříženú reaktivitu s metabolitmi. Z tohto dôvodu môžu imunologické testy nadhodnotiť koncentráciu takrolimu (pozri časť Porovnanie metód). Pri narušení eliminácie takrolimu môže dôjsť k väčšej miere hromadenia metabolitov, ktoré vedie k väčšiemu nadhodnoteniu. V takýchto prípadoch sa má zvážiť použitie špecifického testu (napr. chromatografickej metódy).**
- V populácii sa s nízkou frekvenciou vyskytujú rušivé heterofilné protilátky. Tieto protilátky môžu viesť k chybným výsledkom (vrátane chybných nízkych výsledkov spôsobených aglutináciou mikročasticového činidla).
- Na diagnostické účely sa výsledky testu majú vždy hodnotiť v spojení s anamnézou pacienta, klinickými vyšetreniami a ďalšími nálezmi. Ďalšie testovanie na potvrdenie výsledkov sa musí vykonať, ak výsledky nie sú konzistentné s klinickými dôkazmi.
- Informácie o účinkoch súčasne podávaných liekov a liekov, ktoré môžu zvyšovať alebo znižovať koncentrácie takrolimu, nájdete v písomnej informácii pre používateľa lieku PROGRAF.¹⁴

OČAKÁVANÉ HODNOTY

Optimálny terapeutický rozsah takrolimu v plnej krvi nebol týmto testom stanovený. Terapeutický rozsah takrolimu sa môže líšiť v závislosti od klinických faktorov a použitej metodológie.

Vzhľadom na heterogenitu klinického stavu pacienta musia lekári stanoviť požadovaný rozsah terapeutickéj liečby na základe ich vlastných skúseností, ako aj klinických požiadaviek pacienta. Zmeny liečebného režimu by nemali byť založené výlučne na hodnotách takrolimu. Rozdiely v citlivosti na imunosupresívne a nefrotoxické účinky takrolimu, súčasné podávanie iných imunosupresív, typ transplantácie, čas po transplantácii a množstvo ďalších faktorov prispievajú k rôznym požiadavkám na optimálne úrovne takrolimu v krvi.

Optimálne rozsahy sa môžu líšiť v závislosti od použitého testu, a preto by sa mali stanoviť pre každý komerčný test. Hodnoty získané pomocou rozličných testovacích metód nemožno vzájomne zameniť z dôvodu rozdielov v metodológii a skríženej reaktivity a nemali by sa používať ani nápravné faktory. Odporúča sa konzistentné používanie jedného testu pre jednotlivých pacientov.

ŠPECIFICKÉ CHARAKTERISTIKY TESTU

Nasledujú reprezentatívne výsledky testu získané na komerčne dostupnom automatickom klinickom chemickom analyzátore, ktorý používa turbidimetrickú kvantitatívnu analýzu. Ak nie je uvedené inak, všetky testy sa vykonávali v súlade s opísaným postupom testu a s použitím analyzátora Beckman AU680. Výsledky získané v jednotlivých laboratóriách sa od týchto údajov môžu odlišovať. Ďalšie údaje o výkonnosti špecifického analyzátora nájdete v aplikačnom protokole špecifickom pre analyzátor alebo sa obráťte na technickú podporu spoločnosti Thermo Fisher Scientific.

Zaznamenateľný rozsah

Zaznamenateľný rozsah pre takrolimový imunologický test QMS je 1 ng/ml (minimálna zaznamenateľná hodnota založená na funkčnej citlivosti) až 30 ng/ml takrolimu.

Funkčná citlivosť (hranica kvantifikácie)

Funkčná citlivosť predstavuje najnižšiu koncentráciu takrolimu, ktorú možno odmerať s presnosťou medzi testami 20 % CV. Vykonala sa štúdia s použitím vzoriek plnej krvi s pridaním takrolimu v rozsahu 0,5 až 5,0 ng/ml pre jedno meranie v každom cykle dvakrát denne počas 30 dní s celkovo 60 údajovými bodmi. Na hornej 95 % hranici spoľahlivosti sa vypočítala hodnota LoQ 0,9 ng/ml, čo podporuje spodnú hranicu testu 1,0 ng/ml. Pozorované percento výťažnosti pri 0,9 ng/ml je 102,0 %.

Linearita riedenia

Štúdia linearity sa uskutočnila riedením vzorky s vysokou koncentráciou takrolimu takrolimovým kalibrátorom QMS A na koncentrácie s rovnomernou distribúciou v rámci rozsahu testu. Percento výťažnosti sa vypočítalo vypočítaním nameranej koncentrácie takrolimu očakávanou koncentráciou. Očakávané koncentrácie sa vypočítali vynásobením testovanej vysokej koncentrácie faktorom zriedenia.

% vzorky s vysokou koncentráciou	Očakávaná koncentrácia (ng/ml)	Nameraná koncentrácia (ng/ml)	Výťažnosť (%)
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	nevzťahuje sa

Očakávaná koncentrácia = % vzorky s vysokou koncentráciou x Nameraná vysoká koncentrácia

Výťažnosť (%) = (Nameraná koncentrácia ÷ Očakávaná koncentrácia) x 100

Výťažnosť

Do negatívnych vzoriek plnej krvi boli pridané známe množstvá takrolimu pri koncentráciách v rámci rozsahu testu. Koncentrácie takrolimu v týchto vzorkách sa overili pomocou systému LC-MS/MS a testovali pomocou takrolimového imunologického testu QMS. Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Označenie vzorky	n	Očakávaná koncentrácia (ng/ml)	Nameraná koncentrácia (ng/ml)	Výťažnosť (%)
Vzorka 1	21	2,7	2,7	101,8
Vzorka 2	21	9,8	10,8	109,4
Vzorka 3	21	18,0	17,7	98,2
Vzorka 4	21	19,8	21,3	107,5
Vzorka 5	21	27,0	27,1	100,4

Výťažnosť (%) = (Nameraná koncentrácia ÷ Očakávaná koncentrácia) x 100

Presnosť

Presnosť sa hodnotila s použitím zhromaždených vzoriek plnej krvi pacienta a obohatených vzoriek plnej krvi. Štúdia sa uskutočnila podľa opisu v protokole CLSI EP5-A2.¹⁵ Každá vzorka sa testovala dvojmo v každom cykle dvakrát denne po dobu 20 dní. Vypočítali sa stredné hodnoty a SD a % CV v rámci cyklu a v rámci všetkých cyklov. Reprezentatívne výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Vzorky	n	Priemer (ng/ml)	V rámci cyklu		V rámci všetkých cyklov	
			SD	% CV	SD	% CV
Obohatená vzorka A	80	3,0	0,2	4,9 %	0,2	7,1 %
Obohatená vzorka B	80	10,0	0,2	1,9 %	0,4	3,6 %
Obohatená vzorka C	80	20,9	0,4	1,9 %	1,1	5,0 %
Vzorka pacienta A	80	3,2	0,1	4,1 %	0,2	6,2 %
Vzorka pacienta B	80	10,4	0,2	2,2 %	0,4	3,6 %
Vzorka pacienta C	80	24,2	0,5	2,1 %	1,1	4,6 %

Porovnanie metód

Uskutočnili sa korelačné štúdie na porovnanie takrolimového imunologického testu QMS s dvoma metódami LC-MS/MS (systém 1 a systém 2) a takrolimovým testom Abbott ARCHITECT[®]. V štúdiách sa použili vzorky ľudskej plnej krvi EDTA získané od pacientov po transplantácii obličky, pečene a srdca, ktorým sa podáva takrolimus. Všetky testované vzorky pochádzali najmä od dospelých pacientov s časom po transplantácii pre vzorky zvyčajne > ako 9 mesiacov. Testovaní pacienti dostávali v rámci liečebného režimu samotný takrolimus alebo takrolimus podávaný spolu s ďalším imunosupresívnym liekom, ako napríklad mykofenolátmofetil (MMF), kyselina mykofenolová (MPA) alebo kortikosteroidy. Výsledky regresnej analýzy Deming¹⁶ rôznych metód sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Porovnávací metóda	n	Sklon (95 % CI)*	Priesečník (95 % CI)	Korelačný koeficient (R)
Systém LC-MS/MS 1	383	1,111 (1,084 – 1,137)	0,53 (0,31 – 0,76)	0,972
Systém LC-MS/MS 2	232	1,130 (1,092 – 1,167)	0,71 (0,42 – 1,01)	0,967
Takrolimový test Abbott ARCHITECT	208	1,126 (1,071 – 1,181)	-0,03 (-0,63 – 0,56)	0,937

* Interval spoľahlivosti (CI)

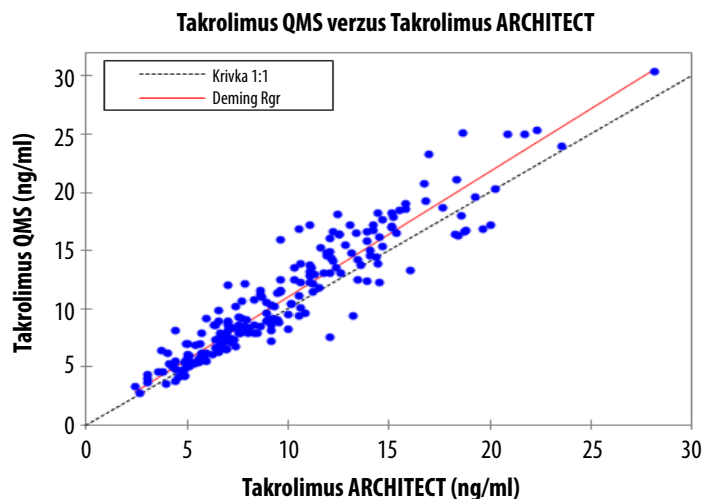
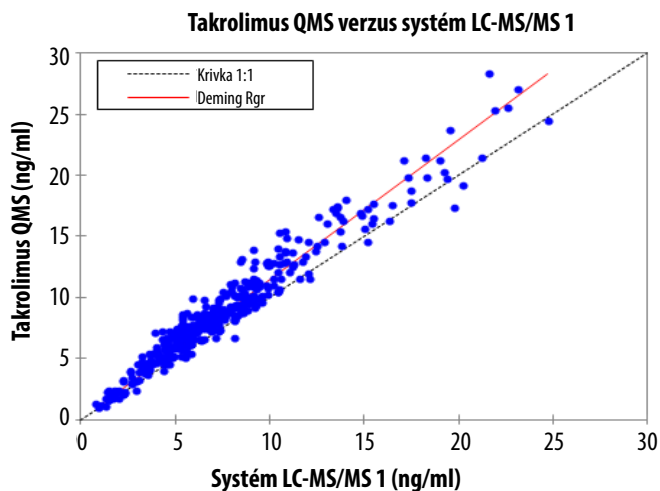
Rozsah koncentrácie vzoriek v rámci takrolimového imunologického testu QMS: 1,0 – 30,8 ng/ml

Rozsah koncentrácie vzoriek v rámci metódy LC-MS/MS: 0,8 – 29,5 ng/ml

Rozsah koncentrácie vzoriek v rámci takrolimového testu ARCHITECT: 2,4 – 28,1 ng/ml

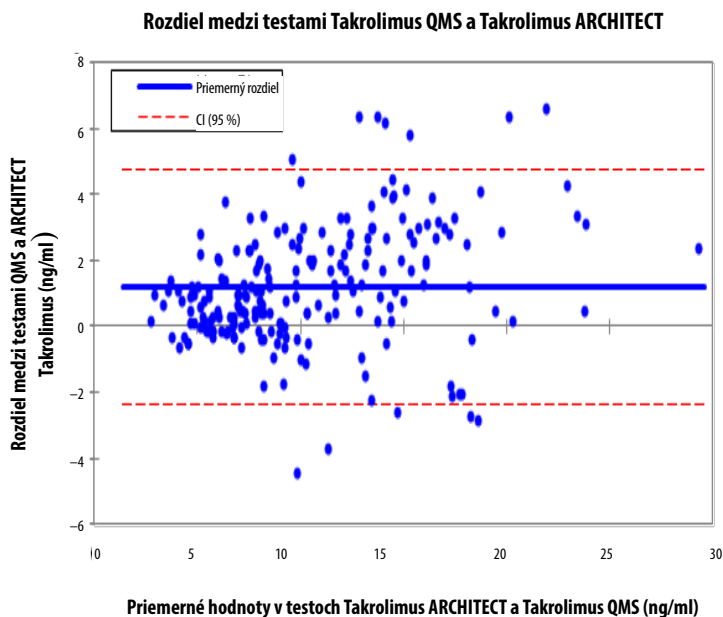
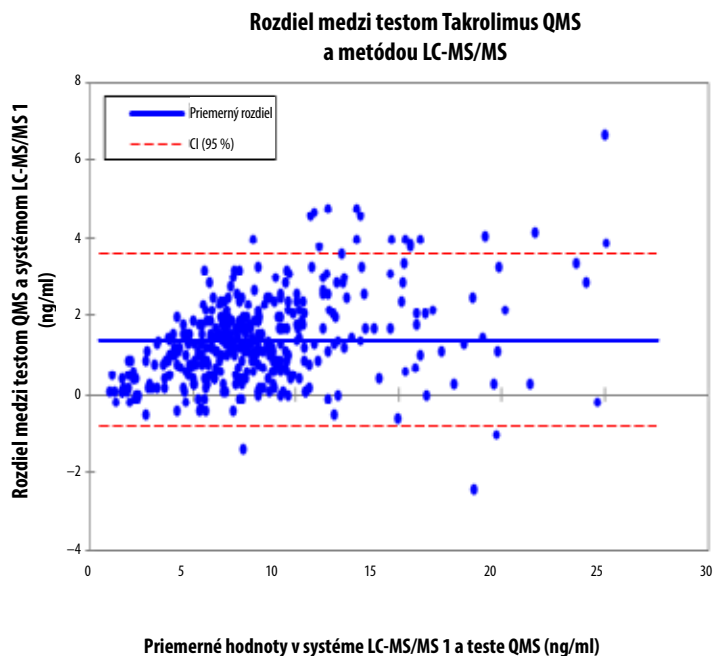
Graf rozptylu pre porovnanie výsledkov takrolimového imunologického testu QMS a systému LC-MS/MS 1 s použitím vzoriek pacientov po transplantácii obličky, pečene alebo srdca.

Graf rozptylu pre porovnanie výsledkov takrolimového imunologického testu QMS a takrolimového testu Abbott ARCHITECT s použitím kombinovaných vzoriek pacientov po transplantácii obličky a pečene.



Bland-Altmanov graf rozdielov¹⁷ pre porovnanie výsledkov takrolimového imunologického testu QMS a systému LC-MS/MS 1 s použitím vzoriek pacientov po transplantácii obličky, pečene alebo srdca. Priemerný rozdiel sa vypočíta ako priemerný rozdiel medzi výsledkami takrolimového imunologického testu QMS a systému LC-MS/MS 1.

Bland-Altmanov graf rozdielov¹⁷ pre porovnanie výsledkov takrolimového imunologického testu QMS a takrolimového testu Abbott ARCHITECT s použitím kombinovaných vzoriek pacientov po transplantácii obličky a pečene. Priemerný rozdiel sa vypočíta ako priemerný rozdiel medzi výsledkami takrolimového imunologického testu QMS a takrolimového testu ARCHITECT.



Špecifickosť

Štúdie špecifickosti sa vykonali pomocou protokolu CLSI EP7-A2 ako návodu.¹⁸ Skrížená reaktivita sa testovala pre dostupné hlavné metabolity takrolimu. Testovali sa aj iné lieky, ktoré sa bežne podávajú s takrolimom, na určenie toho, či tieto zlúčeniny ovplyvnili kvantifikáciu takrolimu pomocou takrolimového imunologického testu QMS.

Skrížená reaktivita metabolitov sa vypočítala s použitím vzorca:

$$\text{Skrížená reaktivita (\%)} = \frac{\text{Nameraná koncentrácia} - \text{Očakávaná koncentrácia}}{\text{Koncentrácia skríženého reaktantu}} \times 100$$

Skrížená reaktivita s metabolitmi takrolimu

Skrížená reaktivita takrolimového imunologického testu QMS s hlavnými metabolitmi takrolimu je uvedená v nasledujúcej tabuľke. Testované zlúčeniny sa pridali do vzoriek plnej ľudskej krvi, ktoré obsahovali dve koncentrácie lieku s obsahom takrolimu, a testovali sa trikrát. Vypočítalo sa percento skríženej reaktivity.

Metabolity takrolimu	Koncentrácia metabolitu (ng/ml)	Očakávaná koncentrácia (ng/ml)	Nameraná koncentrácia (ng/ml)	Výťažnosť (%)	Skrížená reaktivita (%)
M-I (13-0-demetyl)	20	5,8	7,6	131,0	9,2
	20	13,3	14,8	111,3	7,7
M-II (31-0-demetyl)	20	5,7	5,9	103,5	0,7
	20	13,2	13,1	99,2	-0,5
M-III (15-0-demetyl)	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-didemetyl)	20	5,4	7,3	135,2	9,3
	20	13,4	14,7	109,7	6,7
M-VII (13,15-0-didemetyl) + M-VI (13,31-0-didemetyl)	20	5,4	5,8	107,4	2,2
	20	13,4	13,8	103,0	2,0

$$\text{Výťažnosť (\%)} = (\text{Nameraná koncentrácia} \div \text{Očakávaná koncentrácia}) \times 100$$

Pozorovaná skrížená reaktivita metabolitu takrolimu M-IV bola $\leq 174,8\%$. Metabolity takrolimu M-V a M-VIII sa nehodnotili na určenie novej skríženej reaktivity.

Takrolimové vzorky pacientov obsahujú nízke koncentrácie metabolitov takrolimu v porovnaní s pôvodným liekom s približne 6 % M-I, 15 % M-II, 6 % M-III a s takmer nezistiteľným množstvom M-IV.^{9,12,19}

Interferujúce látky

Štúdie interferencie sa vykonali pomocou protokolu CLSI EP7-A2 ako návodu.¹⁸ Takrolimový imunologický test QMS sa testoval spolu so súčasne podávanými liekmi a bežnými liekmi, aby sa zistilo, či existuje potenciálna interferencia. Testované zlúčeniny sa pridali do vzoriek plnej ľudskej krvi, ktoré obsahovali približne 5 a 12 ng/ml lieku s obsahom takrolimu, a testovali sa pomocou takrolimového imunologického testu QMS. Výťažnosť koncentrácie takrolimu s odchýlkou väčšou ako 10 % sa považovala za interferenčnú s testom. Zlúčeniny testované pri koncentráciách uvedených v nasledujúcej tabuľke nevykazujú žiadnu interferenciu s testom. Priemerné percento výťažnosti takrolimu kolísalo v rozsahu 91 % – 109 %.

Zlúčenina	Koncentrácia (ng/ml)	Zlúčenina	Koncentrácia (ng/ml)
Acetaminofén	200 000	Kanamycín B sulfát	100 000
Acykloguanisín/Acylovir	1 000 000	Ketokonazol	100 000
Alopurinol	50 000	Labetalol	17 100
Amikacín sulfát	150 000	Lidokain	100 000
Amfotericín B	100 000	Lítium	35 000
Ampicilín	100 000	Lovastatin	20 000
Apresolín/Hydralazín	100 000	Metylprednizolón	100 000
Atenolol	40 000	Metoklopramid	100 000
Azatioprín	100 000	Minoxidil	60 000
Azitromycín	5 000	Morfín sulfát	100 000
Bromokriptín / 2-Bromo- α -ergokriptín	8 000	Kyselina mykofenolová	100 000
Karbamazepín	120 000	N-Acetylprokainamid	120 000

Pokračovanie tabuľky

Zlúčenina	Koncentrácia (ng/ml)	Zlúčenina	Koncentrácia (ng/ml)
Cefazolín	150 000	Nadolol	1 200
Ceftriaxón	500 000	Naproxén	100 000
Cefalosporín C	100 000	Nikardipín	500
Chlompromazín	50 000	Nikotín	20 000
Chlóramfenikol	250 000	Nifedipín	100 000
Chlórdiazepoxid	20 000	Penicilín G	100 000
Chlorochín	1 500	Pentobarbitál	100 000
Cimetidín	100 000	Fenobarbitál	150 000
Ciprofloxacín	7 400	Fenytoín	100 000
Klaritromycín	5 000	Prazosín	100 000
Klonidín	100	Prednizolón	100 000
Kolchicín	90	Prednizón	100 000
Kortizón	1 200	Primidón	100 000
Cyklosporín/Cyklosporín A	10 000	Probukol	600 000
Diazepam	20 000	Prokainamid	100 000
Digitoxín	100 000	Propoxyfén	4 000
Digoxín	10 000	Propranolol	40 000
Diltiazém	60 000	Chinidín	100 000
Dizopyramid	100 000	Ranitidín	200 000
Erytromycín	200 000	Rifampín/Rifampicín	100 000
Etosuximid	300 000	Kyselina salicylová	500 000
Everolimus	100	Sirolimus (Rapamycín)	300
Famotidín	10 000	Spektinomycín	100 000
Flukonazol	100 000	Streptomycín	100 000
Flucytosín / 5-Fluorocytosín	40 000	Sulfametoxazol	150 000
Furosemid	100 000	Teofylín	250 000
Ganciklovir	1 000 000	Tiklopidín	150 000
Gemfibrozil	100 000	Tobramycín	100 000
Gentamicín	120 000	Triamterén	100 000
Hydrochlórtiazid	40 000	Trimetoprim	40 000
Hydrokortizol	100 000	Kyselina valproová	500 000
Ibuprofén	400 000	Vankomycín	100 000
Itrakonazol	100 000	Verapamil	100 000
Kanamycín A sulfát	100 000		

Nasledujúce potenciálne interferujúce endogénne látky vykazovali pri testovaní pomocou takrolimového imunologického testu QMS pri uvedených koncentráciách 92 % až 108 % výťažnosť.

Potenciálne interferujúca látka	Koncentrácia
Albumín	12 g/dl
Bilirubín	60 mg/dl
Cholesterol	500 mg/dl
Kreatinín	5 mg/dl
Triglycerid	1 500 mg/dl
Kyselina močová	20 mg/dl
IgG gama globulín	12 g/dl
Reumatoidný faktor	500 IU/ml
HAMA*	400 ng/ml
Hematokrit	12 % – 64 %

* HAMA (human anti-mouse antibodies) = ľudské protilátky proti myším protilátkam

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.

Glosár:

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



Výrobca:

Microgenics Corporation
46500 Kato Road
Fremont, CA 94538 USA
Bezplatné telefónne číslo v USA: 800-626-0690



Autorizovaný zástupca v EÚ:
B-R-A-H-M-S GmbH
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, Germany

Služby zákazníkom

Bezplatné telefónne číslo v USA: 1-800-232-3342
Ostatné štáty: Obráťte sa na miestneho zástupcu spoločnosti Microgenics.

Bio-Rad Lyphecheck® je registrovanou značkou spoločnosti Bio-Rad®.
Kontrolné prípravky MORE Diagnostics sú vlastníctvom spoločnosti MORE Diagnostics, Inc.
ARCHITECT je registrovanou značkou spoločnosti Abbott Laboratories®.
Všetky ostatné ochranné známky sú vlastníctvom spoločnosti Thermo Fisher Scientific Inc. a jej dcérskych spoločností.
© 2018 Thermo Fisher Scientific Inc. Všetky práva vyhradené.



Aktualizácie príbalového letáka nájdete na internetovej stránke:
www.thermofisher.com/diagnostics

10015557-12-SK
2021 01

thermo
scientific