

### Emit® 2000 Cyclosporine Specific Assay

**Cuidado: A legislação federal nos Estados Unidos limita a venda e distribuição deste dispositivo por um médico ou por ordem deste, bem como a um laboratório clínico. A sua utilização está restringida ao médico ou sob ordem deste.**

**Informações actualizadas:**

► Consultar as secções 1, 15 e o painel final.



6R004UL.11SL

## Ensaio específico de ciclosporina

### 1 Fim a que se destina

- O Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 destina-se à utilização na análise quantitativa *in vitro* da ciclosporina (CsA) em sangue total humano como um auxílio na gestão dos pacientes de transplantes do coração, fígado e rim.

**CONTRA-INDICAÇÕES:**

Não existem quaisquer contra-indicações para o Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000.

**ADVERTÊNCIA:**

1. MANUSEAR TODAS AS AMOSTRAS COMO SE FOSSEM PASSÍVEIS DE TRANSMITIR INFECÇÕES.
2. Não comer, beber, fumar nem aplicar cosméticos em locais onde os reagentes do kit forem manipulados.
3. Não pipetar com a boca.
4. Utilizar luvas descartáveis e equipamento laboratorial de protecção adequado durante a manipulação das amostras e reagentes do kit. Lavar abundantemente as mãos após a utilização.
5. Manipular sempre os materiais derivados humanos como se fossem potencialmente infecciosos. Os calibradores e controlos deste kit contêm componentes do sangue humano. Todos os lotes são testados e são negativos para anticorpos do vírus da imunodeficiência adquirida humano (HIV) e Antígeno de Superfície da Hepatite B (HBsAg).
6. O metanol, que é um material necessário mas não fornecido com o Ensaio específico da ciclosporina Emit® 2000 e é utilizado para extrair a ciclosporina das amostras, é inflamável. Não ingerir. Evitar o contacto com a pele.
7. Os componentes do ensaio contêm azida de sódio, que pode reagir com as canalizações de chumbo ou cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Depois de as soluções que contêm azida de sódio terem sido eliminados através dos esgotos do laboratório, enxaguar com um grande volume de água para prevenir a formação de azidas.<sup>1</sup>
8. Este kit contém sulfato de estreptomicina. Eliminar de forma adequada.

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

**PRECAUÇÕES:**

Para a eliminação de quaisquer reagentes ou amostras remanescentes do kit, consultar a regulamentação local para a eliminação adequada de resíduos médicos.

### 2 Fundamentos

A ciclosporina é um undecapéptido cíclico de origem fúngica e um poderoso agente imunossupressivo. Desde a sua produção em 1983, a ciclosporina melhorou substancialmente a sobrevivência de doentes e transplantes em doentes submetidos a transplantes de coração, rim, fígado, pâncreas ou pulmão. Muitos estudos documentaram o efeito da ciclosporina no combate à rejeição de órgãos.

Doses e níveis inadequados de ciclosporina podem dar origem à rejeição do órgão transplantado. Níveis tóxicos de ciclosporina estão associados a muitos efeitos secundários graves, incluindo a nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e um conjunto de outras complicações. Os médicos estão particularmente preocupados com os efeitos nefrotóxicos da droga quando é utilizada em transplantes renais por causa da dificuldade em distinguir entre a rejeição do órgão e a toxicidade da ciclosporina.<sup>2,3</sup>

A monitorização das concentrações da droga ciclosporina original no sangue total e a interpretação destas concentrações em conjunção com outros dados clínicos e considerações clínicas constituem a forma mais eficaz de garantir a terapêutica imunossupressora adequada para receptores de transplantes de órgãos sólidos.

O sangue total, ao contrário do plasma, constitui a matriz de eleição para a medição da ciclosporina, uma vez que a droga é rapidamente distribuída pelos glóbulos vermelhos. Devido ao facto de a contribuição de mais de 30 metabolitos da ciclosporina para a imunossupressão ou toxicidade permanecer incerta, as concentrações de ciclosporina deveriam ser medidas utilizando um método que seja específico para a droga original.

Os métodos historicamente utilizados para monitorizar as concentrações de ciclosporina no sangue incluem a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), o radioimunoensaio (RIA) e o imunoensaio por fluorescência polarizada (FPIA).

### 3 Princípio

O Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 emprega uma técnica de imunoensaio enzimático homogéneo utilizada para a análise de ciclosporina no sangue total. O ensaio contém anticorpos monoclonais de rato com uma alta especificidade para a ciclosporina.

O Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 baseia-se na competição pelos locais de ligação dos anticorpos da ciclosporina. A ciclosporina na amostra compete com a ciclosporina no Reagente B Enzima que se encontra marcado com a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). A enzima activa (não ligada) converte o dinucleótido de adenina nicotinamida oxidado (NAD) no Reagente A Anticorpo para NADH, resultando numa variação cinética da absorvância, que pode ser medida espectrofotometricamente. A actividade enzimática diminui após a ligação com o anticorpo, permitindo que a concentração de ciclosporina na amostra seja medida em termos da actividade enzimática. A G6PDH sérica endógena não interfere, pois a coenzima NAD funciona apenas com a enzima bacteriana (*Leuconostoc mesenteroides*) utilizada no ensaio.

Antes de efectuar o teste com o Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000, as amostras, calibradores e controlos são pré-tratados com metanol. O metanol efectua a lise das células, solubiliza a ciclosporina e precipita a maioria das proteínas do sangue. As amostras são centrifugadas, sendo então diluído um alíquota do sobrenadante resultante, contendo ciclosporina, utilizando o Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000. Esta solução é então ensaiada utilizando os Reagentes A e B nos sistemas químicos COBAS MIRA®, COBAS MIRA® S ou COBAS MIRA® Plus.

**Não existe qualquer intervalo terapêutico sólido para a ciclosporina no sangue total. A complexidade do estado clínico, as diferenças individuais na sensibilidade aos efeitos imunossupressivos e nefrotóxicos da ciclosporina, a co-administração de outros imunossupressores, o tipo de transplante, o tempo decorrido após o transplante e um conjunto de factores adicionais contribuem para requisitos diferentes em termos dos níveis sanguíneos óptimos de ciclosporina. Os valores individuais de ciclosporina não devem ser utilizados como único indicador para efectuar alterações do regime de tratamento. Todos os doentes devem ser alvo de uma avaliação clínica exaustiva antes de se efectuarem quaisquer ajustes no tratamento, devendo os utilizadores do ensaio estabelecer os seus próprios intervalos com base na experiência clínica. Estes intervalos variarão de acordo com o teste de diagnóstico *in vitro* comercial utilizado. Os intervalos devem ser estabelecidos para cada teste comercial utilizado.**

(Consultar secção 10, Valores esperados)

### 4 Reagentes

REF	Descrição do produto	Quantidade/Volume
6R019UL	<b>Ensaio específico de Ciclosporina Emit® 2000</b> <b>Reagente A Anticorpo*</b> Anticorpos monoclonais de rato reactivos à ciclosporina, <sup>†</sup> nicotinamida adenina dinucleótido, glicose-6-fosfato, cloreto de sódio, agente espessante, surfactante e conservantes incluindo azida de sódio a 0.1% e sulfato de estreptomicina a 0.005%	16 ml
	<b>Reagente B Enzima*</b> Ciclosporina marcada com glicose-6-fosfato desidrogenase bacteriana ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ), <sup>†</sup> Tampão Tris, agentes espessantes, estabilizadores e conservantes incluindo azida de sódio 0.1% e sulfato de estreptomicina 0.005%	8 ml
	<b>Diluinte específico de ciclosporina Emit® 2000*</b> Tampão Tris, surfactante e conservantes incluindo azida de sódio 0.1% e sulfato de estreptomicina 0.005%	100 ml
6R119UL	<b>Calibradores específicos de ciclosporina Emit® 2000<sup>‡</sup></b> (consultar, em baixo, as concentrações) Ciclosporina, sangue total humano e conservantes incluindo azida de sódio 0.1%	um frasco de 2.5 ml, <sup>§</sup> cinco frascos de 2 ml

\* Os reagentes e o diluinte são fornecidos como um conjunto correspondente. Não devem ser trocados com componentes de kits com números de lote diferentes.

<sup>†</sup> A titulação do anticorpo e a actividade do conjugado enzimático podem variar de lote para lote.

<sup>‡</sup> Necessário para utilização com o Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000. Fornecido em separado

<sup>§</sup> O calibrador negativo adicional é fornecido como uma opção para a diluição de amostras com concentração elevada (consultar a Secção 7, Procedimento, Diluição de amostras com concentração elevada).

Os calibradores contêm as seguintes concentrações de ciclosporina:

Calibradores	0	50	100	200	350	500
Ciclosporina (ng/ml)	0	50	100	200	350	500
Ciclosporina (nmol/l)	0	41.6	83.3	166.5	291.4	416.3

Os calibradores específicos de Ciclosporina Emit® 2000 são preparados em hemolisado de sangue total conservado. Prepara-se um soluto de ciclosporina para estes calibradores utilizando o procedimento gravimétrico padrão e a concentração do soluto é determinada por meio de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Adicionam-se alíquotas do soluto a quantidades definidas da matriz do calibrador para produzir a concentração final pretendida.

#### Preparação, armazenamento e estabilidade dos componentes do ensaio

Os reagentes do Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 e o Diluente específico de ciclosporina Emit® 2000 são fornecidos prontos a serem utilizados. Fechar os frascos do reagente e do diluente quando não estiverem a ser utilizados. Colocar sempre as tampas de enrosacar do reagente nas aberturas originais da cassete de reagente.

Não congelar nem expor os reagentes a temperaturas superiores a 27°C. Os reagentes não abertos permanecerão estáveis até ao prazo de validade impresso na etiqueta quando armazenados a uma temperatura de 2–8°C. Após a abertura, os reagentes permanecerão estáveis durante 12 semanas ou até ao prazo de validade impresso na etiqueta, consoante o que se verificar primeiro, se armazenados a uma temperatura de 2–8°C, na vertical e com as tampas bem fechadas.

**Nota: Se os reagentes adquirirem uma cor amarela forte, encontram-se deteriorados e devem ser descartados.**

O diluente pode ser armazenado em frigorífico ou à temperatura ambiente de 18–25°C. Contudo, uma vez aberto o kit, o diluente deve ser armazenado e utilizado à temperatura ambiente. Após a abertura, o diluente permanecerá estável durante 6 meses ou até ao prazo de validade, consoante o que se verificar primeiro, se armazenado com as tampas bem fechadas.

Os calibradores não abertos devem ser armazenados congelados a uma temperatura de -10°C ou inferior. Antes da utilização inicial, os calibradores devem ser descongelados completamente sem quaisquer cristais de gelo remanescentes. Deixar os calibradores descongelarem à temperatura ambiente de 18–25°C durante aproximadamente uma hora ou a uma temperatura de refrigeração de 2–8°C de um dia para o outro. Antes da utilização, inverter **lentamente** os frascos do calibrador pelo menos dez vezes, de modo a garantir que os conteúdos ficam exaustivamente misturados. **Não agitar no vortex. Uma vez descongelados, os calibradores não devem voltar a ser congelados e devem ser armazenados a 2–8°C.** Os calibradores podem ser utilizados durante um período de 8 semanas ou até ao fim do prazo de validade impresso na etiqueta, consoante o que se verificar primeiro, quando armazenados a 2–8°C.

**Os reagentes, diluente e calibradores devem ser deixados em repouso à temperatura ambiente (18–25°C) antes da utilização.** A Tabela 1 apresenta os tempos mínimos de repouso necessários para os reagentes, diluente e calibradores, para além de informações resumidas sobre armazenamento e estabilidade.

**Tabela 1 — Armazenamento e estabilidade dos componentes do ensaio**

Componente	Temp. de Armazenamento	Tempo mínimo a 18–25°C antes da utilização	Estabilidade*	
			Frasco não aberto	Frasco aberto
Reagente A (tampa preta)	2–8°C	60 min †	Prazo val.	12 sem
Reagente B (tampa branca)	2–8°C	60 min †	Prazo val.	12 sem
Diluente	Kit não aberto: 2–8°C	2 hr	Prazo val.	N/A
	Kit aberto: 18–25°C	N/A	Prazo val.	6 mes
Calibradores	Não aberto: <-10°C	1 hr	Prazo val.	N/A
	Aberto: 2–8°C	30 min	N/A	8 sem

\* A estabilidade depende da manipulação dos componentes conforme é indicado.

† Se for utilizado um compartimento refrigerado nos sistemas COBAS MIRA® S ou COBAS MIRA® Plus, os reagentes podem ser utilizados directamente depois de retirados do frigorífico.

## 5 Instrumentos

O Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 é executado nos sistemas de química COBAS MIRA®, COBAS MIRA® S e COBAS MIRA® Plus. Todos estes sistemas possuem um detector de nível na sonda do reagente que detecta quando o nível do Reagente A está demasiado baixo para executar o ensaio. O sistema de química COBAS MIRA® Plus possui também um detector de nível para o Reagente B. Todavia, nos sistemas COBAS MIRA® e COBAS MIRA® S, o Reagente B é dispensado pela agulha de amostras que não possui qualquer detector de nível. **Deste modo, o operador deve confirmar que existe uma quantidade suficiente de Reagente B para executar o ensaio.**

Consultar os manuais do instrumento para a programação dos sistemas de química COBAS MIRA®, COBAS MIRA® S e COBAS MIRA® Plus.

## 6 Colheita de amostras e manipulação

- O volume de amostra mínimo necessário é de 100 µl de sangue total.
- Os factores farmacocinéticos influenciam a hora correcta de colheita da amostra após a última administração da droga. Estes factores incluem a dose, o modo de administração, terapêutica medicamentosa concomitante e variações biológicas que afectam a disposição da droga. Recomenda-se a colheita de uma amostra de níveis mínimos para medição da ciclosporina.
- O sangue deve ser colhido utilizando tubos contendo anticoagulante EDTA. O EDTA é recomendado como anticoagulante de eleição para o ensaio de ciclosporina em amostras de sangue total. As amostras heparinizadas não são recomendadas devido à possibilidade de formação de coágulos durante o armazenamento.

- Utilizar amostras colhidas recentemente. Se as amostras se destinarem a ser testadas no prazo de 8 horas após a colheita, podem ser armazenadas à temperatura ambiente de 18–25°C. Podem ser armazenadas no frigorífico a 2–8°C durante até uma semana. Se for necessário um armazenamento mais prolongado, as amostras devem ser congeladas a uma temperatura de -20°C. A ciclosporina demonstrou ser estável em amostras de sangue total durante pelo menos 3 meses quando armazenadas a -20°C.<sup>4,5</sup> Antes do teste, descongelar e agitar exaustivamente as amostras congeladas. A repetição de ciclos de congelação-descongelação deve ser evitada. Os materiais insolúveis que se podem formar quando algumas amostras são congeladas devem ser evitadas durante a pipetagem.
- Manusear todas as amostras como se fossem passíveis de transmitir doenças. Seguir as precauções padrão para o manuseamento de agentes infecciosos durante todos os procedimentos.<sup>6,7</sup>

## 7 Procedimento

### Materiais necessários

#### Fornecido pela Syva Company

Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000

Reagente A Anticorpo e Reagente B Enzima

Diluente específico de ciclosporina Emit® 2000

Calibradores específicos de ciclosporina Emit® 2000

#### Disponível a partir da Syva Company

Sistema de química COBAS MIRA®, COBAS MIRA® S ou COBAS MIRA® Plus

#### Disponível a partir da Roche Diagnostic Systems

Suportes de reagente 5<sub>s</sub>

Suportes de calibrador Cal CS 30

Suporte de amostra (Sample 30) e tampa de suporte

Segmentos de cuvete COBAS MIRA®, COBAS MIRA® S ou COBAS MIRA® Plus

Copos de amostra

### Materiais necessários mas não fornecidos

Controlos multi-nível de sangue total

Pipeta de dispensação positiva de 200 µl ou Repetidor Eppendorf (para dispensação de metanol)

Pipeta de dispensação positiva de 100 µl ou 200 µl (para dispensação de amostras)

Pipetador-diluidor com distribuidor de amostras de 100 µl e dispensador de diluente de 200 µl (para transferência do extracto para o copo de amostra do COBAS MIRA®; pode também ser utilizada uma pipeta de dispensação positiva)\*

Combitips Eppendorf (5 ml) se for utilizado o Repetidor Eppendorf

Tubo de microcentrifuga (1.5 a 2 ml de capacidade)

Água destilada ou desionizada em frasco de plástico para solução de lavagem

Metanol (grau de reagente ou melhor)

Microcentrifuga

Suporte para tubos de centrifuga

Agitador vortex

Panos de laboratório

Inversor ou agiatdor basculante de amostras (opcional)

\* **Especificações sugeridas para o pipetador-diluidor (baseadas em ensaios gravimétricos): seringa de amostra de precisão ±3%, seringa de diluente de precisão ±2%; seringa de amostra e diluente de precisão de 1% CV.**

### Instruções gerais de utilização do instrumento

- Se necessário, regular o instrumento para 37°C.
- Para programar a temperatura, premir <PROGRAM>, <6> SYSTEM PARAMETERS e <1> ANALYTICAL PARAMETERS.
- Para programar o ensaio, premir <PROGRAM>, <2> TESTS. O ecrã apresentará a Tabela de atribuições.
  - Seleccionar uma tecla de letra não definida.
  - Digitar o nome do teste (TEST NAME) (até quatro caracteres).
  - Premir <ENTER>. O cursor/destacador avançará para COPY FROM (COPIAR DE).
  - Premir <ENTER> para ultrapassar esta opção.
  - Surgirá a primeira página de parâmetros de teste com os valores predefinidos.
  - Começar a introduzir as configurações do instrumento para os sistemas de química COBAS MIRA® S ou COBAS MIRA® Plus (consultar a Secção 12, Apêndice). Premir <ENTER> ou <←> para avançar para o parâmetro seguinte.
- Premir <PRINT> para obter uma cópia dos parâmetros de teste para verificação das definições.
- Programar o suporte do reagente 5<sub>s</sub> premindo <PROGRAM>, <5> RACKS e <1> REAGENT 5<sub>s</sub>. Seleccionar o número do suporte ao qual o ensaio será atribuído e premir <ENTER>. Avançar o cursor para a posição do suporte pretendida. Premir <TEST KEY>.
- A calibração é programada em duplicado para o ensaio, a pedido. A calibração será executada automaticamente na ausência de uma curva armazenada ou pode ser solicitada através da introdução em <ROUTINE>:
  - <P> <C> <TEST KEY> <ENTER> na ausência de amostras
  - ou <C> <A> <TEST KEY> <ENTER> em conjunto com um ensaio da amostra
- Para armazenar uma curva de calibração, os resultados da amostra devem ser eliminados através de PATIENT FILE e não de TEST RESULTS.
- O pedido para o ensaio da amostra é programado através de ROUTINE.

### Manutenção diária

Consultar o manual do operador adequado relativamente às instruções de manutenção.

### Procedimento de preparação

- Permitir que os reagentes, amostras, calibradores e controlos sejam deixados em repouso à temperatura ambiente (18–25°C) antes da utilização (consultar a Tabela 1 para conhecer os tempos mínimos). Se for utilizado um compartimento refrigerado nos sistemas COBAS MIRA® S ou COBAS MIRA® Plus, os reagentes podem ser utilizados directamente depois de retirados do frigorífico. Contudo, as amostras e todos os outros componentes do ensaio devem ser deixados em repouso à temperatura ambiente antes da utilização.
- Permitir que o diluente e o metanol atinjam a temperatura ambiente, utilizando-os a esta temperatura (18–25°C). Notar que ambos podem ser armazenados à temperatura ambiente.
- Preparar, armazenar e utilizar os controlos de acordo com as instruções do fabricante.
- Ligar o sistema COBAS MIRA®. Confirmar que o sistema está programado de acordo com o protocolo adequado, na Secção 12, Apêndice. Consultar o manual do operador adequado do sistema COBAS MIRA® para obter instruções completas.
- Se utilizar um pipetador diluidor automático, verificar as definições e purgar o pipetador-diluidor com o Diluente específico de ciclosporina Emit® 2000. Garantir que não existem quaisquer bolhas de ar nas linhas.
- Preparar e etiquetar um tubo de microcentrífuga para cada calibrador, controlo e amostra a pré-tratar.
- Preparar o mesmo número de copos de amostra COBAS MIRA® no calibrador e/ou suporte(s) de amostra COBAS MIRA®.

### Procedimento de pré-tratamento e de ensaio

O procedimento foi separado em duas secções, Passos e Notas técnicas, para uma consulta fácil. As notas técnicas constituem uma parte essencial das instruções e devem ser lidas exaustivamente antes de completar cada passo do procedimento.

**Nota: Para minimizar a contaminação, manter adequadamente o seu instrumento e amostra, manuseando o equipamento de acordo com as instruções do fabricante e seguindo cuidadosamente o procedimento do ensaio, tal como salientado nas secções Passos e Notas técnicas. Consultar a Secção 8, Avaliação dos resultados, para mais explicações.**

**A reprodutibilidade e exactidão dos dispositivos de pipetagem da amostra e do metanol são cruciais para o sucesso do método. Deve ser efectuada uma calibração periódica. É também essencial a utilização adequada destes dispositivos.**

PASSOS	NOTAS TÉCNICAS
1. Agitar todos os calibradores, controlos e amostras suave mas exaustivamente imediatamente antes da utilização.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Não agitar no vortex.</b> Os líquidos podem ser misturados à mão ou num inversor ou agitador basculante.</li> <li>• Os calibradores são um hemolisado de sangue total e podem apresentar uma aparência ligeiramente diferente das amostras de sangue total.</li> </ul>
2. Transferir 100 µl (consultar a primeira nota técnica relativa ao passo 2) de cada calibrador, controlo e/ou amostra para o tubo de microcentrífuga etiquetado adequadamente, utilizando uma pipeta de dispensação positiva.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alternativamente, podem ser extraídos 200 µl de amostra com 400 µl de metanol. Estes volumes mais elevados tornam fácil evitar o precipitado durante a remoção de alíquotas sobrenadante da amostra com o pipetador-diluidor (consultar o passo 7).</li> <li>• Pode ser utilizado um único tubo de capilaridade para dispensar todas as amostras, calibradores e controlos, desde que o exterior do cilindro de capilaridade e a ponta do êmbolo sejam exaustivamente limpos entre a dispensação de cada amostra com um pano de laboratório humedecido.</li> </ul>
3. Adicionar 200 µl (consultar a primeira nota técnica relativa ao passo 2) de metanol a cada um dos tubos de microcentrífuga com uma pipeta de dispensação positiva. Tapar <b>imediatamente</b> todos os tubos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deve ser utilizada uma pipeta de dispensação positiva ou um Repetidor Eppendorf para a dispensação de metanol devido ao facto de a viscosidade do metanol ser baixa em relação à da água.</li> </ul>
4. Agitar no vortex cada uma dos tubos de microcentrífuga durante pelo menos dez segundos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A agitação no vortex pouco depois da adição do metanol minimizará o tempo necessário para fracturar quaisquer partículas que se possam formar. A mistura da amostra com o metanol deve apresentar-se completamente homogénea imediatamente após a agitação no vortex.</li> </ul>
5. Incubar o conteúdo dos tubos de microcentrífuga à temperatura ambiente (18–25°C) durante pelo menos um minuto após a conclusão agitação da última amostra no vortex.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os tubos de microcentrífuga podem incubar durante até uma hora após a agitação no vortex e antes da centrifugação.</li> </ul>
6. Centrifugar os tubos de microcentrífuga numa microcentrifugadora durante pelo menos dois minutos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O sobrenadante pode apresentar uma aparência ligeiramente amarelada ou esverdeada, mas não deve apresentar-se turvo. Se o sobrenadante apresentar um aspecto turvo em repouso, deve ser centrifugado novamente (força g x minutos ≥25.000 g-min).</li> </ul>

PASSOS	NOTAS TÉCNICAS
7. Retirar cuidadosamente 100 µl de sobrenadante com o pipetador-diluidor ou com uma pipeta de dispensação positiva. Dispensar o sobrenadante com 200 µl de Diluente específico de ciclosporina Emit® 2000 para o copo da amostra COBAS MIRA®. Tapar <b>imediatamente</b> o copo da amostra após a dispensação de cada amostra.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evitar o precipitado quando remover alíquotas do sobrenadante da amostra com o pipetador-diluidor.</li> <li>• O diâmetro interno da tubagem do pipetador-diluidor deve ser inferior a 1 mm para minimizar a contaminação da amostra.</li> <li>• A ponta do pipetador-diluidor deve ser limpa entre as dispensações de amostra para minimizar a contaminação.</li> </ul>
8. Agitar os sobrenadantes diluídos cobrindo os suportes da amostra e/ou de calibração com a tampa do suporte e inverter completamente o(s) suporte(s) pelo menos 10 vezes. Em seguida, aplicar suavemente ligeiras pancadas no(s) suporte(s) para libertar quaisquer bolhas de ar que estejam retidas no fundo dos copos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para evitar a obtenção de um valor de ensaio quando não está presente qualquer amostra, garantir que todos os copos de amostra contêm amostra.</li> <li>• Os sobrenadantes diluídos podem permanecer em copos de amostra <b>não perfurados</b> por períodos não superiores a 4 horas antes de serem analisados. Uma vez perfurados, os sobrenadantes diluídos podem ser reutilizados por um período adicional de 2 horas, desde que o tempo total decorrido desde a preparação não exceda 4 horas.</li> <li>• O volume de cada sobrenadante diluído é suficiente para seis ensaios de réplicas.</li> </ul>
9. Colocar os suportes na plataforma do suporte.	(nenhum)
10. Agitar suave mas exaustivamente os reagentes e colocar nas posições adequadas no suporte do Reagente 5 <sub>s</sub> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Não agitar no vortex.</b> Os reagentes podem ser misturados à mão ou num inversor ou oscilador. Se existir uma bolha a cobrir bocal de qualquer dos frascos de reagente, perfurar a bolha com um instrumento limpo.</li> </ul>
11. Inserir segmentos de cuvete vazios nas posições respectivas.	(nenhum)
12. Purgar as seringas premindo as teclas bolhas. <INFO> e <6> SYSTEM CHECKS. Premir <1> PRIME. O ecrã responderá com "PRIME". Premir <F1> START para purgar. Permitir que o sistema escorva 5 ciclos completos. Premir novamente <F1> para interromper a escorvagem.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verificar se as seringas apresentam bolhas. Verificar se as correntes de líquido que saem das sondas apresentam um fluxo estável. Se necessário, remover quaisquer bolhas das seringas e/ou substituir a(s) sonda(s).</li> </ul>
13. <i>Para pré-calibrar:</i> Premir <ROUTINE> e, em seguida, no local correspondente ao número da posição da amostra, digitar "PC". O ecrã responderá com "PCAL". Seleccionar os testes a pré-calibrar e, em seguida, premir <ENTER>. Prosseguir para o passo 16.  <i>Para calibrar:</i> Premir <ROUTINE> e, em seguida, no local correspondente ao número da posição da amostra, digitar "CA". O ecrã responderá com "CAL". Seleccionar os testes a calibrar e, em seguida, premir <ENTER>... Prosseguir para o passo 14.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-calibrar quando ensaiar calibradores individualmente (sem amostras ou controlos).</li> <li>• Calibrar quando ensaiar amostras e/ou controlos com calibradores.</li> </ul>
14. <i>Para programar a Lista de trabalhos:</i> Premir <ROUTINE>. Digitar a(s) posição(ões) da amostra e as teclas de teste apropriadas (testes a efectuar) para cada uma, premindo em seguida <ENTER>. Se se pretender duplicados, premir duas vezes as Teclas de teste apropriadas e, em seguida, premir <ENTER>.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Garantir que a rotina programada à localização dos copos de amostra no suporte das amostras.</li> </ul>
15. Para executar controlos ou amostras de doentes a partir de uma curva armazenada, programar a lista de trabalho <ROUTINE> tal como no passo 14, premir <ENTER> e, em seguida, premir <START>.	(nenhum)
16. Premir <STATUS>. O ecrã STATUS apresentará "RACK HANDLING POSSIBLE" e "SEGMENT HANDLING POSSIBLE". Premir <START>. Se análise não for iniciada, o instrumento apresentará uma mensagem de sistema no fundo do monitor CRT. Consultar o manual do operador para obter informações mais detalhadas.	(nenhum)

## Calibração

1. Calibrar sempre que for utilizado um novo lote de reagentes. Pode ser necessária uma recalibração quando são efectuadas alterações significativas no instrumento (por ex., alterações na pipetagem e sistemas fotométricos) durante a manutenção do instrumento.
2. Verificar se o sistema de química se encontra a funcionar correctamente seguindo as instruções do manual do operador do instrumento.
3. Pré-tratar um conjunto de Calibradores específicos da ciclosporina Emit® 2000 de acordo com o protocolo de pré-tratamento de amostras. Os calibradores podem ser pré-tratados em conjunto com as amostras e controlos.
4. Colocar os calibradores pré-tratados no suporte de calibrador COBAS MIRA® apropriado e calibrar de acordo com as instruções do manual do operador do instrumento.
5. Aceitar a calibração se cada controlo de dois ou três níveis se situar dentro dos limites de controlo (consultar em baixo, para obter informações sobre a forma de estabelecer os limites de controlo).

## Controlo da Qualidade

### Limites temporários do controlo

1. Após a calibração inicial, ensaiar três réplicas de cada um dos controlos multi-nível (2 ou mais) numa única execução. Recomenda-se o teste dos controlos por ordem descendente. Registrar os resultados do controlo. Não eliminar qualquer resultado do controlo, excepto se tiver sido produzido por erro do operador ou avaria do instrumento ou se o resultado do controlo pode ser rejeitado por um teste estatístico separado.
2. Repetir mais duas vezes a calibração, o ensaio dos controlos e o registo dos resultados do controlo, tal como foi descrito no Passo 1. A partir das três execuções, devem ser registados nove (9) resultados em cada nível.
3. Calcular uma concentração média de controlo para cada controlo com base nas nove determinações geradas para esse nível.
4. Definir limites temporários de controlo para cada nível de controlo, utilizando as concentrações médias de controlo determinadas no Passo 3 e consultando a Tabela 2. Por exemplo, se a concentração média de controlo é de 100 ng/ml, os limites de controlo serão de 70 ng/ml (-30%) e 130 ng/ml (+30%).

Tabela 2 — Limites do controlo

Controlo*	Concentração média do controlo (ng/ml)	Limite
Baixo†	50–100	média ± 30%
	101–150	média ± 20%
Médio	151–300	média ± 20%
Alto	301–400	média ± 20%

\* Utilizar controlos de dois níveis (baixo e alto) ou de três níveis.

† Executar apenas um nível do controlo baixo. Se o controlo baixo se situar dentro do intervalo de 50–100 ng/ml, definir os limites de controlo de acordo com a média ±30%. Se o controlo baixo se situar dentro do intervalo de 101–150 ng/ml, definir os limites de controlo de acordo com a média ±20%.

5. Utilizar os limites temporários estabelecidos durante pelo menos 30 dias de calendário de execução de amostras de doentes. Para estabelecer os limites permanentes, reunir um mínimo de 20 determinações em cada nível de controlo e recalibrar pelo menos de 10 em 10 dias durante o período em forem utilizados os limites temporários.

**Nota: Os limites temporários do controlo devem ser correctos ao longo de 30 dias. Todavia, se qualquer controlo apresentar um desvio consistente do ensaio em relação aos seus limites temporários, estabelecer novamente limites temporários de controlo, repetindo os passos 1 a 5, referidos acima. Se os desvios do controlo persistirem, contactar um consultor técnico para obter assistência**

### Limites permanentes do controlo

1. Recolher resultados de controlo durante os 30 dias de calendário (um mínimo de 20 leituras em cada nível) em que os limites temporários do controlo estiverem a ser utilizados. Recomenda-se o teste dos controlos por ordem descendente. Não eliminar qualquer resultado do controlo, excepto se tiver sido produzido por erro do operador ou avaria do instrumento ou se o resultado do controlo pode ser rejeitado por um teste estatístico separado.
2. Recalcular a média e o desvio padrão das concentrações do controlo para cada nível, incluindo todos os resultados recolhidos no Passo 1 e os nove resultados obtidos durante o estabelecimento dos limites temporários.
3. Os limites permanentes do controlo devem ser estabelecidos em ±2.25 DP da média, conquanto estes limites não sejam inferiores a ±12% da média e não sejam superiores a ±25% em relação à média. Se o DP de ±2.25 em relação à média for inferior a ±12% da média, definir os limites permanentes do controlo em ±12% da média. Se o DP de ±2.25 em relação à média for superior a ±25% da média, definir os limites permanentes do controlo em ±25% da média. Depois de terem sido obtidas pelo menos 20 curvas de calibração, os limites permanentes do controlo podem ser redefinidos através do cálculo da média e multiplicando por 2 o desvio padrão para cada nível de controlo.
4. Estabelecer novos limites permanentes do controlo sempre que for utilizado um novo conjunto de controlos. Os novos limites podem ser estabelecidos através do ensaio dos novos controlos em 20 execuções que sejam verificadas utilizando os controlos antigos.

### Controlo Diário da Qualidade

1. Ensaiair cada um dos controlos de dois ou três níveis pelo menos uma vez em cada execução. Se, durante uma execução, for adicionado reagente adicional a uma cassete ou forem introduzidos no sistema uma nova cassete ou frasco de reagente, efectuar a validação ensaiando pelo menos um controlo por cada cassete ou frasco adicional. Se for exigido o teste de mais do que um nível do controlo pelos procedimentos de operação do seu laboratório, esses requisitos deverão ser cumpridos.

2. Verificar cada uma das execuções utilizando as seguintes instruções:

- Se os controlos se situarem dentro dos seus limites de controlo, aceitar a execução.
- Se qualquer dos controlos não se situar dentro dos seus limites de controlo, examinar todos os materiais, confirmar que não existe qualquer erro do operador ou avaria do instrumento e executar de novo esse controlo. Se, após a repetição do teste, o controlo se situar dentro dos seus limites de controlo, aceitar a execução.
- Se o controlo continuar a não se situar dentro dos seus limites de controlo, recalibrar. Se, após a recalibração, os controlos se situarem dentro dos seus limites de controlo, aceitar a execução.
- Se, após a recalibração, qualquer dos controlos não se situar dentro dos seus limites de controlo, examinar todos os materiais, confirmar que não existe qualquer erro do operador ou avaria do instrumento e executar de novo o controlo. Se, após a repetição do teste, o controlo se situar dentro dos seus limites de controlo, aceitar a execução.
- Se, após a repetição do teste, um controlo se mantiver mesmo assim fora dos limites de controlo, contactar um consultor técnico para obter assistência.

**Nota: Se, de acordo com os procedimentos de funcionamento no seu laboratório, for necessária uma verificação dos resultados dos testes mais frequente, esses requisitos deverão ser cumpridos.**

### Diluição de amostras com concentração elevada

Se o ensaio de uma amostra de doente pré-tratada apresentar um resultado superior a 500 ng/ml (416.3 nmol/l) de ciclosporina (ou seja, a impressão apresenta "OUT OF TEST RANGE"), utilizar as orientações seguintes para diluir manualmente um alíquota da amostra de doente ensaiada (colhido a partir do copo da amostra COBAS MIRA®) com uma solução de metanol a 25% em Diluente específico da ciclosporina Emit® 2000.

1. Preparar uma solução de metanol a 25% em Diluente específico de ciclosporina Emit® 2000.
  - a. Pipetar 2.5 ml de metanol (grau de reagente ou superior) num frasco volumétrico de 10 ml.
  - b. Preencher o volume de líquido até perfazer 10 ml com Diluente específico de ciclosporina Emit® 2000.
  - c. Agitar exaustivamente a solução por inversão repetida.

Minimizar a exposição da solução ao ar. A solução pode ser utilizada durante até uma semana após a preparação, quando armazenada à temperatura ambiente, num recipiente bem selado.

2. Diluir e ensaiar amostras pré-tratadas de alta concentração.

- a. Num copo de amostra COBAS MIRA® limpo, combinar uma parta de amostra de doente ensaiada (retirada do copo de amostra COBAS MIRA® original) com duas partes de solução de metanol a 25% em Diluente específico de ciclosporina Emit® 2000 (preparado de acordo com as orientações apresentadas acima). O volume mínimo necessário para executar duas réplicas é de 125 µl para os sistemas COBAS MIRA® e COBAS MIRA® S e de 175 µl para o sistema COBAS MIRA® Plus.
- b. Tapar imediatamente a amostra diluída.
- c. Ensaiair a amostra diluída utilizando os passos 8 a 16 do Procedimento de pré-tratamento e ensaio.
- d. Multiplicar o resultado do ensaio por 3 para obter uma estimativa da concentração de ciclosporina.

**Nota: Os sobrenadantes diluídos podem ser utilizados durante 2 horas após o ensaio inicial, desde que o tempo total decorrido desde a preparação não exceda 4 horas.**

Alternativamente, as amostras de sangue total com alta concentração podem ser diluídas com um calibrador de sangue total negativo utilizando as seguintes orientações:

1. Agitar suave mas exaustivamente o calibrador de sangue total negativo e as amostras de sangue total de alta concentração, imediatamente antes da utilização.
2. Combinar uma parte de amostra de sangue total com duas partes de calibrador de sangue total negativo.
3. Agitar exaustivamente a solução por inversão repetida.
4. Pré-tratar e ensaiar a amostra de sangue total diluída utilizando os passos 1 a 16 do Procedimento de pré-tratamento e ensaio.
5. Multiplicar o resultado do ensaio por 3 para obter uma estimativa da concentração de ciclosporina.

## 8 Avaliação dos resultados

Os resultados são calculados automaticamente pelo software dos sistemas COBAS MIRA®, COBAS MIRA® S ou COBAS MIRA® Plus. Consultar o manual do operador para obter instruções completas.

O efeito de contaminação deve ser considerado durante a avaliação de uma amostra de concentração baixa testada imediatamente a seguir a uma amostra com uma concentração de ciclosporina de 500 ng/ml ou superior. A dimensão da contaminação varia de sistema para sistema; os estudos indicaram que a contaminação pode ser de até 4% (por ex., 2 ng/ml a partir de uma amostra de 50 ng/ml ou 32 ng/ml a partir de uma amostra de 800 ng/ml). Para minimizar a contaminação, manter adequadamente o seu instrumento e amostra, manuseando o equipamento de acordo com as instruções do fabricante e seguindo cuidadosamente o procedimento do ensaio, tal como salientado nas secções Passos e Notas técnicas.

## 9 Limitações

- O Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 destina-se apenas à utilização em diagnóstico *in vitro* na medição de ciclosporina em sangue total. Este ensaio não foi concebido para ser utilizado na medição de ciclosporina no soro ou no plasma.
- Uma potencial fonte de erro é a contaminação. A dimensão da contaminação varia de sistema para sistema; os estudos indicaram que a contaminação pode ser de até 4%.
- Não utilizar uma solução de lixívia para purgar os sistemas COBAS MIRA®, COBAS MIRA® S ou COBAS MIRA® Plus. A utilização de uma solução de lixívia afectará negativamente o desempenho do ensaio.

## 10 Valores esperados

Não existe qualquer intervalo terapêutico sólido para a ciclosporina no sangue total. A complexidade do estado clínico, as diferenças individuais na sensibilidade aos efeitos imunossuppressivos e nefrotóxicos da ciclosporina, a co-administração de outros imunossuppressores, o tipo de transplante, o tempo decorrido após o transplante e um conjunto de factores adicionais contribuem para requisitos diferentes em termos dos níveis sanguíneos óptimos de ciclosporina. Os valores individuais de ciclosporina não devem ser utilizados como único indicador para efectuar alterações do regime de tratamento. Todos os doentes devem ser alvo de uma avaliação clínica exaustiva antes de se efectuarem quaisquer ajustes no tratamento, devendo os utilizadores do ensaio estabelecer os seus próprios intervalos com base na experiência clínica. Estes intervalos variarão de acordo com o teste de diagnóstico *in vitro* comercial utilizado. Os intervalos devem ser estabelecidos para cada teste comercial utilizado.

Uma avaliação clínica do Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 foi conduzida em doentes submetidos a transplantes de coração, rim e fígado em três locais de estudo e, num quarto local de estudo, em doentes submetidos a transplantes de rim e fígado. Em cada local, os níveis sanguíneos mínimos de ciclosporina foram monitorizados em série.

Foram incluídos neste estudo cento e trinta e dois (132) doentes: 30 doentes submetidos a transplante cardíaco, 65 doentes submetidos a transplante renal e 37 doentes submetidos a transplante hepático. Foram analisadas mais de 4000 amostras de sangue. Os doentes foram acompanhados durante uma média de 127 dias (4.1 meses), com um intervalo de 37 a 312 dias. Os regimes de tratamento variaram de acordo com as instituições e com os doentes.

A Tabela 3 apresenta os resultados do Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 ao longo do tempo relativamente a 26 doentes (9 doentes submetidos transplante de coração, 6 de rim e 11 de fígado) que não experimentaram rejeição moderada ou grave, nefrotoxicidade ou níveis séricos de creatinina superiores a 2 mg/dl. Apesar de o limite superior normal para a creatinina sérica ser de aproximadamente 1.7 mg/dl, foi seleccionado o nível de 2 mg/dl para contemplar o facto de os doentes submetidos a transplante apresentarem níveis séricos de creatinina elevados devido a uma combinação de factores, incluindo o procedimento cirúrgico e os efeitos de várias drogas nefrotóxicas. A informação constante na Tabela 3 resultou de uma medição de ciclosporina em cada um dos períodos para cada doente testado durante o período de tempo. Nem todos os doentes foram testados durante cada um dos períodos de tempo.

**Tabela 3 — Níveis de ciclosporina ao longo do tempo em doentes que não experimentaram rejeição, nefrotoxicidade ou níveis séricos de creatinina elevados**

Período de tempo	Rim (6 doentes)			Fígado (11 doentes)			Coração (9 doentes)		
	N (doentes)	Média (ng/ml)	DP (ng/ml)	N (doentes)	Média (ng/ml)	DP (ng/ml)	N (doentes)	Média (ng/ml)	DP (ng/ml)
Semana 1	5	123	47	9	330	126	9	279	89
Semana 2	6	240	132	10	254	117	9	402	141
Semana 3	6	359	149	11	288	46	8	527	187
Semana 4	6	289	180	11	250	111	9	386	122
Mês 2	6	270	122	10	230	68	9	337	148
Mês 3	6	205	77	11	276	104	8	343	226
Mês 4	5	200	56	10	224	83	8	315	127

A Tabela 4 apresenta a distribuição de todas as leituras do Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 para os mesmos 26 doentes; são incluídas várias medições para cada doente.

**Tabela 4 — Distribuição das medições de ciclosporina em doentes que não experimentaram rejeição, nefrotoxicidade ou níveis séricos de creatinina elevados**

Concentração de ciclosporina	Rim (6 doentes)		Fígado (11 doentes)		Coração (9 doentes)	
	N (amostras)	%	N (amostras)	%	N (amostras)	%
< 50 ng/ml	1	0.6	9	2.5	6	1.9
50–100 ng/ml	10	6.4	5	1.4	16	5.1
100–150 ng/ml	26	16.7	39	10.9	17	5.4
150–200 ng/ml	34	21.8	64	17.9	17	5.4
200–250 ng/ml	26	16.7	70	19.6	32	10.2
250–300 ng/ml	24	15.4	52	14.5	37	11.8
300–350 ng/ml	16	10.3	48	13.4	36	11.5
350–400 ng/ml	5	3.2	31	8.7	33	10.5
400–450 ng/ml	3	1.9	17	4.7	40	12.7
450–500 ng/ml	5	3.2	9	2.5	26	8.3
500–550 ng/ml	3	1.9	2	0.6	10	3.2
550–600 ng/ml	0	0	0	0	10	3.2
> 600 ng/ml	3	1.9	12	3.4	34	10.8

Através da inspecção visual dos dados apresentados na Tabela 4, foram identificados intervalos que foram representativos da maioria dos resultados do ensaio não associados com rejeição, nefrotoxicidade ou níveis séricos de creatinina elevados. Nos doentes submetidos a transplante renal, 81% das determinações situaram-se entre 100 e 350 ng/ml. De modo similar, nos doentes submetidos a transplante hepático, 76% das determinações situaram-se entre 100 e 350 ng/ml. Não foi efectuada qualquer tentativa no sentido de identificar intervalos representativos dos nove doentes submetidos a transplante cardíaco porque cinco destes doentes, todos tratados no mesmo centro médico, apresentavam níveis sanguíneos de ciclosporina significativamente superiores aos dos quatro doentes que foram tratados noutros centros médicos. Não deverão ser retiradas quaisquer conclusões aplicáveis universalmente a partir dos dados apresentados acima.

As amostras representativas utilizadas para calcular as percentagens apresentadas na Tabela 5 e 6 foram seleccionadas do seguinte modo. Para os doentes que experimentaram qualquer tipo de rejeição ou nefrotoxicidade, foram seleccionadas as amostras recolhidas imediatamente antes (no máximo a uma semana) do episódio. Para os doentes que não experimentaram rejeição e para os doentes que não experimentaram nefrotoxicidade, foram incluídas no cálculo uma amostra por semana durante o primeiro mês e uma amostra por mês nos dois meses seguintes.

**Tabela 5 — Número e percentagens de doentes com amostras nos intervalos de concentração de ciclosporina descritos e que experimentaram rejeição**

Concentração de ciclosporina	Número de doentes	Número de doentes com rejeição	Percentagem de doentes com rejeição	Intervalo de confiança de 95%
<b>Coração</b>				
<200 ng/ml	13	4	30.8%	5.7% a 55.9%
≥200 ng/ml	87	8	9.2%	3.1% a 15.3%
<b>Rim e fígado</b>				
<100 ng/ml	20	2	10%	-3.1% a 23.1%
≥100 ng/ml	314	20	4.6%	3.7% a 9.1%

**Tabela 6 — Número e percentagens de doentes com amostras nos intervalos de concentração de ciclosporina descritos e que experimentaram nefrotoxicidade**

Concentração de ciclosporina	Número de doentes	Número de doentes com nefrotoxicidade	Percentagem de doentes com nefrotoxicidade	Intervalo de confiança de 95%
<b>Coração</b>				
<500 ng/ml	115	4	3.5%	0.1% a 6.8%
≥500 ng/ml	28	3	10.7%	-0.7% a 22.2%
<b>Rim</b>				
<350 ng/ml	264	7	2.7%	0.7% a 4.6%
≥350 ng/ml	21	1	4.8%	-4.3% a 13.9%
<b>Fígado</b>				
<350 ng/ml	126	4	3.2%	0.1% a 6.2%
≥350 ng/ml	35	4	11.4%	0.9% a 22.2%

Apesar de as tendências indicadas nas Tabelas 5 e 6 serem consistentes com os resultados esperados (isto é, um aumento de incidência de rejeição com baixos níveis de ciclosporina e um aumento da incidência de nefrotoxicidade com níveis altos de ciclosporina), não podem ser retiradas quaisquer conclusões aplicáveis universalmente devido à reduzida dimensão da amostra populacional.

## 11 Desempenho

As características de desempenho do Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 são afectadas por todos os parâmetros de leitura. As informações que seguem representam o desempenho total do sistema e não devem ser interpretadas como pertinentes apenas para os reagentes e calibradores.

### Intervalo de referência

O Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 quantifica as concentrações de ciclosporina em sangue total humano contendo 40–500 ng/ml de ciclosporina. Resultados quantitativos de até 1500 ng/ml podem ser estimados por diluição e nova execução do ensaio com amostras de concentração elevada e multiplicando depois os resultados pelo factor de diluição (consultar a Secção 7, Procedimento, Diluição de amostras com concentração elevada).

### Sensibilidade

A sensibilidade do Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 é de 40 ng/ml. Este nível representa a menor concentração de ciclosporina que pode ser distinguida a partir dos 0 ng/ml com um intervalo de confiança de 95%.

### Especificidade

Os compostos cuja estrutura química ou uso terapêutico concomitante possam sugerir uma possível interferência foram testados. Os compostos apresentados na Tabela 7 não interferem com o Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 quando são testados na presença de 200 ng/ml de ciclosporina. Os níveis testados foram determinados de acordo com a directiva proposta pelo Comité Nacional de Padrões Laboratoriais Clínicos (National Committee of Clinical Laboratory Standards) (NCCLS) relativa a estudos de interferência.<sup>8</sup>

**Tabela 7 — Drogas co-administradas e metabolitos da droga que não interferem**

Droga	Nível de ensaio (µg/ml)	Droga	Nível de ensaio (µg/ml)
Acetaminofeno	200	Cetoconazole	70
Albuterol	0.18	Lidocaína	60
Alopurinol	60	Lovastatina	4
Alprazolam	0.37	Metilprednisolona	12
Amitriptilina	20	Metoclopramida	4
Amfotericina B	20	Ácido micofenólico	100
Atenolol	40	Glicurónio do ácido micofenólico	1000
Azatriopina	10	Misoprostol	0.015
Captopril	50	Sulfato de morfina	6
Carbamazepina	120	Muromonab-CD3	1
Cefaclor	230	Naproxeno	1000
Cloranfenicol	250	Nitroglicerina	5
Cimetidina	100	Omeprazole	14
Ciprofloxacina	43	Fenobarbital	150
Ciclofosfamida	250	Fenitoína	100
Digoxina	0.02	Piperacilina	8
Dipiridamol	25	Prazosina	3
Disopiramida	30	Prednisolona	12
Encainida	1050	Prednisona	12
Eritromicina	200	Prometazina	10
Etanol	3500	Ranitidina	200
Fluconazole	81	Rapamicina	0.1
Furosemda	20	Ácido Salicílico	500
Ganciclovir	400	Sulfametoxazol	400
Gentamicina	120	Tacrolimus	0.1
Heparina	8000 U/l	Teofilina	250
Hidralazina	32	Triantereno	2.8
Hidroclorotiazida	40	Trimetoprim	20
Imunoglobulina	5000	Ácido Valpróico	500
Isoniazida	70	Vancomicina	630
Cloridrato de isoproterenol	0.06		

A reactividade cruzada com os quatro principais metabolitos da ciclosporina foi avaliada na presença de 200 ng/ml de ciclosporina. A percentagem de reactividade cruzada, indicada na Tabela 8, foi determinada através da subtração da concentração real de ciclosporina (200 ng/ml) a partir da concentração aparente de ciclosporina, dividindo este valor pela concentração de metabolito adicionado e expressando o resultado sob a forma de percentagem.

**Table 8 — Reactividade cruzada do metabolito na presença de ciclosporina**

Metabolito da ciclosporina	Nível de metabolito Testado (ng/ml)	Reactividade cruzada (%)
AM1 (M17)	500	<0.3
AM19 (M8)	500	3
AM4N (M21)	500	<0.3
AM9 (M1)	670	7.3

### Substâncias Endógenas

Não foi observada qualquer interferência em amostras às quais foram adicionados 40 mg/dl de bilirrubina, 20 mg/dl de ácido úrico, 3000 mg/dl de triglicéridos ou 500 mg/dl de colesterol.

### Interações medicamentosas

Informação apresentada em seguida, reportada pela Sandoz Pharmaceuticals, foi retirada do Physicians' Desk Reference.<sup>9</sup>

A ciclosporina é extensivamente metabolizada pelo fígado. Deste modo, os níveis circulantes de ciclosporina podem ser influenciados por drogas que afectam as enzimas microssómicas hepáticas, particularmente o sistema do citocromo P-450. As substâncias conhecidas por inibirem estas enzimas diminuirão o metabolismo hepático e aumentarão os níveis de ciclosporina. As substâncias indutoras da actividade do citocromo P-450 aumentarão o metabolismo hepático e reduzirão os níveis de ciclosporina. A monitorização dos níveis circulantes de ciclosporina e o ajuste da dose adequada de Sandimmune® (ciclosporina) são essenciais quando estas drogas são utilizadas concomitantemente. . . .

### Drogas que aumentam os níveis de ciclosporina

Diltiazem	Cetoconazole
Nicardipina	Fluconazole
Verapamil	Itraconazole
Danazol	Eritromicina
Bromocriptina	Metilprednisolona
Metoclopramida	

### Drogas que diminuem os níveis de ciclosporina

Rifampina	Fenitoína
Fenobarbital	Carbamazepina

### Precisão

A precisão total e a respectiva componente de precisão intra-ensaio foram determinadas em três locais de ensaio de acordo com a norma experimental do Comité Nacional de Padrões Laboratoriais Clínicos (National Committee of Clinical Laboratory Standards) (NCCLS) para a avaliação da precisão.<sup>10</sup> Foram testados em triplicado controlos BioRad de três níveis, com duas execuções por dia durante 20 dias (N = 120). A precisão total foi determinada nove vezes, utilizando dois analisadores separados (cada um dos sistemas de química COBAS MIRA® e COBAS MIRA® S) e três lotes de reagente (cada um com um lote de calibrador separado). A Tabela 9 apresenta o valor médio normal (n = 9) para cada nível do controlo, os intervalos do desvio padrão (DP) e os intervalos da % do coeficiente de variação (%CV) obtidos.

**Tabela 9 — Precisão**

Nível do controlo (ng/ml)*	Precisão intra-ensaio		Precisão total	
	Intervalo do DP	Intervalo da % CV	Intervalo do DP	Intervalo da % CV
72	4.4 – 8.5	6 – 11.8	7.6 – 13.8	10.4 – 19.1
178	6.9 – 11.2	4 – 6.2	10.7 – 16.8	6 – 10
414	14.8 – 26.1	3.8 – 6.1	26.9 – 35.6	6.3 – 8.5

\* Média de nove valores determinados para três lotes de reagente em três analisadores. Foram utilizados lotes de calibrador separados para cada lote de reagente. A média variou de 63.3 a 77.8 ng/ml para o nível 1 do controlo, de 166.7 a 187.4 ng/ml para o nível 2 do controlo e de 390.6 a 436.1 ng/ml para o nível 3 do controlo.

Os estudos internos de precisão demonstraram que a precisão obtida com o sistema de química COBAS MIRA® Plus é comparável à dos sistemas de química COBAS MIRA® e COBAS MIRA® S.

### Exactidão

Os níveis sanguíneos de ciclosporina nos doentes começaram a ser monitorizados imediatamente após o transplante e durante aproximadamente três meses. O Local 1 monitorizou níveis de doentes submetidos a transplante de rim e fígado. Os Locais 2, 3 e 4 monitorizaram níveis de doentes submetidos a transplante de rim, fígado e coração. As amostras foram analisadas pelo Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 e por dois métodos de referência: um radioimunoensaio (RIA) empregando um anticorpo monoclonal específico e procedimentos de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Na Tabela 10, é apresentada uma análise comparativa dos resultados.

**Tabela 10 — Análise comparativa**

Local	Declive	Inter.	R	SEE	Nº de amostras	Nº de doentes	Xméd	Yméd
<b>RIA vs Ensaio Emit®</b>								
Local 1	0.82	24	0.968	26.78	593	21	269.9	245.1
Local 2	0.91	-4	0.934	40.43	1113	37	265.1	236.6
Local 3	0.79	8	0.929	35.69	786	38	309.7	252.5
Local 4	0.84	13	0.981	24.56	1650	40	311.3	275.9
<b>HPLC vs Ensaio Emit®</b>								
Local 1	1.02	24	0.965	25.39	595	21	217.5	244.9
Local 2	1.14	-3	0.917	39.71	1113	37	205.7	231.9
Local 3	0.92	9	0.828	50.68	1030	38	277.7	263.1
Local 4	1.05	12	0.975	25.33	1645	40	252.6	277
<b>HPLC vs RIA</b>								
Local 1	1.24	0	0.976	23.66	595	21	220.1	272.7
Local 2	1.29	-3	0.912	43.17	1045	37	207.9	265.3
Local 3	1.12	-1	0.818	59.09	663	38	279.5	312.2
Local 4	1.24	-1	0.977	26.38	1648	40	252.6	312.5

Os dados de correlação apresentados na Tabela 10 representam os resultados de estudos efectuados num conjunto de laboratórios. As diferenças nos dados estatísticos de correlação são típicas das diferenças de laboratório para laboratório que podem ser observadas quando é utilizado qualquer dos ensaios isolados ou uma combinação dos ensaios descritos. Para converter valores entre métodos, não deverão ser utilizados estes dados de correlação nem quaisquer outros factores de correcção. Qualquer comparação dos métodos deverá ser efectuada apenas depois de ser atingida uma padronização cuidadosa dos métodos.

**Recuperação**

A recuperação de ciclosporina foi avaliada utilizando sangue total isento de ciclosporina, ao qual se adicionou ciclosporina original. O sangue total foi contaminado para atingir 85 ng/ml e 425 ng/ml de ciclosporina. Três alíquotas de cada contaminação foram pré-tratadas, reunidas e ensaiadas dez vezes. Os resultados do estudo de recuperação são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11 — Estudo de recuperação**

Valor nominal (ng/ml)	85	425
Intervalo dos valores médios medidos (ng/ml):	82.5–90.7	408.4–459.4
Intervalo da percentagem de recuperação	97%–106.7%	96.1%–108.1%

Foi conduzido um estudo separado para determinar o efeito do hematócrito sobre a recuperação de ciclosporina a partir de uma amostra. Foram adicionados glóbulos vermelhos a plasma para criar cinco amostras de sangue total com hematócritos que variavam entre 15% e 59%. Foram adicionadas concentrações nominais de 75 ng/ml e 425 ng/ml de ciclosporina para separar alíquotas de cada uma das amostras. Estes alíquotas foram então ensaiados. Como se pode observar na Tabela 12, a influência do hematócrito sobre a recuperação de ciclosporina foi insignificante.

**Tabela 12 — Efeito do hematócrito sobre a recuperação da ciclosporina**

Hematócrito (%)	15	26	37	46	59
<b>75 ng/ml Ciclosporina</b>					
Recuperação (%)	109	104	111	115	111
%CV	5	6.3	4.1	3.3	7.4
<b>425 ng/ml Ciclosporina</b>					
Recuperação (%)	91.3	97.7	97.5	101	101
%CV	6.4	5.3	7.5	7.9	8.7

**Linearidade**

A linearidade do Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 foi avaliada de acordo com a directiva proposta pelo Comité Nacional de Padrões Laboratoriais Clínicos (National Committee of Clinical Laboratory Standards) (NCCLS) para avaliação da linearidade.<sup>11</sup> Verificou-se que o ensaio foi linear no intervalo de 40 a 500 ng/ml. A informação apresentada na Tabela 13 foi determinada através da elaboração de um gráfico do valor alvo (x) versus resultado analítico (y).

**Tabela 13 — Estudo de linearidade**

	Analizador COBAS MIRA® Plus	Analizador COBAS MIRA®	Analizador COBAS MIRA® S
N	20	20	20
Declive	0.97	0.98	1.05
Intersecção	-4.5	3.9	-13.3
valor p	0.82	0.70	0.72

**12 Apêndice**

**Definições do Instrumento COBAS MIRA®**

<b>GENERAL</b>	MEASUREMENT MODE : ABSORB	<b>CALIBRATION</b>	CALIB. INTERVAL : ON REQUEST
	REACTION MODE : R-S-SR1		STANDARD NONLINEAR CUP-POS: USER DEFINED
	CALIBRATION MODE : STD NONLIN		1 : 0 2 : 50 ng/mL
	REAGENT BLANK : NO BLANK		3 : 100 4 : 200 ng/mL
	CLEANER : NO		5 : 350 6 : 500 ng/mL
	WAVELENGTH : 340 nm		7 : NO 8 : NO
	DECIMAL POSITION : 0		REPLICATE : DUPL
	UNIT : ng/mL		DEVIATION : NO
<b>ANALYSIS</b>	SAMPLE DIL. NAME : H20		CALC. MODEL : LOGIT/LOG4
	POST DIL. FACTOR : NO		CORRECTION STD : NO
	CONC.FACTOR : NO	<b>CONTROL</b>	CS1 POS : NO
	SAMPLE CYCLE : 1		CS2 POS : NO
	VOL.: 36.0 µL		CS3 POS : NO
	DIL.: 39.0 µL		
	REAGENT CYCLE: 1		
	VOL.: 155 µL		
	START REAGENT 1 CYCLE: 4		
	VOL.: 75.0 µL		
	DIL.: 20.0 µL		
<b>CALCULATION</b>	SAMPLE LIMIT : NO		
	REAC. DIRECTION : INCREASE		
	CHECK : OFF		
	ANTIGEN EXCESS : NO		
	CONVERS. FACTOR : 1.00000		
	OFFSET : 0.00000		
	NORM. RANGE LOW : USER DEFINED*		
	HIGH : USER DEFINED		
	NUMBER OF STEPS : 1		
	CALC. STEP A : KINETIC		
	READINGS FIRST : 11 LAST: 22		
	REACTION LIMIT : NO		

*\*Nota: a sensibilidade descrita para o Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 é de 40 ng/ml*

**Definições dos instrumentos COBAS MIRA® S e COBAS MIRA® Plus**

<b>GENERAL</b>	MEASUREMENT MODE : ABSORB	<b>CALIBRATION</b>	CALIB. INTERVAL : ON REQUEST
	REACTION MODE : R-S-SR1		STANDARD POS : USER DEFINED
	CALIBRATION MODE : LOGIT/LOG4		1 : 0 2 : 50 ng/mL
	REAGENT BLANK : NO BLANK		3 : 100 4 : 200 ng/mL
	CLEANER : NO		5 : 350 6 : 500 ng/mL
	WAVELENGTH : 340 nm		7 : NO 8 : NO
	DECIMAL POSITION : 0		REPLICATE : DUPL
	UNIT : ng/mL		DEVIATION : NO
			CORRECTION STD : NO
<b>ANALYSIS</b>	POST DIL. FACTOR : NO	<b>CONTROL</b>	CS1 POS : NO
	CONC. FACTOR : NO		CS2 POS : NO
	SAMPLE CYCLE : 1		CS3 POS : NO
	VOLUME : 36.0 µL		
	DILUTION NAME : H20		
	VOLUME : 39.0 µL		
	REAGENT CYCLE : 1		
	VOLUME : 155 µL		
	START R1 CYCLE : 4		
	VOLUME : 75.0 µL		
	DILUTION NAME : H20		
	VOLUME : 20.0 µL		
<b>CALCULATION</b>	SAMPLE LIMIT : NO		
	REAC. DIRECTION : INCREASE		
	CHECK : OFF		
	ANTIGEN EXCESS : NO		
	CONVERS. FACTOR : 1.00000		
	OFFSET : 0.00000		
	TEST RANGE LOW : ON		
	HIGH : ON		
	NORM. RANGE LOW : USER DEFINED*		
	HIGH : USER DEFINED		
	NUMBER OF STEPS : 1		
	CALC. STEP A : KINETIC		
	READINGS FIRST : 11 LAST: 22		
	REACTION LIMIT : NO		

*\*Nota: a sensibilidade descrita para o Ensaio específico de ciclosporina Emit® 2000 é de 40 ng/ml.*

**13 Risco e segurança**

**Nocivo. Contém azida de sódio.**

**R22: Nocivo por ingestão.**

**R32: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.**

**S36: Usar vestuário de protecção adequado.**

Preparado em conformidade com a Directiva 92/32/EEC do Concelho da UE sobre etiquetas.

EINECS 247-852-1

Para obter informações adicionais sobre saúde e segurança, consultar a ficha de material de segurança (Material Safety Data Sheet - MSDS) disponível no site Internet da Dade Behring Inc., www.dadebehring.com, ou contactar o seu representante local.

## 14 Bibliografia

1. Decontamination of laboratory sink drains to remove azide salts. Manual Guide-Safety Management No. CDC-22. Centers for Disease Control, Atlanta, GA; April 30, 1976.
2. McMillan MA: Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Pharmac Ther* 1989;42:135-156.
3. Kahan BD: Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989;321:1725-1738.
4. Schran HF et al: Determination of cyclosporine concentrations with monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1987;33:2225-2229.
5. Wong PY et al: Quality assessment of cyclosporine monitoring – Canadian validations. *Transplant Proc* 1990;22:1216-1217.
6. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, JY Richmond, RW McKinney, (eds). Atlanta, GA, US Dept of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention; Bethesda, MD, National Institutes of Health, 1993.
7. Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; Final Rule. Federal Register. Part II; Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration; 29 CFR Part 1910.1030; Friday, December 6, 1991.
8. NCCLS Proposed Guideline EP7-P. Interference testing for clinical chemistry. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, February 1982.
9. Physician's Desk Reference, ed 49. Montvale, NJ, Medical Economics Data Production Company, 1995, pp 2184-2185.
10. NCCLS Tentative Guideline EP5-T2. Precision performance of clinical chemistry devices-second edition. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, March 1992.
11. NCCLS Proposed Guideline EP6-P. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, August 1986.

## ► 15 Chave dos símbolos

	Fabricado por
<b>EC REP</b>	Representante Autorizado
<b>IVD</b>	Dispositivo Médico para Diagnóstico <i>In Vitro</i>
<b>LOT</b>	Código do Lote
<b>EXP</b> YYYY-MM-DD	A data em "Utilizar antes de" encontra-se no formato ano-mês-dia (AAAA-MM-DD)
 2°C	Limitação da Temperatura
	Marca CE
<b>REF</b>	Número de Catálogo
	Consulte as Instruções de Utilização

2001-12-13 PE-1

## Notas

 **0800-170417**  
SAC - Serviço de Atendimento ao Cliente  
sac/brazil@dadebehring.com

Importado e distribuído por  
**DADE BEHRING LTDA.**  
Rua Geraldo Flausino Gomes, 61 - 1º Andar  
Brooklin - São Paulo - SP - CEP 04575-060  
Fone (11) 3371-3200 - Fax (11) 3371-3201  
CNPJ: 00.897.408/0001-08  
Resp. Téc.: Nanci A. Trindade  
CRF - SP: 7.297

Para obter assistência técnica, contactar a Syva Company:

**1-800-227-8994 nos EUA**

**1-800-264-0083 no Canadá**

► Fora dos EUA e Canadá, contactar o representante local da Syva Company.

**Aviso: A adulteração dos reagentes, a utilização de instrumentos inadequados ou outra falha no cumprimento das instruções definidas neste rótulo podem afectar as características do desempenho e as indicações do rótulo explícitas ou implícitas.**

 Syva®, Syva® e Emit® são marcas comerciais registadas da Syva Company nos EUA e noutros países.

COBAS MIRA®, COBAS MIRA® S e COBAS MIRA® Plus são marcas comerciais registadas da Roche Diagnostics Systems Inc.

Sandimmune® é uma marca comercial registada da Sandoz Pharmaceutical Corporation.

© 1991, Syva Company

**Dade Behring Limited**  
**EC REP** Regus House, Atterbury  
Milton Keynes MK10 9RG  
United Kingdom

 **Syva Company**  
Dade Behring Inc.  
Cupertino, CA 95014

  
Printed in USA  
Revisto Abril 2003  
6R004UL.11SL

04/21/03 • **Part No.** 6R004UL.11SL\_Portuguese • **Layout:** 8-1/2" x 11"  
• **Final size:** N/A • **Folded to:** N/A  
• **Doc #** 204-03-22-02 (if applicable) • **Colors:** Black