

REF: 10008656

Aplicação

O ensaio CEDIA[®] Tacrolimus é um dispositivo médico in vitro que se destina à determinação quantitativa de tacrolimus em sangue total humano, utilizando analisadores de química clínica automatizados, como um meio auxiliar para gestão da terapêutica com tacrolimus em doentes submetidos a alotransplantes renais e hepáticos.

Resumo e explicação do teste

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

O tacrolimus exerce um efeito semelhante ao da ciclosporina em concentrações aproximadamente 100 vezes inferiores às da ciclosporina.¹ A distribuição do tacrolimus entre o sangue total e o plasma depende de vários factores, tais como o hematócrito, a concentração do fármaco e a concentração de proteínas plasmáticas. A razão entre a concentração no sangue e no plasma apresentou uma média de 35 (com uma variação de

12 a 67).⁶⁻⁷ O tacrolimus é largamente metabolizado pelo sistema do citocromo P-450, principalmente pela CYP3A.⁸⁻¹¹ O fármaco é metabolizado em 8 metabolitos (M-1 a M-8) através de desmetilação e hidroxilação. Os metabolitos M-1 e M-2 demonstraram uma actividade farmacológica significativa em bioensaios.¹¹ Estima-se que a semi-vida média do tacrolimus in vivo seja de 48 horas.⁸⁻¹¹ Nos doentes com um risco de rejeição normal, recomenda-se uma concentração terapêutica no sangue total entre 5 e 20 ng/mL.¹¹⁻¹⁴ Foi igualmente descrita uma grande variabilidade nas concentrações de tacrolimus no sangue total de cada doente, bem como entre diferentes doentes.¹⁵ Assim, a monitorização do tacrolimus é importante para uma utilização eficaz do fármaco na prevenção da rejeição dos alotransplantes renais e hepáticos, especialmente em doentes de alto risco. A medição das concentrações de tacrolimus no sangue total, associada a outros dados laboratoriais e à avaliação clínica, constitui a melhor forma de otimizar o efeito imunossupressor e minimizar os efeitos secundários nos doentes.

O ensaio CEDIA Tacrolimus utiliza a tecnologia de ADN recombinante (patente n.º 4708929 nos EUA) para produzir um sistema único de imunoensaio enzimático homogéneo.¹⁶ O ensaio baseia-se na enzima β -galactosidase, que foi separada em dois fragmentos inactivos (dador de enzimas e aceitador de enzimas) através de engenharia genética. Estes fragmentos voltam a associar-se espontaneamente formando enzimas totalmente activas, as quais, no formato do ensaio, fragmentam um substrato e produzem uma alteração de cor que pode ser medida através de espectrofotometria.

No ensaio, o fármaco existente na amostra compete com o análogo do tacrolimus conjugado com o dador de enzimas (DE) da β -galactosidase para um número limitado de locais de ligação dos anticorpos contra o análogo do tacrolimus. Se existir fármaco na amostra, este liga-se aos anticorpos contra o análogo do fármaco, deixando o conjugado com o DE livre para formar enzimas activas com o aceitador de enzimas (AE). Se não existir fármaco na amostra, os anticorpos contra o análogo do fármaco ligam-se ao análogo do fármaco conjugado com o DE, inibindo a reassociação entre o DE e o AE, não se formando enzima activa. A quantidade de enzima activa formada e a alteração da absorbância resultante são directamente proporcionais à quantidade de fármaco presente na amostra.

Reagentes

- Tampão de reconstituição do AE:** Contém PIPES [Piperazina-N,N-bis (2-ácido etanesulfónico)], 0,39 μ g/mL de anticorpos monoclonais de ratinho anti-análogo do tacrolimus, estabilizador e conservante (1 x 26 mL).
- 1a Reagente AE:** Contém 0,171 g/l de aceitador de enzimas (microbiano), sais de tampão e conservante (1 x 26 mL).
- 2 Tampão de reconstituição do AE:** Contém MES [tampão ácido 2-(N-morfolino) etanesulfónico], anticorpo secundário, detergente e conservante (1 x 11 mL).
- 2a Reagente DE:** Contém 6 nM (119 ng/mL) de dador de enzimas (microbiano) conjugado com um análogo do tacrolimus, 3,27 g/l de vermelho de clorofenol- β -D-galactopiranosido, estabilizadores e conservante (1 x 11 mL).
- 3 Reagente de extracção:** Contém 300 mM de ZnSO₄ (1 x 50 mL).

Materiais adicionais: Códigos de barras Hitachi 1xR1 e 1xR2.

Materiais adicionais necessários (mas não fornecidos):

N.º de catálogo 10008666 - Kit de calibradores CEDIA Tacrolimus
Analisador automatizado de química clínica
Metanol, grau HPLC (\geq 99,8% de pureza)

Tubos de microcentrífuga de fundo redondo
Controlos de tacrolimus (Contacte a Assistência Técnica da Microgenics para obter informações)

Precauções e advertências

Apenas para utilização em diagnóstico in vitro: Utilize as precauções habituais referentes à manipulação de todos os reagentes laboratoriais.

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

PRECAUÇÃO - ADVERTÊNCIA: Os reagentes incluídos no ensaio CEDIA Tacrolimus contêm menos de 0,1% de azida de sódio. Evite o contacto com a pele e as membranas mucosas. Lave as áreas afectadas com água em abundância. Consulte imediatamente um médico em caso de ingestão de reagentes ou de contacto dos mesmos com os olhos. A azida de sódio pode reagir com a canalização de chumbo ou de cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Quando eliminar estes reagentes, lave sempre com uma grande quantidade de água de forma a impedir a acumulação de azidas. Limpe as superfícies metálicas expostas com uma solução de hidróxido de sódio a 10%.

Preparação e conservação dos reagentes

Para preparar as soluções para os analisadores Hitachi, consulte as instruções seguintes. Para todos os outros analisadores, consulte o folheto de aplicação específico do analisador. Prepare as soluções seguintes, utilizando reagentes e tampões refrigerados (2°C-8°C). Retire o kit do compartimento de refrigeração, imediatamente antes da preparação das soluções de trabalho.

Prepare as soluções na ordem seguinte para minimizar a possibilidade de contaminação.

Solução do dador de enzimas R2: Utilizando um dos adaptadores fornecidos, ligue o frasco 2a (reagente DE) ao frasco 2 (tampão de reconstituição do DE). Inverta suavemente para misturar, certificando-se de que todo o material liofilizado do frasco 2a é transferido para o frasco 2. Evite a formação de espuma. Separe o frasco 2a e o adaptador do frasco 2 e elimine. Tape o frasco 2 cheio e deixe repousar durante cerca de 5 minutos à temperatura ambiente (15°C-25°C). Volte a misturar suavemente e registre a data de reconstituição no rótulo do frasco. Coloque o frasco directamente no compartimento de reagentes do analisador ou no compartimento de refrigeração (2°C-8°C) e deixe repousar 15 minutos antes de utilizar.

Solução do aceitador de enzimas R1: Utilizando um dos adaptadores fornecidos, ligue o frasco 1a (reagente AE) ao frasco 1 (tampão de reconstituição do AE). Inverta suavemente para misturar, certificando-se de que todo o material liofilizado do frasco 1a é transferido para o frasco 1. Evite a formação de espuma. Separe o frasco 1a do adaptador e elimine. Tape o frasco 1 cheio e deixe repousar durante cerca de 5 minutos à temperatura ambiente (15°C-25°C). Volte a misturar suavemente e registre a data de reconstituição no rótulo do frasco. Coloque o frasco directamente no compartimento de reagentes do analisador ou no compartimento de refrigeração (2°C-8°C) e deixe repousar 15 minutos antes de utilizar.

Solução de extracção: Adicione um volume exacto de 10 mL de reagente de extracção à temperatura ambiente a um frasco limpo, seco e hermético. Adicione ao frasco um volume exacto de 40 mL de metanol, purificado por HPLC, com um grau de pureza 99,8%, e misture suavemente. Identifique como "Solução de trabalho de extracção de tacrolimus". Registe a data actual e a data de validade (2 semanas a partir da data de fabrico) no rótulo. Conserve à temperatura ambiente.

Nota 1: Os componentes fornecidos neste kit destinam-se a ser utilizados como uma unidade integral. Não misture componentes de kits de ensaios CEDIA Tacrolimus de lotes diferentes ou de outros kits CEDIA.

Nota 2: Evite a contaminação cruzada de reagentes, fazendo corresponder de forma correcta as tampas aos frascos de reagentes. A solução R2 (reagente DE) deve ter uma cor amarela-alaranjada. Uma cor vermelha ou púrpura-avermelhada indica que o reagente foi contaminado e tem de ser eliminado.

Nota 3: Antes de efectuar o ensaio, as soluções R1 e R2 têm de estar à temperatura de conservação do compartimento de reagentes do analisador. Consulte o folheto de aplicação específico do analisador, para obter mais informações.

Nota 4: Prepare a solução R2 antes da solução R1.

Nota 5: Para garantir a estabilidade do reagente AE reconstituído, proteja-o da exposição contínua e prolongada à luz intensa.

Conserve os componentes à temperatura adequada, conforme indicado a seguir. **NÃO CONGELE.** Relativamente à estabilidade dos componentes não abertos, consulte o prazo de validade indicado nos rótulos da caixa ou dos frascos.

Solução R1: 60 dias refrigerada no analisador ou entre 2°C e 8°C.

Solução R2: 60 dias refrigerada no analisador ou entre 2°C e 8°C.

Solução de extracção: 2 semanas à temperatura ambiente (15°C-25°C).

Preparação das Amostras

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

1. Deixe os calibradores, os controlos e as amostras dos doentes atingirem a temperatura ambiente.
2. Misture bem as amostras (calibradores, controlos ou amostras dos doentes) agitando durante 15 a 20 minutos.

Extracção das amostras

Nota: Antes da produção e emissão dos resultados do doente utilizando o ensaio CEDIA Tacrolimus, familiarize-se com o procedimento de extracção e certifique-se de que a solução de extracção não ultrapassou o prazo de validade, ou seja, de que está a ser utilizada dentro do prazo de 2 semanas após a constituição.

1. Pipete um volume exacto de 200 µL da amostra para um tubo de microcentrífuga de fundo redondo.
2. Pipete um volume exacto de 200 µL de solução de extracção para o tubo de microcentrífuga.
3. Misture de imediato no agitador tipo vórtex, à velocidade máxima, durante 15 a 20 segundos.
4. Deixe o tubo da microcentrífuga repousar à temperatura ambiente durante 5 a 7 minutos.
5. Centrifugue numa microcentrífuga durante 5 minutos a 13 000 rpm (aproximadamente 15 000-16 000 x g).
6. Decante o sobrenadante para um recipiente de amostras e execute imediatamente a medição.

Nota: Analisadores Hitachi

Se o analisador não ler o código de barras, a sequência numérica do rótulo do código de barras pode ser introduzida manualmente, através do teclado.

O ensaio CEDIA Tacrolimus destina-se a ser utilizado em analisadores automatizados. Os dados específicos sobre o desempenho do ensaio estão arquivados na Microgenics Corporation.¹⁷

Procedimento do ensaio

Calibração

O ensaio CEDIA Tacrolimus produz uma curva padrão utilizando os kits de calibradores CEDIA Tacrolimus adequados. Antes de analisar as amostras do doente, valide a calibração do ensaio testando o(s) controlo(s) com os intervalos de recuperação estabelecidos para o ensaio CEDIA Tacrolimus.

Nota: Os cartões de atribuição dos valores dos calibradores são fornecidos em cada kit de calibradores. Antes de utilizar um novo kit de calibradores, verifique os seus parâmetros químicos para garantir que as concentrações do calibrador correspondem aos valores impressos no cartão de atribuição de valores.

Frequência da calibração

A recalibração é recomendada

- Após a mudança de frasco do reagente.
- Após a mudança do lote do calibrador ou do reagente (kit).
- Após a manutenção mensal do instrumento.
- Conforme for necessário de acordo com os procedimentos de controlo de qualidade.

Intervalo relatável

O intervalo relatável para o ensaio CEDIA Tacrolimus situa-se entre 2,0 ng/mL e 30 ng/mL de tacrolimus. A concentração mínima de tacrolimus detectável no sangue total pelo ensaio CEDIA Tacrolimus é de 2,0 ng/mL.

Amostras fora do intervalo

As amostras com valores de tacrolimus > 30 ng/mL podem ser apresentadas como concentração de tacrolimus > 30 ng/mL ou podem ser diluídas na proporção de uma parte da amostra original para uma parte de calibrador baixo e novamente analisadas. O valor obtido neste novo ensaio deve ser derivado da seguinte forma:

$$\text{Valor real} = 2 \times \text{valor diluído}$$

As amostras com valores abaixo da concentração mínima detectável pelo ensaio devem ser apresentadas como < 2,0 ng/mL de tacrolimus.

Controlo de qualidade e calibração

Cada laboratório deverá estabelecer a sua frequência de controlo. As boas práticas laboratoriais sugerem que sejam testados pelo menos dois níveis (por exemplo, pontos de decisão médica alto e baixo) de controlo de qualidade nos dias em que são testadas amostras de doentes e sempre que for efectuada uma calibração. Monitorize os valores de controlo, relativamente a quaisquer tendências ou desvios. Caso sejam detectadas tendências ou desvios, ou o controlo não se encontre dentro do intervalo especificado, reveja todos os parâmetros de funcionamento. Contacte a Assistência

Técnica da Microgenics, para obter assistência e recomendações sobre os materiais de controlo adequados.

Nota: Volte a avaliar os alvos e os intervalos dos controlos, após uma mudança de lote do reagente (kit).

Resultados e valores esperados

Consulte o manual do operador ou o protocolo específico para o analisador em questão, para obter informações de cálculo pormenorizadas.

Limitações - substâncias endógenas

As características de desempenho do ensaio CEDIA Tacrolimus não foram estabelecidas para outros fluidos corporais, além de sangue total humano com EDTA.

Crítérios de aceitação: Considera-se que o desempenho é aceitável quando a recuperação se situar a $\pm 1,5$ ng/mL do valor do tacrolimus em concentrações iniciais < 10 ng/mL, ou a $\pm 10\%$ de concentrações iniciais > 10 ng/mL de tacrolimus.

Ictericia: Não ocorreram interferências significativas resultantes da presença de bilirrubina não conjugada em concentrações de até 60 mg/dL.

Lipemia: Não ocorreram interferências significativas resultantes da presença de triglicéridos em concentrações de até 1500 mg/dL, nem de valores de colesterol até 500 mg/dL.

Proteínas totais: Não ocorreram interferências significativas resultantes da presença de albumina em concentrações de até 12 g/dL, nem de γ -globulina até 12 g/dL.

Factor reumatóide: Não ocorreram interferências significativas resultantes da presença de factor reumatóide em concentrações de até 573 UI/mL.

Intervalo do hematócrito: Não houve diferenças significativas com valores de hematócrito entre 15% e 60%.

Concentração de EDTA: As amostras de sangue total a serem testadas devem ser colhidas em tubos com EDTA (tampa cor de lavanda). As concentrações de EDTA não devem ser superiores a 4,5 mg/mL; assim, as amostras colhidas nos tubos com tampa cor de lavanda devem ocupar pelo menos 1/3 do tubo de colheita de modo a garantir que a concentração de EDTA é inferior a 4,5 mg/mL. Concentrações de EDTA superiores a 4,5 mg/mL podem afectar a quantificação.

A incidência de doentes com anticorpos contra a β -galactosidase da *E. coli* é extremamente baixa. No entanto, algumas amostras que contenham estes anticorpos poderão produzir concentrações erroneamente elevadas de tacrolimus, inconsistentes com o perfil clínico do doente. Se suspeitar da ocorrência desta situação, contacte a Assistência Técnica da Microgenics, para obter ajuda.

Tal como com qualquer outro ensaio que utilize anticorpos de rato, existe a possibilidade de interferência de anticorpos humanos anti-rato (HAMA). As amostras que contenham estes anticorpos poderão produzir concentrações erroneamente elevadas de tacrolimus, inconsistentes com o perfil clínico do doente. Se suspeitar da ocorrência desta situação, contacte a Assistência Técnica da Microgenics, para obter ajuda.

Limitações - efeito de fármacos administrados em simultâneo sobre a concentração de tacrolimus

O tacrolimus é largamente metabolizado pela isoenzima CYP3A4 no intestino e no fígado. Assim, a absorção e conseqüente eliminação do tacrolimus absorvido a nível sistémico pode ser influenciada por fármacos que afectem esta isoenzima. Os inibidores da CYP3A4 poderão diminuir o metabolismo do tacrolimus e aumentar as respectivas concentrações, enquanto os indutores da CYP3A4 poderão aumentar o metabolismo do tacrolimus e diminuir as suas concentrações. Sabe-se que os fármacos indicados a seguir são capazes de afectar as concentrações de tacrolimus, quer aumentando a absorção, quer diminuindo a sua depuração, ou ambos. Esta lista não é definitiva.⁷

Os fármacos que podem aumentar as concentrações de tacrolimus incluem:

Imunossuppressores: ciclosporina

Bloqueadores dos canais de cálcio: diltiazem, nicardipina, verapamil e nifedipina

Agentes antifúngicos: clotrimazol, fluconazol, ketoconazol e itraconazol

Antibióticos macrólidos: claritromicina, eritromicina e troleandomicina

Agentes procinéticos gastrointestinais: cisapride e metoclopramida

Outros: bromocriptina, cimetidina, danazol, inibidores da protease do VIH (por exemplo, ritonavir e indinavir), etinilestradiol, metilprednisolona, omeprazol e nefazodona

Os fármacos que podem diminuir as concentrações de tacrolimus incluem:

Anti-convulsivantes: carbamazepina, fenobarbital e fenitoína

Antibióticos: rifampicina e rifabutina

Preparações de ervas: Erva de São. João

Limitações - diferenças e variação do ensaio

Imunoensaios diferentes poderão apresentar resultados variáveis para a mesma amostra devido a variações específicas do ensaio na reactividade cruzada com metabolitos. Os doentes com diminuição da depuração poderão apresentar as maiores variações. Para esses doentes, a utilização deste ensaio poderá ser apoiada por um método cromatográfico mais específico para o composto inicial. Dada a potencial variabilidade da comparação do ensaio CEDIA Tacrolimus com a LC/MS para a detecção do tacrolimus em sangue total, é importante que cada laboratório estabeleça o seu próprio intervalo terapêutico.

Valores esperados

O intervalo recomendado para as concentrações de tacrolimus em sangue total, de forma a obter um tratamento pós-operatório eficaz nos doentes submetidos a alotransplantes renais ou hepáticos, situa-se entre 5 ng/mL e 20 ng/mL usando a LC/MS.¹¹⁻¹⁴ O intervalo terapêutico óptimo para o tacrolimus no sangue total não foi ainda estabelecido para este ensaio.

A situação médica actual e anterior do doente, as diferenças individuais na sensibilidade aos efeitos imunossuppressores e tóxicos do tacrolimus, a administração simultânea de outros imunossuppressores, o período de tempo decorrido após o transplante e vários outros factores poderão originar diferentes necessidades de níveis sanguíneos óptimos de tacrolimus. As concentrações individuais de tacrolimus não devem ser utilizadas como o único critério para alteração de regimes terapêuticos. Dada a heterogeneidade do estado clínico do doente, os médicos devem estabelecer um intervalo terapêutico desejado com base na sua própria experiência, bem como nas necessidades clínicas individuais de cada doente. Além disso, as concentrações de tacrolimus poderão variar de acordo com a metodologia usada. Não devem ser usados factores de conversão para prever os valores de cada doente num determinado método com os resultados obtidos com um método diferente. Além disso, as concentrações de tacrolimus para cada doente devem ser determinadas usando um método único e consistente para minimizar os efeitos causadores de confusão associados à reactividade cruzada e ao reconhecimento dos metabolitos.

Características específicas do desempenho

Os dados do desempenho típicos obtidos com o ensaio CEDIA Tacrolimus são apresentados mais abaixo.¹⁷ Excepto quando estiver indicado, todos os ensaios foram realizados de acordo com o procedimento de ensaio descrito no presente documento e usando o analisador Hitachi 917. Os resultados obtidos em laboratórios individuais poderão diferir destes dados. Para obter mais dados sobre o desempenho específico do analisador, consulte o protocolo de aplicação específico do analisador ou contacte a Assistência Técnica da Microgenics para obter ajuda.

Precisão

Os estudos da precisão intra-ensaio e inter-ensaio (reprodutibilidade) foram realizados com amostras de sangue total de doentes e de sangue total com adição de tacrolimus. Os resultados da precisão intra-ensaio e da precisão total (determinados em 21 séries individuais em 11 dias, conforme é descrito numa experiência de replicação modificada EP5-A do NCCLS) são os seguintes:

Precisão intra-ensaio e precisão total (reprodutibilidade)

Amostra	n	Méd	Intra-ensaio		Total	
			DP	CV %	DP	CV%
Doente 1	126	6,30	0,43	6,80	0,49	7,80
Doente 2	126	9,23	0,43	4,68	0,56	6,06
Doente 3	126	15,18	0,47	3,12	0,65	4,26
Adição 1	126	5,33	0,32	5,97	0,48	8,90
Adição 2	126	10,54	0,35	3,28	0,49	4,69
Adição 3	126	21,01	0,43	2,04	0,72	3,40

Linearidade

Para avaliar a linearidade do ensaio, uma amostra à qual foi adicionada uma elevada concentração de tacrolimus foi diluída com uma amostra de sangue sem tacrolimus, de forma a produzir uma série de amostras representativas do intervalo dinâmico do ensaio. A percentagem de recuperação foi determinada dividindo a concentração de tacrolimus observada pela concentração esperada. As concentrações esperadas foram determinadas usando a concentração elevada testada multiplicada pelo factor de diluição.

% Amostra elevada	Valor esperado (ng/mL)	Valor observado (ng/mL)	Recuperação (%)
100	28,9	28,9	100,0
80	23,1	23,9	103,4
60	17,3	18,1	104,7
40	11,5	12,4	107,7
20	5,8	6,1	106,2
0	0,0	0,0	--

Recuperação

Para avaliar a recuperação do ensaio CEDIA Tacrolimus, foi adicionado tacrolimus a amostras de sangue total normal, isento de tacrolimus, bem como a amostras de doentes contendo tacrolimus. Foram analisados duplicados de cada amostra. A percentagem de recuperação foi determinada através da divisão da dose observada em cada amostra pela concentração esperada do tacrolimus adicionado mais o tacrolimus original presente nas amostras.

	N	Valor esperado (ng/mL)	Valor observado (ng/mL)	Recuperação (%)
Amostra A	20	5,0	5,1	101,0
Amostra B	20	10,0	9,6	96,5
Amostra C	20	15,0	15,8	105,2
Amostra D	20	25,0	25,3	101,2

Especificidade

Foram adicionadas amostras contendo metabolitos do tacrolimus a amostras de sangue total contendo cerca de 12 ng/mL de tacrolimus. As amostras foram testadas com o ensaio e os resultados foram comparados com um controlo isento de metabolitos. A reactividade cruzada dos metabolitos foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{concentração medida} - \text{concentração do controlo}}{\text{concentração do metabolito adicionado}} \times 100\%$$

Os resultados são apresentados na tabela seguinte.

Reactividade cruzada com metabolitos do tacrolimus

Metabolitos do tacrolimus	Conc. esp. (ng/mL)	Conc. obs. (ng/mL)	Reactividade cruzada (%)
M-1,13-O-demetil	20	7,5	37,7
M-2,31-O-demetil	20	0,9	ND
M-3,15-O-demetil	20	0,9	ND
M-4,12-hidroxil	NA	NA	NA
M-5,15,31-O-didemetil	NA	NA	NA
M-6,13,31-O-didemetil	20	0,6	ND

ND - não detectável

NA - material não disponível

Foram adicionados imunossuppressores passíveis de serem administrados em simultâneo a amostras de sangue total contendo cerca de 15 ng/mL de tacrolimus, as quais foram testadas relativamente à reactividade cruzada. Os resultados são apresentados na tabela abaixo.

#	Inmunossuppressores administrados em simultâneo	Concentração testada (ng/mL)	Reactividade cruzada (%)
1	Ciclosporina	10.000	0,0
2	Sirolimus	30	0,7
3	Ácido micofenólico	100.000	0,0
4	Prednisona	100.000	0,0
5	Hidroocortisol	100.000	0,0
6	Prednisolona	100.000	0,0

Os seguintes compostos foram adicionados a amostras de sangue total isentas de tacrolimus, tendo a reactividade cruzada destas amostras sido testada usando o ensaio CEDIA Tacrolimus. Tal como a tabela seguinte demonstra, não se observou qualquer reactividade cruzada com nenhum dos compostos, nas concentrações testadas.

Reactividade cruzada com fármacos comuns

Composto	Concentração testada (ng/mL)	Concentração medida (ng/mL)	Reactividade cruzada (%)
Acetaminofeno	100.000	0,8	0,00
Acicloguanosina	100.000	-0,5	0,00
Amicacina	100.000	0,8	0,00
Ampicilina	100.000	0,8	0,00
Atenolol	40.000	-0,6	0,00
Azatioprina	100.000	0,6	0,00
Carbamazepina	100.000	0,6	0,00
Cloranfenicol	100.000	0,4	0,00
Cimetidina	100.000	0,1	0,00
Digoxina	10.000	0,0	0,00
Digitoxina	10.000	-0,2	0,00
Disopiramide	100.000	0,7	0,00
Eritromicina	100.000	0,3	0,00
Furosemida	100.000	-0,6	0,00
Fluconazol	100.000	0,6	0,00
Ganciclovir	100.000	-0,4	0,00
Gentamicina	100.000	0,1	0,00
Hidroclorotiazida	40.000	-0,5	0,00
Ibuprofeno	100.000	-0,6	0,00
Itraconazol	100.000	0,0	0,00
Kanamicina A	100.000	0,1	0,00
Kanamicina B	100.000	-0,1	0,00
Cetoconazol	100.000	-0,2	0,00
Lidocaina	100.000	0,3	0,00

A tabela continua

Composto	Concentração testada (ng/mL)	Concentração medida (ng/mL)	Reactividade cruzada (%)
Metilprednisolona	100.000	-0,8	0,00
Metoclopramida	100.000	0,0	0,00
Sulfato de morfina	100.000	-0,6	0,00
Glucuronido del ácido micofenólico	100.000	-1,3	0,00
N-acetilprocainam	100.000	-1,5	0,00
Naproxeno	100.000	0,7	0,00
Nifedipina	100.000	-0,2	0,00
Penicilina	100.000	-1,6	0,00
Fenobarbitol	100.000	-2,0	0,00
Fenitoína	100.000	-2,1	0,00
Prazosina	100.000	0,1	0,00
Primidona	100.000	-0,3	0,00
Procainamida	100.000	0,2	0,00
Propranolol	40.000	0,2	0,00
Quinidina	100.000	0,0	0,00
Rifampicina	60.000	-0,7	0,00
Ácido salicílico	100.000	-1,2	0,00
Espectinomicina	100.000	-1,3	0,00
Sulfato de estreptomina	100.000	-0,5	0,00
Teofilina	100.000	-1,2	0,00
Tobramicina	100.000	-2,2	0,00
Triametreño	100.000	-1,4	0,00
Ácido valproico	100.000	-2,0	0,00
Vancomicina	100.000	-2,0	0,00
Varapamil	100.000	-1,7	0,00

Sensibilidade

A sensibilidade funcional do ensaio CEDIA Tacrolimus é de 2,0 ng/mL, a qual foi determinada como a concentração da substância a analisar com um coeficiente de variação de aproximadamente 20%.

Comparação de métodos

Foi realizada uma comparação entre o ensaio CEDIA Tacrolimus (y), a LC-MS/MS e o MEIA. Esta comparação de métodos foi realizada com amostras (intervalo de concentração entre 0 e 30 ng/mL de tacrolimus) obtidas em doentes submetidos a transplantes renais ou hepáticos.

CEDIA vs.	Tipo de transplante	n	Declive	Intersecção	Correlação (r)
LC-MS/MS	Rim e fígado	187	1,190	0,70	0,9643
LC-MS/MS	Rim	118	1,157	1,01	0,9777
LC-MS/MS	fígado	69	1,193	1,04	0,9616
MEIA	fígado	50	0,945	0,28	0,8228

Referências

- Kino T, Hatanaka H, Myata S, et al. FK506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomyces II. Immunosuppressive effect of FK506 in vitro. J Antibiotics 1987; 40:1256-1265.
- Bierer BE, Jin YJ, Fruman DA, et al. FK506 and rapamycin: molecular probes of T-lymphocyte activation. Transplant Proc 1991;23:2850-2855.
- Schreiber SL. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. Science 1991;251:283-287.
- Thomson AW, Bonham CA, and Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. Ther Drug Monit 1995;17:584-591.
- Griffith JP, Kim JL, Kum EE, et al. X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. Cell 1995;82:507-522.
- Jusko WJ, Thomson AW, Fung W, et al. Consensus document; therapeutic monitoring of tacrolimus (FK506). Ther Drug Monit 1995;17:606-614.
- Physicians' Desk Reference, 58th ed. Thomson PDR at Montvale, NJ. 2004; Prograf®: 1323-1327.
- Lhoest GJJ, Maton N, Latinne D, et al. 15-demethyl FK506 and 15, 31-demethyl FK506 from human liver microsomes: isolation, identification (by fast bombardment mass spectrometry and NMR), and evaluation of in vitro immunosuppressive activity. Clin chem. 1994;50:740-744.
- 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.
- 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;19:338-352.
- Jusko WJ. Analysis of tacrolimus (FK506) in relation to therapeutic drug monitoring. Ther Drug Monit. 1995;17:596-601.
- Busuttill RW, Klintmalm GB, Lake JR, et al. General guidelines for the use of tacrolimus in adult liver transplant patients. Transplantation 1996;61:845-847.
- van Hooff JP, Boots JM, van Duijnhoven EM, et al. Dosing and management guidelines for tacrolimus in renal transplant patients. Transplant Proc. 1999;31:54S-57S.
- Oellerich M, Armstrong VW, Schutz E, and Shaw LM. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine and tarcolimus. Clin Biochem. 1998;31:309-316.
- Staatz CE, Willis C, Taylor PJ, and Tett SE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult kidney transplant recipients. Clin Pharmacology & Ther. 2002;72:660-669.
- Henderson DR, Friedman SB, Harris JD, et al. CEDIA, a new homogeneous immunoassay system. Clin chem. 1986;32:1637-1641.
- Dados nos arquivos da Microgenics Corporation.



Fabricante:

Microgenics Corporation
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538-6406 USA
Número de telefone
gratuito nos E.U.A.:
1-800-232-3342



Representante Autorizado na U.E.:



Microgenics GmbH
Spitalhofstrasse 94
D-94032 Passau Alemanha
Tel: +49 (0) 851-88 68 90
Fax: +49 (0) 851-88 68 910

Outros países:

Por favor, contacte o seu representante local da Microgenics.