

Immunosoppressori su sangue intero in LC-MS – Cod. LC75010

(Acido Micofenolico, Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus, Ciclosporina A)

PREPARATIVA AUTOMATIZZATA ASPEC

INTRODUZIONE

Gli immunosoppressori sono farmaci usati per il controllo di gravi manifestazioni allergiche, malattie autoimmuni e malattie correlate ai trapianti. Alcuni farmaci presentano un effetto diffuso sul sistema immunitario, mentre altri agiscono su uno specifico bersaglio.

I principali farmaci immunosoppressori utilizzati sono l'acido Micofenolico, la Ciclosporina A, il Tacrolimus, il Sirolimus e l'Everolimus.

L'**Acido Micofenolico** (Mofetil o MPA) è un potente immunosoppressore che inibisce in modo reversibile l'enzima Inosina-monofosfato deidrogenasi Tipo 2 coinvolto nella sintesi della guanosina. Poiché il modo d'azione dell'MPA differisce dalla Ciclosporina, dal Tacrolimus e dal Sirolimus, può essere co-prescritto come parte di un pannello farmacologico.

L' MPA è metabolizzato tramite glucuronazione per formare un metabolita inattivo (MPA-glucuronide) e anche un metabolita minore (MPA-acil-glucuronide).

La **Ciclosporina A** è il principio attivo che influenza la risposta immunitaria dell'individuo. Come gli altri, tale farmaco immunosoppressore è il prodotto naturale di alcuni miceti, ed è il principale agente terapeutico impiegato per bloccare il rigetto di trapianto allogenico; esplica la sua funzione essenzialmente bloccando la trascrizione dei geni delle citochine nei linfociti T.

Anche il **Tacrolimus** (anche noto come **FK-506**) è un farmaco immunosoppressore utilizzato soprattutto nei trapianti d'organo per ridurre l'attività del sistema immunitario del paziente e di conseguenza il rischio di rigetto.

Ha caratteristiche simili alla Ciclosporina, ma è molto più potente a parità di volume. Come la Ciclosporina ha un ampio spettro di interazioni contrarie, fra cui quella con il pompelmo che aumenta la concentrazione del farmaco nel plasma sanguigno.

È stato anche usato in preparazioni topiche per il trattamento di gravi dermatiti.

Sirolimus ed **Everolimus** stanno raccogliendo sempre maggiori consensi nella gestione del trapianto renale in quanto rappresentano una strategia ideale per ridurre l'utilizzo di inibitori della calcineurina nei pazienti a basso rischio immunologico.

Tali farmaci sembrano essere associati ad un minor rischio di ipertensione e intolleranza al glucosio. Nonostante siano caratterizzati da una minore nefrotossicità rispetto agli inibitori della calcineurina, essi potrebbero potenziare la tossicità renale della Ciclosporina e richiedono dunque un monitoraggio costante della funzionalità renale.

L'uso del Sirolimus e dell'Everolimus deve essere evitato nel periodo perioperatorio in quanto la loro somministrazione potrebbe causare un grave ritardo nella cicatrizzazione delle ferite. Il bilancio rischio/beneficio di una terapia continuativa con questi farmaci, nei pazienti che sviluppano un'iperlipidemia refrattaria al trattamento, andrebbe attentamente rivalutato. Il monitoraggio terapeutico di tali farmaci è essenziale a causa del rischio di effetti tossici quali anemia, leucopenia e trombocitopenia.

EUREKA srl – LAB DIVISION
VAT N° 01547310423
E-mail: info@eurekaone.com
www.eurekaone.com



Head Quarter:
Via Enrico Fermi 25
60033 Chiaravalle (AN) ITALY
Tel. +39 071 7450790
Fax + 39 071 7496579



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare gli Immunosoppressori su sangue intero dopo una semplice deproteinizzazione e lettura in LC-MS.

Recupero del Metodo : > 98 %

<u>Sensibilità del Metodo :</u>	Acido Micofenolico	0,1 mg/l
	Tacrolimus	0,1 ng/ml
	Sirolimus	0,1 ng/ml
	Everolimus	0,1 ng/ml
	Ciclosporina A	1,0 ng/ml
	Acido Micofenolico	5.38%
<u>CV% :</u>	Tacrolimus	5.92%
	Sirolimus	5.50%
	Everolimus	5.85%
	Ciclosporina A	5.08%
	Acido Micofenolico	0,1 – 50 mg/l
	Tacrolimus	0,5 – 5.000 ng/ml

<u>Range dinamico del Metodo :</u>	Sirolimus	0,5 – 5.000 ng/ml
	Everolimus	0,5 – 5.000 ng/ml
	Ciclosporina A	1 – 50.000 ng/ml
	Acido Micofenolico	4 – 15 mg/l
	Tacrolimus	1 – 50 ng/ml
	Sirolimus	1 – 50 ng/ml

<u>Range terapeutico:</u>	Everolimus	1 – 50 ng/ml
	Ciclosporina A	10 – 2000 ng/ml
	Acido Micofenolico	4 – 15 mg/l
	Tacrolimus	1 – 50 ng/ml

Contenuto della Confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2 – 8 °C, eccetto il Reagente A ed il Reagente B che vanno stoccati a – 20 °C.

Reagente A – Soluzione Deproteinizzante + Standard Interni, **1 x 30 ml**

Reagente B – Standard Interno, **4 x 10 ml**

Da ricostituire con 10 ml di Reagente A al momento dell'uso. La soluzione ricostituita è stabile 3 mesi a –20 °C.

Reagente C1 – Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 1, **1 x 1 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente C2 – Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 2, **1 x 1 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente C3 – Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 3, **1 x 1 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente C4 – Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 4, **1 x 1 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente C5 – Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 5, **1 x 1 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente M1 – Fase Mobile M1, **2 x 500 ml**

Reagente M2 – Fase Mobile M2, **1 x 500 ml**

Colonne Clean-up, 100 pz

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento LC-MS triplo quadrupolo
(modalità MRM)
Valvola Divert a 6 vie
Interfaccia ESI (+)
Pompa binaria
Loop 100 µl
Preparatore Automatico/
Autoiniettore Aspec GX 274
Computer gestionale

Modalità di prelievo ematico :

Provetta con anticoagulante EDTA
Stabile per circa 4 settimane a 2 – 8
°C o 4 mesi a – 20 °C.

PROCEDURA ANALITICA (automatizzata ASPEC):

FASE 1 : Deproteinizzazione dei campioni

	Calibratore	Campione	Controlli
Reagente C – Calibratore liofilo	100 µl		
Campione		100 µl	
Controlli			100 µl
Reagente B – Standard interno (precedentemente ricostituito con il Reagente A)	300 µl	300 µl	300 µl

FASE 2 : Caricare tutto il deproteinizzato nelle colonne di Clean-up

FASE 3 : Raccogliere l'eluato

INIEZIONE :

- Iniettare 100 µl della soluzione nel sistema LC

Immunosoppressori su sangue intero – Avvertenze

REAGENTE C1-C2-C3-C4-C5 : CALIBRATORI LIOFILI (5 x 1 ml)

LIVELLI	1	2	3	4	5
Acido Micofenolico (mg/L)	0	2.0	5.0	10.0	15.0
Tacrolimus (ng/mL)	0	3.2	6.3	12.5	31.0
Sirolimus(ng/mL)	0	5.3	9.8	19.9	31.9
Everolimus(ng/mL)	0	5.3	9.8	19.9	31.9
Ciclosporina A(ng/mL)	0	100	200	500	1000
Modalità d'uso e Ricostituzione: i Calibratori devono essere usati per calibrare il sistema LC. Aggiungere esattamente 1 ml di H ₂ O di grado HPLC e agitare delicatamente per 30 min. fino a quando tutto il materiale non è dissolto. Prima del campionamento rimescolare gentilmente per assicurarne l'omogeneità.					
Conservazione e stabilità: i Calibratori sono stabili 36 mesi se conservati a – 20 °C. Una volta ricostituiti 7 giorni se conservati a 2 – 8 °C e 1 mese a – 20 °C. Non usarli dopo la data di scadenza.					
Confezionamento : 5 x 1 ml					
Precauzioni: questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo.					

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica *nuova* PURSUIT XRs C18 2 mm x 30 mm termostata a 60°C. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Metanolo (20 : 80 v/v) al flusso di 300 µl / minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile M2 al flusso di 400 µl / minuto e scaricare i primi 30 ml.

NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.

Se la T Amb del Laboratorio è > 25°C si consiglia di conservare a 2-8°C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

Il sistema lavora in SPE ONLINE (colonna monolitica RP C18 2,5 cm x 4,6mm) con la Fase Mobile M1.

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare una soluzione di H₂O : Metanolo (20 : 80 v/v) per 30 minuti scaricandola.

LAVAGGIO SIRINGA AUTOCAMPIONATORE

Lavare la siringa e dell'ago del campionatore, prima e durante di ogni seduta analitica, con Metanolo.

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

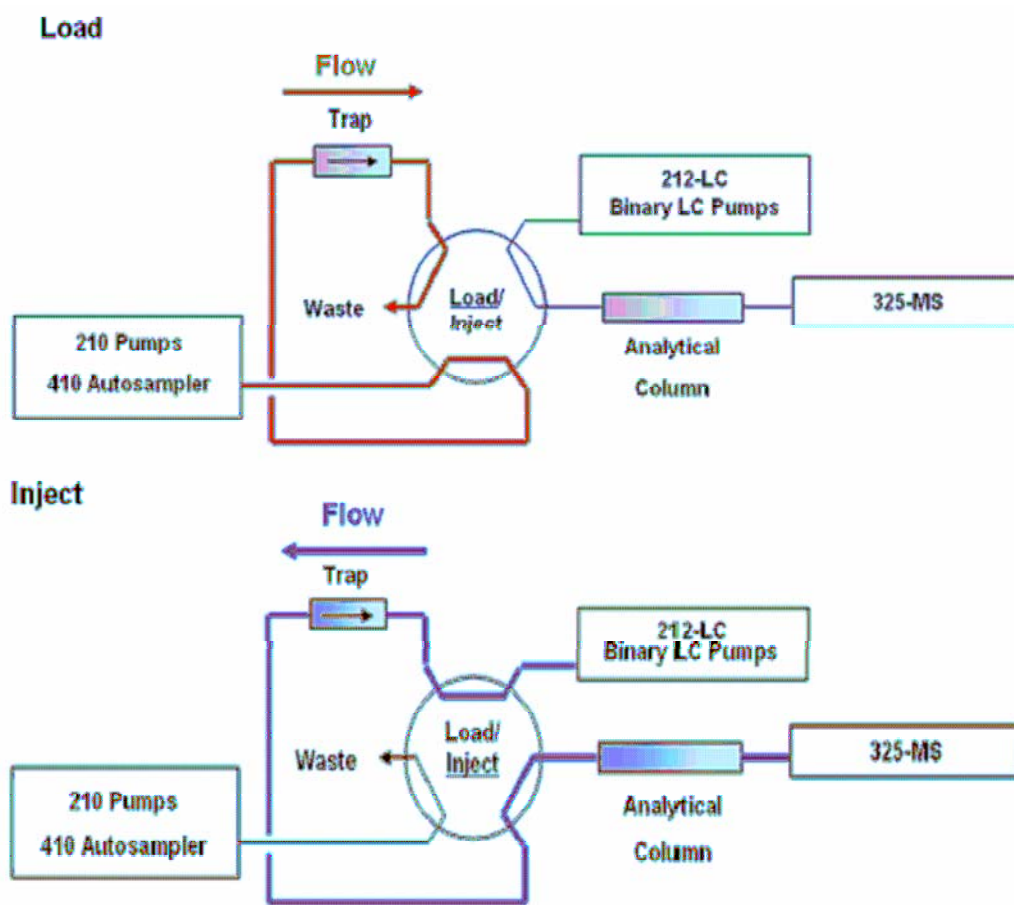
SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE

PARAMETRI LC

Flusso di lavoro consigliato SPE online (Fase Mobile M1)	500 µl/minuto
Flusso di lavoro consigliato colonna analitica (Fase Mobile M2)	400 µl/minuto

ANALITA	PARENT ION
Acido Micofenolico	321.0 (H ⁺)
Tacrolimus	826.4 (Na ⁺) 821.4 (NH ₄ ⁺)
Sirolimus	936.4 (Na ⁺) 931.4 (NH ₄ ⁺)
Everolimus	980.4 (Na ⁺) 975.4 (NH ₄ ⁺)
Ciclosporina A	1224.7 (Na ⁺) 1219.7 (NH ₄ ⁺)

Divert Valve



SPE ONLINE	
Tempo (min)	Posizione Valvola
0-1	Load
1-4	Inject
4-5	Load



Immunosoppressori su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento LC-MS)

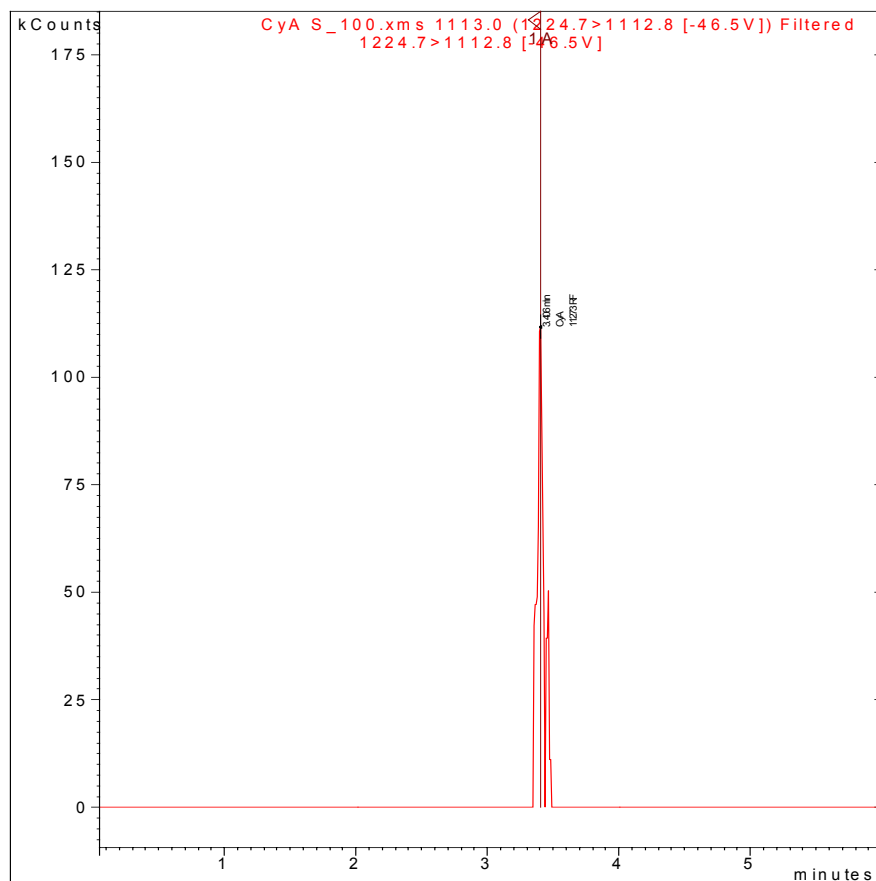


Fig. 1 :	Campione su sangue intero
	R.T. 3.40 CICLOSPORINA A 100 ng/ml

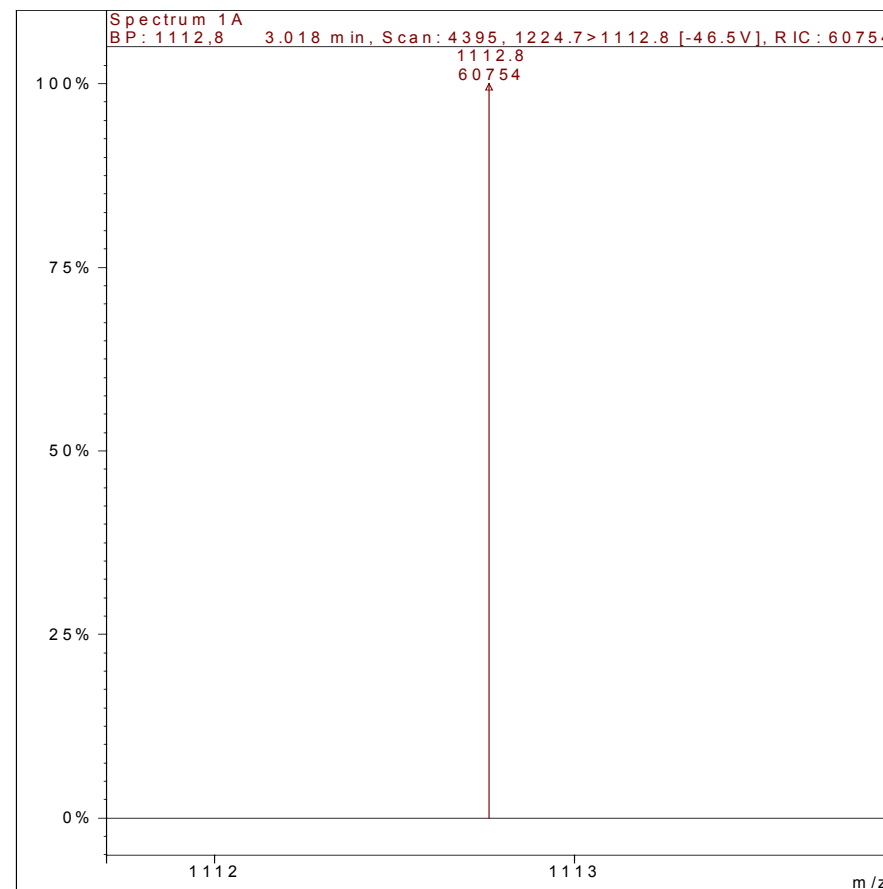


Fig. 2 :	Spettro di Massa della Ciclosporina A
	Transizione 1224.7 > 1112.8

Immunosoppressori su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento LC-MS)

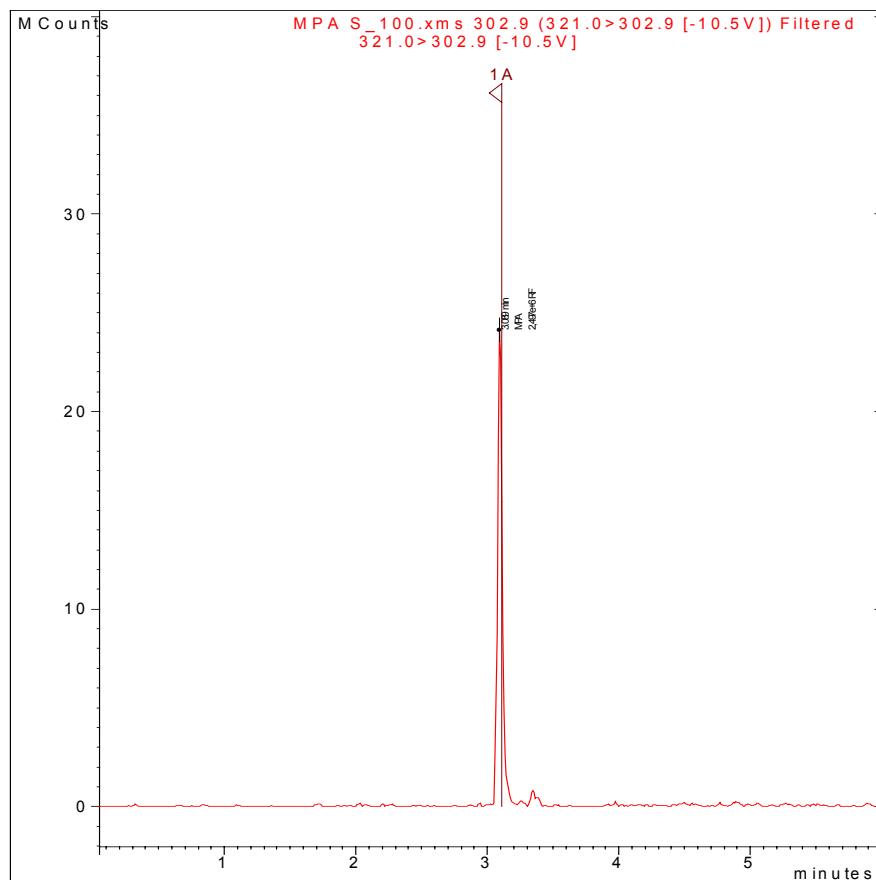


Fig. 3 :	Campione su sangue intero
	R.T. 3.09 ACIDO MICOFENOLICO 100 ng/ml

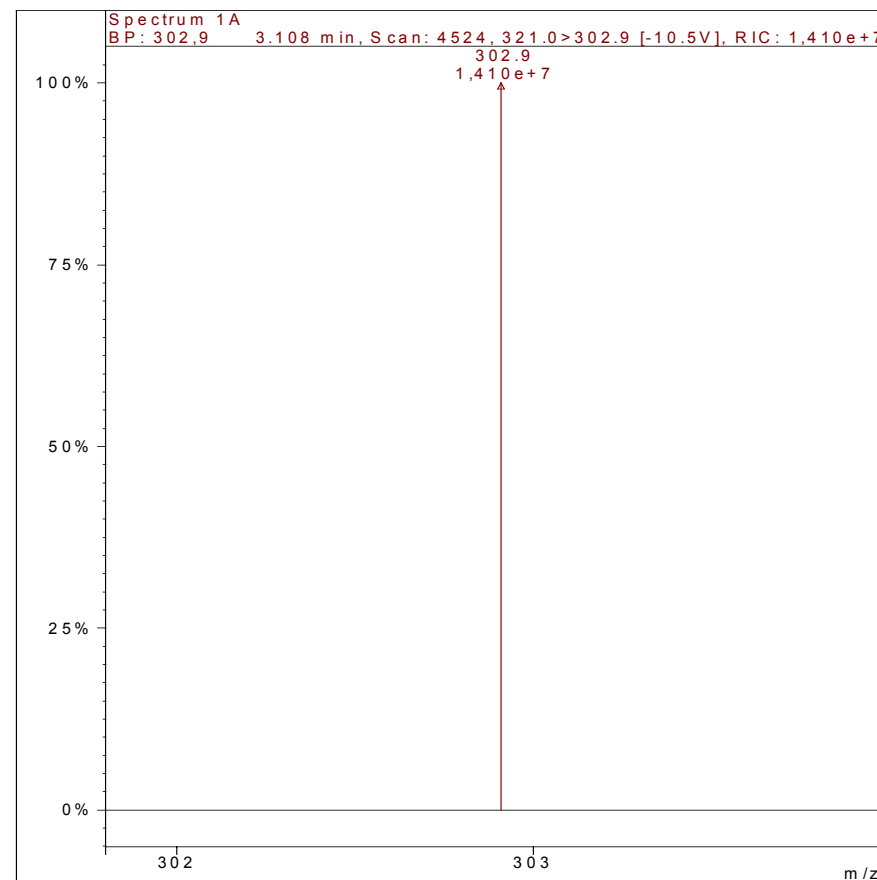


Fig. 4 :	Spettro di Massa dell'Acido Micofenolico
	Transizione 321.0 > 302.9

Immunosoppressori su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento LC-MS)

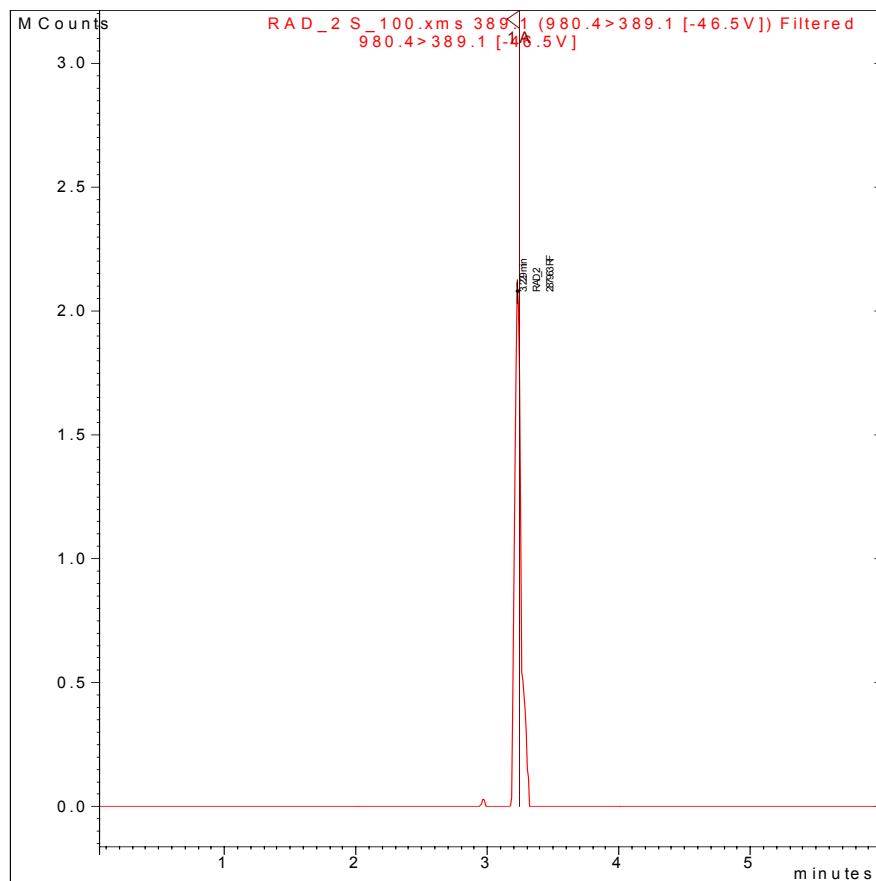


Fig. 5 :	Campione su sangue intero
	R.T. 3.23 EVEROLIMUS 100 ng/ml

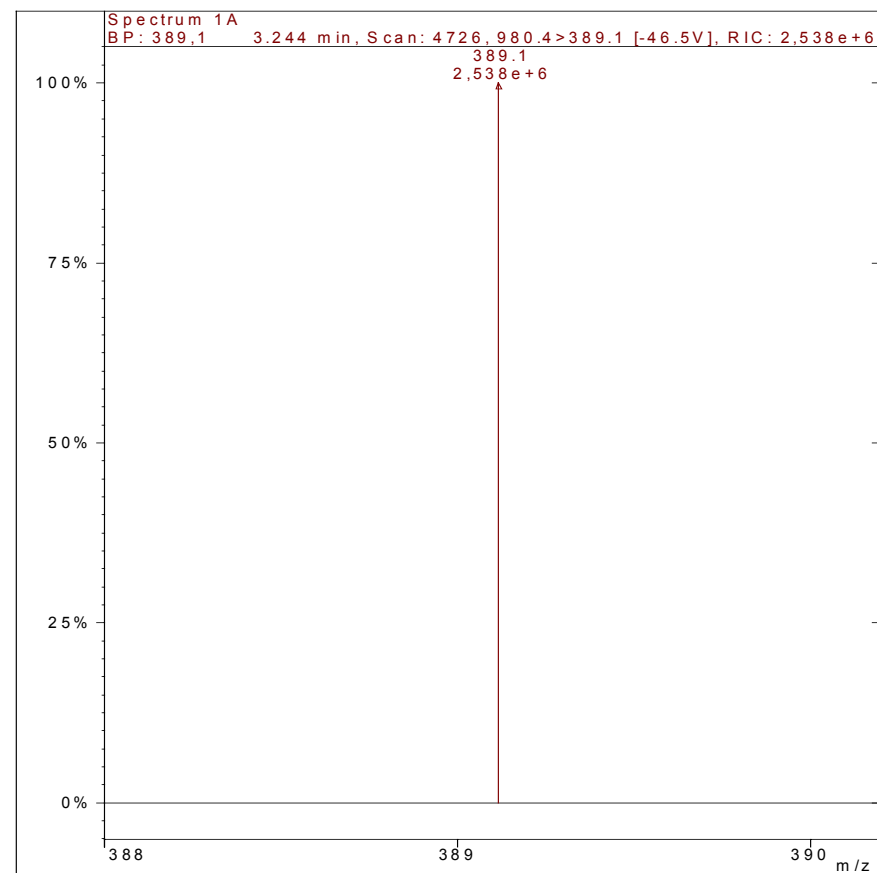


Fig. 6 :	Spettro di Massa dell'Everolimus
	Transizione 980.4 > 389.1

Immunosoppressori su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento LC-MS)

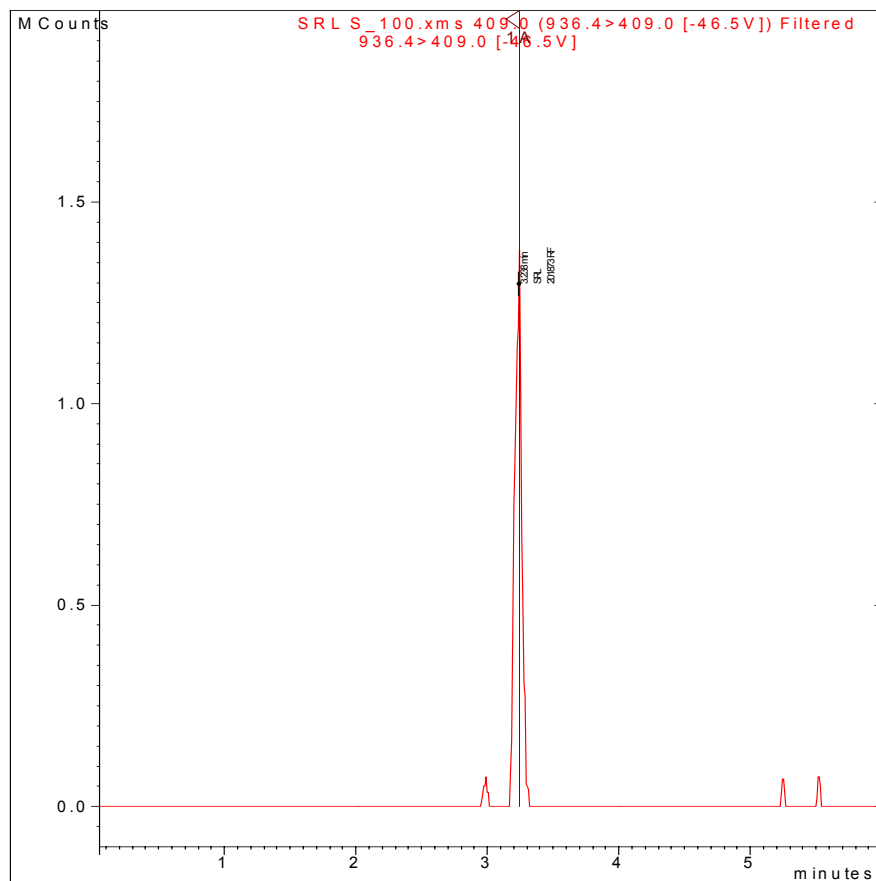


Fig. 7 :	Campione su sangue intero
	R.T. 3.24 SIROLIMUS 100 ng/ml

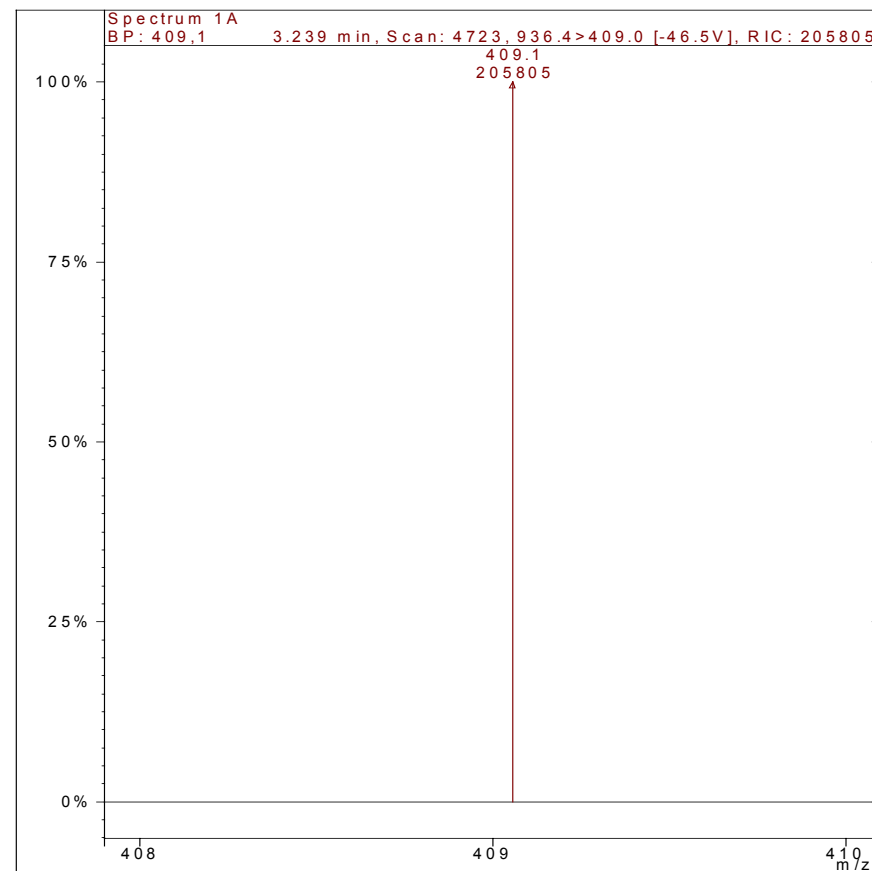


Fig. 8 :	Spettro di Massa del Sirolimus
	Transizione 936.4 > 409.0

Immunosoppressori su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento LC-MS)

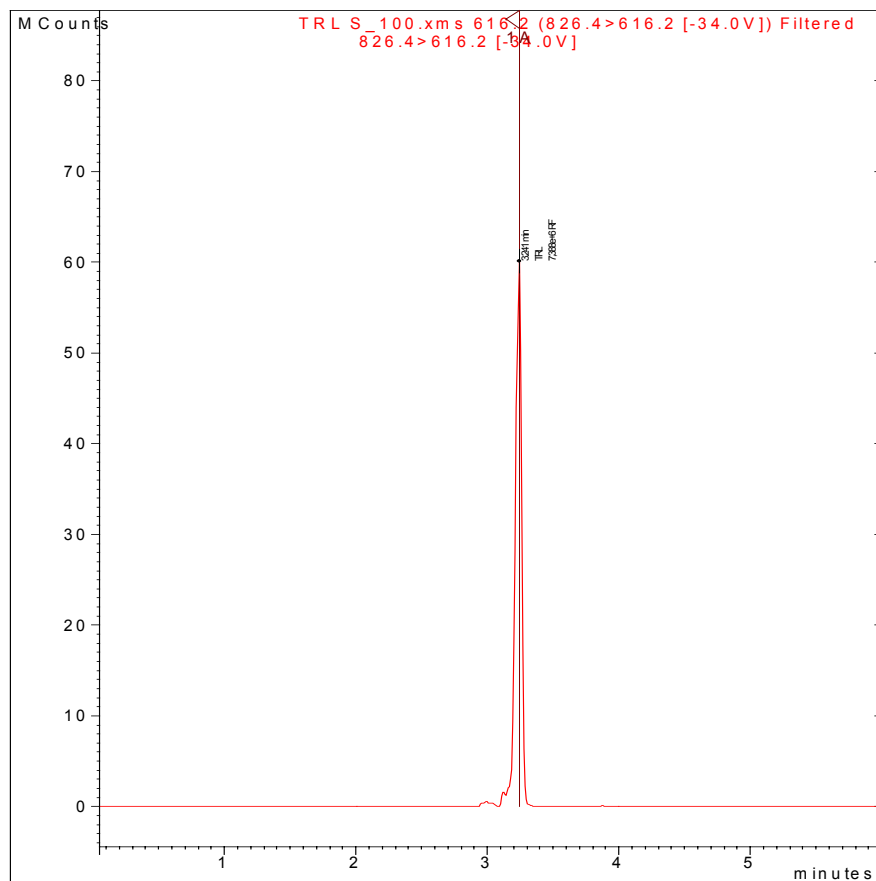


Fig. 9 :	Campione su sangue intero
	R.T. 3.24 TACROLIMUS 100 ng/ml

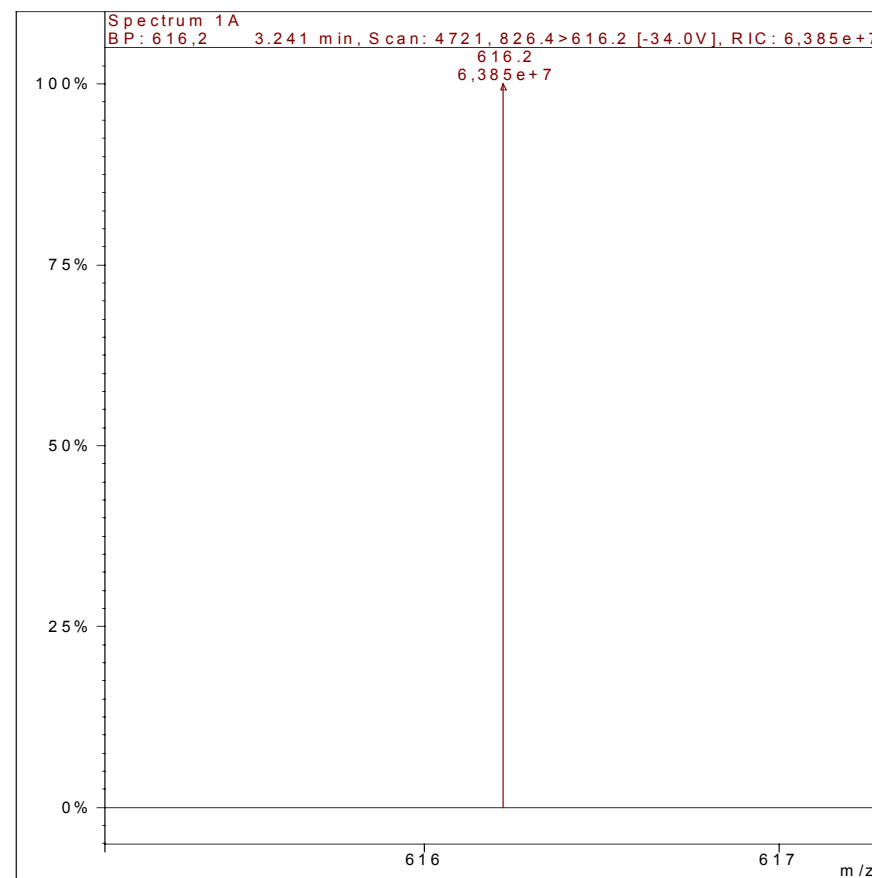


Fig. 10 :	Spettro di Massa del Tacrolimus
	Transizione 826.4 > 616.2