

Immunosoppressori DUAL KIT su sangue intero/plasma in LC-MS - 200 TEST –

Codice LC75410

(Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus, Ciclosporina A, Ac. Micofenolico)

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 la Ciclosporina A, il Tacrolimus, il Sirolimus e l'Everolimus.

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.

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).

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.

Il metodo proposto consente di determinare la concentrazione plasmatica o sierica dell'Acido Micofenolico dopo precipitazione delle proteine plasmatiche ed iniezione in LC-MS.

 EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



CE

Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE del 27/10/1998 e del D.L. n.332 del 08/09/2000 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

N° 002	Immunosoppressori Dual kit in LC/MS	06/2024
--------	-------------------------------------	---------

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. Il metodo proposto consente di determinare la concentrazione plasmatica o sierica dell'Acido Micofenolico dopo precipitazione delle proteine plasmatiche ed iniezione in LC-MS.

Recupero del Metodo :

89 – 102 %

Sensibilità del Metodo (LLOD) :

Tacrolimus	0,01 ng/ml
Sirolimus	0,01 ng/ml
Everolimus	0,01 ng/ml
Ciclosporina A	0,01 ng/ml
Ac. Micofenolico	0,01 µg/ml

Linearità:

Tacrolimus	0,05 – 100 ng/ml
Sirolimus	0,05 – 100 ng/ml
Everolimus	0,05 – 100 ng/ml
Ciclosporina A	0,05 – 1.500 ng/ml
Ac. Micofenolico	0,05 – 80 µg/ml

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) :

Tacrolimus	0,05 ng/ml
Sirolimus	0,05 ng/ml
Everolimus	0,05 ng/ml
Ciclosporina A	0,05 ng/ml
Ac. Micofenolico	0,05 µg/ml

Accuratezza intra serie (errore relativo %)

Tacrolimus:

Cm	Cs
2,5 ng/ml	12,5 ng/ml
4,2%	5,1%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)

Tacrolimus:

Cm	Cs
2,5 ng/ml	12,5 ng/ml
8,6%	9,9%

Riproducibilità intra serie (errore relativo %)

Tacrolimus:

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 ng/ml	1,25 ng/ml	25 ng/ml
1,6%	4,6%	4,4%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %)

Tacrolimus:

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 ng/ml	1,25 ng/ml	25 ng/ml
16,9%	7,1%	3,7%

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Sirolimus:

Cm	Cs
2,5 ng/ml	12,5 ng/ml
5,3%	11,3%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Sirolimus:

Cm	Cs
2,5 ng/ml	12,5 ng/ml
7,2%	7,1%

Riproducibilità intra serie (errore relativo %)**Sirolimus:**

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 ng/ml	1,25 ng/ml	25 ng/ml
9,7%	8,1%	1,9%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %)**Sirolimus:**

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 ng/ml	1,25 ng/ml	25 ng/ml
8,4%	7,0%	5,6%

Accuratezza intra serie (errore relativo %)**Everolimus:**

Cm	Cs
2,5 ng/ml	12,5 ng/ml
6,6%	6,0%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)**Everolimus:**

Cm	Cs
2,5 ng/ml	12,5 ng/ml
8,2%	6,8%

Riproducibilità intra serie (errore relativo %)**Everolimus:**

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 ng/ml	1,25 ng/ml	25 ng/ml
11,7%	4,0%	2,1%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %)**Everolimus:**

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 ng/ml	1,25 ng/ml	25 ng/ml
8,5%	6,6%	3,5%

Accuratezza intra serie (errore relativo %)**Ciclosporina A:**

Cm	Cs
60 ng/ml	300 ng/ml
3,4%	10,1%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)**Ciclosporina A:**

Cm	Cs
60 ng/ml	300 ng/ml
12,0%	13,9%

Riproducibilità intra serie (errore relativo %)**Ciclosporina A:**

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 ng/ml	25 ng/ml	500 ng/ml
9,9%	3,7%	2,2%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %)**Ciclosporina A:**

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 ng/ml	25 ng/ml	500 ng/ml
15,8%	7,3%	2,9%

Accuratezza intra serie (errore relativo %)**Acido Micofenolico:**

Cm	Cs
2 ug/ml	8 ug/ml
8,7%	2,2%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)**Acido Micofenolico:**

Cm	Cs
2 ug/ml	8 ug/ml
11,0%	4,2%

Riproducibilità intra serie (errore relativo %) Acido Micofenolico:

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 ug/ml	4 ug/ml	16 ug/ml
10,8%	4,9%	1,8%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Acido Micofenolico:

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 ug/ml	4 ug/ml	16 ug/ml
11,5%	5,1%	5,1%

Coefficiente di correlazione R2 + DS :

Tacrolimus	0,9951 ± 0,0026
Sirolimus	0,9939 ± 0,0026
Everolimus	0,9964 ± 0,0005
Ciclosporina A	0,9941 ± 0,0060
Ac. Micofenolico	0,9954 ± 0,0026

Range Terapeutico:

Tacrolimus	1 – 50 ng/ml
Sirolimus	1 – 50 ng/ml
Everolimus	1 – 50 ng/ml
Ciclosporina A	10 – 2000 ng/ml
Ac. Micofenolico	2 – 10 ug/ml

Contenuto della Confezione (200 test) :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2 – 8 °C, eccetto il Reagente B ed il Reagente B1 che vanno stoccati a – 20 °C.

Reagente A – Soluzione Deproteinizzante, **1 x 150 ml**

Reagente B – Soluzione Standard Interno, **1 x 1000 µl**

Stabile 6 mesi a –20°C

Reagente B1 – Soluz. Standard Interno per Ac. Micofenolico, **1 x 400 µl**

Stabile 6 mesi a –20°C

Reagente C – Soluzione Lisante, **1 x 55 ml**

Reagente D – Soluzione Diluente, **1 x 50 ml**

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 0, 4 x 1 ml

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 1, 4 x 1 ml

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 2, 4 x 1 ml

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 3, 4 x 1 ml

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 4, 4 x 1 ml

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 5, 4 x 1 ml

Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 6, 4 x 1 ml

Calibratore liofilo plasmatico – Livello 0, 1 x 1 ml

Calibratore liofilo plasmatico – Livello 1, 1 x 1 ml

Calibratore liofilo plasmatico – Livello 2, 1 x 1 ml

Calibratore liofilo plasmatico – Livello 3, 1 x 1 ml

Calibratore liofilo plasmatico – Livello 4, 1 x 1 ml

Calibratore liofilo plasmatico – Livello 5, 1 x 1 ml

Calibratore liofilo plasmatico – Livello 6, 1 x 1 ml

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

Reagente M2 – Fase Mobile M2, **2 x 500 ml**

Codice LC75016 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75016 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75016 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75016 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75016 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75016 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75016 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75016 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica
Codice LC75316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento LC-MS triplo quadrupolo (modalità MRM)
Interfaccia ESI (+)
Pompa binaria
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.

Per l'analisi dell'Ac. Micofenolico : prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta senza gel per il siero e con Eparina come anticoagulante per il plasma. Centrifugare a 4000 rpm per 5 minuti. Separare il siero e stoccarlo a – 20 °C. Stabile 4 settimane.

PROCEDURA ANALITICA Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus, Ciclosporina A:

FASE 1 : Preparazione dello standard interno

Dispensare 100 µl di **Reagente B – Soluzione Standard Interno**, 400 µl di Metanolo e 500 µl di acqua di grado HPLC in una provetta.

Vortex per 5 secondi

N.B.: sono necessari 20 µl di standard interno diluito a campione, quindi preparare un volume adeguato di soluzione.

FASE 2 : Preparazione dei campioni

In provette tipo eppendorf dispensare in sequenza.

	Calibratore	Campione	Controlli
Calibratore	50 µl		
Campione		50 µl	
Controlli			50 µl
Standard interno (come da diluzione FASE 1)	20 µl	20 µl	20 µl
	<i>Vortex per 10 secondi</i>		
Reagente C – Soluzione Lisante	100 µl	100 µl	100 µl
	<i>Vortex per 10 secondi</i>		
Reagente A – Soluzione Deproteinizzante	300 µl	300 µl	300 µl
	<i>Vortex per 10 secondi</i>		

FASE 3 : Centrifugare a 14.000 rpm per 10 minuti

FASE 4 : Prelevare il surnatante e trasferirlo in vial.

INIEZIONE :

- Iniettare 2-10 µl della soluzione nel sistema LC

PROCEDURA ANALITICA Acido Micofenolico:

FASE 1 : Preparazione dello standard interno

Dispensare 100 µl di **Reagente B1 – Soluzione Standard Interno per Ac. Micofenolico**, 400 µl di Metanolo e 500 µl di acqua di grado HPLC in una provetta.

Vortex per 5 secondi

N.B.: sono necessari 20 µl di standard interno diluito a campione, quindi preparare un volume adeguato di soluzione.

FASE 2 : Preparazione dei campioni

In provette tipo eppendorf dispensare in sequenza.

	Calibratore	Campione	Controlli
Calibratore	50 µl		
Campione		50 µl	
Controlli			50 µl
Standard interno per Acido Micofenolico (come da diluzione FASE 1)	20 µl	20 µl	20 µl
	<u>Vortex per 10 secondi</u>		
Reagente C – Soluzione Lisante	100 µl	100 µl	100 µl
	<u>Vortex per 10 secondi</u>		
Reagente A – Soluzione Deproteinizzante	300 µl	300 µl	300 µl
	<u>Vortex per 10 secondi</u>		

FASE 3 : Centrifugare a 14.000 rpm per 10 minuti

FASE 4 : In vial a volume ridotto (calicetto), diluire 20 µl di surnatante in 480 µl di **Reagente D – Soluzione Diluente**

Vortex per 5 secondi

N.B.: il campione così preparato è stabile 48 h a 2-8°C

INIEZIONE :

- Iniettare 2 µl della soluzione nel sistema LC

Immunosoppressori su sangue intero - Avvertenze

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA ANALITICA

Installare la colonna analitica nuova Colonna Analitica RRHD Eclipse Plus C18 (50 x 2,1 mm - 1,8 µm) termostata a 60 °C dopo la valvola. Disconnettere il detector e far passare una soluzione di H₂O : Fase Mobile M2 (5 : 95 v/v) al flusso di 500 µl / minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.**

Condizionare la colonna con una soluzione di Fase Mobile M1 : Fase Mobile M2 (5 : 95 v/v) al flusso di 500 µl / minuto, con la valvola in posizione B, per 10 minuti. Quindi, con la valvola in posizione A, flussare con 100% fase mobile M1 per 5 minuti. Quindi, effettuare 4 iniezioni di fase mobile prima di lanciare la seduta.

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.

PULIZIA DELLA COLONNA ANALITICA

Disconnettere il detector. Flussare una soluzione di H₂O : Fase Mobile M2 (5 : 95 v/v) al flusso di 500 µl / minuto per 15 minuti scaricandola. Stoccare nella medesima soluzione.

COLONNA DI ARRICCHIMENTO

Monodimensionale

TF25403012101 Colonna di arricchimento Hypersil GOLD PFP Guard 10 x 2.1 mm, 3 µm
TF84200 Drop in Holder 2 mm

Bidimensionale

ZRE917950210 Colonna di arricchimento Ultra PFPP 10 x 4.0 mm (SPE ON-LINE/Bidimensional Modality)
ZRE25021 Holder per 10 mm Guard Trident Guard System

Installare la colonna di arricchimento prima della valvola e condizionare come previsto per la colonna analitica.

LAVAGGIO SIRINGA AUTOCAMPIONATORE

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

PARAMETRI SETTATI SU TRIPLO QUADRUPOLO AGILENT 6460

Parametri ESI 6460

Gas Temperature 250 °C
Gas Flow 5 L/min
Nebulizer 60 psi
Sheath Gas Heater 300 °C
Sheath Gas Flow 12 L/min
Capillary 4000 V

PARAMETRI SETTATI SU TRIPLO QUADRUPOLO SCIEX 4500

Parametri ESI + 4500

Curtain Gas (CUR): 25
Collision Gas (CAD): 10
Ion Spry Voltage: (IS): 5500 V
Temperature (TEM): 550°C
Ion Source Gas 1 (GS1): 60
Ion Source Gas 2 (GS2): 60

Frammentazioni (ottimizzate su TRIPLO QUADRUPOLO AGILENT 6460)

Analita	Q1	Q3	ENERGIA DI COLLISIONE
Tacrolimus	821,5	768,5	20
Sirolimus	931,6	864,5	14
Everolimus	975,6	908,6	12
Ciclosporina A	1.219,9	1.202,9	14
Acido Micofenolico	321,0	207,0	29
² H ₄ Ciclosporina A	1.223,7	1.206,9	14
¹³ C ₂ ² H ₄ Everolimus	981,3	914,5	14
¹³ C ² H ₂ Tacrolimus	824	771	20
¹³ C ² H ₃ Sirolimus	935,4	864,6	14
Acido Micofenolico-D3	324,2	210,0	29

SETTAGGIO DEI FLUSSI

GRADIENTE			
Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (µl/min)
0.00	100	0	500
0.50	100	0	500
SWITCHING VALVOLA			
0.51	100	0	600
1.50	5	95	600
3.00	5	95	600
SWITCHING VALVOLA			
3.01	100	0	500
3.50	100	0	500

SETTAGGIO DEI FLUSSI PER ACIDO MICOFENOLICO

GRADIENTE			
Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (µl/min)
0.00	100	0	500
0.50	100	0	500
SWITCHING VALVOLA			
0.51	100	0	600
1.50	1	99	600
3.00	1	99	600
SWITCHING VALVOLA			
3.01	100	0	500
3.50	100	0	500

REAGENTE B e B1 – SOLUZIONI STANDARD INTERNI:

Soluzione B contenente: $^{13}\text{C}^2\text{H}_2$ Tacrolimus, $^{13}\text{C}_2^2\text{H}_4$ Everolimus, $^{13}\text{C}^2\text{H}_3$ Sirolimus, $^2\text{H}_4$ Ciclosporina A. Stoccare a – 20 °C. Soluzione B1 contenente: Acido Micofenolico-D3. Stoccare a – 20 °C.	
Immunosoppressori:	Standard interno da utilizzare per la calibrazione:
TACROLIMUS	$^{13}\text{C}^2\text{H}_2$ Tacrolimus
EVEROLIMUS	$^{13}\text{C}_2^2\text{H}_4$ Everolimus
SIROLIMUS	$^{13}\text{C}^2\text{H}_3$ Sirolimus
CICLOSPORINA A	$^2\text{H}_4$ Ciclosporina A
ACIDO MICOFENOLICO	Acido Micofenolico-D3

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
LC75016	Calibratore su sangue intero per Immunosoppressori	7 x 2 x 1 ml
LC75019	Controllo su sangue intero per Immunosoppressori – Livelli 1, 2 e 3	3 x 5 x 1 ml
LC75316	Calibratore plasmatico per Acido Micofenolico	7 x 2 x 1 ml
LC75319	Controllo plasmatico per Acido Micofenolico – Livello 1, 2 e 3	3 x 5 x 1 ml
SK75310	Starter kit per su sangue intero per Immunosoppressori	1 Pz
Per sistemi UHPLC		
Z959757902	Colonna Analitica RRHD Eclipse Plus C18 (50 x 2,1 mm - 1,8 um)	1 Pz
Per sistemi HPLC		
TF17126032130	Colonna analitica ACCUCORE C 18 (30 x 2,1 mm - 2,6 um)	1 Pz
Monodimensionale		
TF25403012101	Prefiltri Hypersil GOLD PFP Guard (10 x 2,1 mm - 3 um)	1 Pz
TF84200	2mm DROP-IN HOLDER	1 Pz
Bidimensionale		
ZRE917950210	Ultra PFPP 10 x 4,0 mm (SPE ON-LINE/Bidimensional Modality)	1 x 3 Pz
ZRE25021	Holder per 10 mm Guard Trident Guard System	1 Pz
Z51843550	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ
Z51820717	Tappi per vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ

Immunosoppressori su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento LC-MS)

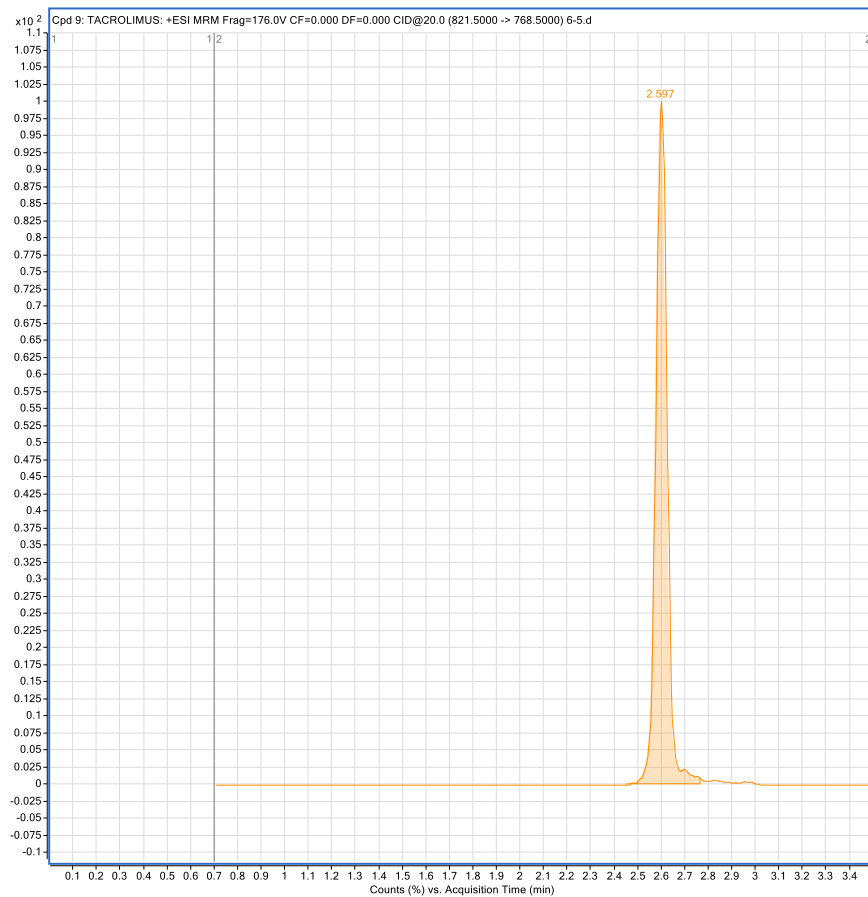


Fig. 1 : Tacrolimus

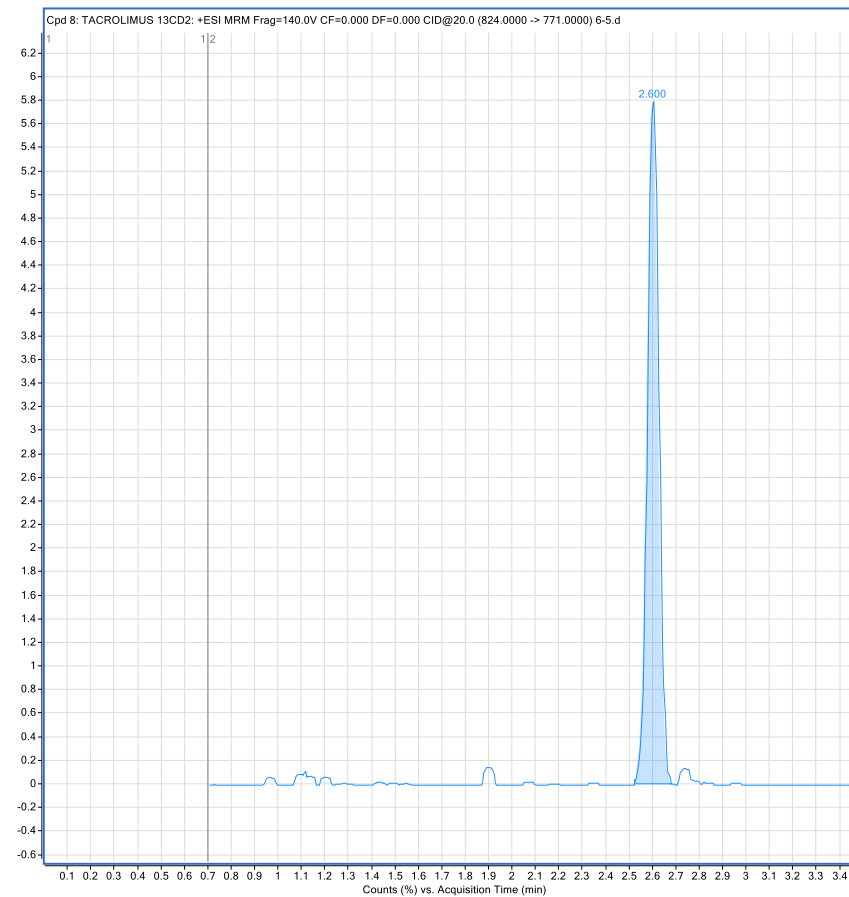


Fig. 2 : Standard interno Tacrolims

Immunosoppressori su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento LC-MS)

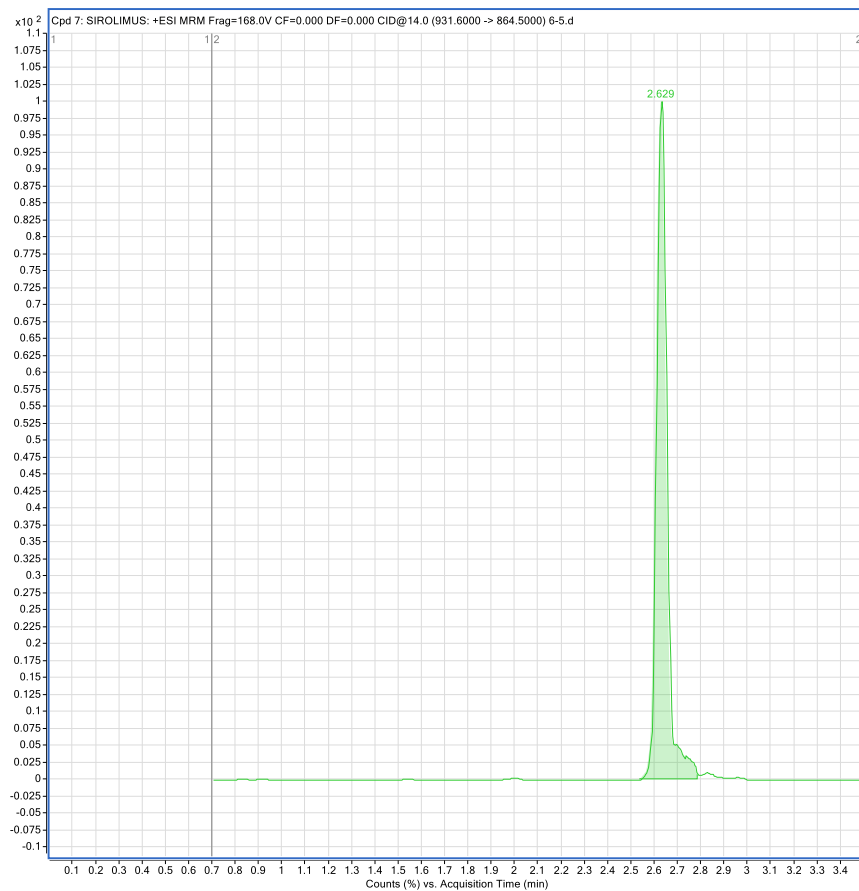


Fig. 3 : *Sirolimus*

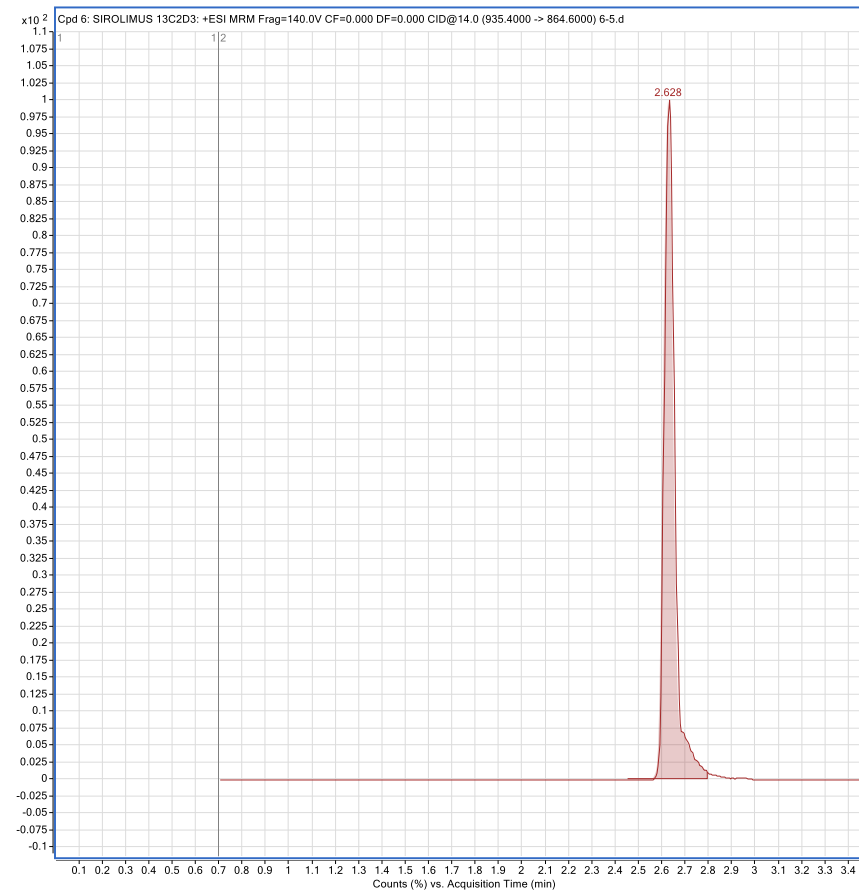


Fig. 4 : *Sirolimus Standard interno*

Immunosoppressori su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento LC-MS)

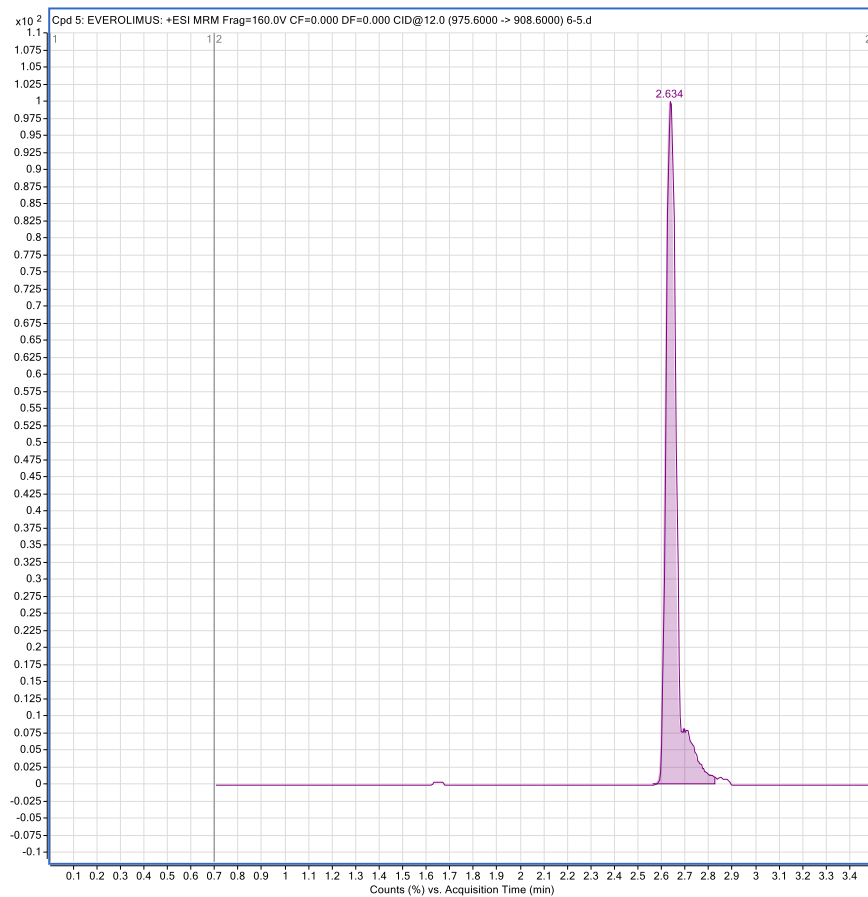


Fig. 5 : Everolimus

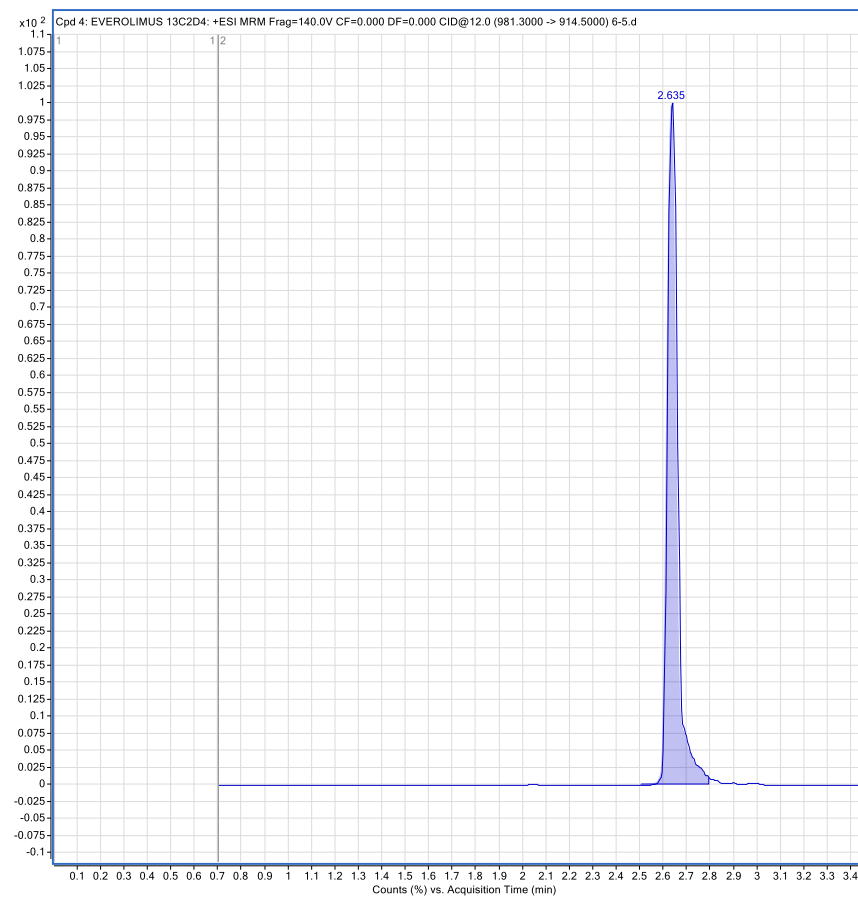


Fig. 6 : Standard interno Everolimus

Immunosoppressori su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento LC-MS)

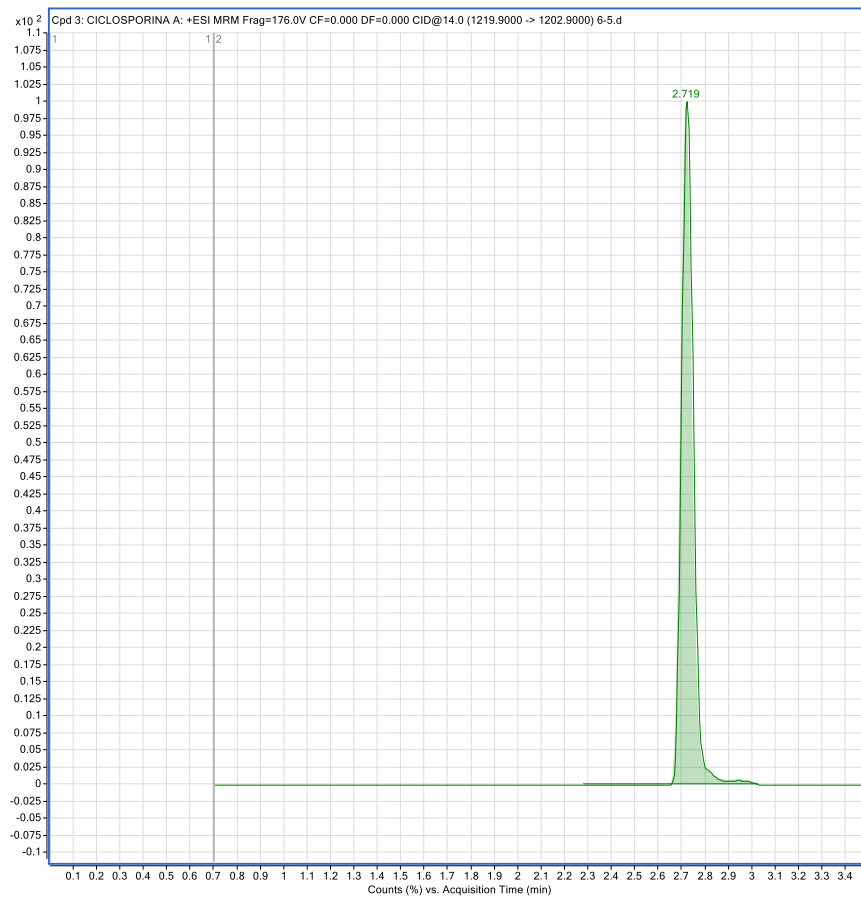


Fig. 7 : *Ciclosporina A*

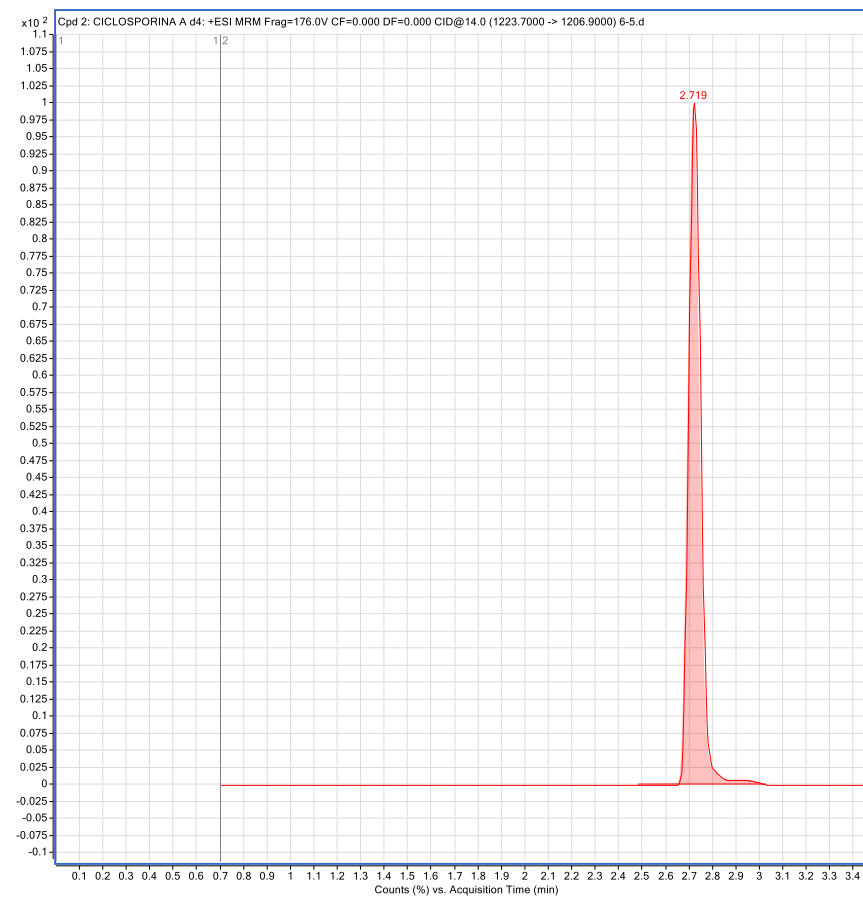


Fig. 8 : *Standard interno Ciclosporina A*

Immunosoppressori plasmatici

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento LC-MS)

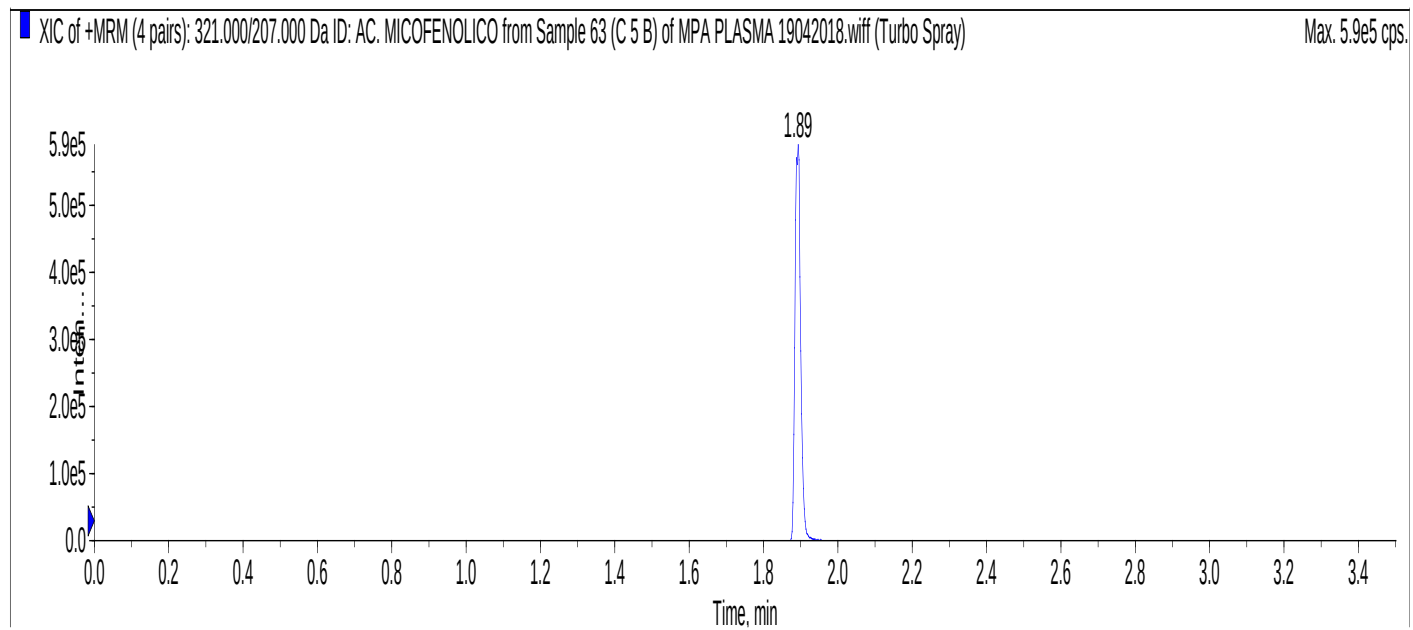


Fig. 9 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 1.89 Acido Micofenolico 16 µg/ml

Immunosoppressori plasmatici

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento LC-MS)

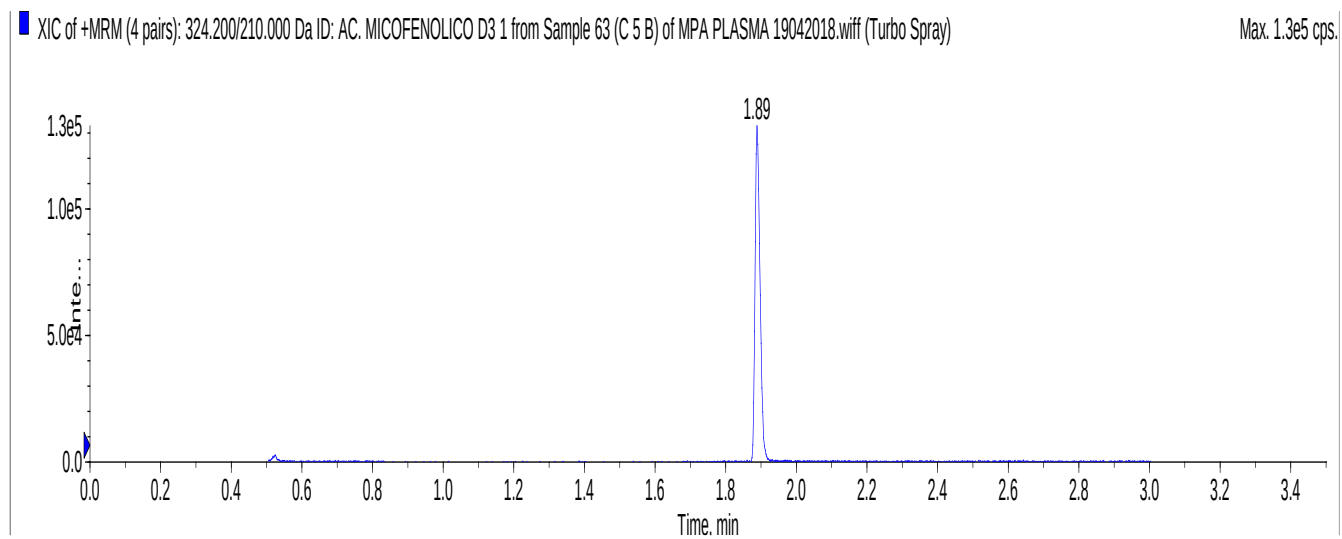


Fig. 10 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 1.89 Acido Micofenolico-D3

Immunosoppressori plasmatici

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento LC-MS)

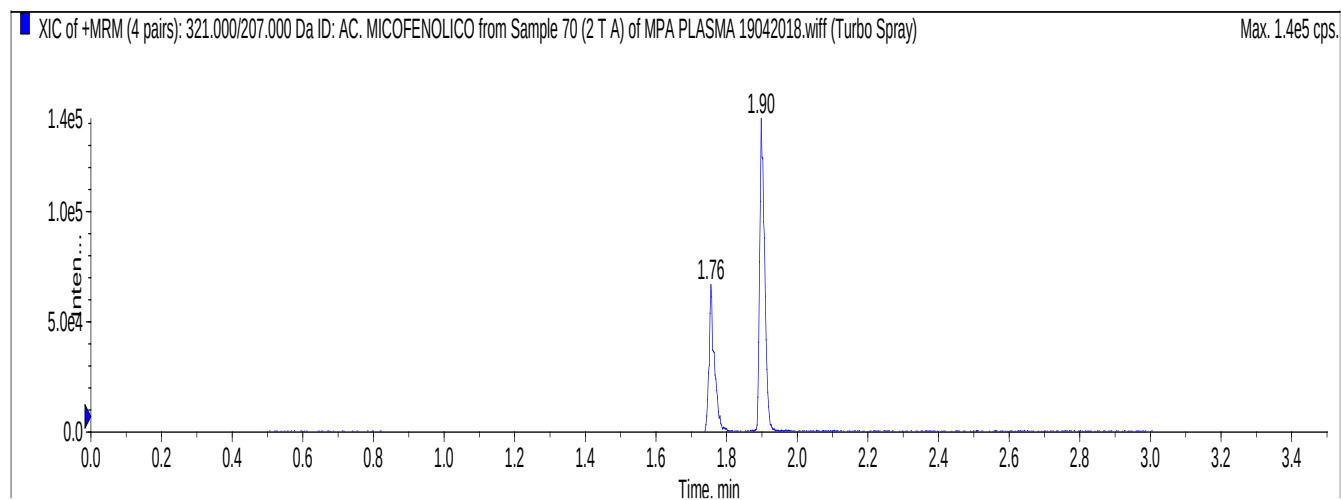


Fig. 11 :	Campione plasmatico
	R.T. 1.90 Acido Micofenolico 3,35 µg/ml