

CHROMSYSTEMS

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

THERAPEUTISCHES DRUG MONITORING
THERAPEUTIC DRUG MONITORING
SUIVI THÉRAPEUTIQUE DE MÉDICAMENTS
MONITORAGGIO DEI FARMACI
MONITORIZACIÓN DE FÁRMACOS



Procedura per la determinazione LC-MS/MS

MassTox®

**Immunosoppressori
in sangue intero**

ONEMINUTE Test

Codice 93900

CE 

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH è certificata in accordo con la DIN EN ISO 9001, DIN EN ISO 13485 e ISO 13485 CMDR. I nostri articoli vengono prodotti, confezionati e messi in circolazione in accordo alla direttiva europea 98/79/CE sui dispositivi medici per diagnostica in vitro.

© This document is protected by copyright. All rights reserved.

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
82166 Gräfelfing
Germania

Tel.: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-299
www.chromsystems.com

Indice.....	Pagina
1 Informazioni per l'ordine	4
2 Introduzione	6
3 Sistema LC-MS/MS	8
3.1 Equipaggiamento e parametri del sistema LC-MS/MS.....	8
3.2 Misurazione MS/MS	10
3.3 Ottimizzazione delle transizioni MRM (tuning)	10
3.4 Messa in esercizio	11
3.5 Messa a riposo temporanea	11
4 Transizioni di massa degli analiti e dello standard interno	11
5 Preparazione dei campioni	12
5.1 Raccolta e conservazione dei campioni dei pazienti	12
5.2 Ricostituzione degli standard di calibrazione nel sangue intero 6PLUS1® Multilevel.....	12
5.3 Ricostituzione dei controlli nel sangue intero MassCheck ®	13
5.4 Ricostituzione dello standard interno (Internal Standard Mix)	13
5.5 Preparazione dei campioni	14
5.5.1 ... Preparazione manuale dei campioni.....	14
5.5.2 ... Preparazione automatizzata del campione.....	14
5.6 Stabilità e stoccaggio dei campioni preparati.....	15
5.7 Equipaggiamento aggiuntivo necessario, non compreso nel kit	15
6 Calibrazione del sistema di valutazione	15
7 Controllo di qualità	16
8 Intervalli terapeutici.....	16
9 Fattori di conversione	17
10 Stoccaggio e stabilità dei reagenti.....	17
11 Smaltimento.....	18
12 Esempi di cromatogrammi.....	19
13 Determinazione di interferenze	20
14 Limitazioni cliniche - Avvertenze	20
15 Diagnostica	21
16 Bibliografia.....	22
Allegato I: Preparazione automatizzata del campione.....	23
Allegato II: Avvertenze sulle sostanze pericolose	27
Allegato III: Avvertenza per il calcolo manuale.....	30

Indice Pagina

Allegato IV: Dati di validazione 31
 Allegato IVa: Dati di validazione con preparazione manuale del campione 31
 Allegato IVb: Dati di validazione con preparazione automatizzata del
 campione 33

Allegato V: Dichiarazione di conformità 36

1 Informazioni per l'ordine

Codice	Prodotto	
93900/400	Kit di reagenti LC-MS/MS	
	MassTox [®] Immunosoppressori in sangue intero	
	ONEMINUTE Test	
	Contenuto per 400 analisi:	
	Mobile Phase A	2 x 900 ml
	Mobile Phase B	1 x 450 ml
	Rinsing Solution	1 x 1000 ml
	Precipitation Reagent	1 x 100 ml
	Internal Standard Set, <u>costituito da:</u>	
	Internal Standard Mix	4 x 2,5 ml (liof.)
	Reconstitution Buffer	1 x 10 ml
	Extraction Buffer	1 x 40 ml
	Vial di reazione, trasparenti	4 x 100 pezzi
	93900/1200	Kit di reagenti LC-MS/MS
MassTox [®] Immunosoppressori in sangue intero		
ONEMINUTE Test		
Contenuto per 1200 analisi:		
Mobile Phase A		5 x 900 ml
Mobile Phase B		3 x 450 ml
Rinsing Solution		1 x 1000 ml
Precipitation Reagent		3 x 100 ml
Internal Standard Set, <u>costituito da:</u>		
Internal Standard Mix		3 x 4 x 2,5 ml (liof.)
Reconstitution Buffer		3 x 10 ml
Extraction Buffer		3 x 40 ml
Vial di reazione, trasparenti		12 x 100 pezzi
6PLUS1 [®] Multilevel Whole Blood Calibrator Set		7 x 2,0 ml (liof.)
Colonna analitica (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo	
Colonna "trap" (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo	
93900/1200/DWP	Kit di reagenti LC-MS/MS	
	MassTox [®] Immunosoppressori in sangue intero	
	ONEMINUTE Test	
	Per la preparazione automatizzata dei campioni con piastre di estrazione deepwell a 96 pozzetti.	
	Contenuto per 1200 analisi:	
	Mobile Phase A	5 x 900 ml
	Mobile Phase B	3 x 450 ml
	Rinsing Solution	2 x 1000 ml
	Precipitation Reagent	3 x 100 ml
	Internal Standard Set, <u>costituito da:</u>	
	Internal Standard Mix	3 x 4 x 2,5 ml (liof.)
	Reconstitution Buffer	3 x 10 ml
	Extraction Buffer	3 x 40 ml
	Piastre di estrazione deepwell a 96 pozzetti	3 x 5 St.
Piastre di raccolta a 96 pozzetti	3 x 5 St.	
Pellicole adesive perforabili, per piastre a 96 pozzetti	3 x 5 St.	
6PLUS1 [®] Multilevel Whole Blood Calibrator Set	7 x 2,0 ml (liof.)	
Colonna analitica (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo	
Colonna "trap" (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo	
Componenti ordinabili singolarmente		

93911	Mobile Phase A	900 ml
93922	Mobile Phase B	450 ml
93909	Rinsing Solution	1.000 ml
93003	Precipitation Reagent	100 ml
93946	Internal Standard Set, <u>costituito da:</u>	
	Internal Standard Mix	4 x 2,5 ml (liof.)
	Reconstitution Buffer	1 x 10 ml
93005	Extraction Buffer	40 ml
33006	Vial di reazione, trasparenti	100 pezzi

Equipaggiamento

93122	Colonna "trap" (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo
93100	Colonna analitica (equilibrata, con cromatogramma test)	1 pezzo
93915	Tuning Mix	1 ml
15010	Involucro prefiltro in PEEK	1 pezzo
15011	Prefiltro rivestito in PEEK, 2 µm	5 pezzi
15070	Holder per prefiltro in acciaio	1 pezzo
15071	Prefiltro in acciaio, 0,5 µm	5 pezzi

Standard di calibrazione multilevel e controlli *MassCheck*® Chromsystems

28039/XL	6PLUS1® Multilevel Whole Blood Calibrator Set	7 x 2,0 ml (liof.)
0081	MassCheck ® Immunosuppressants Whole Blood Control Four-Level (I + II + III + IV)	4 x 2 x 2,0 ml (liof.)
0082	MassCheck ® Immunosuppressants Whole Blood Control Level I	5 x 2,0 ml (liof.)
0083	MassCheck ® Immunosuppressants Whole Blood Control Level II	5 x 2,0 ml (liof.)
0084	MassCheck ® Immunosuppressants Whole Blood Control Level III	5 x 2,0 ml (liof.)
0085	MassCheck ® Immunosuppressants Whole Blood Control Level IV	5 x 2,0 ml (liof.)
0089	MassCheck ® Immunosuppressants Whole Blood Blank Control	5 x 2,0 ml (liof.)

Per la preparazione dei campioni con piastre di estrazione deepwell a 96 pozzetti

93956	Piastre di estrazione deepwell a 96 pozzetti	5 pezzi
93058	Piastre di raccolta a 96 pozzetti	5 pezzi
93059	Pellicole adesive perforabili, per piastre a 96 pozzetti	5 pezzi

2 Introduzione

Gli immunosoppressori sono farmaci in grado di inibire la risposta del sistema immunitario, ad esempio per evitare reazioni di rigetto dopo i trapianti d'organo. Vengono inoltre utilizzati nella terapia di malattie autoimmuni e di altre disfunzioni del sistema immunitario. La ciclosporina A (DCI ciclosporina), il tacrolimus, il sirolimus e l'everolimus, gli immunosoppressori più frequentemente somministrati dopo i trapianti, sono un gruppo di immunosoppressori ad effetto più selettivo che agiscono tramite il legame con le immunofiline prodotte dall'organismo.

La ciclosporina A (Fig. 1), utilizzata per la prima volta nel 1978 nella medicina dei trapianti è un peptide ciclico non idrosolubile costituito da 11 aminoacidi e da diverse varietà di funghi ascomiceti come ad es. il *Tolypocladium inflatum* e il *Trichoderma polysporum*. L'effetto immunosoppressore è indotto attraverso la riduzione selettiva della produzione di linfocina (interleuchina-2, γ -interferone), che a sua volta provoca l'inibizione reversibile dei linfociti-T antigene-specifici. A causa del ristretto spettro terapeutico e dell'incerta biodisponibilità, la terapia con ciclosporina A deve essere sottoposta a continuo controllo dei livelli ematici [1].

Il tacrolimus (FK-506) (Fig. 2), un lattone macrociclico, si differenzia sostanzialmente in quanto a struttura dalla ciclosporina A, ma presenta un meccanismo d'azione analogo, agendo attraverso l'inibizione della calcineurina. Inoltre è più efficace e ha meno effetti collaterali: per questo viene impiegato anche come terapia "rescue" in caso di reazioni di rigetto nei pazienti sotto ciclosporina A.

Il sirolimus (rapamicina), un lattone macrociclico isolato da culture batteriche di *Streptomyces hygroscopicus*, presenta analogie strutturali con il tacrolimus (Fig. 3). Dopo essersi legato con il suo recettore citosolico FKBP-12 non agisce tuttavia come inibitore della calcineurina, ma inibisce la trasduzione del segnale tramite la serin-treonin chinasi multifunzionale di mTOR (mammalian Target of Rapamycin) e di conseguenza la proliferazione dei linfociti T. Il sirolimus viene spesso somministrato in combinazione con ciclosporina A e glucocorticoidi dopo trapianto renale. La ciclosporina A viene poi interrotta gradualmente dopo 2-3 mesi.

L'everolimus, derivato sintetico del sirolimus, agisce con lo stesso meccanismo, e si differenzia dal sirolimus solo marginalmente per la struttura chimica, una catena laterale dell'anello del cicloesano (Fig. 4). È un macrolide prodotto semi-sinteticamente e si distingue dal sirolimus per l'emivita più breve. Inoltre è meglio assorbibile per via orale e viene eliminato più rapidamente.

Poiché i metodi immunologici si differenziano notevolmente per selettività e specificità, e talvolta acquisiscono anche metaboliti inattivi, per la determinazione quantitativa degli immunosoppressori ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus ed everolimus dovrebbe essere impiegata solo l'analisi LC-MS/MS [2].

Finalità applicative:

Questo kit di reagenti di Chromsystems è un prodotto per la diagnosi *in-vitro* destinato ai laboratori clinici per la determinazione quantitativa di ciclosporina A, everolimus, sirolimus (rapamicina) e tacrolimus (FK-506) in campioni umani di sangue intero EDTA mediante LC-MS/MS (cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa). Il kit viene utilizzato come test in pazienti trattati con immunosoppressori, per controllare il livello dei farmaci nel sangue e regolarne il dosaggio all'interno della finestra terapeutica.

Principio alla base del kit di reagenti

Questo kit di reagenti Chromsystems permette la determinazione degli immunosoppressori ciclosporina A, everolimus, sirolimus (rapamicina) e tacrolimus (FK-506) mediante LC-MS/MS specificamente nel sangue intero. La preparazione manuale dei campioni è limitata a una fase di precipitazione ad alta efficienza della proteina. L'arricchimento degli analiti e la separazione delle sostanze di disturbo avvengono tramite una colonna trappola collegata, attraverso una valvola a 2 posizioni e 6 porte oppure a 2 posizioni e 10 porte, con la colonna analitica nella quale si svolge la separazione cromatografica. L'impiego di uno standard interno marcato con isotopi garantisce precisione e affidabilità del metodo e permette di compensare gli effetti matrice (ion suppression).

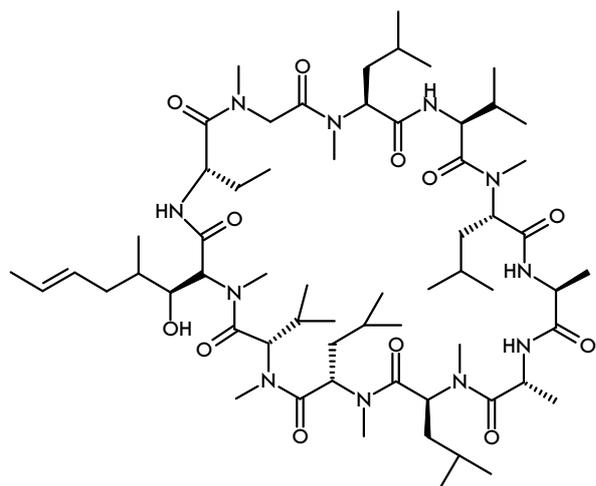


Fig. 1: Ciclosporina A (ciclosporina)

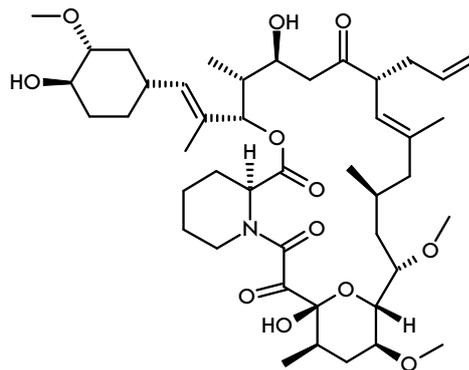


Fig. 2: Tacrolimus (FK-506)

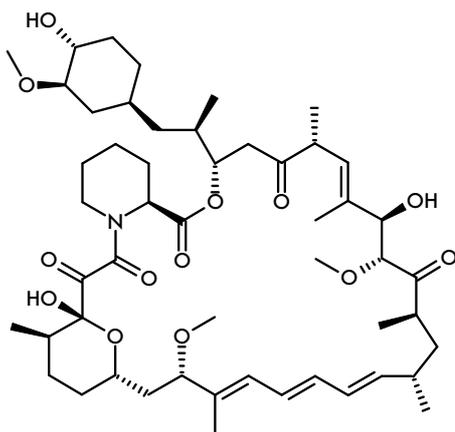


Fig. 3: Sirolimus (rapamicina)

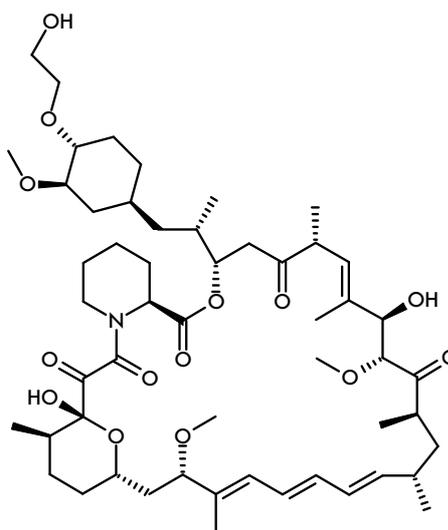


Fig. 4: Everolimus

Fig. 1-4: Struttura chimica degli immunosoppressori

3 Sistema LC-MS/MS

Attenzione:

Quando si manipolano i reagenti, consultare le avvertenze sulle sostanze pericolose all'allegato II.

3.1 Equipaggiamento e parametri del sistema LC-MS/MS

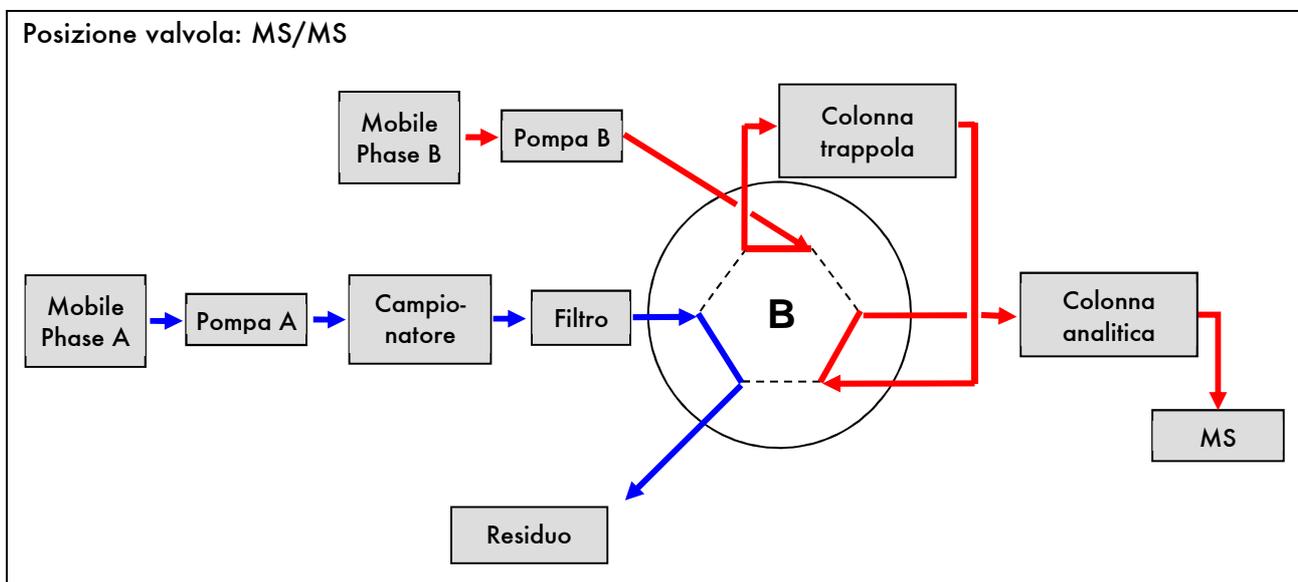
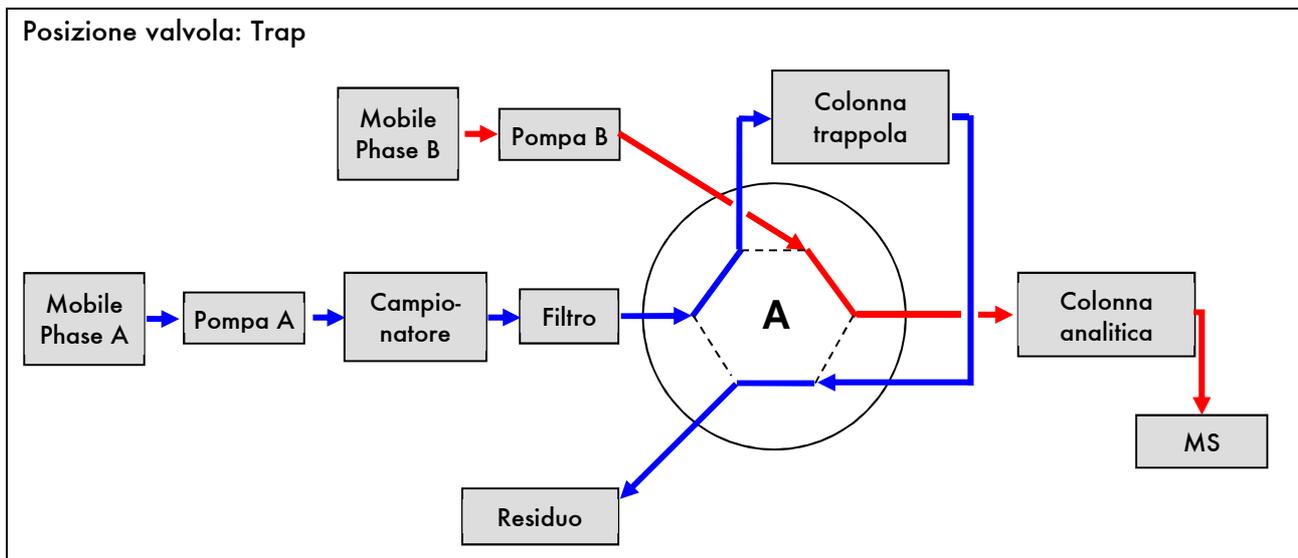
Per l'analisi LC-MS/MS di ciclosporina A, everolimus, sirolimus e tacrolimus nel sangue intero sono necessari un sistema per HPLC con dispositivo di riscaldamento della colonna (65 °C), un campionatore automatico, almeno una valvola di commutazione flusso a 2 posizioni e 6 porte comandato da computer, due pompe isocratiche e uno spettrometro di massa in tandem sufficientemente sensibile. Mantenere le fasi mobili possibilmente chiuse (coperte) anche durante il funzionamento. Gli estratti dei campioni vengono depurati tramite una colonna trappola (codice 93122); la separazione delle sostanze ha luogo in una colonna analitica (codice 93100).

Regolazioni dello strumento

Volume d'iniezione:	5-50 µl (a seconda dello spettrometro di massa in uso)
Durata dell'analisi:	a seconda dello spettrometro di massa in uso (AB Sciex API 4000™/IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500): 1,5 min; Agilent 6460: 1,3 min; Waters ACQUITY® TQD: 1,7 min)
Flusso (isocratico):	Mobile Phase A: 2 ml/min (colonna trap) Mobile Phase B: a seconda dello spettrometro di massa in uso (colonna analitica)
Temperatura termostato della colonna:	Colonna analitica: 65 °C Colonna "trap": Temperatura ambiente (+20...+25 °C)
Detergente per il lavaggio dell'iniettore:	Rinsing Solution (codice 93909)

Commutazione della colonna

In posizione "Trap" la colonna trappola viene caricata con l'estratto del campione. Portando la valvola in posizione "MS/MS", gli analiti vengono eluiti dalla colonna trappola alla colonna analitica e qui separati dalle sostanze di disturbo tramite cromatografia. Contemporaneamente, la colonna "trap" viene re-equilibrata. Le fasi mobili vengono pompate a un flusso costante di 2 ml/min. (fase mobile A) o come indicato per lo spettrometro di massa in uso (fase mobile B), avendo cura di utilizzare una sorgente ESI concepita per la portata richiesta.



Posizione valvola	Tempo [min]		
	AB Sciex API 4000™/ AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)	Agilent 6460	Waters ACQUITY® TQD
Trap	0,00	0,00	0,00
MS/MS	0,25	0,25	0,25
Trap	1,50	1,15	1,65

3.2 Misurazione MS/MS

Fondamenti del metodo di misurazione

Lo spettrometro di massa analizza le molecole distinguendole in funzione del rapporto massa/carica (m/z). A tal fine le molecole devono essere precedentemente ionizzate. Il metodo di ionizzazione che si è dimostrato più affidabile e semplice da utilizzare è l'ESI (electrospray ionization).

Il sistema MS/MS è costituito da due quadrupoli di massa interfacciati l'uno di seguito all'altro divisi da una cella di collisione. Nel primo quadropolo (MS 1) viene separata una massa specifica (ione "genitore") in base al rapporto massa/carica. In seguito, lo ione generato è introdotto in una cella di collisione nella quale, impattando contro un gas inerte (argon o azoto), produce una frammentazione secondaria (ioni "figli"). Il secondo quadrupolo di massa (MS 2) analizza quindi gli ioni "figli", sempre in base al rapporto massa/carica.

Nella tecnologia MS/MS si sono dimostrate efficaci diverse modalità di misurazione, a seconda dei pattern di frammentazione. Per questo kit si utilizza tuttavia esclusivamente il *Multiple Reaction Monitoring*.

Multiple Reaction Monitoring (MRM)

In modalità MRM, entrambi gli spettrometri di massa sono regolati in modo statico su una determinata massa. L'MS1 seleziona solo lo ione "genitore" interessato, mentre gli ioni con un'altra massa vengono esclusi. Lo ione genitore si frammenta quindi nella camera di collisione e l'MS2 rileva la frammentazione caratteristica. La modalità MRM garantisce la massima selettività nonché una maggiore sensibilità.

3.3 Ottimizzazione delle transizioni MRM (tuning)

Si raccomanda di verificare la precisione e la risoluzione del sistema MS/MS su misure di massa esatta, di ricalibrarlo se necessario e di ottimizzare le transizioni MRM come segue:

1. Immettere in circolo il Tuning Mix (codice 93915) con la pompa a iniezione tramite un raccordo a T a una velocità di 5 -20 $\mu\text{l}/\text{min}$ (fase mobile B, la velocità di flusso varia a seconda dello spettrometro di massa in uso). Se necessario, il Tuning Mix può essere diluito con la fase mobile B.
2. Mediante Q1 Scan (MS Scan) ottimizzare i parametri della sorgente ionica, in particolare la temperatura e i flussi dei diversi gas. Infine, determinare le posizioni esatte dei segnali massimi delle masse MS1 (ioni genitore) almeno fino a una cifra decimale dopo la virgola.
3. Ottimizzare la frammentazione degli ioni genitore e, per ogni sostanza, i parametri di entrambi gli spettrometri di massa e la cella di collisione. Infine, determinare le posizioni esatte dei segnali massimi delle masse MS2 (ioni "figli") almeno fino a una cifra decimale dopo la virgola.

Per una corretta messa a punto dell'apparecchio, leggere accuratamente le istruzioni per l'uso del sistema LC-MS/MS installato. Eventualmente può essere necessario frequentare un corso di formazione della casa produttrice.

3.4 Messa in esercizio

Prima di dare inizio a una serie di analisi

1. Accendere le pompe a vuoto del sistema LC-MS/MS almeno 8 ore prima di dare inizio a una sequenza di analisi.
2. Equilibrare l'intero sistema per 10 min. a una velocità di flusso di 1,0 ml/min. con fase mobile A (2 ml/min per la misurazione) e 0,5 ml/min con fase mobile B (velocità di flusso variabile in base all'apparecchio in uso per la misurazione).
3. Quindi iniettare ripetutamente un controllo **MassCheck**[®] preparato fino a ottenere valori di concentrazione e intensità di segnale pressoché identici.
4. È ora possibile dare inizio alla serie di analisi.

Per un utilizzo corretto del sistema LC-MS/MS, leggere accuratamente le istruzioni per l'uso.

Eventualmente può essere necessario frequentare un corso di formazione della casa produttrice.

3.5 Messa a riposo temporanea

In caso d'interruzioni temporanee, la pompa HPLC può essere disinserita e la fase mobile può rimanere nel sistema HPLC. Si esclude l'eventualità di una cristallizzazione di sali sulle guarnizioni dei pistoni della pompa HPLC. Le pompe a vuoto del sistema LC-MS/MS devono rimanere costantemente in funzione. Impostare il sistema MS/MS in modalità standby per risparmiare la fonte di ioni e il moltiplicatore. In caso di interruzioni dell'attività deve essere disinserito anche il dispositivo di riscaldamento della colonna.

4 Transizioni di massa degli analiti e dello standard interno

La seguente tabella contiene le transizioni di massa raccomandate per gli analiti e gli standard interni marcati con isotopi. Tutte le sostanze vengono misurate in ioni positivi. Come ione genitore viene misurato l'addotto con l'ammonio $[M + NH_4]^+$.

Dove possibile sono indicati altri valori di transizione utilizzabili per la qualificazione, che non sono tuttavia validati.

Analita	Formula molecolare	Massa esatta [g/mol]	MRM 1	MRM 2
Ciclosporina A	C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂	1201,8	1219,9 → 1202,8	1219,9 → 675,5
Ciclosporina A-d ₁₂	C ₆₂ H ₉₉ D ₁₂ N ₁₁ O ₁₂	1213,9	1231,9 → 1214,8	—
Everolimus	C ₅₃ H ₈₃ NO ₁₄	957,6	975,6 → 908,5	975,6 → 926,5
Everolimus-d ₄	C ₅₃ H ₇₉ D ₄ NO ₁₄	961,6	979,6 → 912,5	—
Sirolimus	C ₅₁ H ₇₉ NO ₁₃	913,6	931,6 → 864,5	931,6 → 882,5
Sirolimus-d ₃	C ₅₁ H ₇₆ NO ₁₃ D ₃	916,6	934,6 → 864,5	—
Tacrolimus	C ₄₄ H ₆₉ NO ₁₂	803,5	821,5 → 768,6	821,5 → 786,6
Tacrolimus- ¹³ Cd ₂	C ₄₃ ¹³ CH ₆₇ D ₂ NO ₁₂	806,5	824,5 → 771,6	—

I valori di massa indicati vanno pertanto utilizzati solo come punti di partenza da cui procedere all'ottimizzazione. La posizione esatta del segnale massimo varia leggermente da sistema a sistema e deve essere determinata nell'ambito della messa a punto dell'apparecchio (almeno una cifra decimale dopo la virgola). A questo scopo utilizzare il relativo Tuning Mix (codice 93915) (si veda cap. 3.3 Ottimizzazione delle transizioni MRM).

5 Preparazione dei campioni

Attenzione:

Quando si manipolano i reagenti, consultare le avvertenze sulle sostanze pericolose all'allegato II.

Attenzione

I campioni di sangue intero possono presentare coaguli nonostante l'aggiunta di anticoagulanti (EDTA). I coaguli possono eventualmente modificare il volume di pipettamento.

In particolare quando si utilizza un robot di laboratorio, se il sistema non dispone delle funzioni di controllo adatte („Clot Detection“), la presenza di coaguli può falsare le misurazioni. Nella pratica, i sistemi configurabili, con controllo a pressione si sono dimostrati più adatti rispetto a quelli basati sulla misurazione della conduttività. Si consiglia pertanto di richiedere informazioni a questo proposito alla casa produttrice dell'apparecchio. Chromsystems non si assume alcuna responsabilità in caso di inadeguatezza dell'apparecchio in uso. Il kit di reagenti Chromsystems può fornire risultati affidabili solo se viene garantito l'utilizzo della corretta quantità di campione.

5.1 Raccolta e conservazione dei campioni dei pazienti

L'analisi viene condotta su sangue EDTA.

I campioni si conservano per un massimo di 7 giorni a +2...+8 °C [2].

Avvertenza: Rientra nelle responsabilità di ogni laboratorio ricorrere a tutto il materiale di riferimento disponibile e/o svolgere studi propri per definire i criteri di stabilità specifici per il proprio laboratorio.

5.2 Ricostituzione degli standard di calibrazione nel sangue intero

6PLUS1® Multilevel

Gli standard di calibrazione nel sangue intero 6PLUS1® Multilevel (codice 28039/XL) sono riconducibili alla propria sostanza di riferimento acquistata da fornitori certificati. Dopo la ricostituzione, questi vanno sottoposti a tutte le operazioni di preparazione del campione, al pari dei campioni del paziente. Gli standard di calibrazione preparati vengono utilizzati per la calibrazione del sistema LC-MS/MS. **Per preparare gli standard di calibrazione dai liofilizzati, pipettare nel flacone esattamente 2,0 ml di acqua distillata.** Attendere circa 10-15 min. a temperatura ambiente, agitando il flacone delicatamente ma ripetutamente, finché il contenuto risulta disciolto in modo omogeneo. **Evitare la luce solare diretta.** Le concentrazioni variano da lotto a lotto e vanno ricavate per ogni standard di calibrazione dal relativo foglietto illustrativo.

Attenzione:

Questo prodotto è stato ottenuto da sangue umano intero che, in seguito alle opportune verifiche da parte del produttore, è risultato negativo agli agenti infettivi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV), del virus dell'epatite B (HBV), del virus dell'epatite C (HCV) e del batterio *Treponema pallidum*. Tuttavia non è possibile escludere completamente il rischio d'infezione di questo prodotto. Considerare tutti i prodotti che contengono materiali di origine umana come potenzialmente contagiosi e adottare, nell'uso di questi prodotti, le stesse precauzioni prescritte per i campioni di pazienti potenzialmente infetti.

Stabilità e stoccaggio degli standard di calibrazione nel sangue intero 6PLUS1® Multilevel ricostituiti

Al riparo dalla luce, ben chiusi e a una temperatura di +2...+8 °C, gli standard di calibrazione ricostituiti possono essere conservati per un massimo di 7 giorni. Per conservarli più a lungo (max. 9 mesi), suddividerli in aliquote e congelarli a temperature inferiori a -18°C.

5.3 Ricostituzione dei controlli nel sangue intero *MassCheck*®

I controlli nel sangue intero *MassCheck*® (codici 0081, 0082, 0083, 0084, 0085, 0089) vengono sottoposti a tutte le operazioni di preparazione del campione, al pari dei campioni del paziente. I controlli preparati vengono fatti passare in ogni serie ai fini del controllo dell'accuratezza del sistema. **Per preparare i controlli dal liofilizzato, pipettare nel flacone esattamente 2,0 ml di acqua distillata.** Attendere circa 10-15 min. a temperatura ambiente, agitando il flacone delicatamente ma ripetutamente, finché il contenuto risulta disciolto in modo omogeneo. **Evitare la luce solare diretta.** Le concentrazioni variano da lotto a lotto e vanno ricavate per ogni controllo dal relativo foglietto illustrativo.

Attenzione:

Questo prodotto è stato ottenuto da sangue umano intero che, in seguito alle opportune verifiche da parte del produttore, è risultato negativo agli agenti infettivi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV), del virus dell'epatite B (HBV), del virus dell'epatite C (HCV) e del batterio *Treponema pallidum*. Tuttavia non è possibile escludere completamente il rischio d'infezione di questo prodotto. Considerare tutti i prodotti che contengono materiali di origine umana come potenzialmente contagiosi e adottare, nell'uso di questi prodotti, le stesse precauzioni prescritte per i campioni di pazienti potenzialmente infetti.

Stabilità dei controlli *MassCheck*® ricostituiti

Al riparo dalla luce, ben chiusi e a una temperatura di +2...+8 °C, i controlli ricostituiti possono essere conservati per un massimo di 7 giorni. Per conservarli più a lungo (max. 9 mesi), suddividerli in aliquote e congelarli a temperature inferiori a -18°C.

5.4 Ricostituzione dello standard interno (Internal Standard Mix)

1. Scongela un flacone di Internal Standard Mix liofilizzato (codice 93904).
 2. Aggiungere 2,5 ml di Reconstitution Buffer (codice 93006).
 3. Chiudere con uno dei tappi neri forniti e attendere circa 5 min. a temperatura ambiente, agitando il flacone delicatamente ma ripetutamente, finché il contenuto risulta omogeneo.
- Evitare la luce solare diretta.**

Avvertenza:

Il Reconstitution Buffer contiene additivi stabilizzanti. La stabilità dello standard interno è garantita solo se viene utilizzato il Reconstitution Buffer.

Lo Internal Standard Mix ricostituito può essere leggermente torbido, tuttavia questa torbidità non compromette assolutamente le performances analitiche. In caso di torbidità si prega di non centrifugare lo standard interno ma di agitarlo brevemente prima dell'uso.

Stabilità e stoccaggio dello standard interno ricostituito

Al riparo dalla luce, ben chiuso e a una temperatura di +2 ... +8 °C, lo standard interno ricostituito può essere conservato per un massimo di 2 settimane. Per conservarlo più a lungo (max. 3 mesi), suddividerlo in aliquote e congelarlo (a una temperatura inferiore a -18 °C).

5.5 Preparazione dei campioni**Attenzione**

I campioni di sangue intero possono presentare coaguli nonostante l'aggiunta di anticoagulanti (EDTA). I coaguli possono eventualmente modificare il volume di pipettamento.

In particolare quando si utilizza un robot di laboratorio, se il sistema non dispone delle funzioni di controllo adatte („Clot Detection“), la presenza di coaguli può falsare le misurazioni. Nella pratica, i sistemi configurabili, con controllo a pressione si sono dimostrati più adatti rispetto a quelli basati sulla misurazione della conduttività. Si consiglia pertanto di richiedere informazioni a questo proposito alla casa produttrice dell'apparecchio. Chromsystems non si assume alcuna responsabilità in caso di inadeguatezza dell'apparecchio in uso. Il kit di reagenti Chromsystems può fornire risultati affidabili solo se viene garantito l'utilizzo della corretta quantità di campione.

5.5.1 Preparazione manuale dei campioni

Ricostituire gli standard di calibrazione nel sangue intero **6PLUS1**[®] Multilevel e i controlli nel sangue intero **MassCheck**[®] con 2,0 ml di acqua distillata e lo standard interno (Internal Standard Mix) con 2,5 ml di Reconstitution Buffer (cfr. cap. 5.2-5.4).

1. Preparare 50 µl di campione/standard di calibrazione/controllo in un vial di reazione da 1,5 ml
2. Aggiungere 25 µl di Internal Standard Mix ricostituito
3. Aggiungere 100 µl di Extraction Buffer
4. Aggiungere 250 µl di Precipitation Reagent e miscelare per 1 min. (mediante Vortex); incubare per 2 min. a temperatura ambiente
5. Centrifugare per 5 min. a 15000 x g
6. Trasferire il surnatante in un vial dell'autocampionatore e iniettare 5-50 µl dell'estratto del campione nel sistema HPLC-MS/MS

Per definire il volume d'iniezione ottimale, iniettare volumi crescenti (da 5 a 50 µl) in uno standard di calibrazione 1 preparato (28031) fino ad ottenere un picco delle dimensioni desiderate. Infine, verificare con uno standard di calibrazione 6 (28036/XL) preparato se tutti gli analiti si trovano ancora nell'intervallo di linearità del sistema MS/MS.

5.5.2 Preparazione automatizzata del campione

I campioni possono essere preparati in maniera automatica o semi-automatica con un robot da laboratorio (liquid handler). Si veda l'Appendice I.

Attenzione

Il robot da laboratorio deve disporre di adeguate funzioni di controllo (Clot Detection). Nella pratica, i sistemi configurabili, con controllo a pressione si sono dimostrati più adatti rispetto a quelli basati sulla misurazione della conduttività. Si consiglia pertanto di richiedere informazioni a questo proposito alla casa produttrice dell'apparecchio. Chromsystems non si assume alcuna responsabilità in caso di inadeguatezza dell'apparecchio in uso. Il kit di reagenti Chromsystems può fornire risultati affidabili solo se viene garantito l'utilizzo della corretta quantità di campione.

La preparazione del campione può avvenire anche manualmente con piastre filtranti a 96 pozzetti e una pipetta multicanale (multipetta e/o una pipetta con pettine).

5.6 Stabilità e stoccaggio dei campioni preparati

Gli estratti dei campioni così ottenuti restano stabili per 2 giorni a temperatura ambiente, per 5 giorni in frigorifero a +2...+8 °C o per almeno 7 giorni in congelatore a una temperatura inferiore a -18°C (in contenitori di vetro e al riparo dalla luce).

5.7 Equipaggiamento aggiuntivo necessario, non compreso nel kit

Il kit di reagenti per la determinazione LC-MS/MS di immunosoppressori nel sangue intero richiede il seguente equipaggiamento, non contenuto nel kit:

- spettrometro di massa a triplo quadrupolo con ESI
- almeno una valvola a 2 posizioni e 6 porte
- sistema HPLC con due pompe isocratiche, dispositivi di riscaldamento delle colonne e campionatore
- pipette e puntali
- vial per autocampionatore e dispositivi di chiusura
- centrifuga da tavolo
- agitatore orbitale (ad es. Vortex™)

6 Calibrazione del sistema di valutazione

Le concentrazioni dei singoli analiti negli standard di calibrazione variano da lotto a lotto e vanno ricavate dai relativi foglietti illustrativi. Nella spettrometria di massa si raccomanda in genere vivamente di eseguire una calibrazione completa a ogni serie di analisi. Si raccomanda inoltre di eseguire regolarmente una verifica della precisione della misurazione con masse esatte ed eventualmente la ri-calibrazione dello strumento. A tal fine, leggere attentamente le avvertenze contenute nel libretto d'istruzioni dell'apparecchio in uso e rivolgersi eventualmente alla casa costruttrice. Per garantire che le condizioni d'analisi LC-MS/MS non varino in modo consistente nel tempo, iniettare nuovamente i controlli **MassCheck**® preparati nel corso dell'analisi di una numerosa serie di campioni o almeno al termine della stessa.

Per il corretto utilizzo del software di valutazione contattare eventualmente il produttore del sistema LC-MS/MS.

7 Controllo di qualità

La precisione e l'accuratezza delle analisi vengono verificate facendo passare in ogni serie di campioni anche i relativi controlli **MassCheck**[®] (codici 0081, 0082, 0083, 0084, 0085, 0089).

Se i valori rilevati risultano al di fuori dell'intervallo indicato sui foglietti illustrativi dei controlli **MassCheck**[®], controllare il sistema ed eventualmente rifare la calibrazione.

8 Intervalli terapeutici

Ciclosporina A: intervallo terapeutico nel sangue [$\mu\text{g/l}$] [2, 3]

	Terapia iniziale	Terapia di mantenimento
Trapianto di reni	150-225	100-150
Trapianto di fegato	225-300	100-150
Trapianto di cuore	250-350	150-250

Everolimus: intervallo terapeutico nel sangue [$\mu\text{g/l}$] [2, 3]

	Minimo
Terapia tripla con ciclosporina A, corticosteroidi e everolimus in trapiantati di rene	3-8

Sirolimus: intervallo terapeutico nel sangue [$\mu\text{g/l}$]

	Minimo
Trapianto di rene [2]	
- Combinazione con steroidi e micofenolato mofetile (MMF)	5-10
- Combinazione con steroidi e micofenolato mofetile (MMF)	8-12
Trapianto di rene [3]	
- Triplice terapia con ciclosporina A, corticosteroidi e sirolimus	4-12
- Doppia terapia con corticosteroidi e sirolimus	12-20
Trapianto di fegato [3]	
- Terapia con ciclosporina A o tacrolimus, sirolimus ed eventualmente corticosteroidi	3-6
- Terapia con sirolimus e eventualmente corticosteroidi	5-8

Tacrolimus: intervallo terapeutico nel sangue [$\mu\text{g/l}$]

	Terapia iniziale		Terapia di mantenimento	
	[2]	[3]	[2]	[3]
Trapianto di reni	10-15	9-13	5-10	4-9
Trapianto di fegato	10-15	9-13	5-10	4-9
Trapianto di cuore	10-18	9-15	8-15	7-13

Avvertenza/Attenzione

Gli intervalli terapeutici qui forniti sono ricavati dalla letteratura e vanno considerati puramente indicativi. Si raccomanda di considerare che per ciclosporina A, everolimus, sirolimus o tacrolimus nel sangue intero non esistono valori generalmente validi per la definizione dell'intervallo terapeutico. I valori ricavati con metodi di test differenti non possono essere messi a confronto. Per poter interpretare correttamente i risultati, i laboratori devono indicare il metodo utilizzato per l'analisi.

9 Fattori di conversione

La tabella sottostante elenca i fattori per la conversione della concentrazione molare alla concentrazione in masse e viceversa.

Sostanza	Da nmol/l a $\mu\text{g/l}$:	Da $\mu\text{g/l}$ a nmol/l
Ciclosporina A	x 1,202	x 0,832
Everolimus	x 0,958	x 1,044
Sirolimus	x 0,914	x 1,094
Tacrolimus	x 0,804	x 1,244

10 Stoccaggio e stabilità dei reagenti

Osservando le avvertenze per il trasporto e lo stoccaggio e in confezione integra, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Trasportare e conservare i reagenti osservando le avvertenze fornite di seguito.

Condizioni di trasporto:

Prodotto	Temperatura di trasporto
Kit di reagenti (codice 93900/400, 93900/1200, 93900/1200/DWP)	+18... +30 °C

Estrarre i reagenti dalla confezione immediatamente dopo il trasporto e stoccare ogni singolo reagente come indicato nella seguente tabella.

Lagerungsbedingungen:

Prodotto	Temperatura di stoccaggio
Mobile Phase A (codice 93911)	+18...+30 °C
Mobile Phase B (codice 93922)	+18...+30 °C
Rinsing Solution (codice 93909)	+18...+30 °C
Precipitation Reagent (codice 93003)	+18...+30 °C
Internal Standard Set (codice 93946)	<-18 °C
Extraction Buffer (codice 93005)	+18...+30 °C
Tuning Mix (codice 93915)	<-18 °C
6PLUS1® Multilevel Calibrator Set (codice 28039/XL)	<-18 °C
Colonna analitica (codice 93100)	+18...+30 °C
Colonna trappola (codice 93122)	+18...+30 °C
MassCheck ® Whole Blood Controls (codice 0081, 0082, 0084, 0085, 0089)	<-18 °C

Chiudere i reagenti immediatamente dopo l'uso e conservarli alla temperatura indicata. I reagenti possono essere conservati per un anno dalla data di apertura, ma non oltre la data di scadenza indicata. Per la stabilità degli standard di calibrazione, dei controlli e dello standard interno dopo la ricostituzione vedi paragrafi 5.2 a 5.4.

11 Smaltimento

Le fasi mobili A e B, la Rinsing Solution, il Precipitation Reagent, il Reconstitution Buffer e l'Internal Standard Mix ricostituito, l'Extraction Buffer e il Tuning Mix contengono solventi organici. Collocare i residui in contenitori appositi, per solventi organici non alogenati.

I residui dei campioni dei pazienti e i campioni preparati, così come i controlli e gli standard di calibrazione sono potenzialmente infettivi e devono pertanto essere raccolti e smaltiti come rifiuti potenzialmente infettivi.

Le soluzioni menzionate non possono essere smaltite né come rifiuto domestico, né attraverso la rete fognaria pubblica. Smaltire ai sensi della Direttiva 2008/98/CE sui rifiuti, nonché delle normative nazionali e regionali. Tenere i recipienti e i contenitori per la raccolta fuori dalla portata di persone non autorizzate.

12 Esempi di cromatogrammi

I seguenti cromatogrammi sono stati ottenuti attraverso la preparazione e l'analisi di uno standard di calibrazione Chromsystems 2 (codice 28032). Le concentrazioni sono di ca. 125 µg/l per la ciclosporina A, circa 7 µg/l per il tacrolimus e il sirolimus, circa 6 µg/l per l'everolimus.

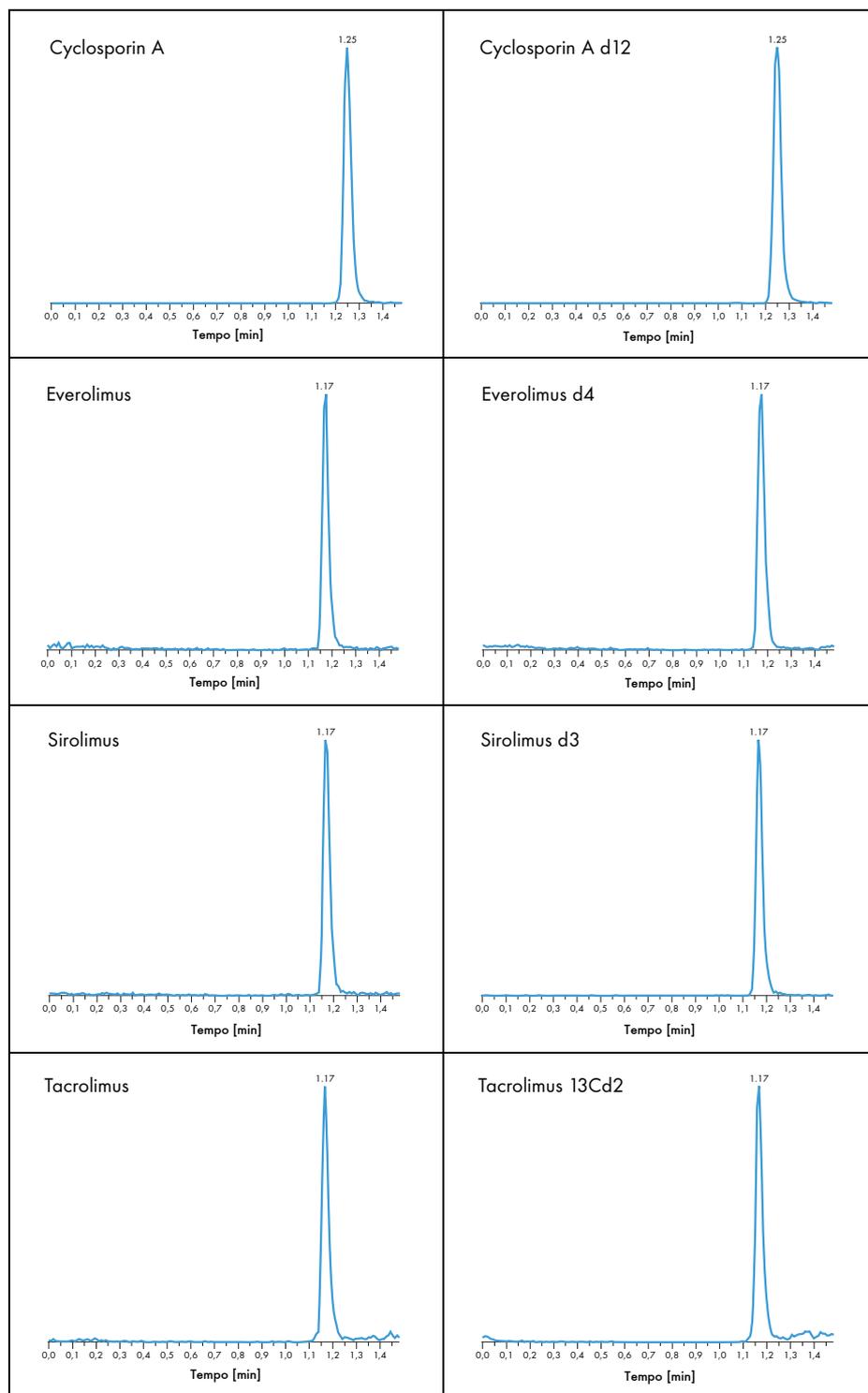


Fig. 5: Cromatogramma di uno standard di calibrazione nel sangue intero per immunosoppressori

13 Determinazione di interferenze

52 farmaci di uso frequente sono stati addizionati a campioni di sangue con immunosoppressori (in concentrazione doppia del range terapeutico) ed analizzati con uno strumento AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500) al fine di ricercare possibili interferenti.

Nessuna interferenza degna di nota

I seguenti farmaci influiscono sui risultati quantitativi in maniera trascurabile (deviazione ≤ 15 %):

acetazolamide, aciclovir, ampicillina, ampicillina B, ampicillina S, ampicillina V, ampicillina X, ampicillina Z, ampicillina AA, ampicillina AB, ampicillina AC, ampicillina AD, ampicillina AE, ampicillina AF, ampicillina AG, ampicillina AH, ampicillina AI, ampicillina AJ, ampicillina AK, ampicillina AL, ampicillina AM, ampicillina AN, ampicillina AO, ampicillina AP, ampicillina AQ, ampicillina AR, ampicillina AS, ampicillina AT, ampicillina AU, ampicillina AV, ampicillina AW, ampicillina AX, ampicillina AY, ampicillina AZ, ampicillina BA, ampicillina BB, ampicillina BC, ampicillina BD, ampicillina BE, ampicillina BF, ampicillina BG, ampicillina BH, ampicillina BI, ampicillina BJ, ampicillina BK, ampicillina BL, ampicillina BM, ampicillina BN, ampicillina BO, ampicillina BP, ampicillina BQ, ampicillina BR, ampicillina BS, ampicillina BT, ampicillina BU, ampicillina BV, ampicillina BW, ampicillina BX, ampicillina BY, ampicillina BZ, ampicillina CA, ampicillina CB, ampicillina CC, ampicillina CD, ampicillina CE, ampicillina CF, ampicillina CG, ampicillina CH, ampicillina CI, ampicillina CJ, ampicillina CK, ampicillina CL, ampicillina CM, ampicillina CN, ampicillina CO, ampicillina CP, ampicillina CQ, ampicillina CR, ampicillina CS, ampicillina CT, ampicillina CU, ampicillina CV, ampicillina CW, ampicillina CX, ampicillina CY, ampicillina CZ, ampicillina DA, ampicillina DB, ampicillina DC, ampicillina DD, ampicillina DE, ampicillina DF, ampicillina DG, ampicillina DH, ampicillina DI, ampicillina DJ, ampicillina DK, ampicillina DL, ampicillina DM, ampicillina DN, ampicillina DO, ampicillina DP, ampicillina DQ, ampicillina DR, ampicillina DS, ampicillina DT, ampicillina DU, ampicillina DV, ampicillina DW, ampicillina DX, ampicillina DY, ampicillina DZ, ampicillina EA, ampicillina EB, ampicillina EC, ampicillina ED, ampicillina EE, ampicillina EF, ampicillina EG, ampicillina EH, ampicillina EI, ampicillina EJ, ampicillina EK, ampicillina EL, ampicillina EM, ampicillina EN, ampicillina EO, ampicillina EP, ampicillina EQ, ampicillina ER, ampicillina ES, ampicillina ET, ampicillina EU, ampicillina EV, ampicillina EW, ampicillina EX, ampicillina EY, ampicillina EZ, ampicillina FA, ampicillina FB, ampicillina FC, ampicillina FD, ampicillina FE, ampicillina FF, ampicillina FG, ampicillina FH, ampicillina FI, ampicillina FJ, ampicillina FK, ampicillina FL, ampicillina FM, ampicillina FN, ampicillina FO, ampicillina FP, ampicillina FQ, ampicillina FR, ampicillina FS, ampicillina FT, ampicillina FU, ampicillina FV, ampicillina FW, ampicillina FX, ampicillina FY, ampicillina FZ, ampicillina GA, ampicillina GB, ampicillina GC, ampicillina GD, ampicillina GE, ampicillina GF, ampicillina GG, ampicillina GH, ampicillina GI, ampicillina GJ, ampicillina GK, ampicillina GL, ampicillina GM, ampicillina GN, ampicillina GO, ampicillina GP, ampicillina GQ, ampicillina GR, ampicillina GS, ampicillina GT, ampicillina GU, ampicillina GV, ampicillina GW, ampicillina GX, ampicillina GY, ampicillina GZ, ampicillina HA, ampicillina HB, ampicillina HC, ampicillina HD, ampicillina HE, ampicillina HF, ampicillina HG, ampicillina HH, ampicillina HI, ampicillina HJ, ampicillina HK, ampicillina HL, ampicillina HM, ampicillina HN, ampicillina HO, ampicillina HP, ampicillina HQ, ampicillina HR, ampicillina HS, ampicillina HT, ampicillina HU, ampicillina HV, ampicillina HW, ampicillina HX, ampicillina HY, ampicillina HZ, ampicillina IA, ampicillina IB, ampicillina IC, ampicillina ID, ampicillina IE, ampicillina IF, ampicillina IG, ampicillina IH, ampicillina II, ampicillina IJ, ampicillina IK, ampicillina IL, ampicillina IM, ampicillina IN, ampicillina IO, ampicillina IP, ampicillina IQ, ampicillina IR, ampicillina IS, ampicillina IT, ampicillina IU, ampicillina IV, ampicillina IW, ampicillina IX, ampicillina IY, ampicillina IZ, ampicillina JA, ampicillina JB, ampicillina JC, ampicillina JD, ampicillina JE, ampicillina JF, ampicillina JG, ampicillina JH, ampicillina JI, ampicillina JJ, ampicillina JK, ampicillina JL, ampicillina JM, ampicillina JN, ampicillina JO, ampicillina JP, ampicillina JQ, ampicillina JR, ampicillina JS, ampicillina JT, ampicillina JU, ampicillina JV, ampicillina JW, ampicillina JX, ampicillina JY, ampicillina JZ, ampicillina KA, ampicillina KB, ampicillina KC, ampicillina KD, ampicillina KE, ampicillina KF, ampicillina KG, ampicillina KH, ampicillina KI, ampicillina KJ, ampicillina KK, ampicillina KL, ampicillina KM, ampicillina KN, ampicillina KO, ampicillina KP, ampicillina KQ, ampicillina KR, ampicillina KS, ampicillina KT, ampicillina KU, ampicillina KV, ampicillina KW, ampicillina KX, ampicillina KY, ampicillina KZ, ampicillina LA, ampicillina LB, ampicillina LC, ampicillina LD, ampicillina LE, ampicillina LF, ampicillina LG, ampicillina LH, ampicillina LI, ampicillina LJ, ampicillina LK, ampicillina LL, ampicillina LM, ampicillina LN, ampicillina LO, ampicillina LP, ampicillina LQ, ampicillina LR, ampicillina LS, ampicillina LT, ampicillina LU, ampicillina LV, ampicillina LW, ampicillina LX, ampicillina LY, ampicillina LZ, ampicillina MA, ampicillina MB, ampicillina MC, ampicillina MD, ampicillina ME, ampicillina MF, ampicillina MG, ampicillina MH, ampicillina MI, ampicillina MJ, ampicillina MK, ampicillina ML, ampicillina MM, ampicillina MN, ampicillina MO, ampicillina MP, ampicillina MQ, ampicillina MR, ampicillina MS, ampicillina MT, ampicillina MU, ampicillina MV, ampicillina MW, ampicillina MX, ampicillina MY, ampicillina MZ, ampicillina NA, ampicillina NB, ampicillina NC, ampicillina ND, ampicillina NE, ampicillina NF, ampicillina NG, ampicillina NH, ampicillina NI, ampicillina NJ, ampicillina NK, ampicillina NL, ampicillina NM, ampicillina NN, ampicillina NO, ampicillina NP, ampicillina NQ, ampicillina NR, ampicillina NS, ampicillina NT, ampicillina NU, ampicillina NV, ampicillina NW, ampicillina NX, ampicillina NY, ampicillina NZ, ampicillina OA, ampicillina OB, ampicillina OC, ampicillina OD, ampicillina OE, ampicillina OF, ampicillina OG, ampicillina OH, ampicillina OI, ampicillina OJ, ampicillina OK, ampicillina OL, ampicillina OM, ampicillina ON, ampicillina OO, ampicillina OP, ampicillina OQ, ampicillina OR, ampicillina OS, ampicillina OT, ampicillina OU, ampicillina OV, ampicillina OW, ampicillina OX, ampicillina OY, ampicillina OZ, ampicillina PA, ampicillina PB, ampicillina PC, ampicillina PD, ampicillina PE, ampicillina PF, ampicillina PG, ampicillina PH, ampicillina PI, ampicillina PJ, ampicillina PK, ampicillina PL, ampicillina PM, ampicillina PN, ampicillina PO, ampicillina PP, ampicillina PQ, ampicillina PR, ampicillina PS, ampicillina PT, ampicillina PU, ampicillina PV, ampicillina PW, ampicillina PX, ampicillina PY, ampicillina PZ, ampicillina QA, ampicillina QB, ampicillina QC, ampicillina QD, ampicillina QE, ampicillina QF, ampicillina QG, ampicillina QH, ampicillina QI, ampicillina QJ, ampicillina QK, ampicillina QL, ampicillina QM, ampicillina QN, ampicillina QO, ampicillina QP, ampicillina QQ, ampicillina QR, ampicillina QS, ampicillina QT, ampicillina QU, ampicillina QV, ampicillina QW, ampicillina QX, ampicillina QY, ampicillina QZ, ampicillina RA, ampicillina RB, ampicillina RC, ampicillina RD, ampicillina RE, ampicillina RF, ampicillina RG, ampicillina RH, ampicillina RI, ampicillina RJ, ampicillina RK, ampicillina RL, ampicillina RM, ampicillina RN, ampicillina RO, ampicillina RP, ampicillina RQ, ampicillina RR, ampicillina RS, ampicillina RT, ampicillina RU, ampicillina RV, ampicillina RW, ampicillina RX, ampicillina RY, ampicillina RZ, ampicillina SA, ampicillina SB, ampicillina SC, ampicillina SD, ampicillina SE, ampicillina SF, ampicillina SG, ampicillina SH, ampicillina SI, ampicillina SJ, ampicillina SK, ampicillina SL, ampicillina SM, ampicillina SN, ampicillina SO, ampicillina SP, ampicillina SQ, ampicillina SR, ampicillina SS, ampicillina ST, ampicillina SU, ampicillina SV, ampicillina SW, ampicillina SX, ampicillina SY, ampicillina SZ, ampicillina TA, ampicillina TB, ampicillina TC, ampicillina TD, ampicillina TE, ampicillina TF, ampicillina TG, ampicillina TH, ampicillina TI, ampicillina TJ, ampicillina TK, ampicillina TL, ampicillina TM, ampicillina TN, ampicillina TO, ampicillina TP, ampicillina TQ, ampicillina TR, ampicillina TS, ampicillina TT, ampicillina TU, ampicillina TV, ampicillina TW, ampicillina TX, ampicillina TY, ampicillina TZ, ampicillina UA, ampicillina UB, ampicillina UC, ampicillina UD, ampicillina UE, ampicillina UF, ampicillina UG, ampicillina UH, ampicillina UI, ampicillina UJ, ampicillina UK, ampicillina UL, ampicillina UM, ampicillina UN, ampicillina UO, ampicillina UP, ampicillina UQ, ampicillina UR, ampicillina US, ampicillina UT, ampicillina UU, ampicillina UV, ampicillina UW, ampicillina UX, ampicillina UY, ampicillina UZ, ampicillina VA, ampicillina VB, ampicillina VC, ampicillina VD, ampicillina VE, ampicillina VF, ampicillina VG, ampicillina VH, ampicillina VI, ampicillina VJ, ampicillina VK, ampicillina VL, ampicillina VM, ampicillina VN, ampicillina VO, ampicillina VP, ampicillina VQ, ampicillina VR, ampicillina VS, ampicillina VT, ampicillina VU, ampicillina VV, ampicillina VW, ampicillina VX, ampicillina VY, ampicillina VZ, ampicillina WA, ampicillina WB, ampicillina WC, ampicillina WD, ampicillina WE, ampicillina WF, ampicillina WG, ampicillina WH, ampicillina WI, ampicillina WJ, ampicillina WK, ampicillina WL, ampicillina WM, ampicillina WN, ampicillina WO, ampicillina WP, ampicillina WQ, ampicillina WR, ampicillina WS, ampicillina WT, ampicillina WU, ampicillina WV, ampicillina WW, ampicillina WX, ampicillina WY, ampicillina WZ, ampicillina XA, ampicillina XB, ampicillina XC, ampicillina XD, ampicillina XE, ampicillina XF, ampicillina XG, ampicillina XH, ampicillina XI, ampicillina XJ, ampicillina XK, ampicillina XL, ampicillina XM, ampicillina XN, ampicillina XO, ampicillina XP, ampicillina XQ, ampicillina XR, ampicillina XS, ampicillina XT, ampicillina XU, ampicillina XV, ampicillina XW, ampicillina XX, ampicillina XY, ampicillina XZ, ampicillina YA, ampicillina YB, ampicillina YC, ampicillina YD, ampicillina YE, ampicillina YF, ampicillina YG, ampicillina YH, ampicillina YI, ampicillina YJ, ampicillina YK, ampicillina YL, ampicillina YM, ampicillina YN, ampicillina YO, ampicillina YP, ampicillina YQ, ampicillina YR, ampicillina YS, ampicillina YT, ampicillina YU, ampicillina YV, ampicillina YW, ampicillina YX, ampicillina YY, ampicillina YZ, ampicillina ZA, ampicillina ZB, ampicillina ZC, ampicillina ZD, ampicillina ZE, ampicillina ZF, ampicillina ZG, ampicillina ZH, ampicillina ZI, ampicillina ZJ, ampicillina ZK, ampicillina ZL, ampicillina ZM, ampicillina ZN, ampicillina ZO, ampicillina ZP, ampicillina ZQ, ampicillina ZR, ampicillina ZS, ampicillina ZT, ampicillina ZU, ampicillina ZV, ampicillina ZW, ampicillina ZX, ampicillina ZY, ampicillina ZZ.

Per qualsiasi domanda riguardante possibili interferenze, si prega di rivolgersi al nostro Servizio Clienti oppure direttamente alla nostra hotline (+49 89 18930-300) o di inviare una mail al nostro servizio assistenza LCMS (LCMS-Support@chromsystems.com).

14 Limitazioni cliniche - Avvertenze

Non esistono valori generalmente validi per la definizione dell'intervallo terapeutico di ciclosporina A, everolimus, sirolimus o tacrolimus nel sangue intero. I valori ricavati con metodi di test differenti non possono essere messi a confronto. Per poter interpretare correttamente i risultati, i laboratori devono indicare il metodo utilizzato per l'analisi.

Si raccomanda di non modificare il regime terapeutico sulla base di singoli risultati. Prima di modificare la terapia occorre valutare accuratamente i referti clinici del paziente; ciascun utilizzatore deve stabilire i propri intervalli di riferimento in base alle valutazioni cliniche. I fattori di conversione tra i diversi metodi di analisi non devono essere utilizzati per ricavare i valori individuali dei pazienti.

La complessità dei fattori che concorrono allo stato clinico, come la diversa risposta individuale agli immunosoppressori e gli effetti nefrotossici di ciclosporina A, everolimus, sirolimus e tacrolimus, la terapia concomitante con altri immunosoppressori, il tipo di trapianto, il tempo trascorso dal trapianto e una serie di altri fattori concorrono fa sì che possano essere utilizzati sistemi di misura diversi per ottenere i livelli ottimali di questi farmaci.

15 Diagnostica

Malfunzionamento	Possibile causa	Rimedio
Picchi di disturbo	Sistema d'iniezione sporco	Pulire con metanolo o iniettare 10 volte la Mobile Phase B.
	Contenitori dei campioni sporchi	Utilizzare contenitori nuovi o puliti con metanolo.
	Setto del contenitore del campione	Utilizzare un altro setto
	Fasi mobili o colonne contaminate	Cambiare le fasi mobili o le colonne e lavare il sistema
	Risoluzione della massa troppo bassa	Ottimizzare la risoluzione della massa
Segnale assente	Valvola di commutazione flusso montata in modo errato	Verificare il funzionamento della valvola
	Iniettore guasto	Controllare l'iniettore
	Pompa guasta	Ispezionare la pompa
	Capillari di trasferimento non collegati alla sorgente ionica	Collegare i capillari alla sorgente ionica
	Sistema MS/MS non pronto	Controllare il sistema MS/MS
Sensibilità ridotta	Sorgente ionica sporca	Pulire la sorgente ionica
	Spettrometro di massa sporco	Pulire lo spettrometro di massa
	La valvola dell'iniettore perde	Controllare l'iniettore
	La valvola di commutazione flusso perde	Controllare la valvola
	Moltiplicatore vecchio	Sostituire il moltiplicatore o aumentare la tensione
Forti oscillazioni del segnale	Ionizzazione instabile	Verificare la sorgente ionica, eventualmente ottimizzare la tensione
	Flusso non uniforme	Controllare la pompa HPLC
	Flusso di gas instabile	Controllare i flussi dei gas

Malfunzionamento	Possibile causa	Rimedio
Non si produce il vuoto	Pompe per vuoto guaste	Controllare la pompa di prevuoto e quella per l'alto vuoto
	Perdita nel sistema di vuoto	Controllare i tubi e i raccordi del sistema di vuoto
Alimentazione del gas assente	Generatore di azoto guasto	Controllare il generatore di azoto
	Compressore guasto	Controllare il compressore
	Bombola del gas vuota	Sostituire la bombola del gas
	Pressioni d'ingresso del gas fuori dai valori nominali	Regolare le pressioni d'ingresso del gas

16 Bibliografia

1. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (Hrsg). Allgemeine und spezifische Pharmakologie und Toxikologie. 9. Aufl, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH München (2005).
2. Gressner AM, Arndt T (Hrsg). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Aufl, Springer Medizin Verlag Heidelberg (2013).
3. Thomas L (Hrsg). Labor und Diagnose. 8. Aufl, Verlag TH-Books Frankfurt/Main (2012).

Allegato I: Preparazione automatizzata del campione

Nota:

Per il preparatore automatico MassSTAR è disponibile, su richiesta, una procedura dedicata. MassSTAR è un prodotto sviluppato in collaborazione tra Chromsystems e Hamilton.

1 Equipaggiamento aggiuntivo necessario, non compreso nel kit:

Preparazione del campione con robot da laboratorio:

Robot da laboratorio con:

- agitatore
- centrifuga con rotore per piastre deepwell
- Clot Detection

Preparazione del campione con pipetta multicanale:

- pipetta multicanale (a 8 o 12 canali)
- agitatore
- centrifuga con rotore per piastre deepwell

2 Preparazione automatizzata del campione con robot da laboratorio:

Attenzione

I campioni di sangue intero possono presentare coaguli nonostante l'aggiunta di anticoagulanti (EDTA). I coaguli possono eventualmente modificare il volume di pipettamento.

In particolare quando si utilizza un robot di laboratorio, se il sistema non dispone delle funzioni di controllo adatte („Clot Detection“), la presenza di coaguli può falsare le misurazioni. Nella pratica, i sistemi configurabili, con controllo a pressione si sono dimostrati più adatti rispetto a quelli basati sulla misurazione della conduttività. Si consiglia pertanto di richiedere informazioni a questo proposito alla casa produttrice dell'apparecchio. Chromsystems non si assume alcuna responsabilità in caso di inadeguatezza dell'apparecchio in uso. Il kit di reagenti Chromsystems può fornire risultati affidabili solo se viene garantito l'utilizzo della corretta quantità di campione.

Prima di iniziare la preparazione del campione, lavare accuratamente il sistema di circolazione del robot con soluzione di lavaggio (acqua ultrapura, 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 18,2 M Ω) per eliminare le bolle d'aria e le impurità eventualmente presenti nel sistema. Il volume di lavaggio dipende dal volume del circuito del robot. In genere sono sufficienti 15-20 ml. Se si utilizzano aghi fissi, vanno puliti tutti i giorni con metanolo prima di iniziare il lavoro.

Per ottenere risultati costanti e affidabili nei lavori di routine, pulire accuratamente mensilmente il circuito e la pipetta / le pipette del robot con metanolo/acqua (80/20), per eliminare eventuali impurità microbiologiche. Al termine, sciacquare il robot con soluzione di lavaggio (acqua ultrapura, 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 18,2 M Ω).

Attenzione! In alcuni sistemi il contenuto di metanolo della soluzione detergente deve essere regolato per non danneggiare il sistema di circolazione. Leggere attentamente le istruzioni della casa costruttrice.

2.1 Quantità di reagente occorrenti

Per ciascun campione occorrono le seguenti quantità di reagenti:

Reagente	Quantità per campione
Campione/Standard di calibrazione/Controllo	50 µl
Internal Standard (standard interno)	25 µl
Extraction Buffer (buffer di estrazione)	100 µl
Precipitation Reagent (reagente di precipitazione)	250 µl

2.2 Procedura

Osservare scrupolosamente la sequenza di pipettamento.

1. Collocare 50 µl di sangue intero ben omogenizzato (standard di calibrazione, controlli, campioni) in una piastra di eluizione deepwell a 96 pozzetti
2. Aggiungere 25 µl di Internal Standard
3. Aggiungere 100 µl di Extraction Buffer.
4. Aggiungere 250 µl di Precipitation Reagent
5. Agitare per 3 min. (1200 giri/min.)
6. Separare il precipitato mediante centrifugazione (2000 x g, 3 min.)
7. Trasferire il surnatante in una piastra di raccolta
8. Sigillare la piastra di raccolta con l'apposita pellicola e trasferirla nell'autocampionatore
9. Iniettare 5-50 µl di eluato nel sistema LC-MS/MS.

Gli standard interni, il buffer di estrazione e il reagente di precipitazione possono essere prelevati in modalità multipipetting. Per il lavaggio dell'ago utilizzare acqua ultrapura (0,055 µS/cm, 18,2 MΩ).

Importante

Quando si utilizzano campioni di sangue intero freschi, vanno accuratamente omogeneizzati subito prima di essere caricati nel preparatore, in modo da garantire una sufficiente miscelazione.

2.3 Stabilità dei campioni preparati

Poiché nella piastra di raccolta vi è il rischio che i campioni preparati evaporino, vanno analizzati entro un giorno. Nel caso in cui ciò non sia possibile, gli estratti dei campioni così ricavati, trasferiti in contenitori di vetro sigillati e conservati al riparo dalla luce sono stabili per 2 giorni a temperatura ambiente, 5 giorni in frigorifero a +2 ... +8 °C o almeno 7 giorni in congelatore a una temperatura inferiore a -18 °C.

2.4 Messa a riposo temporanea

Prima e dopo interruzioni dell'attività superiori a 2 settimane, pulire accuratamente il sistema di circolazione e la pipetta / le pipette del robot con metanolo/acqua (80/20), per eliminare eventuali impurità microbiologiche. Al termine, sciacquare il robot con soluzione di lavaggio (acqua ultrapura, 0,055 µS/cm, 18,2 MΩ).

Attenzione!

In alcuni sistemi il contenuto di metanolo della soluzione detergente deve essere regolato per non danneggiare il sistema di circolazione. Leggere attentamente le istruzioni della casa costruttrice.

Per informazioni riguardo la programmazione del robot di pipettazione rivolgersi al nostro Servizio Clienti al numero +49 89 18930-0.

3 Preparazione del campione con pipetta multicanale

3.1 Quantità di reagente occorrenti

Per ciascun campione occorrono le seguenti quantità di reagenti:

Reagente	Quantità per campione
Campione/Standard di calibrazione/Controllo	50 µl
Internal Standard (standard interno)	25 µl
Extraction Buffer (buffer di estrazione)	100 µl
Precipitation Reagent (reagente di precipitazione)	250 µl

3.2 Procedura

Osservare scrupolosamente la sequenza di pipettamento.

1. Collocare 50 µl di sangue intero ben omogenizzato (standard di calibrazione, controlli, campioni) in una piastra di eluizione deepwell a 96 pozzetti
2. Aggiungere 25 µl di Internal Standard
3. Aggiungere 100 µl di Extraction Buffer
4. Aggiungere 250 µl di Precipitation Reagent
5. Agitare per 3 min. (1200 giri/min.)
6. Separare il precipitato mediante centrifugazione (2000 x g, 3 min.)
7. Trasferire il surnatante in una piastra di raccolta
8. Sigillare la piastra di raccolta con l'apposita pellicola e trasferirla nell'autocampionatore
9. Iniettare 5-50 µl di eluato nel sistema LC-MS/MS.

4 Diagnostica

Malfunzionamento	Possibile causa	Rimedio
Elevata variazione delle superfici dei picchi dello standard interno	Perdita di standard interno a causa dell'elevata pressione di vapore dello stesso	Prelevare 50 µl oltre al volume occorrente
	Dispositivo di rilevamento del livello nel recipiente guasto	Effettuare il rilevamento con un solo ago e portare gli altri aghi sullo stesso livello
	Contaminazione del campione con pellicola sigillante non adatta per la piastra di raccolta	Utilizzare un film senza collante nei punti di foratura

Malfunzionamento	Possibile causa	Rimedio
<p>Non viene rilevato alcun analita</p>	<p>Il campione non è stato iniettato o non completamente</p>	<p>Verificare la profondità di immersione dell'ago dell'autocampionatore</p>
	<p>Evaporazione del campione nell'autocampionatore</p>	<p>Far raffreddare l'autocampionatore Utilizzare la pellicola per piastre a 96 pozzetti</p>
	<p>Contaminazione del campione con pellicola sigillante non adatta per la piastra di raccolta</p>	<p>Utilizzare un film senza collante nei punti di foratura</p>
<p>Carry-over</p>	<p>Robot sporco</p>	<p>Pulire gli aghi e i tubi</p>
	<p>Autocampionatore sporco</p>	<p>Pulire le parti a contatto con l'eluato dell'autocampionatore</p>

Allegato II: Avvertenze sulle sostanze pericolose

Osservare le seguenti avvertenze relative alle sostanze pericolose e adottare le opportune misure di sicurezza. Altre informazioni sono contenuti nelle schede di sicurezza, disponibili su richiesta o scaricabili dal nostro sito Internet www.chromsystems.com.

Pittogrammi	Indicazioni di pericolo e consigli di prudenza
Mobile Phase A (Codice 93911)	
  	<p>Pericolo H226 Liquido e vapori infiammabili. H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato. H370 Provoca danni agli organi.</p> <p>P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare. P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone. P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.</p>
Mobile Phase B (Codice 93922)	
  	<p>Pericolo H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili. H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato. H370 Provoca danni agli organi.</p> <p>P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare. P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone. P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.</p>
Rinsing Solution (Codice 93909)	
  	<p>Pericolo H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili. H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato. H370 Provoca danni agli organi.</p> <p>P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare. P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone. P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.</p>

Pittogrammi

Indicazioni di pericolo e consigli di prudenza

Precipitation Reagent (Codice 93003)



Pericolo

H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili.
 H302+H312+H332 Nocivo se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.
 H319 Provoca grave irritazione oculare.

P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
 P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare.
 P241 Utilizzare impianti elettrici/di ventilazione/d'illuminazione/a prova di esplosione.
 P243 Prendere precauzioni contro le scariche elettrostatiche.

Internal Standard Set (Codice 93946), costituito da:

Internal Standard Mix (liof.) (REF 93904):



Attenzione

H319 Provoca grave irritazione oculare.
 P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
 P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
 P337+P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

Reconstitution Buffer (REF 93006):



Attenzione

H226 Liquido e vapori infiammabili.
 H319 Provoca grave irritazione oculare.
 H336 Può provocare sonnolenza o vertigini.
 P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare.
 P233 Tenere il recipiente ben chiuso.
 P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

L'Internal Standard Mix ricostituito va considerato come il Reconstitution Buffer e va maneggiato con la dovuta cautela.

Pittogrammi

Indicazioni di pericolo e consigli di prudenza

Extraction Buffer (Codice 93005)



Pericolo

H226 Liquido e vapori infiammabili.
 H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.
 H318 Provoca gravi lesioni oculari.
 H370 Provoca danni agli organi.
 H411 Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
 P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare.
 P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico.
 P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.
 P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.

Tuning Mix (Codice 93915)



Pericolo

H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili.
 H301+H311+H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.
 H370 Provoca danni agli organi.

P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
 P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare.
 P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico.
 P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.
 P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.

I componenti non sono classificati come pericolosi ai sensi della normativa europea:

6PLUS1® Multilevel Whole Blood Calibrator Set (Codice 28039/XL)

MassCheck® Whole Blood Controls (Codice 0081, 0082, 0083, 0084, 0085, 0089)

Allegato III: Avvertenza per il calcolo manuale

I quozienti delle superfici dei picchi degli analiti e delle superfici dei picchi dello standard interno vengono visualizzati a confronto con le concentrazioni degli analiti. Per regressione lineare si ottiene il gradiente della retta di calibrazione, dalla quale si calcola la concentrazione dei campioni.

Per il calcolo manuale occorrono i seguenti dati:

- Superficie dei picchi dell'analita A nel cromatogramma MRM = A_{Campione}
- Superficie dei picchi dello standard interno nel cromatogramma MRM = I_{Campione}
- Gradiente della retta di calibrazione = a
- Intercetta della retta di calibrazione = b

Calcolare quindi la concentrazione dell'analita A nel campione (C_{Campione}) come segue:

$$C_{\text{Campione}} = \frac{(A_{\text{Campione}} / I_{\text{Campione}}) - b}{a}$$

Allegato IV: Dati di validazione

Allegato IVa:

Dati di validazione con preparazione manuale del campione

Per la verifica della linearità e la validazione sono stati più volte elaborati campioni di sangue addizionati con quantità definite di sostanze pure. Le prestazioni sono state verificate e validate sui seguenti apparecchi:

- spettrometro di massa AB Sciex API 4000™
- spettrometro di massa Agilent 6460 (con sorgente ionica ESI standard)
- spettrometro di massa Waters ACQUITY® TQD

Se questo kit *MassTox*® (codice 93900) viene utilizzato su uno spettrometro di massa diverso da quelli qui citati, occorre validare il metodo sull'apparecchio in uso.

Recupero:

Il tasso di recupero degli analiti analizzati è stato ricavato dai gradienti delle rette di calibrazione dopo ripetute addizioni di sangue intero e diluizioni delle soluzioni standard. La seguente tabella riporta i tassi di recupero:

Sostanza	Tasso di recupero [%]		
	AB Sciex API 4000™	Agilent 6460	Waters ACQUITY® TQD
Ciclosporina A	107,5	97,7	103,5
Everolimus	100,3	103,4	97,8
Sirolimus	101,7	101,0	93,3
Tacrolimus	99,9	100,9	98,7

Linearità / Limite di quantificazione

La linearità è stata determinata addizionando campioni di sangue intero con quantità definite di sostanze standard. Il limite di quantificazione (LOQ) è stato ricavato con diluizioni definite dello standard di calibrazione 1 (28039/1) con uno standard di calibrazione in bianco (28039/0).

Sostanza	Limite di quantificazione [µg/l]			Intervallo lineare fino ad almeno [µg/l]
	AB Sciex API 4000™	Agilent 6460	Waters ACQUITY® TQD	
Ciclosporina A	5	5	5	2000
Everolimus	0,5	1	1	100
Sirolimus	0,5	1	1	100
Tacrolimus	0,5	0,5	0,5	100

Riproducibilità intra-assay

I coefficienti di variazione sono stati determinati attraverso la ripetuta elaborazione (n = 10) dello stesso campione a quattro diverse concentrazioni.

Sostanza	Coefficiente di variazione [%] (per concentrazioni in µg/l)			
	AB Sciex API 4000™			
Ciclosporina A	4,1 (53,0)	3,6 (261)	2,4 (495)	1,4 (1140)
Everolimus	6,9 (2,8)	5,1 (5,0)	2,8 (9,9)	3,7 (33,5)
Sirolimus	5,1 (2,8)	4,2 (10,0)	2,9 (18,5)	4,0 (37,3)
Tacrolimus	3,8 (2,8)	5,2 (7,8)	3,8 (15,5)	2,9 (32,6)
Agilent 6460				
Ciclosporina A	2,6 (53,0)	3,2 (261)	2,9 (495)	3,6 (1140)
Everolimus	9,0 (2,8)	7,7 (5,0)	6,8 (9,9)	5,0 (33,5)
Sirolimus	8,8 (2,8)	9,8 (10,0)	4,9 (18,5)	7,7 (37,3)
Tacrolimus	5,9 (2,8)	4,9 (7,8)	5,0 (15,5)	3,8 (32,6)
Waters ACQUITY® TQD				
Ciclosporina A	2,3 (53,0)	2,5 (261)	2,8 (495)	3,0 (1140)
Everolimus	5,9 (2,8)	5,9 (5,0)	5,0 (9,9)	3,8 (33,5)
Sirolimus	6,6 (2,8)	3,1 (10,0)	3,5 (18,5)	5,4 (37,3)
Tacrolimus	3,6 (2,8)	2,7 (7,8)	4,8 (15,5)	3,5 (32,6)

Riproducibilità inter-assay

La riproducibilità inter-assay è stata ricavata attraverso la ripetuta elaborazione (n = 10) dello stesso campione a quattro concentrazioni diverse in 10 giorni diversi.

Sostanza	Coefficiente di variazione [%] (per concentrazioni in µg/l)			
	AB Sciex API 4000™			
Ciclosporina A	6,4 (53,0)	6,6 (261)	6,3 (495)	7,6 (1140)
Everolimus	8,6 (2,8)	6,8 (5,0)	5,2 (9,9)	4,9 (33,5)
Sirolimus	9,1 (2,8)	5,9 (10,0)	5,2 (18,5)	5,3 (37,3)
Tacrolimus	9,5 (2,8)	6,6 (7,8)	5,8 (15,5)	5,3 (32,6)
Agilent 6460				
Ciclosporina A	4,0 (53,0)	5,2 (261)	6,2 (495)	5,4 (1140)
Everolimus	12,0 (2,8)	11,0 (5,0)	8,7 (9,9)	8,7 (33,5)
Sirolimus	12,8 (2,8)	9,3 (10,0)	9,3 (18,5)	9,2 (37,3)
Tacrolimus	9,9 (2,8)	6,7 (7,8)	6,3 (15,5)	5,7 (32,6)
Waters ACQUITY® TQD				
Ciclosporina A	5,0 (53,0)	4,5 (261)	5,7 (495)	4,0 (1140)
Everolimus	7,5 (2,8)	5,7 (5,0)	5,4 (9,9)	3,8 (33,5)
Sirolimus	8,3 (2,8)	6,0 (10,0)	5,5 (18,5)	5,4 (37,3)
Tacrolimus	6,0 (2,8)	4,2 (7,8)	4,9 (15,5)	3,6 (32,6)

Questi dati sono stati ricavati nei nostri laboratori con gli appositi componenti del kit come previsto dalle norme di legge. I dati non contengono né alcuna valutazione della capacità di prestazione generale dello spettrometro di massa utilizzato né implicano alcun giudizio su di esso.

Drift

Per la definizione del drift della concentrazione degli analiti nel tempo è stata messa a confronto per un periodo di 10 giorni la concentrazione dei 4 analiti nei quattro controlli utilizzati. Il test è stato effettuato con tre diversi sistemi LC-MS/MS (AB Sciex API 4000™, Agilent 6460, Waters ACQUITY® TQD). Non è stato osservato alcun drift per ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus e everolimus.

Carry-Over

È stato misurato lo standard di calibrazione con la concentrazione di analiti più elevata e subito dopo lo standard di calibrazione in bianco; quindi le superfici dei picchi del bianco è stata confrontata in termini percentuali con la superficie dello standard di calibrazione. Il test è stato effettuato con tre sistemi LC-MS/MS (AB Sciex API 4000™, Agilent 6460 e Waters ACQUITY® TQD). Dalla verifica dei dati ricavati per tutti e quattro gli analiti non risultano effetti di carry-over degni di nota. Per tutte le misurazioni, la concentrazione del bianco si situava al di sotto del limite di rivelazione.

Allegato IVb:

Dati di validazione con preparazione automatizzata del campione

Per la verifica della linearità e la validazione sono stati più volte elaborati campioni di sangue addizionati con quantità definite di sostanze pure. Le prestazioni sono state verificate e validate sul seguente apparecchio:

- spettrometro di massa AB Sciex API 4000™
- AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)

La preparazione del campione è stata eseguita con il seguente robot da laboratorio:

- Tecan Freedom EVO® 100 (per AB Sciex API 4000™)
- MassSTAR (per AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500))

Se questo kit **MassTox®** (codice 93900) viene utilizzato su uno spettrometro di massa diverso da quello qui citato, occorre validare il metodo sull'apparecchio in uso.

Recupero:

Il tasso di recupero degli analiti analizzati è stato ricavato dai gradienti delle rette di calibrazione dopo ripetute addizioni di sangue intero e diluizioni delle soluzioni standard. La seguente tabella riporta i tassi di recupero:

Sostanza	Tasso di recupero [%]	
	AB Sciex API 4000™	AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)
Ciclosporina A	104,1	98,7
Everolimus	103,8	96,1
Sirolimus	103,7	103,8
Tacrolimus	103,6	99,6

Linearità / Limite di quantificazione

La linearità è stata determinata addizionando campioni di sangue intero con quantità definite di sostanze standard. Il limite di quantificazione (LOQ) è stato ricavato con diluizioni definite dello standard di calibrazione 1 (28039/1) con standard di calibrazione in bianco (28039/0).

Sostanza	Limite di quantificazione [µg/l]	Intervallo lineare fino ad almeno [µg/l]
AB Sciex API 4000™		
Ciclosporina A	5	2000
Everolimus	1	80
Sirolimus	1	80
Tacrolimus	0,5	80
AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)		
Ciclosporina A	5	2000
Everolimus	0,5	100
Sirolimus	0,5	100
Tacrolimus	0,5	100

Riproducibilità intra-assay

I coefficienti di variazione sono stati determinati attraverso la ripetuta elaborazione (n = 10) dello stesso campione a quattro diverse concentrazioni.

Sostanza	Coefficiente di variazione [%] (per concentrazioni in µg/l)			
AB Sciex API 4000™				
Ciclosporina A	3,2 (53,0)	3,4 (261)	3,7 (495)	3,9 (1140)
Everolimus	7,8 (2,8)	7,0 (5,0)	4,1 (9,9)	2,9 (33,5)
Sirolimus	4,9 (2,8)	4,4 (10,0)	3,7 (18,5)	4,0 (37,3)
Tacrolimus	4,5 (2,8)	3,5 (7,8)	3,7 (15,5)	4,7 (32,6)
AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)				
Ciclosporina A	3,1 (49,7)	5,1 (249)	5,7 (484)	4,4 (1116)
Everolimus	3,8 (2,7)	5,1 (4,8)	3,1 (9,4)	2,5 (33,1)
Sirolimus	4,3 (2,7)	2,4 (9,7)	4,0 (18,5)	2,6 (37,6)
Tacrolimus	3,4 (2,7)	2,1 (7,4)	2,7 (15,3)	1,4 (32,2)

Riproducibilità inter-assay

La riproducibilità inter-assay è stata ricavata attraverso la ripetuta elaborazione (n = 10) dello stesso campione a quattro concentrazioni diverse in 10 giorni diversi.

Sostanza	Coefficiente di variazione [%] (per concentrazioni in µg/l)			
	AB Sciex API 4000™			
Ciclosporina A	5,7 (53,0)	5,0 (261)	5,8 (495)	3,7 (1140)
Everolimus	8,5 (2,8)	8,2 (5,0)	7,6 (9,9)	6,1 (33,5)
Sirolimus	11,4 (2,8)	7,1 (10,0)	7,7 (18,5)	6,0 (37,3)
Tacrolimus	6,7 (2,8)	7,3 (7,8)	6,6 (15,5)	5,9 (32,6)
	AB Sciex IVD-MS™ Analyzer (Triple Quad™ 4500)			
Ciclosporina A	7,7 (49,7)	6,0 (249)	6,6 (484)	6,2 (1116)
Everolimus	4,1 (2,7)	5,1 (4,8)	4,7 (9,4)	4,1 (33,1)
Sirolimus	5,8 (2,7)	4,2 (9,7)	4,2 (18,5)	3,6 (37,6)
Tacrolimus	4,3 (2,7)	3,7 (7,4)	4,1 (15,3)	3,6 (32,2)

Copy

EC-Declaration of Conformity

according to directive 98/79 EC on in vitro diagnostic medical devices

We, as manufacturer

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
D-82166 Gräfelfing, Germany

declare on our own responsibility, that herein after called in vitro diagnostic medical devices for the LC-MS/MS determination of:

Nomenclature term: Other Immunosuppressant (TDM)
Nomenclature code: 12-08-06-90-00
Classification: other product

Product name: **MassTox® Immunosuppressants in Whole Blood - ONEMINUTE Test**

Controls: **MassCheck® Immunosuppressants Whole Blood Control**

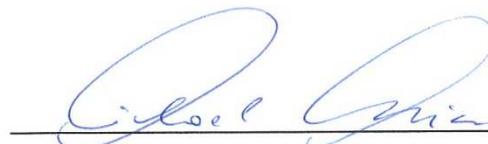
meets all applicable requirements of the directive 98/79/EC

Conformity assessment procedure:
Annex III of the directive 98/79/EC

Applied harmonized standards:
EN ISO 9001, EN ISO 13485, EN ISO 14971, EN 18113-2, EN 980, EN 13640,
EN 13641

Notified body: -

Munich, January 24, 2012



Michael Meier
General Manager

Vers. 1.1

Dichiarazione di conformità

ai sensi della direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro

Noi, come produttore,

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
82166 Gräfelfing, Germania

dichiariamo sotto la propria responsabilità che i sottocitati prodotti per la diagnostica in vitro per la determinazione LC-MS/MS

Denominazione nomenclatura: Other Immunosuppressants (TDM)
Codice nomenclatura: 12-08-06-90-00
Classificazione: altro dispositivo

Denominazione prodotto: **MassTox®** Immunosoppressori nel sangue intero
ONEMINUTE Test

Controlli: **MassCheck®** Immunosuppressants Whole Blood Control

sono conformi ai requisiti della direttiva 98/79 CE.

Procedura di valutazione della conformità:

Allegato III della direttiva 98/79 CE.

Norme armonizzate applicate:

EN ISO 9001, EN ISO 13485, EN ISO 14971, EN 18113-2, EN 980, EN 13640,
EN 13641

Organismo notificato:-

Monaco, 24 gennaio 2012

M. Meier
Amministratore delegato