

Farmaci Immunosoppressori: monitoraggio della terapia

Metodi d'analisi consolidati ed emergenti

Dr Antonello Nonnato, Dr.ssa Donatella Moscato
Azienda Ospedaliero-Universitaria San Giovanni
Battista di Torino
Sede MOLINETTE

Metodi d'analisi proposti per il monitoraggio terapeutico dei farmaci immunosoppressori

- metodi immunometrici
- metodi cromatografici

Metodi Immunometrici

- *MEIA: microparticle enzyme-linked immunoassay*
- *ACMIA: antibody conjugated magnetic immunoassay*
- *EMIT: enzyme multiplied immunoassay technique*
- *CEDIA: cloned enzyme donor immunoassay*
- *FPIA: fluorescent polarization immunoassay*
- *CMIA: chemiluminescent microparticle immunoassay*

Metodi Cromatografici

- HPLC-UV: cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelatore UV
- HPLC-MS: con rivelatore a separazione di massa
- HPLC-MS-MS: con rivelazione a separazione di massa accoppiata

Metodi d'analisi: Ciclosporina

Secondo le ultime stime di Holt dal suo *Int. Proficiency Scheme* le tecniche più utilizzate dai laboratori sono:

- ACRIA (Siemens-Healthcare Diagnostics) : 56 laboratori
- FPIA-TDx monoclonale (Abbott): 52 laboratori
- CMIA-AxsYM (Abbott): 46 laboratori
- CEDIA-Olympus (Microgenics-GmbH) : 39 laboratori
- EMIT: 36 laboratori
- HPLC-MS: 28 laboratori
- RIA: 6 laboratori
- HPLC-UV: 2 laboratori
- FPIA-TDx policlonale (Abbott): 2 laboratori

Metodi d'analisi: Tacrolimus

Holt - Int. Proficiency Scheme

- MEIA IMx (Abbott): 119 laboratori
- HPLC-MS: 93 laboratori
- ACMIA-Dimension (Siemens-Healthcare Diagnostics): 56 laboratori
- EMIT: 54 laboratori
- CMIA Architect (Abbott): 24 laboratori

Metodi d'analisi: Sirolimus

Holt - Int. Proficiency Scheme

- HPLC-MS: 86 laboratori
- MEIA IMx (Abbott): 73 laboratori
- HPLC-UV: 22 laboratori

Metodi d'analisi: Everolimus

Holt - Int. Proficiency Scheme

- FPIA (Innofluor®, Seradyn Inc., IN, USA) da impiegare sui sistemi TDx: 56 laboratori
- HPLC: 54 laboratori

Metodi d'analisi: Micofenolato

proposti in letteratura

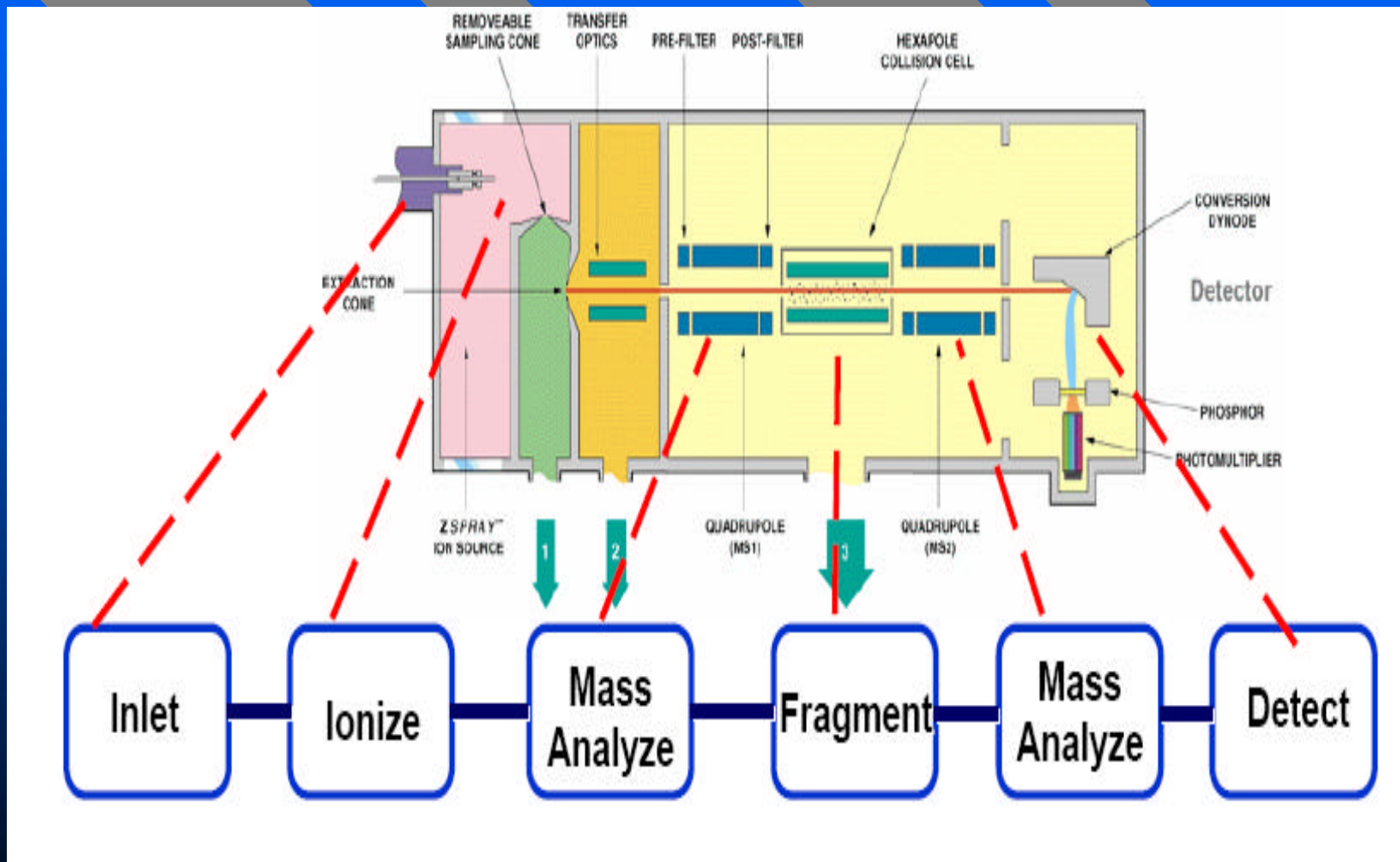
- EMIT-Dade (Siemens Healthcare Diagnostics)
- HPLC-UV
- HPLC-MS-MS.

Determinazione del Tacrolimus

Metodo HPLC-MS-MS

- HPLC a gradiente
- Colonna a cartuccia Waters Mass Track TDM - C18 da 2.1x10mm.
- Temperatura della colonna 55C
- Fase Mobile A: soluzione acquosa di acetato di ammonio 2mM e acido formico 0.1%
- Fase Mobile B: soluzione in metanolo di acetato di ammonio 2mM e acido formico 0.1%
- Rivelatore: Quattro micro Tandem Mass in modalità Multiple Reaction Monitoring (MRM)
- Durata corsa cromatografica: 3 min

Schema del separatore di massa accoppiato



Determinazione del Tacrolimus

Prestazioni HPLC-MS-MS

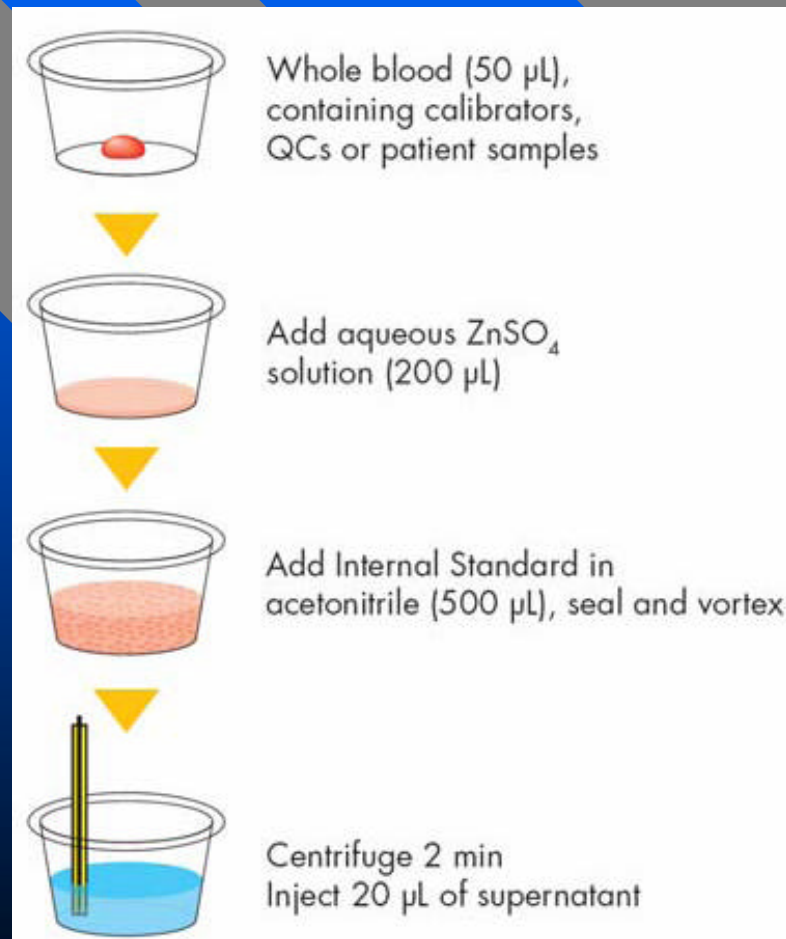
- Sensibilità Funzionale: **0.5 ng/ml** (minima concentrazione alla quale il CV% < 10%)
- Limite di Quantificazione: **0.38 ng/ml** (minima concentrazione alla quale il CV% < 15%, errore sistematico +3.3%, rapporto segnale/rumore > 5:1)
- Lineare fino a **32 ng/ml**
- Precisione CQ1 < 8%
- Precisione CQ2 < 5%
- Precisione CQ3 < 4%

Preparazione Standard e CQ

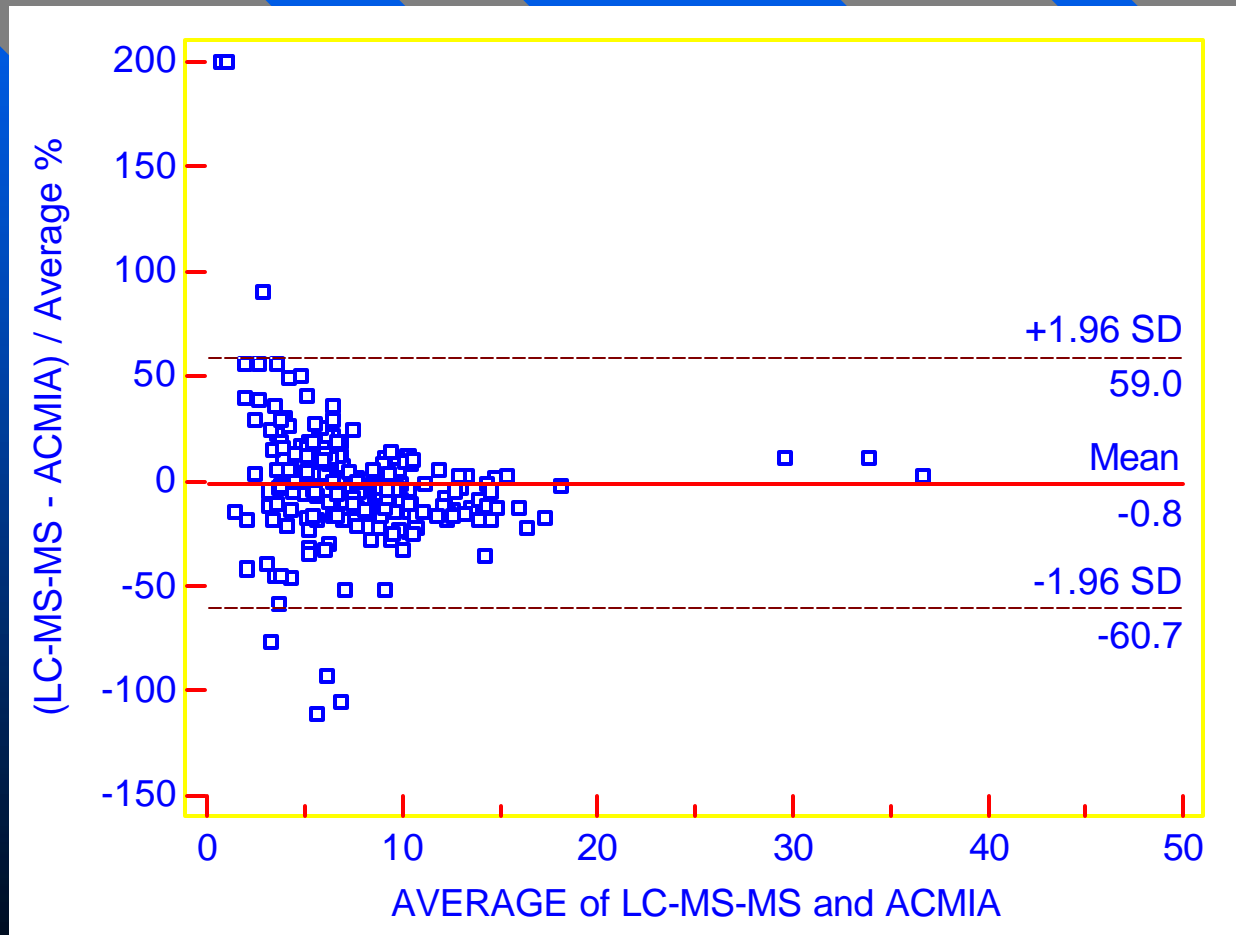
Sei livelli di calibrazione da 3 a 32 ng/ml
CQ1=2.2 ng/ml; CQ2=8.3 ng/ml; CQ3=22.4 ng/ml



Determinazione del Tacrolimus: preparazione del campione



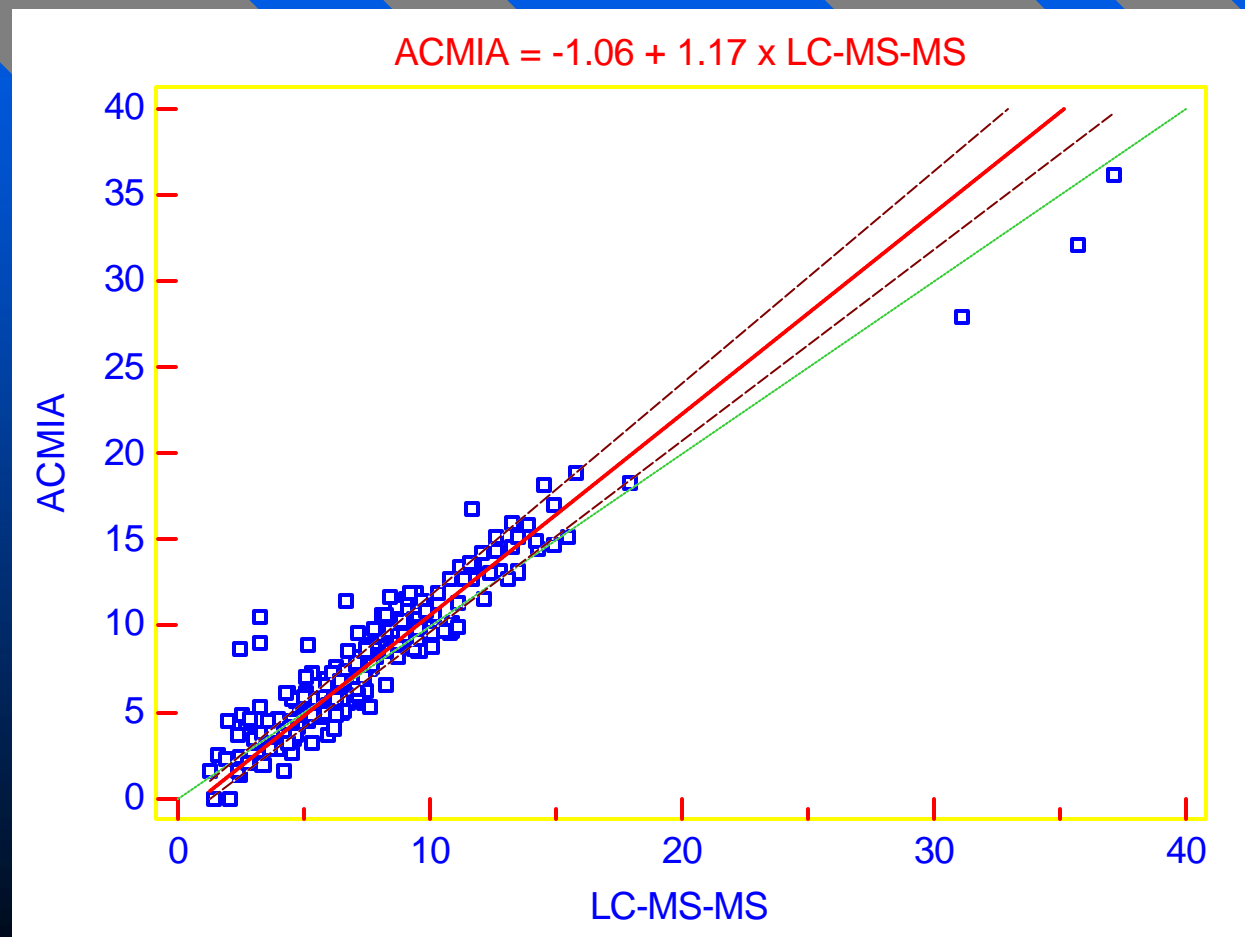
Determinazione del Tracrolimus ACMIA vs LC-MS-MS Rappresentazione Altman e Bland



Determinazione del Tracrolimus

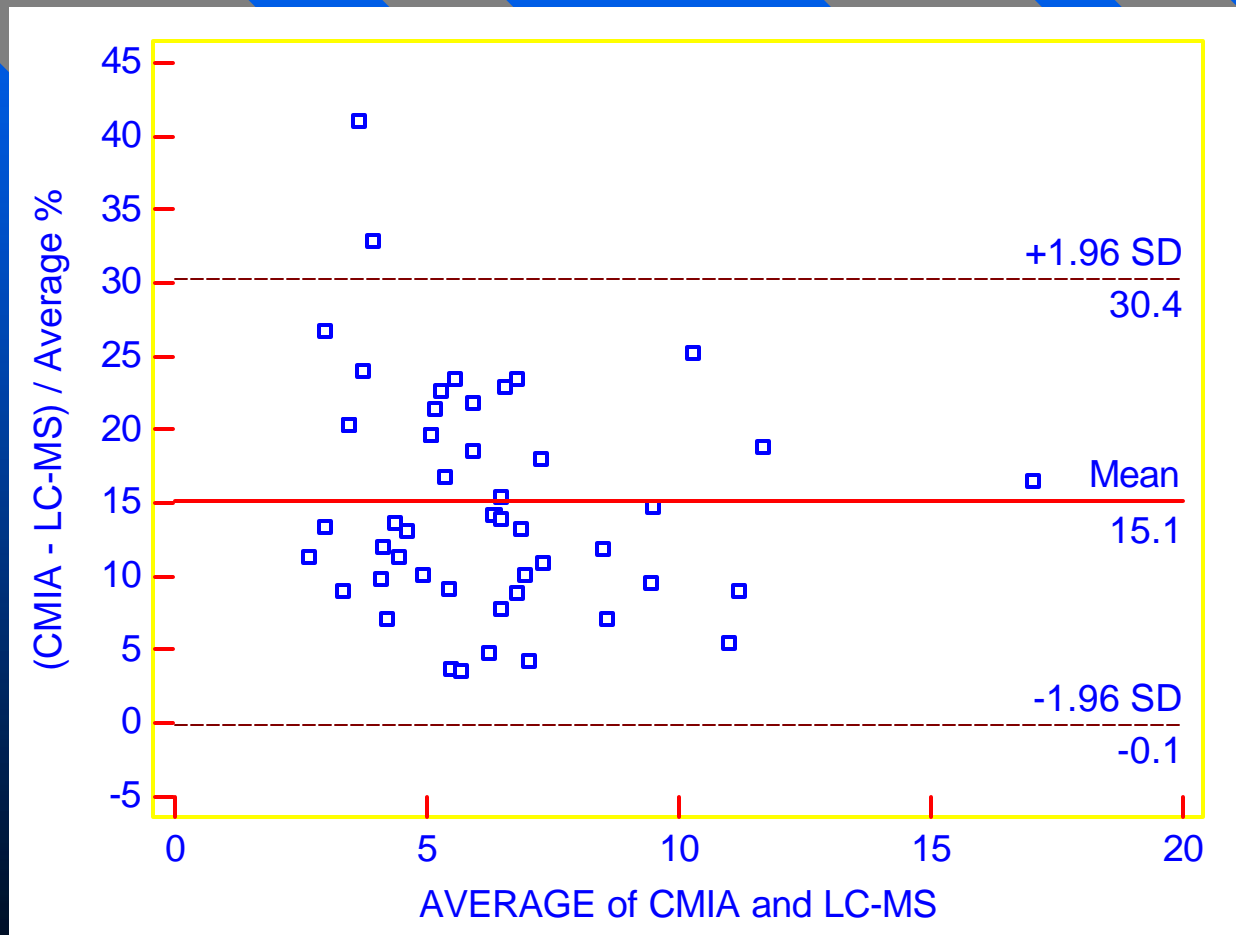
ACMIA vs LC-MS-MS

Correlazione Passing e Bablok



Campioni con interferenza riscontrata con il metodo ACMIA

Rappresentazione secondo Altman e Bland CMIA vs LC-MS-MS

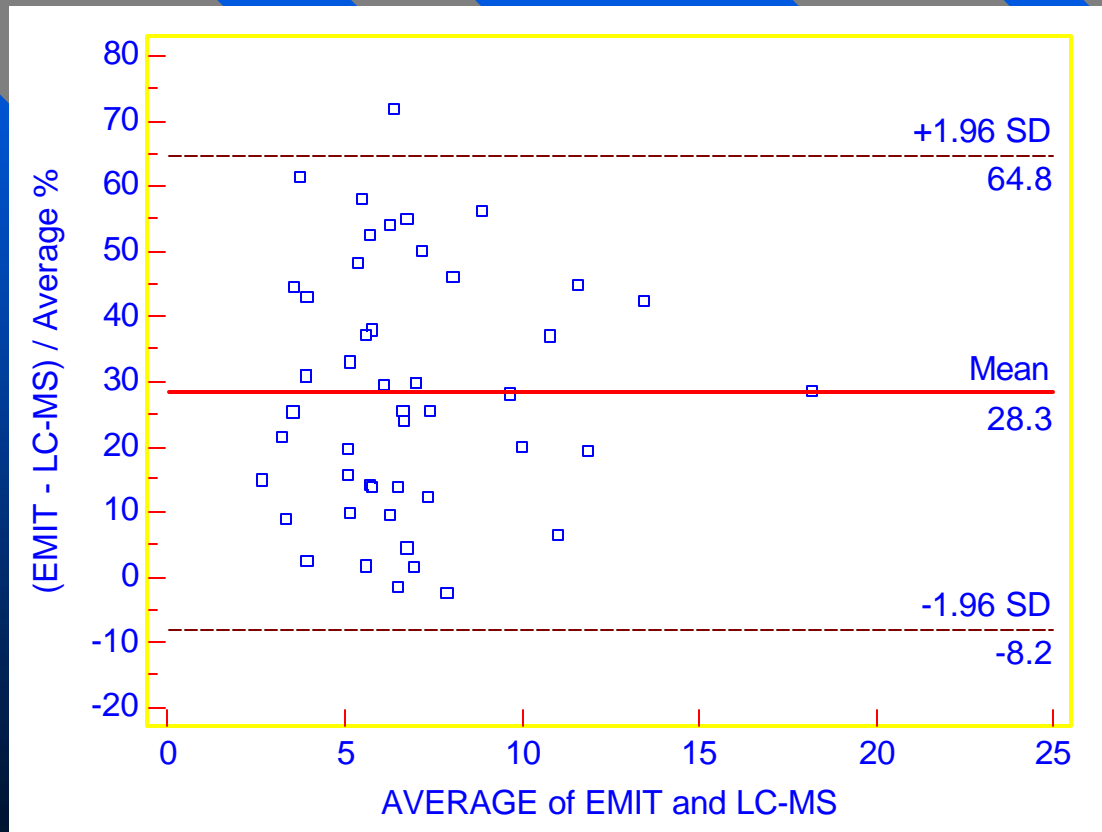


Campioni con interferenza riscontrata con il metodo

ACMIA

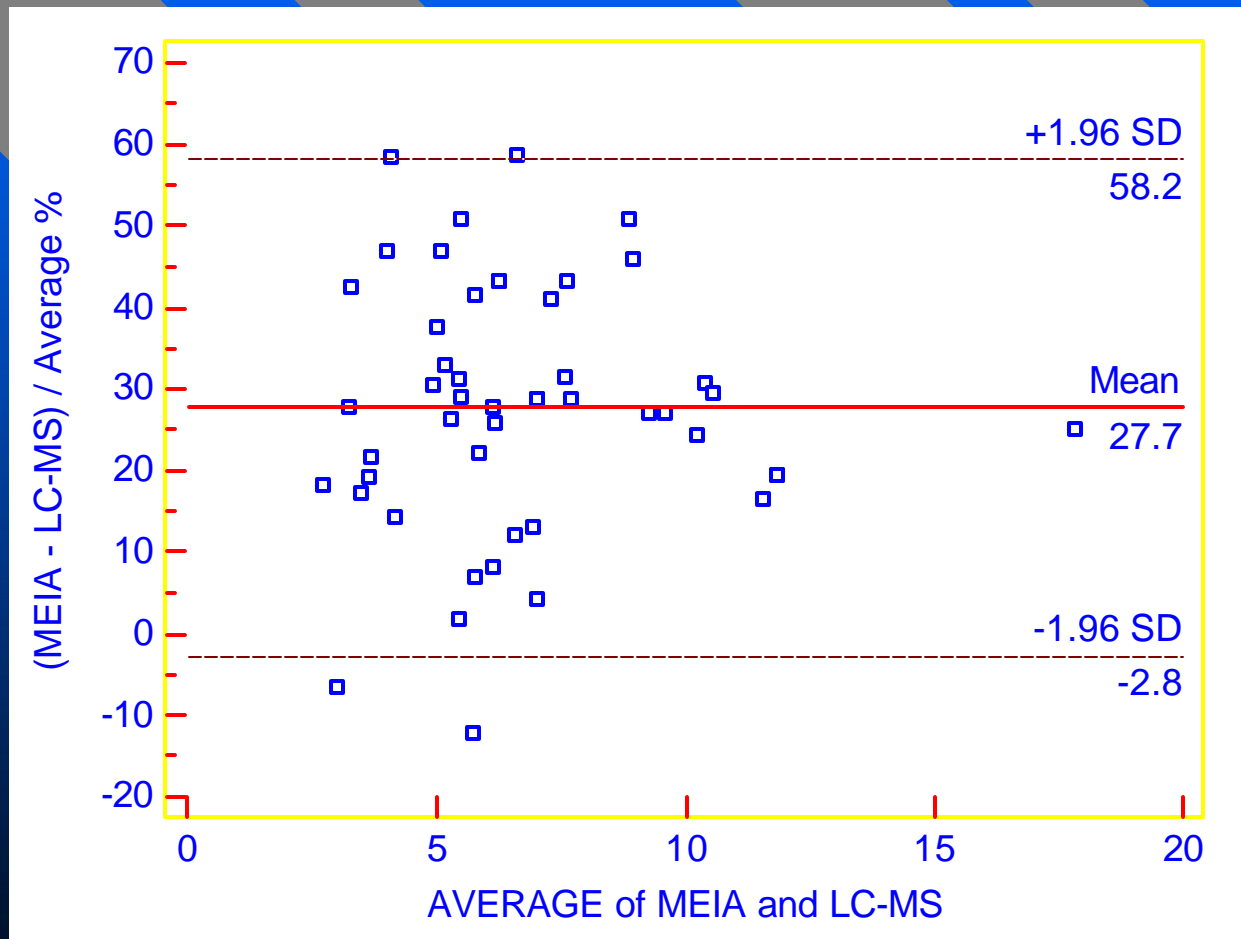
Rappresentazione secondo Altman e Bland

EMIT II vs LC-MS-MS



Campioni con interferenza riscontrata con il metodo ACMIA

Rappresentazione secondo Altman e Bland MEIA vs LC-MS-MS



Conclusioni 1

- Considerando il ristretto indice terapeutico dei farmaci immunosoppressori e l'impatto che potrebbe avere un errato monitoraggio delle concentrazioni del farmaco le metodiche immunoenzimatiche andrebbero utilizzate con cautela nella pratica clinica.

Conclusioni 2

- Intraprendere un maggior dialogo bidirezionale tra laboratorio e reparto per aumentare la consapevolezza dell'eventuale inadeguatezza del dato analitico imputabile alla variabilità preanalitica, analitica o a variabili antropomorfe.

Conclusioni 3

- Possibilità di introdurre in routine la tecnologia HPLC-MS-MS valutando:
- Robustezza
- Produttività
- Impatto organizzativo per l'impiego nei giorni feriali e festivi