

## Confronto tra metodo FPIA (“fluorescent polarized immunoassay”) e metodo CEDIA (“cloned enzyme donor immunoassay”) per la determinazione della ciclosporina A

Antonio Colatutto, Laura De Luca, Luca Isola, Nadia Pradal, Rodolfo Zaglia, Alice Lerussi, Barbara Marcon, Pierguido Sala

Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Maria della Misericordia, Udine

### ABSTRACT

**Comparison between FPIA and CEDIA techniques for cyclosporine A determination.** Cyclosporin A (CsA) is a powerful immunosuppressant agent characterized by a narrow therapeutic range. Therefore, therapeutic drug monitoring is a crucial step for CsA treatment. Even if HPLC has been considered the standard technique for CsA determination, immunometric methods have replaced HPLC in clinical laboratory. The purpose of this study is to compare CEDIA and FPIA methods for CsA measurement. We assayed 97 whole blood samples, collected with K<sub>2</sub>EDTA as anticoagulant, from patients undergoing immunosuppressive therapy based on CsA. We found a good correlation between methods, but significant systematic and proportional biases, which denote a lack of result comparability.

### INTRODUZIONE

La ciclosporina A (CsA) è un peptide fungino dotato di potente attività immunosoppressiva, che viene ampiamente utilizzato anche per la terapia di numerose affezioni autoimmuni (1-5). L'importanza e la frequenza degli effetti collaterali del farmaco ed il ristretto intervallo terapeutico condizionano però l'operatività dei clinici, per cui il monitoraggio delle concentrazioni ematiche è essenziale per l'ottimizzazione della terapia con CsA (6). La tecnica di riferimento per la determinazione della CsA è rappresentata dal HPLC che rimane tuttavia un metodo che, per la relativa complessità tecnica abbinata alla necessità di un'indagine procedurale preparativa del campione, richiede personale specificatamente formato e non è pertanto praticabile in tutti i laboratori clinici (7-9). Questi problemi pratici hanno indotto a valutare come possibile alternativa per la determinazione della CsA metodiche immunochimiche, quali RIA, ACMIA (“antibody conjugated magnetic immunoassay”), EMIT (“enzyme multiplied immunoassay technique”), FPIA (“fluorescent polarized immunoassay”), CLIA (“chemoluminescent immunoassay”) e CEDIA (“cloned enzyme donor immunoassay”) (10-13). La metodica CEDIA suscita particolare interesse poiché la fase preanalitica risulta estremamente ridotta e potrebbe rendere questa tecnica praticabile efficacemente anche in regime d'urgenza. Lo scopo del nostro studio è stato quello di confrontare due tecniche immunochimiche, la consolidata metodica FPIA e la più rapida metodica CEDIA, per il dosaggio della CsA in soggetti sottoposti a terapia immunosoppressiva cronica.

### MATERIALI E METODI

Il dosaggio della CsA è stato eseguito su campioni di

sangue intero prelevati in provette contenenti K<sub>2</sub>EDTA a 97 pazienti afferenti al Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio del nostro ospedale. I campioni sono stati suddivisi in due aliquote, di cui una è stata analizzata con metodo FPIA su strumentazione TDx/FLx (Abbott Diagnostics), mentre la seconda aliquota, ottenuta dalla parte residua del campione prelevato a scopo diagnostico e resa opportunamente anonima, è stata immediatamente congelata a -20 °C e analizzata dopo 15 giorni con metodo CEDIA su strumentazione ILAB 650 (Instrumentation Laboratory). Il foglietto illustrativo del metodo riporta una stabilità di 30 giorni del campione conservato a -20 °C.

Il metodo FPIA per la determinazione della CsA è un immunodosaggio competitivo in cui un antigene marcato con fluoresceina, presente nel reagente, compete con la CsA del campione per l'anticorpo monoclonale utilizzato. Il complesso tra l'antigene marcato e l'anticorpo, a causa delle sue dimensioni, determina un aumento di emissione della luce polarizzata. L'intervallo analitico del sistema TDx/FLx è di 25-1500 µg/L. Prima dell'analisi, che il sistema svolge in completa automazione, è necessario pretrattare il campione con un procedimento articolato in diverse fasi: addizione di una soluzione precipitante, aggiunta di una soluzione permeabilizzante, agitazione con vortex, centrifugazione a 10.000 rpm per 5 min e trasferimento del surnatante nella cuvetta che sarà in seguito posta nello strumento.

Il metodo CEDIA è un immunodosaggio enzimatico omogeneo che si avvale della tecnologia del DNA ricombinante. Il dosaggio è basato sull'enzima batterico β-galattosidasi, geneticamente suddiviso in due frammenti inattivi, che solo riassociandosi formano un enzima attivo in grado di scindere il substrato, dando luogo ad una variazione cromatica misurabile spettrofotometricamente. La quantità di enzima attivo formata, e la variazione di

assorbanza risultante, sono direttamente proporzionali alla quantità di analita presente nel campione. Per il metodo CEDIA è stato utilizzato il kit CEDIA Cyclosporine Plus (Microgenics) applicato allo strumento ILAB 650. I campioni, i controlli e gli standard sono stati trattati con soluzione lisante in rapporto 1:5 (100 µL di campione sono stati addizionati a 400 µL di lisante), agitati mediante vortex e quindi analizzati. Per la calibrazione si sono costruite due curve, la prima per l'intervallo basso (25-450 µg/L), usando due calibratori rispettivamente di 23,2 µg/L e 422,8 µg/L, e la seconda per l'intervallo alto (450-2000 µg/L), usando calibratori di 472,2 µg/L e 2057 µg/L di CsA. Sono stati usati i materiali di controllo "Immunosuppressants Whole Blood Control" (Chromsystems) alla concentrazione di 104 µg/L, 258 µg/L, 653 µg/L e 1337 µg/L. Il limite di rilevabilità del metodo CEDIA è 25 µg/L.

I risultati di CsA ottenuti con i due metodi sono stati confrontati statisticamente utilizzando il metodo di regressione lineare e le differenze riscontrate tra i metodi sono state riportate su un grafico di Bland-Altman.

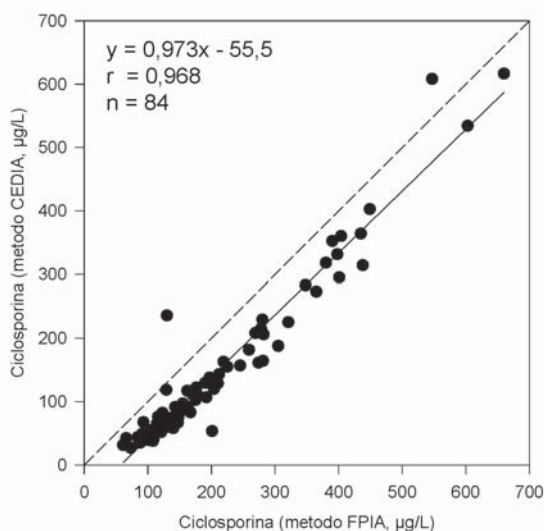
## RISULTATI

Dei 97 campioni analizzati, 13 mostravano concentrazioni di CsA inferiori al limite di rilevabilità di almeno uno dei metodi. Gli 84 risultati validi di CsA erano compresi nell'intervallo 25-660 µg/L con il metodo FPIA e nell'intervallo 25-608 µg/L con il metodo CEDIA. La correlazione tra i due metodi valutati ha mostrato un buon grado di associazione ( $r=0,968$ ), anche se tra i due metodi non si rileva un grado di accordo elevato, in quanto la retta di regressione lineare mostra una pendenza di 0,973 ed una intercetta di -55,5 µg/L (Figura 1). Appare evidente la differenza tra risultati ottenuti con metodo CEDIA e

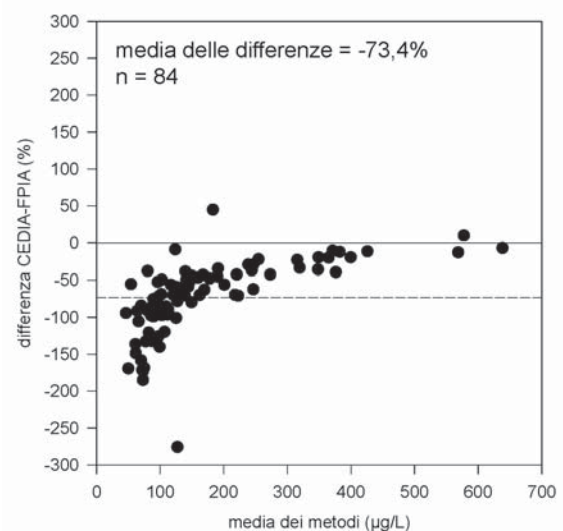
metodo FPIA, che risulta statisticamente significativa ( $P < 0,0001$ ). Il grafico delle differenze percentuali tra i metodi conferma tale marcata differenza, con una tendenza a dipendere dalle concentrazioni del farmaco (Figura 2).

## DISCUSSIONE

La terapia immunosoppressiva ha contribuito con successo all'affermarsi della pratica dei trapianti d'organo e alla terapia di molte patologie su base autoimmune. Nell'ambito della terapia antirigetto dei trapianti, la CsA ha assunto a partire dagli anni '80 un ruolo preminente tra gli immunosoppressori, oltre ad essere il capostipite di una serie di molecole, come il tacrolimus ed il sirolimus, che sono oggi ampiamente utilizzate nella pratica clinica. Gli schemi terapeutici che utilizzano la CsA sono attuati con dosaggi che variano in relazione al tipo e al "timing" del trapianto, e lo stesso approccio specialistico è seguito per la terapia delle patologie autoimmuni. Il rischio di un sovradosaggio con danni irreparabili principalmente alla funzionalità renale o di un sottodosaggio con possibilità di rigetto sono condizioni evitabili solamente se la terapia viene guidata attuando il monitoraggio terapeutico (14,15). Il metodo HPLC è attualmente considerato il metodo di riferimento perchè consente non solo il dosaggio della CsA, ma anche la determinazione e la definizione dei suoi principali metaboliti, quali AM9, AM1 e AM4N (16,17). Purtroppo per la complessità della fase preanalitica e per il tempo necessario all'espletamento dell'analisi cromatografica, il metodo HPLC non è alla portata di ogni laboratorio. Proprio per questi motivi sono stati sviluppati e immessi sul mercato metodi immunochimici alternativi al HPLC. Ognuno di questi metodi



**Figura 1**  
Regressione lineare dei risultati di ciclosporina A determinati con i metodi FPIA e CEDIA. La linea tratteggiata rappresenta la retta di identità ( $y=x$ ).



**Figura 2**  
Grafico delle differenze percentuali tra i risultati di ciclosporina A determinati con il metodo CEDIA e con il metodo FPIA. La linea tratteggiata rappresenta la media delle differenze percentuali rilevate.

presenta caratteristiche analitiche differenti, ma tutti permettono di automatizzare e velocizzare in maniera più o meno significativa la determinazione della CsA, rendendola più praticabile in ogni tipo di realtà (18,19).

Recentemente è stato introdotto un saggio per la determinazione della CsA in CEDIA sul sistema ILAB 650, la cui caratteristica più rilevante è l'estrema semplificazione della fase preparativa. Dal confronto eseguito con il metodo FPIA in uso nel nostro laboratorio si è tuttavia evidenziata una marcata differenza nei risultati ottenuti, nonostante entrambi i produttori dichiarino i metodi in grado di rilevare anche i metaboliti della CsA. Si può ipotizzare che la metodica CEDIA sia in grado di determinare un differente numero di metaboliti rispetto a FPIA o, in alternativa, va presa in considerazione l'ipotesi di una degradazione del farmaco durante la conservazione dei campioni a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La differente specificità dei metodi è sicuramente la prima ipotesi da considerare, ma per definire quali metaboliti siano presenti nei campioni e se possano essere la causa della discrepanza fra i due metodi sarebbe necessario analizzare i campioni in HPLC. Per quanto concerne invece l'ipotesi di una degradazione della CsA nei campioni congelati, abbiamo voluto verificare quanto affermato in termini di stabilità della molecola determinando nuovamente con metodica FPIA 20 dei campioni già analizzati a fresco, dopo 5 mesi di conservazione dei campioni a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Il confronto fra i risultati non ha dimostrato differenze significative fra i campioni freschi e quelli analizzati dopo un ciclo di congelamento e scongelamento.

## BIBLIOGRAFIA

1. Fathman C, Myers B. Cyclosporine therapy for autoimmune disease. *N Engl J Med* 1992;326:1693-5.
2. Meyrier A. Use of cyclosporine in the treatment of idiopathic nephrotic syndrome in adults. *Contrib Nephrol* 1995;114:28-48.
3. Koo J. Cyclosporine in dermatology. *Arch Dermatol* 1995;131:842-5.
4. Iwatsuki S, Starzl TE, Todo S. Experience in 1000 liver transplants under cyclosporine-steroid therapy: a survival report. *Transplant Proc* 1988;20:498-504.
5. De Smet M, Nussenblatt R. Clinical use of cyclosporine in ocular disease. *Int Ophthalmol Clin* 1993;33:31-45.
6. Warrens AN, Waters JB, Salama AD, et al. Improving the therapeutic monitoring of cyclosporin A. *Clin Transplantation* 1999;13:193-200.
7. Niederberger W, Shaub P, Beveridge T. High-performance liquid chromatographic determination of cyclosporin A in human plasma and urine. *J Chromatogr* 1980;182:454-8.
8. Lensmeyer GL, Fields BL. Improved liquid-chromatographic determination of cyclosporine with concomitant detection of cell bound metabolite. *Clin Chem* 1985;31:196-201.
9. Shah AK, Sawchuk RJ. Improved liquid-chromatographic determination of cyclosporine and its metabolites in blood. *Clin Chem* 1988;34:1467-71.
10. Safarcik K, Brozmanova H, Bartos V, et al. Evaluation and comparison of whole blood levels of cyclosporin A and its metabolites in renal transplantation by HPLC and RIA methods. *Clin Chim Acta* 2001;310:165-71.
11. Wacke R, Drewlow B, Hehl EM, et al. Measurement of cyclosporin A in whole blood by RIA, EMIT and FPIA: a comparative study. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1992;30:502-3.
12. Wallemacq PE, Kathy A. Evaluation of the new AxSYM cyclosporine assay: comparison with TDx monoclonal whole blood and EMIT cyclosporine assay. *Clin Chem* 1999;45:432-5.
13. Huet E, Morand K, Blanchet B, et al. Evaluation of the new heterogeneous ACMA immunoassay for the determination of whole-blood cyclosporine concentrations in bone marrow, kidney, heart, and liver transplant recipients. *Transpl Proc* 2004;36:1317-20.
14. Dumont Rj, Ensom MH. Methods for clinical monitoring of cyclosporin in transplant patients. *Clin Pharmacokinet* 2000;38:427-47.
15. Clae CM, Mahalati K, Kiberd BA. Adequate early cyclosporin exposure is critical to prevent renal allograft rejection: patients monitored by absorption profiling. *Am J Transplant* 2002;2:789-95.
16. Kahn GC, Shaw LM, Kane MD. Routine monitoring of cyclosporin in whole blood and in kidney tissue using high performance liquid chromatography. *Anal Toxicol* 1986;10:28-36.
17. Brozmanova H, Grundmann M, Safarcik K, et al. High-performance liquid chromatography method for therapeutic drug monitoring of cyclosporin A and its two metabolites in renal transplant patients. *J Chromatogr B* 2000;749:93-100.
18. Armijo JA, De Cos MA. Parent cyclosporin in whole blood by FPIA and EMIT after kidney, heart and liver transplantation. *Clin Biochem* 1994;27:498-501.
19. Woo J. Therapeutic monitoring of cyclosporine. *Ann Clin Lab Sci* 1994;24:60-8.