

Valutazione di una nuova applicazione strumentale per la determinazione della ciclosporina con metodica CEDIA

Giovanni Cangiano¹, Maria Russo¹, Francesco Forte¹, Elvira Di Maina¹, Annachiara Latte¹, Antonino Sessa², Maurizio D'Amora³, Andrea Risitano¹

¹Laboratorio Patologia Clinica e ²U.O. Nefrologia, Ospedale dei Pellegrini, ASL Napoli 1, Napoli

³Laboratorio Patologia Clinica, Ospedale degli Incurabili, ASL Napoli 1, Napoli

ABSTRACT

Evaluation of a new instrumental application for cyclosporine determination by CEDIA technology. The CEDIA method used for cyclosporine determination in our laboratory is based on two different system applications for low (25-450 µg/L) and high (450-2000 µg/L) range of analyte, respectively. In this paper, we suggest that on the Olympus AU400 analyzer the CEDIA assay should be modified to reach in a single application the analytical range of 75-1000 µg/L, really convenient for clinical purposes, enabling the determination of cyclosporine concentrations both before administration (basal value) and two hours later (peak value) in a single run.

INTRODUZIONE

La ciclosporina (CsA) è un polipeptide ciclico di 11 aminoacidi prodotto come metabolita dal fungo *Beauveria nivea* (1). La CsA sopprime in parte l'immunità umorale, ma è più efficace contro meccanismi immunitari dipendenti dalle cellule T, come quelli relativi al rigetto dei trapianti, e in alcune forme di autoimmunità (2-4). La misurazione delle concentrazioni di CsA nel sangue intero rappresenta il criterio più efficace per assicurare un'adeguata terapia immunosoppressiva e ridurre al minimo gli effetti collaterali nei pazienti sottoposti a trapianto d'organo (5,6).

Nel nostro laboratorio la concentrazione ematica della CsA viene determinata con un immunodosaggio che applica la tecnologia dell'enzima donatore clonato con la tecnica del DNA ricombinante (CEDIA, Cloned Enzyme Donor ImmunoAssay) ed è eseguito sull'analizzatore Olympus AU400. Questo metodo utilizza due differenti applicazioni strumentali per la determinazione della CsA: un'analisi a basso intervallo di concentrazione (25-450 µg/L), adeguata per monitorare il mantenimento della terapia (concentrazione basale), ed un'analisi ad elevato intervallo di concentrazione (450-2000 µg/L), efficace per la determinazione della CsA dopo due ore dall'assunzione orale (concentrazione di picco). Lo studio di Morris et al. (5), assieme all'esigenza di una rapida valutazione del dato del monitoraggio farmacologico, agli elevati costi del kit immunoenzimatico e alla necessità di una migliore organizzazione lavorativa, hanno stimolato il nostro laboratorio a mettere a punto un'unica metodica per questo dosaggio CEDIA con un intervallo dinamico di 75-1000 µg/L, efficace per determinare contemporaneamente sulla stessa curva di calibrazione sia le basse concentrazioni basali che le elevate concentrazioni rilevabili al picco.

MATERIALI E METODI

Lo studio ha impiegato campioni provenienti da un gruppo di 20 pazienti sottoposti a trapianto di rene (tempo trascorso dall'intervento di trapianto, 8-10 anni) ed in terapia con CsA alla posologia di 3-5 mg/Kg/die presso il Day Hospital Trapiantati dell'U.O. Nefrologia dell'Ospedale dei Pellegrini dell'ASL Napoli 1. Il dosaggio ematico della CsA è stato eseguito su campioni residui di sangue intero, anticoagulato con K₃EDTA, prelevato per il monitoraggio terapeutico del farmaco immunosoppressore e resi opportunamente anonimi.

Il metodo utilizzato è stato il kit CEDIA Cyclosporine Plus (Microgenics) applicato al sistema analitico AU400 (Olympus Diagnostics), che utilizza due differenti applicazioni strumentali, una utile per un basso intervallo di concentrazione della CsA (intervallo analitico dell'applicazione 25-450 µg/L: CICLO LOW), l'altra, invece, efficace per intervalli terapeutici più elevati (intervallo analitico dell'applicazione 450-2000 µg/L: CICLO HIGH) (6,7). In questo sistema analitico i campioni di sangue intero ed i calibratori vengono trattati con una soluzione lisante in rapporto 1:5 (generalmente 100 µL di campione o calibratore e 400 µL di lisante). E' necessario attendere circa 15 min per la stabilizzazione della miscela prima di effettuare la determinazione del farmaco.

Nell'applicazione da noi proposta e valutata, l'analizzatore preleva 195 µL di reattivo R1 (soluzione costituita da anticorpi monoclonali anti-CsA ed enzima accettore del metodo CEDIA, tampone acido 3-N-morfolino propansulfonico e detergente) e li miscela con 10 µL di lisato. Dopo una incubazione di 10 cicli macchina, alla temperatura di 37 °C, vengono campionati 100 µL di reattivo R2 (soluzione di lavoro costituita dall'enzima donatore del metodo CEDIA coniugato con CsA, rosso di clorofenolo, β-D-galattopiranoside e sali tampone). La variazione dell'assorbanza/min, rilevata a 570 nm, si effettua

cicli macchina di lettura 24 e 27 dall'immissione del reattivo R2. La curva di calibrazione multipunto, di tipo "spline" a 4 punti, viene estrapolata dal software strumentale utilizzando 4 livelli di multicalibratore alle concentrazioni di 0, 147, 441 e 994 $\mu\text{g/L}$. L'utilizzo di 10 μL di lisato emoglobinico consente il dosaggio di CsA fino a 1000 $\mu\text{g/L}$. In rari casi sono rilevate concentrazioni di CsA >1000 $\mu\text{g/L}$, esclusivamente in pazienti testati nei giorni immediatamente successivi al trapianto. In questo caso viene dosato un nuovo campione, a concentrazione C_m , costituito mescolando in rapporto volume a volume il campione ematico prelevato al tempo zero (C_0) e quello prelevato alla seconda ora (C_2). La concentrazione di CsA rilevata è quindi calcolata con la seguente relazione:

$$C_2 = (2 \times C_m) - C_0$$

Il metodo CEDIA così modificato offre il vantaggio di mantenere una calibrazione a soli 4 punti. Si parte, infatti, da un punto di calibrazione a concentrazione di CsA equivalente a 0 $\mu\text{g/L}$, costituito da una soluzione di albumina bovina. Il secondo punto a concentrazione di 147 $\mu\text{g/L}$ di CsA si ricava diluendo 1:3 con l'albumina bovina il calibratore di 441 $\mu\text{g/L}$, utilizzato immodificato come terzo punto della curva di calibrazione. L'ultimo punto della curva è costituito da un campione alla concentrazione di 994 $\mu\text{g/L}$ di CsA, ottenuto diluendo 1:2 con albumina bovina il calibratore del kit a concentrazione di 1998 $\mu\text{g/L}$.

Il metodo CEDIA è stato correlato al metodo in HPLC. Le determinazioni sono state effettuate in HPLC con detector UV su un sistema isocratico a fase inversa (Chromat 3, Bio-Rad) in colonna Supelco-sil LC1 (50 x 4,5 mm, 5 μm) utilizzando campioni di sangue trattati con la procedura di Svinarov e Dimova (8,9). La corsa cromatografica avveniva alla temperatura di 72 °C e la

lettura degli eluati alla lunghezza d'onda di 214 nm. Le prove di imprecisione nella serie (n=20) e tra le serie (2 campioni per 10 sedute analitiche) sono state eseguite su 3 campioni a diversa concentrazione di CsA. Il profilo di imprecisione è stato ottenuto determinando per 6 volte campioni di sangue alle seguenti concentrazioni di CsA: 73,5, 100, 147, 294, 663 e 950 $\mu\text{g/L}$. Le prove di recupero sono state eseguite misurando in triplicato 6 campioni di sangue ottenuti aggiungendo quantità crescenti di CsA ad un campione di sangue intero privo di farmaco.

RISULTATI

Dallo studio condotto si evidenzia che al tempo 0 (T_0) la concentrazione ematica di CsA è ≥ 75 $\mu\text{g/L}$ in 18 pazienti su 20 e si mantiene sempre <160 $\mu\text{g/L}$ (Figura 1). Due ore dopo l'assunzione del farmaco (T_2) raggiunge concentrazioni comprese tra 325 e 670 $\mu\text{g/L}$ in 18 pazienti su 20, senza segni clinici di nefrotossicità, mentre nei casi 5 e 18 rimane <200 $\mu\text{g/L}$ senza alcun sintomo di rigetto. Questi risultati sono sovrapponibili a quelli pubblicati nel 2003 (10).

Nella Figura 2 è rappresentato il profilo di imprecisione della nuova applicazione da noi approntata: nell'intervallo analitico compreso tra 100 e 1000 $\mu\text{g/L}$ si evidenzia un CV sempre <5%, ma per concentrazioni inferiori il CV aumenta significativamente. Le prove di imprecisione nella serie e tra le serie mostravano CV <5% (Tabella 1).

Nella Tabella 2 sono riportati i risultati delle prove di recupero compresi tra 90,1 e 97,6% (recupero medio 95,9%).

Il metodo immunoenzimatico CEDIA con le modifiche da noi proposte confrontato con il metodo in HPLC ha evidenziato una buona correlazione ($y = 1,078x - 20,8$; $r^2 = 0,9981$, $n = 7$).

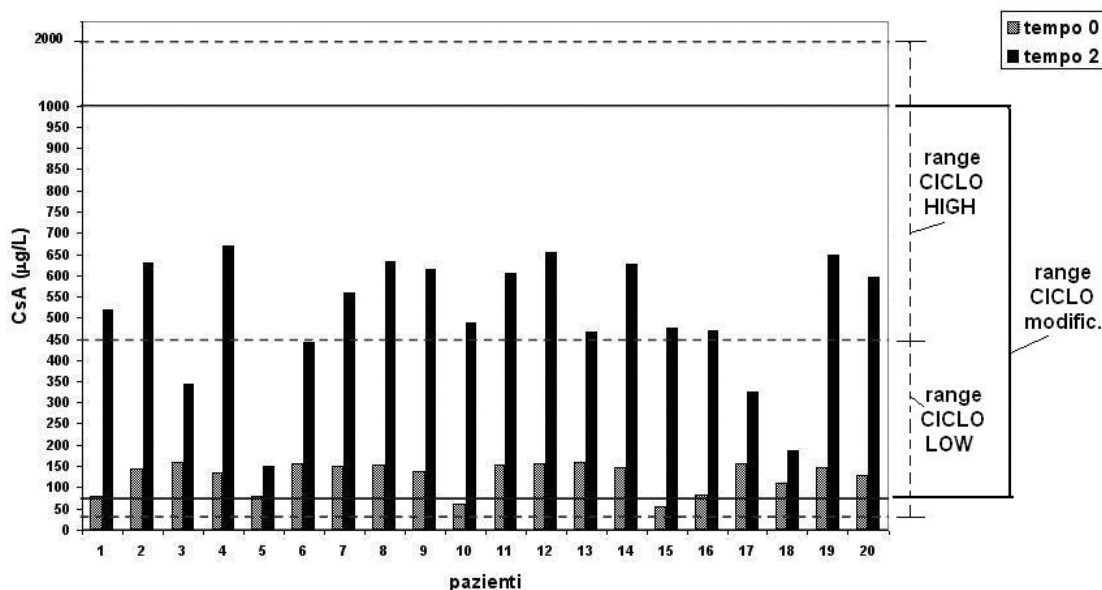


Figura 1

Concentrazioni di ciclosporina (CsA) rilevate al tempo zero e dopo 2 ore su un gruppo di 20 pazienti trapiantati di rene, confrontate con gli intervalli analitici del ciclo LOW, del ciclo HIGH e dell'applicazione proposta (ciclo modificato) per il metodo CEDIA su analizzatore Olympus AU400.

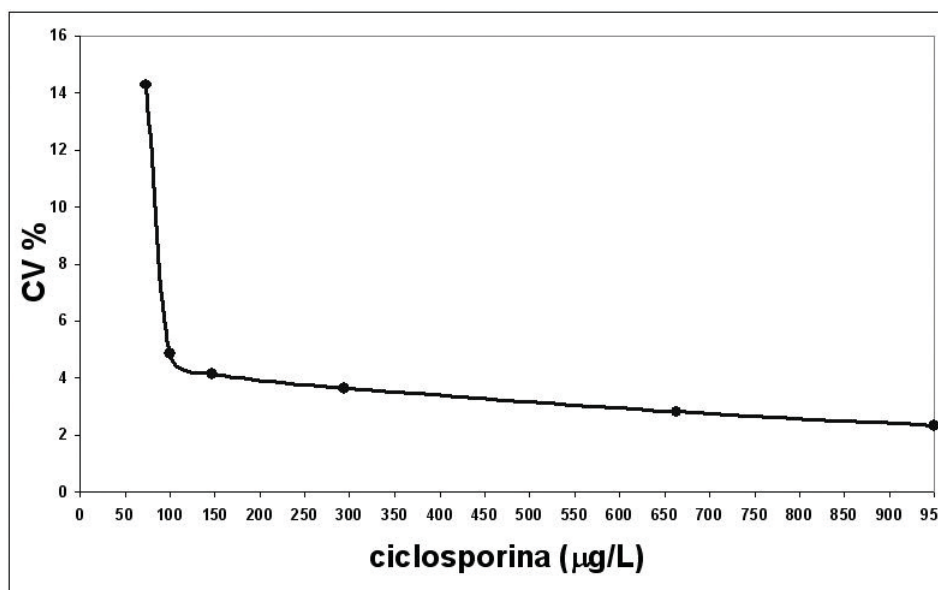


Figura 2

Profilo di imprecisione della determinazione della ciclosporina (CsA) con metodo CEDIA (ciclo modificato).

Tabella 1

Risultati delle prove di imprecisione

Nella serie			Tra le serie		
Media, µg/L	DS, µg/L	CV, %	Media, µg/L	DS, µg/L	CV, %
197,9	7,74	3,91	198,1	9,67	4,88
397,3	13,2	3,32	398,1	16,4	4,11
794,1	21,4	2,69	795,3	28,1	3,53

Tabella 2

Prove di recupero

Valore atteso, µg/L	Valore trovato, µg/L	Recupero, %
72	65	90,1
100	92	92,0
147	138	93,9
294	280	95,2
663	647	97,6
959	904	94,2

DISCUSSIONE

Le motivazioni che ci hanno indotto a ricercare una nuova applicazione per il metodo CEDIA meritano un'analisi approfondita. Il primo obiettivo era di arrivare ad una rapida esecuzione del dosaggio della CsA e degli altri parametri ematobiochimici finalizzata ad una tempestiva ed ottimale valutazione del paziente trapiantato; inoltre, i costi abbastanza elevati del kit e la stabilità limitata dei materiali liofilici dopo la ricostituzione rendevano antieconomico l'uso contemporaneo di due kit di ciclosporina (con relativa doppia calibrazione) per assicurare i dosaggi basali e di picco; ancora, la notevole difficoltà

nel passare da una metodica all'altra sullo strumento, procedura che deve essere eseguita a strumentazione ferma, era una condizione difficilmente realizzabile durante la mattinata lavorativa per l'utilizzo continuativo del sistema Olympus AU400.

L'applicazione da noi proposta del dosaggio CEDIA della CsA su analizzatore Olympus AU 400 prevede l'utilizzo di un'unica metodica lineare fino a 1000 µg/L. Rispetto al metodo originale della ditta Microgenics, che prevede due differenti applicazioni e quindi due diverse calibrazioni, capaci di evidenziare intervalli di concentrazione della CsA bassi, corrispondenti alle concentrazioni terapeutiche basali, e alti, tipici dei valori di concentrazione al picco due ore dopo l'assunzione, il metodo proposto necessita della preparazione di alcuni calibratori intermedi e mostra un intervallo analitico compreso tra 75-1000 µg/L. La nuova metodica a quattro punti di calibrazione mantiene gli stessi volumi di primo e secondo reagente dell'applicazione originale e, rispetto a quest'ultima, presenta un volume di lisato emoglobinico di 10 µL, anziché di 4 µL. Questa procedura evita il passaggio da una metodica all'altra eseguibile solamente a strumentazione ferma, permettendo così la riduzione dei costi, dei tempi di dosaggio ed il suo contemporaneo utilizzo con le altre metodiche biochimiche eseguite sull'analizzatore.

BIBLIOGRAFIA

1. Krensky AM, Vincenti F, Bennett WM. Immunomodulatori: farmaci immunosoppressori, tollerogeni e immunostimolanti. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A, eds. Le basi farmacologiche della terapia. X ed. Milano: McGraw-Hill Italia, 2005;1405-32.
2. Kahan BD. Cyclosporine. N Engl J Med 1989;321:1725-38.
3. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporine A and FK506. Immunol Today 1992;13:136-42.

4. Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B, et al. Lake Louise consensus conference on cyclosporin monitoring in organ transplantation: report of the Consensus Panel. *Ther Drug Monit* 1995;17:642-54.
5. Morris RG, Russ GR, Cervieeli MJ, et al. Comparison of trough, 2-hour, and limited AUC blood sampling for monitoring cyclosporin Neoral® at day 7 post-renal transplantation and incidence of rejection in the first month. *Ther Drug Monit* 2002;24:479-85.
6. Loo R, Pope L, Boyd R, et al. Monitoring cyclosporine of pre-dose and post-dose samples using nonextraction homogeneous immunoassay. *Ther Drug Monit* 2004;26:58-67.
7. Butch AW, Fukuchi AM. Analytical performance of the CEDIA cyclosporine PLUS whole blood immunoassay. *J Anal Toxicol* 2004;28:204-10.
8. Svinarov D, Dimova M. Liquid chromatographic determination of cyclosporine A in whole blood, with Chromosorb P columns used for sample purification. *J Liq Chromatogr* 1991;14:1683-90.
9. Schutz E, Svinarov D, Shipkova M, et al. Cyclosporin whole blood immunoassays (AxSYM, CEDIA, and Emit): a critical overview of performance characteristics and comparison with HPLC. *Clin Chem* 1998;44:2158-64.
10. Risitano A, Forte F, Di Maina E, et al. Il monitoraggio della ciclosporina nel paziente trapiantato in rapporto a marcatori d'infiammazione di funzionalità renale. *Patologo Clinico* 2003;287-92.