

Arbeitsanleitung / Manual

**Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /
For professional use only**

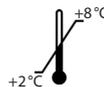
IDK[®] Immunosuppressants LC-MS/MS Kit

***Zur in-vitro-Bestimmung von
vier Immunsuppressiva in Vollblut***

***For the in vitro determination of
four immunosuppressants in whole blood***

Gültig ab / Valid from 2023-12-12

REF KM9100



IVD

CE



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Sicherheitshinweise

Der Assay ist ausschließlich nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen. Wichtige Sicherheitshinweise zu diesem Produkt sind dem Kapitel 11 zu entnehmen.

Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG	2
2. EINLEITUNG	2
3. MITGELIEFERTE MATERIALIEN	4
4. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)	4
5. VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN	5
<i>Kalibratoren und Kontrollen</i>	5
<i>Fällungsreagenz</i>	5
<i>Mobile Phase A und B</i>	6
<i>Autosampler Waschlösung</i>	6
<i>Mischlösung</i>	6
6. HALTBARKEIT, STABILITÄT UND VORBEREITUNG DER PROBE	7
7. LC-MS/MS METHODE	7
8. MUSTERCHROMATOGRAMME	8
9. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Ergebnisse der LC-MS/MS und Referenzwerte</i>	9
10. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Wiederholbarkeit - intra-day Präzision</i>	10
<i>Reproduzierbarkeit - inter-day Präzision</i>	10
<i>Messbereich mit Quantifizierungsgrenze (LOQ)</i>	10
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
12. ENTSORGUNG	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	12
16. SYMBOLE	13

1. ZWECKBESTIMMUNG

Der Verwendungszweck dieses Kits ist die Unterstützung der therapeutischen Arzneimittelüberwachung (TDM) vier immunsuppressiver Medikamente (Cyclosporin A, Everolimus, Sirolimus und Tacrolimus). Die Bestimmung der Medikamentenspiegel erfolgt durch Quantifizierung der Immunsuppressiva im Vollblut mittels automatisierter quantitativer LC-MS/MS-Assay-Technologie. Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch im Labor bestimmt.

2. EINLEITUNG

Die therapeutische Arzneimittelüberwachung (TDM) basiert auf der Annahme, dass es eine Beziehung zwischen der Blutkonzentration und der klinischen Wirkung (therapeutische Verbesserung und unerwünschte Wirkungen) gibt. Außerdem wird angenommen, dass es einen Konzentrationsbereich des Arzneimittels gibt, das "therapeutische Fenster", welches durch maximale Wirksamkeit und maximale Sicherheit gekennzeichnet ist [1]. Der vorliegende Immundiagnostik LC-MS/MS Assay zu Messung von vier verschiedenen Immunsuppressiva aus Vollblut ermöglicht durch die quantitative Bestimmung der Analyten deren Titer Überwachung und ermöglicht so eine individuelle Dosis-Einstellung der Medikamentierung.

Patienten, die eine Organtransplantation (SOT) oder eine Stammzelltransplantation (SCT) erhalten, benötigen immunsuppressive Medikamente, um die Immunreaktion des Patienten auf das Transplantat zu unterdrücken und eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern. Ziel der Immunsuppression ist es, eine spenderspezifische Toleranz für das Transplantat zu erzeugen, ohne die Abwehrkräfte des Patienten zu beeinträchtigen oder seine Anfälligkeit für Infektionen zu erhöhen. Die am häufigsten verschriebenen Immunsuppressiva sind die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin und Tacrolimus sowie die mTOR-Inhibitoren Sirolimus und Everolimus. Diese Immunsuppressiva werden zur Prophylaxe und Behandlung der Transplantatabstoßung nach SOT (Niere, Lunge, Herz und Leber) und SCT eingesetzt [5, 6].

Bei Cyclosporin, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus ist die klinische Variabilität auf die pharmakokinetische Variabilität zwischen und innerhalb des Patienten zurückzuführen. Diese pharmakokinetische Variabilität in Kombination mit einer ausgezeichneten Korrelation zwischen Blutkonzentrationen und Wirksamkeit/Toxizität der Behandlung und dem engen therapeutischen Bereich der Immunsuppressiva, macht die Überwachung der Blutkonzentrationen zu einem entscheidenden Bestandteil der Behandlung. Der therapeutische Bereich für jedes Immunsuppressivum hängt von der Zeit nach der Transplantation, der begleitenden immunsuppressiven Medikation und dem immunologischen Risiko ab [7].

TDM zur Optimierung der immunsuppressiven Behandlung und zur Minimierung der arzneimittelbedingten Toxizität gehört daher sowohl im klinischen als auch im ambulanten Bereich zur Standardversorgung und das entsprechende TDM wird in den Zusammenfassungen der Produktmerkmale (SPC) von Cyclosporin, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus empfohlen [8-11]. Darüber hinaus wurde eine Reihe von Konsensdokumenten zum TDM von Immunsuppressiva verfasst, um Apotheker und Kliniker bei der Individualisierung der Behandlung zu unterstützen [3, 12].

Neben der Standardüberwachung der Arzneimittelkonzentrationen wird eine zusätzliche Überwachung empfohlen, um sicherzustellen, dass eine angemessene systemische Arzneimittelexposition im Falle eines klinischen Behandlungsversagens (Auftreten einer akuten Abstoßungsepisode), einer Dosisanpassung oder Änderung des immunsuppressiven Regimes, eines Wechsels der (generischen) Formulierung des Immunsuppressivums, bei Verdacht auf Probleme mit der Resorption des Arzneimittels, bei unerwünschten Ereignissen, Wechselwirkungen zwischen Arzneimitteln, bei relevanten Komorbiditäten und bei Verdacht auf Non-Adhärenz aufrechterhalten wird [3-8, 13].

Der Immundiagnostik LC-MS/MS-Assay zur Messung von Immunsuppressiva umfasst Cyclosporin, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus. Für alle diese Medikamente basieren die Referenzkonzentrationen auf der Literatur. Eine Übersicht über die Zielkonzentrationen findet sich in mehreren Artikeln sowie in den Fachinformationen von Cyclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus [3-9, 14-18].

Zusammenfassend erfüllen Immunsuppressiva die Voraussetzungen für TDM, da sie ein enges therapeutisches Fenster, eine hohe intra- und interindividuelle pharmakokinetische Variabilität und eine etablierte Expositions-Wirkungs-Beziehung aufweisen. Das TDM von Immunsuppressiva wird für den optimalen Einsatz dieser Medikamente in der klinischen Praxis empfohlen, wie in den Fachinformationen dieser Medikamente sowie in mehreren internationalen Leitlinien und Konsensdokumenten angegeben.

3. MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM9100	AUTOWASH	Autosampler Waschlösung	1 x 1 000 ml
	CAL1–6	Kalibratoren 1–6, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 Fläschchen (à 250 µl) pro Konzentration
	CTRL1–3	Kontrollen 1–3, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	3 Fläschchen (à 250 µl) pro Konzentration
	PREC	Fällungsreagenz (enthält den internen Standard)	3 x 55 ml
	MOPHAA	Laufmittel A	1 x 500 ml
	MOPHAB	Laufmittel B	1 x 250 ml
	MIXSOL	Mischlösung	3 x 25 ml

Bitte verwenden Sie für Nachbestellungen von Einzelkomponenten als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung ohne Leerzeichen.

4. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)

Folgendes Zubehör wird für die IDK® Immunsuppressiva LC-MS/MS Applikation benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Zentrifuge, 10 000 g
- Vortex-Mixer
- Standard-Labor-Einmalreaktionsgefäße aus Kunststoff (z. B. 1,5 ml)
- LC-MS/MS-Anlage und passende LC-MS Probenvials
- Reinstwasser*

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

Folgendes Zubehör kann separat für die IDK® Immunsuppressiva LC-MS/MS Applikation bei der Immundiagnostik AG bestellt werden:

- HPLC Säule (KM9100SP)
- alle Einzelkomponenten

Bitte kontaktieren Sie uns für Ihre individuelle Lösung und fordern Sie unsere Einzelkomponenten-Preisliste an.

5. VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN

Hinweis: Bitte nehmen Sie die Kit-Komponenten sofort nach Erhalt aus der Transportverpackung und beachten Sie die auf den Produktetiketten aufgedruckten Hinweise zu den Lagerbedingungen.

Alle Komponenten sollten lichtgeschützt, trocken und bei der angegebenen Lagertemperatur gelagert werden. Die so gelagerten Testreagenzien sind bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar. Die angegebenen Stabilitäten gelten nur, wenn keine bakterielle Kontamination vorliegt.

Kalibratoren und Kontrollen

Handhabung:

Entfernen Sie die Kappe und den Gummistopfen stets vorsichtig (um Verluste des Inhalts zu vermeiden).

Rekonstituieren Sie die Kalibratoren und Kontrollen wie folgt:

- Rekonstituieren Sie jeden CAL und jede CTRL mit genau 250 µl destilliertem oder deionisiertem Wasser und inkubieren Sie diese 15 min bei Raumtemperatur.
- Die Komponente anschließend gründlich mischen, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Trockenmaterial aufgelöst hat; dabei nicht zu stark schütteln, um Schaumbildung zu vermeiden.
- Die angesetzte Komponente während des Testverfahrens wie eine Patientenprobe handhaben.

Stabilität und Lagerung:

Vor der Rekonstitution: 2–8 °C Bis zu dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum.

nach der Rekonstitution: -20 °C 4 Wochen

Fällungsreagenz

Handhabung:

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Die Komponente kann nach dem ersten Öffnen bis zu 3 Wochen verwendet werden.

Mobile Phase A und B

Handhabung:

Die Komponente ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Die Komponente kann verschlossen bis zu 6 Wochen nach dem ersten Öffnen oder bis zu 2 Wochen auf der UHPLC verwendet werden.

Lagerung bei RT Vor dem ersten Öffnen kann die Komponente für 3 Monate bei Raumtemperatur gelagert werden.

Autosampler Waschlösung

Handhabung:

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Die Komponente kann verschlossen bis zu 6 Wochen nach dem ersten Öffnen oder bis zu 2 Wochen auf der UHPLC verwendet werden.

Mischlösung

Handhabung:

Die Komponente ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Die Komponente kann nach dem ersten Öffnen bis zu 6 Wochen auf der UHPLC verwendet werden.

6. HALTBARKEIT, STABILITÄT UND VORBEREITUNG DER PROBE

Interferenzen und Einschränkungen

Visuelle Anzeichen von Lipämie, Homolyse oder Ikterus (Hyperbilirubinämie) und/oder ein höheres Alter der Probe können die Leistung beeinträchtigen.

Stabilität und Lagerung:

Als Probe eignet sich Vollblut (EDTA- und Heparinröhrchen).

Wiederholte Auftau- und Einfrierzyklen sind zu vermeiden.

Proben können gelagert werden: 3 Monate bei -20°C

Probenvorbereitung

	1,5 ml Reaktionsgefäß	96-Well-Platte
1.	50 µl Probe, CAL or CTRL in eine Kavität bzw. ein Reaktionsgefäß vorlegen.	
2.	200 µl MIXSOL hinzugeben.	
3.	Reaktionsgefäß für mind. 30s vortexen.	Platte mind. 15 min schütteln lassen.
4.	500 µl PREC hinzugeben.	
5.	Reaktionsgefäß für mind. 30s vortexen	Platte mind. 15 min schütteln lassen.
6.	Zentrifugation bei mind. 10 000 g für 5 min.	
7.	Den Überstand (aus Schritt 6.) in ein geeignetes LC-MS-Probenvial oder 96-Well-Platte für den LC-MS-Autosampler überführen.	
8.	Injektion in das LC-MS/MS System (siehe Application Note).	

7. LC-MS/MS METHODE

Die Parameter zur Einstellung der LC-MS/MS-Methode entnehmen Sie bitte der Application Note oder wenden Sie sich an lcms@immundiagnostik.com.

8. MUSTERCHROMATOGRAMME

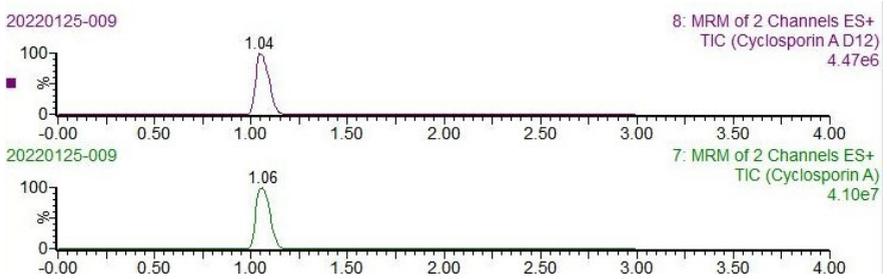


Abb. 1: Chromatogramm (mit einer Waters UHPLC I-Class und LC-MS/MS system Xevo TQ5 aufgenommen) für den internen Standard (oben) und den Analyten (unten) von Cyclosporin A.

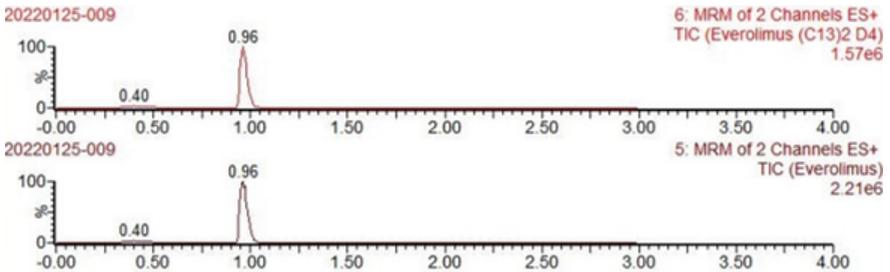


Abb. 2: Chromatogramm (mit einer Waters UHPLC I-Class und LC-MS/MS system Xevo TQ5 aufgenommen) für den internen Standard (oben) und den Analyten (unten) von Everolimus.

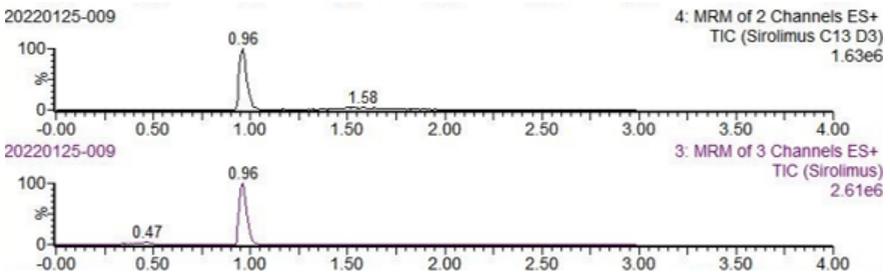


Abb. 3: Chromatogramm (mit einer Waters UHPLC I-Class und LC-MS/MS system Xevo TQ5 aufgenommen) für den internen Standard (oben) und den Analyten (unten) von Sirolimus.

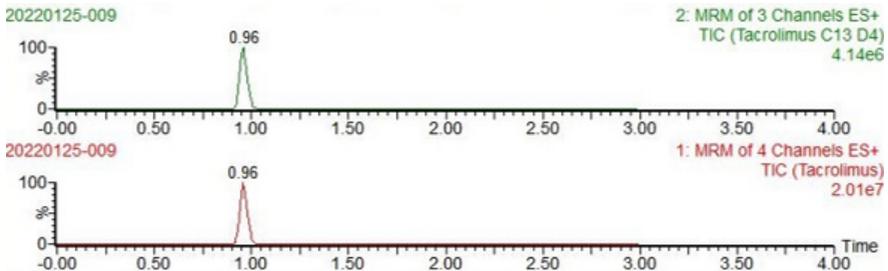


Abb. 4: Chromatogramm (mit einer Waters UHPLC I-Class und LC-MS/MS system Xevo TQS aufgenommen) für den internen Standard (oben) und den Analyten (unten) von Tacrolimus.

9. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen werden verwendet, um die Genauigkeit der Methode zu bestätigen. Liegen einer oder mehrere Werte der Qualitätskontrolle außerhalb des angegebenen Bereiches (siehe Produktspezifikation), kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Testergebnisse nicht gewährleisten.

Ergebnisse der LC-MS/MS und Referenzwerte

Der Test liefert einen bestimmten Wert für den Analyten, der immer mit entsprechenden Referenzwerten verglichen werden muss, um ihn für den jeweiligen Patienten zu interpretieren.

Da die gemessenen Substanzen im menschlichen Körper nicht natürlich vorkommen, können keine klassischen Referenzwerte wie bei endogenen Substanzen herangezogen werden. Für pharmazeutische Substanzen gelten andere Werte, wie z.B. Normaldosierung, Obergrenze und Toxizität. Da diese Informationen (patienten-)spezifisch und technischer Natur sind, verweist die Immundiagnostik AG auf das medizinische Fachpersonal, unter dessen Aufsicht die Tests durchgeführt werden [1-4].

Wenden Sie sich für die Interpretation der Ergebnisse immer an eine ausgebildete medizinische Fachkraft, die über Fachwissen auf dem Gebiet verfügt, für das dieser Test entwickelt wurde.

Die Interpretation der Ergebnisse dieses Tests hängt auch wesentlich von den individuellen Merkmalen des betreffenden Patienten ab. Die Immundiagnostik AG empfiehlt, auch diese Angaben zu berücksichtigen.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Wiederholbarkeit - intra-day Präzision

Probe	CV		
	Kontrolle 1 [%]	Kalibrator 6 [%]	Patientenprobe [%]
Cylosporin A	2,0	2,1	1,7
Everolimus	5,1	1,8	3,8
Sirolimus	5,5	2,2	3,2
Tacrolimus	3,8	1,3	1,9

Reproduzierbarkeit - inter-day Präzision

Probe	CV		
	Kontrolle 1 [%]	Kalibrator 6 [%]	Patientenprobe [%]
Cylosporin A	4,6	4,9	5,0
Everolimus	6,5	5,2	7,9
Sirolimus	5,3	4,3	5,5
Tacrolimus	3,6	5,9	4,4

Messbereich mit Quantifizierungsgrenze (LOQ)

Analyt	µg/l (mmol/l)
Cylosporin A	< 20–2 500 (< 16,6–2 078,8)
Everolimus	< 1,4–195 (< 1,5–203,5)
Sirolimus	< 1,5–190 (< 1,6–207,8)
Tacrolimus	< 1,4–200 (< 1,7–248,8)

11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV1/2-, HBV- und HCV-Antikörper, Hepatitis B-Oberflächenantigen, HIV1- und HCV-RNA, HBV-DNA (NAT) getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.

- Es sind die auf den Einzelkomponenten angegebenen GHS-Symbole und Spezifikationen der Sicherheitsdatenblätter (auf Anfrage bei Immundiagnostik AG erhältlich) zu beachten. Beim Arbeiten mit diesen Reagenzien sind die gesetzlichen Schutzvorkehrungen einzuhalten.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.

12. ENTSORGUNG

Autosmapler Waschlösung (AUTOWASH), Laufmittel A (MOPHAA), Laufmittel B (MOPHAB), Fällungsreagenz (PREC) und Mischlösung (MIXSOL) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

Die Kalibratoren (CAL1–6) und Kontrollen (CTRL1–3) sollten als potentiell infektiöses Material gemäß der örtlichen Vorschriften entsorgt werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Die Einzelkomponenten des Kits sind maximal für die angegebene Anzahl an Testdurchführungen ausgelegt. Ein bereits verwendeter Anteil der Komponenten darf nicht wiederverwendet werden.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- IDK® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnostik verwendet werden.

- Für die Qualitätskontrolle sind die für Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.
- Sollten eine oder mehrere Komponenten des Testkits beschädigt, unvollständig (siehe Liste der Testbestandteile) oder Präzipitate in den gebrauchsfertigen Lösungen sichtbar sein, kontaktieren Sie bitte Immundiagnostik AG.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. <https://tdm-monografie.org/ciclosporine/>
2. <https://tdm-monografie.org/everolimus/>
3. <https://tdm-monografie.org/sirolimus/>
4. <https://tdm-monografie.org/tacrolimus/>
5. Allison. Immunosuppressive Therapy in Transplantation. Nurs Clin North Am. 2016;51(1):107-20
6. Medication Guidelines for Solid Organ Transplants, BC Transplant Society, Canada 2021
7. Brunet et al. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus-Personalized Therapy: Second Consensus Report. Ther Drug Monit 2019;41(3):261-307
8. Summary of product characteristics Prograft Available via: <https://www.ema.europa.eu>

16. SYMBOLE

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmaderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	Herstellungskennung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

Manual
For professional use only

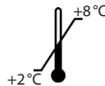
IDK[®] Immunosuppressants

LC-MS/MS Kit

*For the in vitro determination of
four immunosuppressants in whole blood*

Valid from 2023-12-12

REF **KM9100**



IVD

CE



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED PURPOSE	18
2. INTRODUCTION	18
3. MATERIALS PROVIDED	19
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	20
5. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS	20
<i>Calibrators and controls</i>	20
<i>Precipitation solution</i>	21
<i>Mobile phases A and B</i>	21
<i>Autosampler wash solution</i>	21
<i>Mixing solution</i>	22
6. STORAGE, STABILITY AND PREPARATION OF SAMPLE	22
7. LC-MS/MS METHOD	23
8. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS	23
9. QUALITY CONTROL	24
<i>Results from LC-MS/MS and reference values</i>	24
10. TEST CHARACTERISTICS	25
<i>Repeatability - intra-day precision</i>	25
<i>Reproducibility - inter-day precision</i>	25
<i>Measuring range with limit of quantification (LOQ)</i>	25
11. PRECAUTIONS	26
12. DISPOSAL	26
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST	27
15. REFERENCES	27
16. SYMBOL EXPLANATION	28

Safety information

The assay has to be performed exclusively according to the instructions for use enclosed with the kit. Important safety information for this product can be found in chapter 11.

1. INTENDED PURPOSE

The intended use of this device is to aid in the therapeutic drug monitoring (TDM) of four immunosuppressant medications (i.e. cyclosporin A, everolimus, sirolimus & tacrolimus) by the assessment of medicine levels by determination of these levels of immunosuppressants in whole blood, performed by automated quantitative LC-MS/MS assay technology conducted by laboratory professionals.

2. INTRODUCTION

Therapeutic drug monitoring (TDM) is based on the assumption that there is a relationship between blood concentration and clinical effect (therapeutic improvement and adverse effects). It is also assumed that there is a concentration range of the drug that is characterised by maximum efficacy and maximum safety, the "therapeutic window". The Immundiagnostik LC-MS/MS assay for the measurement of four different immunosuppressants from whole blood allows the monitoring of the titer of the analytes by their quantitative determination and thus enables an individual dose adjustment of the medication.

Patients who receive a organ transplantation (SOT) or a stem cell transplantation (SCT) require immunosuppressant drugs to suppress the patients' immune response to the transplant and prevent rejection of the transplant. The goal with immunosuppression is to induce donor specific tolerance for the transplant with minimal impairing of the patients' defenses or increasing the susceptibility to infections. The most common immunosuppressants prescribed are the calcineurine inhibitors cyclosporine and tacrolimus, and the mTOR inhibitors sirolimus and everolimus. These immunosuppressants are used for the prophylaxis and treatment of graft rejection following SOT (kidney, lung, hart, and liver) and SCT [5, 6].

With cyclosporine, tacrolimus, sirolimus and everolimus, clinical variability due to inter- and intra- patient pharmacokinetic variability is seen. This pharmacokinetic variability, in combination with an excellent correlation between blood concentrations and efficacy/toxicity of the treatment and the narrow therapeutic range of the immunosuppressive drugs, makes monitoring of blood concentrations a crucial part of the treatment. The therapeutic range for each immunosuppressant drug depends on post-transplant time, concomitant immunosuppressive medication and immunological risk [7].

TDM to optimize immunosuppressive treatment and minimizing drug-related toxicity is therefore standard care in the clinical setting as well as in the outpatient setting, and the corresponding TDM is advised in the summary of product characteristics (SPC) of cyclosporine, tacrolimus, sirolimus, and everolimus [8–11]. Furthermore, a number of consensus documents on TDM of immunosuppressive drugs have been written to assist pharmacists and clinicians to individualize the treatment [3, 12].

Besides standard monitoring of drug concentrations, extra monitoring is recommended to ensure that an appropriate systemic drug exposure is maintained in case of clinical treatment failure (the occurrence of an acute rejection episode), dose adjustments or changes in the immunosuppressive regimen, a switch in (generic) formulation of the immunosuppressive drug, suspected problems with the absorption of the drug, adverse events, drug-drug interactions, relevant comorbidities and if nonadherence is suspected [3–8, 13].

The Immundiagnostik LC-MS/MS assay for measuring immunosuppressive drugs includes cyclosporine, tacrolimus, sirolimus, and everolimus. For all these drugs, reference concentrations are based on literature and an overview of target concentrations can be found in several articles as well in the SPC of cyclosporin A, tacrolimus, sirolimus, and everolimus [3–9, 14–18].

In conclusion, immunosuppressive drugs fulfill the prerequisites for TDM, having a narrow therapeutic window, a high intra- and inter-individual pharmacokinetic variability, and an established exposure-response relationship. TDM of immunosuppressive drugs is recommended for optimal use of these drugs in clinical practice as stated in the SPC of these drugs as well as in several international guidelines and consensus documents.

3. MATERIALS PROVIDED

Cat. No.	Identifier	Kit components	Quantity
KM9100	AUTOWASH	Autosampler wash solution; ready to use	1 x 1 000 ml
	CAL1–6	Calibrators 1–6; lyophilised (see product specification for concentration)	2 vials (à 250 µl) per level
	CTRL1–3	Controls 1–3; lyophilised (see product specification for concentration)	3 vials (à 250 µl) per level
	PREC	Precipitation solution (contains internal standard)	3 x 55 ml
	MOPHAA	Mobile phase A	1 x 500 ml
	MOPHAB	Mobile phase B	1 x 500 ml
	MIXSOL	Mixing solution	3 x 25 ml

For reorders of single components, please use the catalogue number followed by the identifier without space as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

The following accessories are required for the IDK® Immunosuppressants LC-MS/MS application (not included in the kit):

- Ultrapure water*
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10–1 000 µl
- Centrifuge 10 000 g (at least)
- Vortex mixer
- Standard laboratory disposable plastic reagent tubes (e.g. 1.5 ml)
- LC-MS/MS system and LC-MS vials

*Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696/LC-MS grade), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

The following accessories for the IDK® Immunosuppressants LC-MS/MS application can be ordered separately at Immundiagnostik AG:

- UPLC column (KM9100SP)
- all single components

Please ask for our single component price list. Please contact us for customized inquiries.

5. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Note: Please unpack the kit components from the transport packaging immediately upon receipt and follow the instructions for storage conditions printed on the product labels. In general, all components should be stored protected from light, dry and at the specified storage temperature.

All components are for LC-MS/MS use only, components may also contain other ingredients than those listed as active ingredients below which might influence the measurement. All declared stabilities are only valid in case of no bacterial contamination.

Calibrators and controls

Handling:

Always remove the cap and rubber plug carefully (in order to avoid loss of content). Reconstitute the calibrators and controls as follows:

- Reconstitute each calibrator and control with exactly 250 µl distilled or deionised water and incubate for 15 min at room temperature.
- Next, mix the component thoroughly to make sure that all dry material has dissolved; do not shake too vigorously to avoid foam formation.
- Handle the prepared component as a patient sample during the test procedure.

Stability and storage:

Before reconstitution: 2–8 °C Until expiry date printed on the product label.

After reconstitution: -20 °C 4 weeks

*Precipitation solution***Handling:**

The components are liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C After first opening the component can be used for 3 weeks if closed and stored at 2–8 °C.

*Mobile phases A and B***Handling:**

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C After first opening the component can be used for 6 weeks if closed and stored at 2–8 °C or 6 weeks on the UHPLC.

Store at RT Before first opening the component can be stored for 3 months at room temperature.

*Autosampler wash solution***Handling:**

The components are liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C After first opening the component can be used for 6 weeks if closed and stored at 2–8 °C or 2 weeks on the UHPLC.

Mixing solution

Handling:

The components are liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C

After first opening the component can be used for 3 weeks if closed and stored at 2–8 °C.

6. STORAGE, STABILITY AND PREPARATION OF SAMPLE

Interferences & limitations

Visual evidence of lipemia, hemolysis or icterus (hyperbilirubinemia) and/or older age of the specimen may affect the performance.

Storage and stability

Use whole blood (EDTA- and Heparin-tubes).

Avoid freeze-thaw cycles.

Samples can be stored: 3 months at -20 °C.

Sample preparation

	1.5 ml reaction tube	96-well plate
1.	Pipet 50 µl sample, CAL or CTRL into one reaction tube respectively well.	
2.	Add 200 µl MIXSOL.	
3.	Vortex the tube for at least 30 s.	Shake the plate for 15 min.
4.	Add 500 µl PREC.	
5.	Vortex the tube for at least 30 s.	Shake the plate for 15 min.
6.	Centrifuge for 5 min at 10 000 g (or more).	
7.	Transfer the supernatant (step 6.) into a suitable LC-MS vial or 96-well plate for the LC-MS autosampler.	
8.	Injection in the LC-MS/MS (see application note).	

7. LC-MS/MS METHOD

Please refer to the application note or contact lcms@immundiagnostik.com for the LC-MS/MS method parameters.

8. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS

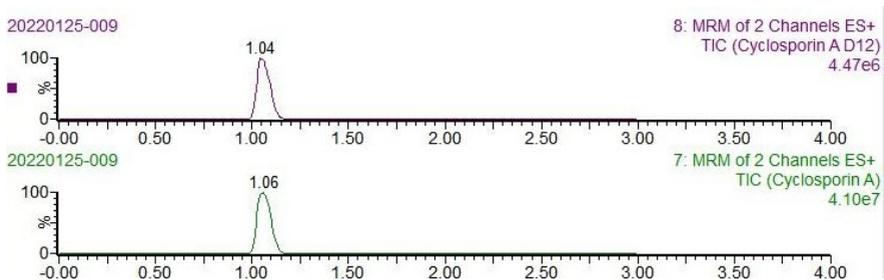


Fig. 1: Chromatogram (recorded with Waters UHPLC I-Class and the LC-MS/MS system Xevo TQS) for the internal standard (top) and analyte (bottom) of cyclosporin A.

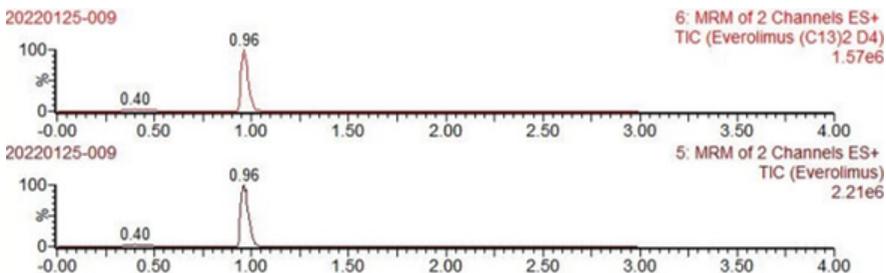


Fig. 2: Chromatogram (recorded with Waters UHPLC I-Class and the LC-MS/MS system Xevo TQS) for the internal standard (top) and analyte (bottom) of everolimus.

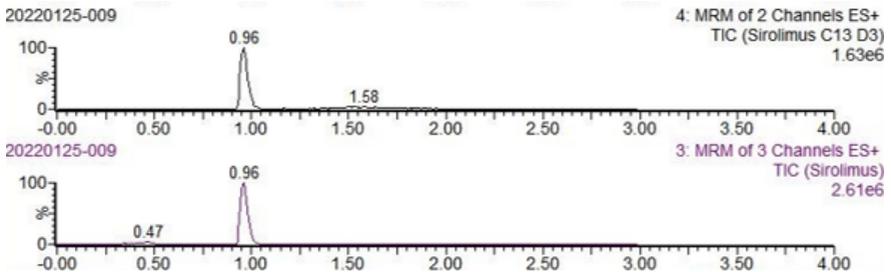


Fig. 3: Chromatogram (recorded with Waters UHPLC I-Class and the LC-MS/MS system Xevo TQS) for the internal standard (top) and analyte (bottom) of sirolimus.

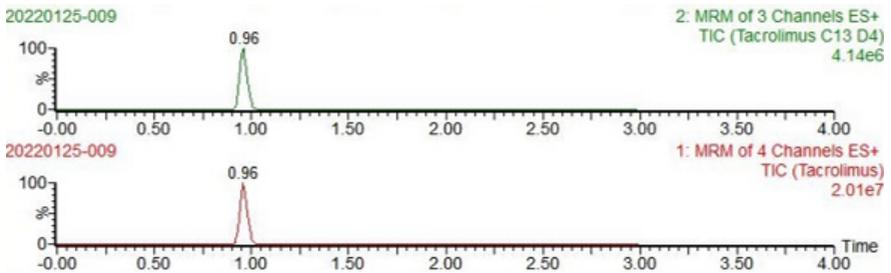


Fig. 4: Chromatogram (recorded with Waters UHPLC I-Class and the LC-MS/MS system Xevo TQS) for the internal standard (top) and analyte (bottom) of tacrolimus.

9. QUALITY CONTROL

Control samples should be analysed with each run. The results of the control samples are used to confirm the accuracy of the method. The test results may not be valid, if one or more values of the quality control sample are outside the acceptable range (see product specification).

Results from LC-MS/MS and reference values

The test gives a certain value for the measurand, which must always be compared with corresponding reference values in order to interpret it for the respective patient. Since the substances measured do not occur naturally in the human body, no classical reference values can be used as with endogenous substances. For pharmaceutical substances, other values apply, such as normal dosage, upper limit and toxicity. As this information is (patient) specific and technical in nature, the Immundiagnostik AG refers to the healthcare professional under whose supervision the tests are performed [1–4].

Always consult a trained medical professional with expertise in the field for which this kit is designed for the interpretation of results.

Interpretation of the results of this test also depends significantly on the individual characteristics of the patient involved. Immundiagnostik AG recommends taking these inputs into consideration as well.

10. TESTCHARACTERISTICS

Repeatability - intra-day precision

Sample	CV		
	Control 1 [%]	Calibrator 6 [%]	Patient sample [%]
Cylosporin A	2.0	2.1	1.7
Everolimus	5.1	1.8	3.8
Sirolimus	5.5	2.2	3.2
Tacrolimus	3.8	1.3	1.9

Reproducibility - inter-day precision

Sample	CV		
	Control 1 [%]	Calibrator 6 [%]	Patient sample [%]
Cylosporin A	4.6	4.9	5.0
Everolimus	6.5	5.2	7.9
Sirolimus	5.3	4.3	5.5
Tacrolimus	3.6	5.9	4.4

Measuring range with limit of quantification (LOQ)

Analyte	µg/l (mmol/l)
Cylosporin A	< 20–2 500 (< 16.6–2 078.8)
Everolimus	< 1.4–195 (< 1.5–203.5)
Sirolimus	< 1.5–190 (< 1.6–207.8)
Tacrolimus	< 1.4–200 (< 1.7–248.8)

11. PRECAUTIONS

- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV1/2-, HBV- and HCV-antibodies, Hepatitis B-surface antigen, HIV1- and HCV-RNA, HBV-DNA (NAT) Still, all kit components should be treated as potentially infectious.
- The GHS symbols indicated on the individual components and specifications of the material safety data sheets (available on request from Immundiagnostik AG) must be noted. When working with these reagents, the legal protective precautions must be adhered to.
- The test components contain organic solvents. Avoid contact with skin or mucous membranes.

12. DISPOSAL

Autosampler wash solution (AUTOWASH), mobile phase A (MOPHAA), mobile phase B (MOPHAB), precipitation solution (PREC) and mixing solution (MIXSOL) must be disposed as non-halogenated solvents.

Calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3) should be disposed as potentially infectious material in accordance with local regulations.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- Plugs and caps of different reagents should not be swapped.
- The individual components of the kit are designed for a maximum of the specified number of test runs. Any part of the components that has already been used must not be reused, but must be disposed of properly in accordance with local regulations.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- IDK® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.
- Please contact Immundiagnostik AG if one or more components of the kit are damaged, missing (see material supplied) or precipitates are visible in the ready-to-use solutions.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be sent to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

15. REFERENCES

1. <https://tdm-monografie.org/ciclosporine/>
2. <https://tdm-monografie.org/everolimus/>
3. <https://tdm-monografie.org/sirolimus/>
4. <https://tdm-monografie.org/tacrolimus/>
5. Allison. Immunosuppressive Therapy in Transplantation. Nurs Clin North Am. 2016;51(1):107-20
6. Medication Guidelines for Solid Organ Transplants, BC Transplant Society, Canada 2021
7. Brunet et al. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus-Personalized Therapy: Second Consensus Report. Ther Drug Monit 2019;41(3):261-307
8. Summary of product characteristics Prograft Available via: <https://www.ema.europa.eu>

16. SYMBOL EXPLANATION

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

