

DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

RECOMENDACIONES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE INMUNOSUPRESORES EN EL MONITOREO DE DROGAS TERAPEÚTICAS

ENERO, 2017

AUTOR

BQ. René Gómez Lagos.

Jefe Sección Química Clínica.

Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles.

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES INTERNOS

TM. Mitzzy Celis Morales.

Jefe Sección Coordinación de Redes de Laboratorios.

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Instituto de Salud Pública de Chile.

BQ. Hugo Moscoso Espinoza.

Jefe Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles.

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Instituto de Salud Pública de Chile.

Dra. Verónica Ramírez Muñoz.

Jefe Subdepartamento Coordinación Externa.

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Instituto de Salud Pública de Chile.

QF. María Alejandra Rodríguez.

Subdepartamento de Fármaco Vigilancia.

Departamento Agencia Nacional de Medicamentos.

Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES EXTERNOS

QF. Daniel Navea.

Jefe Laboratorio Bioquímica Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.

QF. Carolina Salas.

Jefe Laboratorio Clínico Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.

RECOMENDACIONES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE INMUNOSUPRESORES EN EL MONITOREO DE DROGAS TERAPEÚTICAS

INDICE DE CONTENIDOS

1.-RESUMEN	4
2.-ALCANCE	4
3.-INTRODUCCIÓN	4
4.-DESARROLLO	5
5.-RECOMENDACIONES GENERALES	7
5.1.- Recomendaciones para el manejo de muestras	7
5.2.- Recomendaciones sobre control de calidad	8
6.-METODOLOGÍAS ANALÍTICAS DISPONIBLES	9
6.1.- De referencia	9
6.2.- De inmunoensayo	10
7.-PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS INMUNOSUPRESORES Y RECOMENDACIONES PARA SU MONITOREO	12
7.1.- Ciclosporina A	12
7.2.- Tacrolimus	14
7.3.- Sirolimus	16
7.4.- Everolimus	17
7.5.- Micofenolato	19
8.- FIGURA N°1	21
9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1.- RESUMEN

Los fármacos inmunosupresores se caracterizan por poseer un estrecho rango terapéutico, además de presentar una gran variabilidad farmacocinética y farmacodinámica tanto intra como inter individual, por lo que la monitorización de sus concentraciones plasmáticas son la base para la dosificación. Por este motivo se requiere que el laboratorio clínico realice estos exámenes con un alto grado de precisión y exactitud.

El presente documento se elaboró para entregar algunas recomendaciones, tanto al equipo clínico tratante, como a los profesionales de laboratorio clínico que realizan o deseen realizar estos exámenes, teniendo en consideración diferentes aspectos técnicos.

2.- ALCANCE

En el presente documento se dan recomendaciones básicas a tener en cuenta por los laboratorios clínicos para la realización o implementación de los exámenes de determinación de niveles plasmáticos de fármacos inmunosupresores más frecuentemente utilizados en nuestro país, los cuales son usados principalmente posterior al trasplante de órganos. En este documento se incluyeron fármacos como ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, everolimus y ácido micofenólico, considerando los diferentes métodos analíticos disponibles en el mercado.

Las recomendaciones para el laboratorio clínico abordan, desde las consideraciones técnicas, el control de calidad interno y externo a tener presente y requisitos clínicos al momento de seleccionar determinados tipos de técnicas analíticas disponibles. Adicionalmente se incluyen consideraciones útiles para la toma de muestra, manipulación de las muestras, transporte, estabilidad y sensibilidad de las diferentes técnicas.

3.- INTRODUCCIÓN

La principal aplicación de la farmacocinética clínica es contribuir a establecer pautas posológicas individualizadas, consensuadas, tomando en consideración el criterio clínico, la situación del paciente y el análisis farmacocinético del valor de concentración plasmática determinado en una muestra de sangre. Al utilizar el resultado de una concentración diagnóstica y evaluarlo en conjunto con un equipo multidisciplinario, este se convierte en una prueba diagnóstica que representa una gran ventaja en la terapia inmunosupresora que recibe el paciente.

Se entiende como farmacocinética el estudio de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los medicamentos por el organismo, en palabras simples es la forma en que el organismo biotransforma el fármaco.

El primer objetivo de la farmacocinética clínica es la individualización de dosis, buscando un mayor beneficio del tratamiento farmacoterapéutico instaurado, con lo que se consigue minimizar la posible toxicidad y asimismo incrementar la probabilidad de conseguir efectos terapéuticos deseados, debido a que para medicamentos que presentan comportamiento que no son lineales ni predecibles, además de existir una gran variabilidad interindividual, es lo que en gran medida justifica la medición de los niveles plasmáticos de tales fármacos para ajustar dosis.

Es bien sabido que cuando a un paciente no se le puede medir la respuesta farmacológica, con parámetros simples y seguros, la determinación de la concentración del fármaco en sangre es el método más útil para establecer la dosis óptima y como consecuencia, el plan de seguimiento clínico terapéutico que el paciente deberá seguir para asegurar la efectividad y seguridad de su tratamiento, dejándose de lado prácticas como: relaciones empíricas dosis-respuesta, experiencia e intuición médica, interpretación de la respuesta clínica observada; además se debe tomar en cuenta que la intensidad del efecto farmacológico se

correlaciona más estrechamente con su concentración plasmática que con su dosis y por lo tanto permite optimizar su farmacoterapia, esto es lo que se conoce como “Monitorización terapéutica de drogas” (Therapeutic drug monitoring, TDM), que es la interpretación de un resultado de nivel plasmático en función de las condiciones del paciente para lograr realizar la individualización de la dosis.

El objetivo del TDM es eliminar fracasos terapéuticos por una dosis insuficiente y evitar toxicidades por una dosis excesiva, es decir lograr una máxima eficacia con mínimos efectos adversos.

Los fármacos inmunosupresores se utilizan para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como del tipo inmunitarias (artritis reumatoídea, lupus eritematoso sistémico), alergias, mieloma múltiple, nefritis crónica, entre otras, destacándose como base del tratamiento farmacológico para la mantención (aumento de la sobrevida) y prevención del rechazo en pacientes receptores de órganos trasplantados.

La terapia inmunosupresora óptima es básica y esencial para la mantención del órgano trasplantado. Los fármacos inmunosupresores se caracterizan por poseer un estrecho margen terapéutico y una gran variabilidad intra e inter individual, lo cual incrementa las posibilidades de falla terapéutica cuando se usa una dosis estándar para todos los pacientes, por lo tanto, es importante poder usar todas las herramientas disponibles para minimizar la toxicidad y evitar la pérdida o deterioro del órgano trasplantado, es aquí donde juega un rol muy importante el laboratorio clínico puesto que las mediciones (niveles plasmáticos) que entregue al equipo clínico permitirán optimizar las terapias inmunosupresoras.

Para obtener resultados analíticos exactos y precisos, los laboratorios clínicos han incorporado metodologías que pueden cumplir con dichos requisitos. Gran parte de las mediciones se pueden realizar mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) transformándose en el Gold Standard para la mayoría de estas determinaciones. Por otra parte mediante la introducción de inmunoensayos se ha podido masificar el uso de estas mediciones al no requerir equipamiento tan costoso ni mano de obra tan calificada como lo requiere el HPLC, sin embargo, son capaces de tener un buen comportamiento en cuanto a resolución y especificidad, y tener además una buena correlación con el Gold Standard. Últimamente se han desarrollado técnicas acopladas a detectores de masa (HPLC/MS/MS) los cuales han entregado utilidad en los casos en que no es posible la diferenciación mediante HPLC convencional.

4.- DESARROLLO

El éxito logrado en el transcurso de las últimas décadas en la supervivencia de receptores de injertos ha dependido en gran medida del desarrollo y uso clínico de fármacos inmunosupresores de probada eficacia. El mejor ejemplo tuvo lugar en la década de los ochenta, con la disponibilidad de la ciclosporina A (CsA), que permitió una reducción significativa en la incidencia de eventos de rechazo agudo y una mejoría sustancial en la sobrevida de injertos a corto plazo. En los noventa, se introdujeron nuevos inmunosupresores, los cuales han contribuido a reducir todavía más la frecuencia de este tipo de rechazos y mejorar los perfiles de efectos adversos.

En los últimos 25 años se ha comprendido de mejor forma los beneficios de combinar drogas inmunosupresoras y la importancia de contar con una mayor compatibilidad entre receptor y donante, así como también la importancia de preservación de órganos y quimio profilaxis de infecciones oportunistas. Todos estos adelantos contribuyen a una progresiva mejoría en la evolución clínica. Así, receptores no sensibilizados de un primer trasplante de riñón de donante cadáver o vivo tienen ahora una expectativa de sobrevida al año de al menos un 95% (paciente) y un 90% (injerto).

El TDM, ayuda a calcular la dosis de droga a administrar, evitando de este modo la aparición de reacciones adversas que pudiesen estar relacionados con la gran variabilidad farmacocinética y farmacodinámica inter individual e intra individual, al igual que la dependencia de los rangos terapéuticos del período post trasplante. Por otra parte, considera una serie de parámetros, desde la extracción de la muestra del pacien-

te, medición de los niveles plasmáticos de inmunosupresores e interpretación de resultados. Los métodos analíticos y sus resultados son de gran relevancia, especialmente al momento del ajuste terapéutico, en donde el equipo clínico tratante debe considerar el estado clínico del paciente y el nivel de concentración del inmunosupresor.

El TDM es una práctica habitual en pacientes que reciben terapia post trasplante, este monitoreo considera desde la toma de muestra hasta la cuantificación del inmunosupresor e interpretación de resultados. Para lo anterior es de vital importancia que los métodos analíticos utilizados para estos fines sean confiables, con un alto grado de exactitud y precisión, para que el equipo clínico realice el ajuste del esquema terapéutico sobre la base del estado clínico y el nivel de concentración del o de los inmunosupresores en estudio. Es importante además participar de un programa de control de calidad externo.

Se han elaborado numerosos documentos de consenso sobre TDM de inmunosupresores, asimismo una asociación internacional dedicada a este tema la International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (IATDM-CT). En el 2000 se formó un grupo de trabajo sobre inmunosupresores entre la Federación Internacional de Química Clínica, IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) con la IATDM-CT, el cual se ha dedicado a entregar información de utilidad para los laboratorios clínicos y farmacéuticos para el monitoreo de drogas inmunosupresoras y la interpretación de estos resultados.

Respecto de las mediciones requeridas para los inmunosupresores por el laboratorio clínico, se han desarrollado diferentes métodos analíticos para cuantificarlos utilizando Inmunoensayos (IA) acoplados a diversas tecnologías de detección tales como Radioinmunoensayo (Radioimmunoassay, RIA), Enzyme Multiplied Immunoassay (EMIT), Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), Chemiluminescent Enzyme Immunoassay (CLIA), Electro-Chemiluminescent Immunoassay (ECLIA), Automated Antibody Conjugated Magnetic Immunoassay (ACMIA), Cyclosporine Extended Range Assay (CSAE). Últimamente se han incorporado junto al HPLC métodos cromatográficos acoplados a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS), los cuales aparecen como los nuevos métodos gold estándar. Una de las principales desventajas que poseen los inmunoensayos es la reactividad cruzada de la droga en estudio con algunos de sus metabolitos, lo cual puede producir una sobre estimación, esta consideración se debe tener presente al compararlos con los métodos HPLC y los de espectrometría de masas.

Es importante mencionar que la mayoría de los métodos analíticos disponibles miden la droga total presente en el plasma (droga libre más droga unida a proteínas), lo cual no corresponde a la proporción o cantidad de droga que efectivamente tiene el efecto inmunosupresor que es la droga libre, sin embargo los valores de referencia o rango terapéutico con el que se trabaja y dosifica está estimado en base a esta medición o resultado.

Antes de seleccionar la metodología de análisis a implementar, es importante considerar con que plataformas disponibles cuenta el laboratorio y que tiempos de respuesta se debe trabajar, lo cual depende de la necesidad del equipo clínico, disponibilidad presupuestaria, volúmenes de muestra, entre otras consideraciones.

5.- RECOMENDACIONES GENERALES

Algunas recomendaciones y directrices generales para la cuantificación de la concentración y monitorización de sus niveles plasmáticos de los inmunosupresores deben considerar:

- a) La técnica analítica debe estar validada o verificada, según corresponda, y el laboratorio debe implementar un programa de control de calidad interno e idealmente participar en un programa de control de calidad externo.
- b) La determinación analítica se realiza preferentemente en sangre completa.
- c) Es necesario diseñar una orden de solicitud de examen destinada solo para estos fines, la cual debe contener además de la información básica del paciente, datos relacionados con el tratamiento farmacológico como: dosis, fecha y hora de última administración, fecha y hora de toma de muestra, además de consignar otros datos como cuál es el objetivo de la monitorización, es decir control de tratamiento, sospecha de intoxicación, entre otros.
- d) Dependiendo del fármaco inmunosupresor que se desee monitorizar es importante definir el momento óptimo de extracción de la muestra, con el fin de adecuar el número de extracciones de sangre a las estrictamente necesarias. El momento de extracción debe ser el que tenga una mejor correlación con el área bajo la curva del medicamento o el que se defina por consenso en la guía clínica para el tratamiento farmacoterapéutico.
- e) La monitorización se debe realizar en el estado estacionario definido para el fármaco a monitorizar.
- f) Considerar el lugar de extracción, si son obtenidas durante una infusión intra venosa continua, la muestra debe tomarse del miembro opuesto. Si la muestra es de la misma vía intravenosa por la que se administró previamente el medicamento, ésta debe ser cuidadosamente lavada con suero fisiológico.
- g) Incorporar en las mediciones controles de tercera opinión, independientes de los controles que pudiesen ser incluidos en los kits analíticos del proveedor.

5.1.- Recomendaciones para el manejo de muestras

- a) Tipo de contenedor: En general para todos los inmunosupresores abordados en el presente documento se deben utilizar tubos para toma de muestras de sangre con anticoagulante EDTA.
- b) Estabilidad : Aunque las muestras pueden conservarse hasta por 5 días a 15-25°C, de acuerdo a las recomendaciones internacionales del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) si éstas no se procesan dentro de 8 horas, se recomienda conservarlas en los tubos originales, tapados en forma refrigerada a 2-8°C. Bajo estas condiciones las muestras de sangre son estables hasta por 7 días. Si se requiere conservarlas por mayor tiempo, se recomienda conservarlas congeladas a -20°C hasta por un máximo de 6 meses (para Tacrolimus). Una vez descongeladas mezclar cuidadosamente hasta obtener una mezcla completamente homogénea, sin agitar para evitar la formación de espuma. No volver a congelar. Las muestras congeladas y refrigeradas deben alcanzar la temperatura ambiente antes de su pretratamiento.
- c) Para el caso de inmunoensayos, las muestras pretratadas con el reactivo hemolizante deben analizarse dentro de 30 minutos para evitar la evaporación. Caso contrario se pueden conservar en tubos cerrados hasta por 4 horas a temperatura ambiente (20-25°C). Se recomienda una vez abierto estos tubos procesarlas dentro de 30 minutos, evitando retrasos entre las muestras para que todas se analicen dentro de los tiempos recomendados.

5.2.- Recomendaciones sobre control de calidad

El laboratorio clínico debe implementar un programa de control de calidad interno y participar en programas de control de calidad externos para controlar sus métodos analíticos disponibles y evaluar su desempeño analítico. Para lo primero se recomienda consultar la “Guía técnica para control de calidad de mediciones cuantitativas en el laboratorio clínico” (ISP, 2015). Para lo segundo existen algunos programas que se describen en la tabla siguiente.

Organismo organizador del PEEC	Nombre	Inmunosupresores evaluados
CAP (College American Pathology)	Immunosuppressive Drugs CS	Ciclosporina
		Tacrolimus
		Sirolimus
		Everolimus
	Mycophenolic Acid MPA	Ácido micofenólico
RIQAS	Immunosuppressant Programe	Ciclosporina
		Tacrolimus
		Sirolimus
		Everolimus

PEEC: Programa de Evaluación Externa de Calidad

6.- METODOLOGÍAS ANALÍTICAS DISPONIBLES

Las metodologías disponibles para la cuantificación y monitorización de los inmunosupresores se puede dividir en dos grandes categorías: aquellas consideradas como de referencia, implementadas normalmente en centros de referencia y universidades y para la rutina aquellas usadas por diversos proveedores de reactivos de diagnósticos, por métodos de menor complejidad.

6.1.- Metodologías de Referencia o Gold Standard

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Los métodos analíticos de HPLC para la cuantificación de los inmunosupresores han sido considerados por varios años como las técnicas analíticas gold standard para este tipo de mediciones, los cuales están libres de interferencias y reacciones cruzadas con los metabolitos de los inmunosupresores y presentan una elevada sensibilidad.

Estas técnicas son esencialmente manuales y particularmente dependiente del operador en el proceso de extracción del fármaco total.

Ventajas:

- Alto grado de precisión y exactitud

Desventajas:

- Se requiere una mayor inversión inicial en comparación con otras metodologías
- Contar con personal altamente capacitado.
- Fase Pre-examen esencialmente manual.
- De baja utilidad para elevado número de muestra.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a detector de Masas (HPLC/MS/MS)

La espectrometría de masas acoplada a HPLC con detectores del tipo cuadrupolo, LC/MS/MS permite hoy en día la cuantificación simultánea de los inmunosupresores ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus y everolimus en una sola muestra de sangre, la cual debe ser previamente sometida a un proceso de precipitación de sus proteínas.

Estas detecciones son altamente selectivas, específicas y sensibles y consideran breves tiempos de análisis. La detección y cuantificación de los inmunosupresores están dentro de los siguientes rangos de concentración: 2,5 a 30 ng/mL para tacrolimus, sirolimus y everolimus y de 50 a 1500 ng/mL para CsA. En la actualidad se presenta como método de referencia para la cuantificación de esos cuatro inmunosupresores y existen ya algunos proveedores internacionales que los comercializan como kits para este tipo de instrumentos.

Ventajas:

- Alto grado de precisión y exactitud.
- Pueden procesarse simultáneamente cuatro inmunosupresores y un elevado número de muestras si se dispone de un auto sampler.

Desventajas:

- Gran inversión inicial
- Contar con personal altamente capacitado.
- Pre analítico esencialmente manual.

6.2.- Metodologías de Inmunoensayo

ECLIA (Electro-Chemiluminescent Immunoassay)

Es una prueba inmunológica de electroquimioluminiscencia, para la cuantificación del fármaco en sangre humana total.

Utiliza un reactivo de pretratamiento el cual sirve para la lisis de los glóbulos rojos, la extracción del fármaco mediante la precipitación de la mayoría de las proteínas sanguíneas. Una vez pretratadas las muestras con este reactivo se lleva a cabo una centrifugación y se extrae el sobrenadante que es la porción que contiene la CsA total, para realizar el análisis.

La duración de la técnica individual (principio de competición) tiene una duración final de 18 minutos:

- En una primera incubación la muestra pretratada se incuba con un anticuerpo monoclonal anti-fármaco marcada con biotina y un derivado de fármaco marcado con quelato de rutenio (complejo tris (2,2'-bipiridina) rutenio II). Según la concentración de CsA en la muestra y la formación del respectivo inmunocomplejo, los puntos de fijación del anticuerpo marcado son ocupados en parte por el analito de la muestra y en parte por el hapteno marcado con rutenio.
- En una segunda incubación, después de incorporar las micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina.

La mezcla de reactivos se traslada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con un reactivo. Al aplicar una corriente eléctrica se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide espectrofotométricamente.

Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

CLIA (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay)

Esta metodología utiliza un inmunoanálisis quimioluminiscente amplificado de micropartículas de dos pasos.

Tiene características similares del método anterior, respecto de requerir de un pretratamiento previo, de tipo manual, que tiene como objetivo desproteinizar muestra de sangre por medio de centrifugación. El sobrenadante obtenido es el que contiene la droga total presente en la muestra y es el utilizado para realizar la medición analítica. Para realizar la medición por el equipo es necesario utilizar un tubo de pretratamiento, el cual es colocado en el autoanalizador.

En el primer paso, se combinan la muestra, el diluyente de ensayo y las micropartículas paramagnéticas recubiertas de anticuerpo anti-fármaco. El fármaco presente en la muestra se une a las micropartículas. Después del lavado se añade el conjugado de fármaco marcado con acridinio para constituir en esta segunda etapa un complejo inmune. Las soluciones preactivadora y activadora se añaden a la mezcla de reacción después de otro ciclo de lavado y la reacción quimioluminiscente resultante se mide espectrofotométrica-

mente. Existe una relación indirectamente proporcional entre la cantidad de fármaco presente en la muestra y las unidades relativas de luz medidas, detectadas por el sistema óptico del analizador químico.

ACMIA (Automated Antibody Conjugated Magnetic Immunoassay)

El ensayo ACMIA es un inmunoensayo competitivo que utiliza tecnología de quimioluminiscencia directa. El fármaco presente en la muestra del paciente compite con el fármaco marcado con éster de acridinio del reactivo por una cantidad limitada de anticuerpo anti-fármaco monoclonal de ratón marcado con biotina. El anticuerpo anti-fármaco marcado con biotina se une a estreptavidina, que está unida de forma covalente a partículas paramagnéticas de la fase sólida. En el ensayo la muestra se trata previamente de forma manual para lisar las células y solubilizar el fármaco en estudio.

CSAE (Cyclosporine Extended Range Assay).

Al igual que las anteriores requiere de un pretratamiento de la muestra. Utiliza una técnica de inmunoensayo heterogéneo automatizado con sistema acoplado a la enzima β -galactosidasa, sustratos y reactivos necesarios para generar lecturas bicromáticas que son proporcionales a la cantidad de fármaco presente en la muestra de reacción.

Análisis CEDIA PLUS

Utiliza la tecnología recombinante del ADN para producir un sistema de enzimoimmunoanálisis homogéneo. El análisis se basa en la enzima bacteriana β -galactosidasa, que se ha preparado genéticamente dividiéndola en dos fragmentos inactivos. Estos fragmentos se vuelven a asociar espontáneamente para formar enzimas totalmente activas que, durante el análisis, descomponen un sustrato y generan un cambio de color que puede medirse espectrofotométricamente.

En el análisis, el fármaco de la muestra compite con el fármaco conjugada con un fragmento inactivo de β -galactosidasa por los lugares de unión de los anticuerpos monoclonales específicos para el fármaco. Si la muestra contiene el fármaco, ésta se fija al anticuerpo y deja libre los fragmentos enzimáticos inactivos, que forman enzimas activas. Si la muestra no contiene el fármaco, el anticuerpo se fija al fármaco conjugada en el fragmento inactivo e inhibe la recombinación de los fragmentos de β -galactosidasa inactivos, impidiendo la formación de una enzima activa. La cantidad de enzima activa formada y el cambio de absorbancia son directamente proporcionales a la cantidad de fármaco que contenga la muestra.

EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay)

EMIT es un enzimoimmunoensayo homogéneo competitivo, variante que no requiere etapas de separación final, lo que permite un proceso de fácil automatización en los instrumentos analíticos.

El ensayo se fundamenta en la inhibición o activación del marcador enzimático, al producirse la unión antígeno-anticuerpo, no siendo necesario ningún paso de lavado posterior, dado que la reacción se realiza en el mismo tubo o celda de ensayo.

7.- PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS INMUNOSUPRESORES Y RECOMENDACIONES PARA SU MONITOREO.

7.1.- Ciclosporina A (CsA)

La ciclosporina A se extrae de diferentes especies de hongos como el *Trichoderma polysporum*, *Bauveria nivea*, entre otros. Es un péptido cíclico neutro, compuesta de 11 aminoácidos y una masa relativa de 1203 g/mol, es altamente liposoluble, se metaboliza a nivel hepático y se han identificado 11 metabolitos.

Este fármaco fue introducido en 1980 como terapia inmunosupresora en reemplazo de la azatioprina.

Mecanismo de acción

La CsA se utiliza principalmente como droga inmunosupresora para prevenir el rechazo de órganos en pacientes trasplantados (tanto de órganos sólidos como de precursores hematopoyéticos), atraviesa la membrana celular libremente y produce inmunosupresión al bloquear la activación de los linfocitos T, al unirse al receptor de la inmunofilina, ciclofilina, inhibiendo la actividad fosfatasa de la calcineurina, que participa en la transcripción del ácido ribonucleico para la síntesis de interleuquinas (IL-2, IL-3, IL-4 y IL-12), mediadores de la inflamación y factores estimulantes de macrófagos y granulocitos. La inhibición de la calcineurina también produce otros efectos intracelulares que contribuyen al efecto inmunosupresivo. La CsA también puede provocar efectos adversos tales como nefrotoxicidad aguda, reducción del flujo sanguíneo renal, vasoconstricción arterial aferente, disminución de la velocidad glomerular e incremento de la resistencia vascular renal, (ver Figura N°1).

Características farmacocinéticas

- Absorción: La absorción es variable y depende del individuo y de la forma farmacéutica, siendo mejor absorbida en forma de emulsión. La biodisponibilidad oral es del 20 al 50%. La relación entre la dosis administrada y la exposición de ciclosporina A es lineal dentro del intervalo de dosis terapéutica.
- Unión a proteínas: Aproximadamente el 90% se encuentra unido a proteínas (principalmente lipoproteínas).
- Vida media: La distribución del fármaco sigue un modelo bicompartimental (con distribución a nivel sanguíneo y órgano periférico) y variable, aproximadamente 7 horas en niños (rango entre 7 a 19 horas) y 19 horas en adultos (rango de 10 a 27 horas).
- Metabolización: A nivel hepático.
- Eliminación: Principalmente biliar, solo el 6% se excreta por la orina. Solo un 0,1% de la dosis se excreta por la orina sin cambio.

Momento de monitorización

El más ampliamente usado es la medición del nivel pre dosis (C0) o basal, el cual se debe tomar media hora antes de la ingestión de la siguiente dosis del medicamento. El estudio pionero de Levy y col. demostró que la mejor correlación con el área bajo la curva se lograba con la C2. Algunos estudios han demostrado que el nivel C2 se correlaciona mejor con una mayor inhibición de los linfocitos T productores de IL-2 y una mayor inhibición de la Calcineurina, lo que explica su efecto inmunosupresor. Otro de los estudios a favor del uso de C2 es relacionado a una ventaja analítica de C2 puesto que hay una menor relación metabolitos / CsA que en C0 y no habrían tantas diferencias entre los distintos métodos analíticos. Es

muy importante destacar que los estudios mencionados anteriormente han sido realizados en trasplantes de órganos sólidos, principalmente en riñón e hígado por lo que no se pueden aplicar directamente a la infusión de precursores hematopoyéticos, en este tipo de órganos sólo se ha estudiado la aplicación de metodología basada en el monitoreo en C0.

Volumen de muestra: Se debe respetar siempre el volumen del llenado indicado en el tubo con EDTA, como mínimo se pueden aceptar microtubos de 0,5 mL.

Métodos analíticos disponibles para CsA

ACMIA

EMIT

CLIA

ECLIA

Intervalos de medición analítica

Los intervalos de medición para CsA para los diferentes sistemas analíticos indicados van desde 30 – 2000 ng/mL.

Intervalo de referencia

No existe un intervalo terapéutico fijo para la CsA en sangre total. Para determinar el nivel óptimo de CsA en sangre deben considerarse numerosos factores, como la complejidad del estado clínico del paciente, las diferentes sensibilidades individuales frente a los efectos inmunosupresores y nefrotóxicos de la CsA, la coadministración de otros inmunosupresores, el tipo de trasplante, el tiempo transcurrido desde el trasplante y varios otros factores. Los valores individuales de CsA no pueden utilizarse como indicador único para justificar la modificación del tratamiento. Cada paciente debe ser evaluado meticulosamente desde el punto de vista clínico antes de hacerse cualquier ajuste al tratamiento y cada usuario del ensayo debe establecer sus propios límites en base a la experiencia clínica.

Estos intervalos varían de acuerdo a la prueba de diagnóstico in vitro comercial utilizada, sin embargo para trasplante de médula ósea, se consideró lo siguiente:

Nivel	Tiempo post trasplante	Intervalo de Referencia
C0	Día 0 a día 21	250-300 ng/mL
C0	Día 21 en adelante	150 – 300 ng/mL

Para trasplante hepático, lo siguiente:

Nivel	Tiempo post trasplante	Intervalo de Referencia
C2	0 a 3 meses	1000 - 1100 ng/mL
C2	3 a 6 meses	800 - 1000 ng/mL
C2	6 meses en adelante	600 – 800 ng/mL

Nivel de toxicidad: > 350 ng/mL.

7.2.- Tacrolimus

El tacrolimus es un macrólido con un anillo de lactona, con 23 miembros de carbón, proveniente de la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*. Fue aislado por primera vez en Japón en el año 1984.

Mecanismo de acción

Al igual que la CsA el tacrolimus ejerce su acción inmunosupresora formando un complejo al unirse con la inmunofilina reduciendo la actividad de la peptidil-prolil isomerasa. Es este complejo el que interactúa e inhibe a la calcineurina disminuyendo la transcripción de linfocinas, IL-2, IL-3, IL-4, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos y de interferón gamma, en los linfocitos T, reduciendo la respuesta proliferativa de éstas células frente a antígenos y mitógenos.

El mecanismo de acción del tacrolimus es similar al de la CsA, pero su incidencia en el rechazo agudo es menor. Respecto a la supervivencia de trasplantes y al efecto inmunosupresor a corto plazo, tanto la CsA como el tacrolimus producen efectos similares, sin embargo a largo plazo el tacrolimus produce efectos más favorables para el pronóstico en la supervivencia del trasplante y rechazo.

Sus propiedades son similares a las de la CsA, pero su acción es mucho más potente. Tiene un amplio rango de interacciones. Algunos antifúngicos del tipo azol incrementan los niveles plasmáticos por competencia con las enzimas que los degradan. La inmunosupresión con tacrolimus se asocia con significativa baja de rechazo agudo si se compara con la CsA, adicionalmente la respuesta clínica durante el primer año de tratamiento es mejor con tacrolimus que con CsA en el trasplante hepático, (ver figura N°1).

Características farmacocinéticas

- Absorción: La biodisponibilidad oral promedio es de aproximadamente un 20 %, es menor luego de ingestión de comidas ricas en grasas.
- Unión a Proteínas: 75 – 99%, principalmente albúmina y α 1-glicoproteína ácida.
- Vida media: 11,3 horas (Rango de 3,5 a 40,6 horas).
- Metabolización: Hepático, primariamente por la enzima CYP3A4.
- Eliminación: Menos del 1 % es excretada sin cambios por la orina. A través de las heces se elimina $92,6 \pm 30,7\%$, y a través de la orina $2,3 \pm 1 - 1\%$.

Métodos analíticos para Tacrolimus

Los métodos analíticos de inmunoensayo para tacrolimus son del mismo tipo que los descritos para CsA y requieren pre tratamiento similar de las muestras, de acuerdo a lo especificado por el fabricante:

ACMIA

EMIT

CLIA

ECLIA

La única diferencia radica en el tipo de analito en estudio, siendo para este caso el tacrolimus presente en la muestra de sangre.

El pretratamiento para el análisis de tacrolimus requiere de una extracción previa del fármaco y posterior análisis con anticuerpos específicos.

CLIA y ECLIA entregan una precisión adecuada para concentraciones de Tacrolimus de 3 ng/mL. Es necesario utilizar métodos que tengan un alto grado de sensibilidad, precisión y exactitud.

Intervalos de medición analítica

Los intervalos de medición para tacrolimus en los diferentes sistemas analíticos van desde 1 a 30 ng/mL.

Un consenso europeo del año 2007 recomendó a los laboratorios productores de reactivos de diagnósticos buscar métodos analíticos para cuantificar niveles de 1 ng/mL o inferiores para así disminuir los límites terapéuticos de 3 a 7 ng/mL.

Intervalo de referencia

Al igual que con la ciclosporina A, existe una correlación entre los niveles de concentración sanguínea de tacrolimus y el grado de inmunosupresión y toxicidad.

Los intervalos óptimos pueden variar dependiendo de la metodología analítica utilizada, sin embargo como norma general se han establecido valores de consenso

Nivel	Intervalo de Referencia
C0	5 - 20 ng/mL

En la fase de mantención del trasplante renal es recomendable una concentración de 5 ng/mL al usar tacrolimus junto a otros inmunosupresores como ácido micofenólico o esteroides. Recientemente la inclusión de nuevos inmunosupresores como everolimus, han llevado a reducir las concentraciones target (concentración terapéutica esperada) a 3 ng/mL, es por esto que la concentración target puede variar dependiendo de cuáles son las otras drogas inmunosupresoras que se usan de manera concomitante, por lo tanto, los intervalos terapéuticos para tacrolimus varían en función de factores clínicos y de los métodos analíticos empleados para su cuantificación. Lo anterior hace complejo el establecimiento de rangos, sin embargo como norma general se han establecido los siguientes rangos:

Nivel	Tiempo post trasplante	Intervalo de Referencia
C0	0 a 3 meses	10 – 15 ng/mL
	Mayor a 3 meses	5 – 10 ng/mL

Nivel de toxicidad: > 20 ng/mL.

7.3.- Sirolimus

El sirolimus, también denominado rapamicina, es un antibiótico lipofílico macrocíclico, lactona, un anillo de 31 miembros, descubierto en 1965 en una muestra de suelo en Isla de Pascua. Es producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*.

Mecanismo de acción

El sirolimus inhibe la activación del linfocito T y su proliferación vía mTOR (mammalian target of rapamycin). Se une a las inmunofilinas FKBP12 formando un complejo sirolimus/FKBP12. El complejo de sirolimus y la inmunofilina celularFKBP12 modulan la respuesta inmune al combinarse con la proteína mTOR, e inhibiendo su activación y las fases del ciclo celular G1 a S, (ver Figura N°1).

Características farmacocinéticas

- Absorción: Se absorbe poco en el tracto gastrointestinal. Su biodisponibilidad vía oral se estima que es de un 15%.
- Unión a proteínas: Aproximadamente en un 92%, con una mayor afinidad por albúmina (97%). También se une α 1- glicoproteína ácida y lipoproteínas.
- Vida media: 57 – 62 hrs, con un aclaramiento individual muy variable.
- Metabolización: El sirolimus es metabolizado mayoritariamente en el hígado y la pared intestinal por el citocromo P450, por la isoenzima CYP3A4.
- Eliminación: El sirolimus experimenta mayoritariamente desmetilación e hidroxilación y sus metabolitos se excretan en gran medida por la bilis y las heces. Solo un 2% se elimina vía renal.

Métodos analíticos para Sirolimus

ACMIA
E EMIT
CLIA
ECLIA

Intervalos de medición analítica

Los intervalos de medición para sirolimus para los diferentes sistemas analíticos indicados van desde 0,5 a 30 ng/mL.

Intervalo de referencia

No existe un intervalo terapéutico fijo para el sirolimus en sangre total. Para determinar el nivel óptimo de sirolimus en sangre deben considerarse numerosos factores, como la complejidad del estado clínico, las diferentes sensibilidades individuales frente a los efectos inmunosupresores y nefrotóxicos del sirolimus, la coadministración de otros inmunosupresores, el tipo de trasplante, el tiempo transcurrido desde el trasplante y diversos otros factores. Los valores individuales de sirolimus no pueden utilizarse como único indicador para justificar la modificación del tratamiento. Cada paciente se deberá evaluar meticulosamente

desde el punto de vista clínico antes de hacerse cualquier ajuste al tratamiento y cada usuario del ensayo debe establecer sus propios límites en base a la experiencia clínica. Estos intervalos varían de acuerdo a la prueba analítica comercial de diagnóstico in-vitro usado.

Rango terapéutico general: 4 – 20 ng/mL.

Nivel de toxicidad: > 20 ng/mL.

Niveles y correlaciones sanguíneas

El sirolimus es rápidamente absorbido por la vía gastrointestinal, alcanzando su máxima concentración sanguínea a las 2 horas de ingesta. Su máxima biodisponibilidad es de un 15%, atribuido principalmente por el metabolismo hepático e intestinal. Esta barrera de absorción varía considerablemente de paciente a paciente. La distribución del sirolimus alcanza a un 95%, dentro de los glóbulos rojos, un 3% en el plasma y un 2% en otros componentes celulares sanguíneos. Aproximadamente un 92% del sirolimus plasmático está unido a proteínas, especialmente a albúmina. El metabolismo del sirolimus es vía metabolismo oxidativo intestinal CYP3A4 y hepático. Se han caracterizado 7 metabolitos como 41-O- y 7-O-demetil, hidroxi, hidroxi-demetilado y demetilado sirolimus, los cuales son farmacológicamente inactivos, éstos son eliminados vía biliar, con vida media de 62 hrs en adultos y 11 horas en niños.

Las reacciones adversas más frecuentes son: hipertensión, hiperlipidemia, anemia, trombocitopenia, trastornos electrolíticos (hipopotasemia e hipofosfatemia), edema periférico, dolor abdominal, artralgia, trastornos cutáneos, pirexia, cefalea, náuseas, diarrea o estreñimiento y una incidencia más alta de linfocitos.

Se hace necesaria monitorizar las concentraciones mínimas del sirolimus (C₀), debido especialmente a la amplia variabilidad intraindividual e interindividual del comportamiento farmacocinético del fármaco. Se acepta de forma general que la concentración mínima es un buen reflejo de la exposición total medida por el área bajo la curva de concentración respecto del tiempo (AUC). Se ha demostrado una buena correlación entre las concentraciones C₀ y AUC del sirolimus. Esto también sucede cuando se utiliza el fármaco en combinación con tacrolimus.

Se recomienda monitorizar la concentración del sirolimus dado que la posología no es un buen factor predictivo de exposición al fármaco. Cuando el aclaramiento del sirolimus se aproxime al flujo sanguíneo hepático, debe reducirse la dosis en función de las concentraciones medidas de sirolimus en pacientes con disfunción hepática. También se requiere una estrecha monitorización farmacológica debido a que el sirolimus es metabolizado por la isoenzima CYP3A4 del citocromo P450, que metaboliza otros fármacos, por lo que es sensible a las interacciones farmacológicas. Existen numerosos datos sobre interacciones farmacológicas que podrían causar un aumento o una disminución de las concentraciones sanguíneas de sirolimus, como las notificadas para la CsA y el tacrolimus.

La muestra de elección para cuantificar sirolimus es sangre total, en la cual se investigan los niveles concomitantes de CsA y corticosteroides que recibe el paciente.

7.4.- Everolimus

El everolimus es un derivado del sirolimus, sintetizado con la introducción de un grupo 2-hidroxietileno en el átomo de carbono de la posición 40 del sirolimus. El everolimus se metaboliza en el tracto gastrointestinal e hígado, generando al menos 20 metabolitos.

Mecanismo de acción

El everolimus tiene un efecto inmunosupresor idéntico al sirolimus, inhibiendo la activación del linfocito T y su proliferación vía mTOR, mediante su unión a FKBP-12, formando un complejo everolimus/FKB12. Al unirse a mTOR bloquea su función inhibiendo posteriormente la activación de la cinasa p70 S6, deteniendo el ciclo celular en las fases G1 a S. Estos efectos inhiben las vías de señalización del receptor para la IL-2 y dependientes de CD28.

Las concentraciones sanguíneas de everolimus en pacientes trasplantados se correlacionan con la eficacia terapéutica y con la frecuencia de efectos adversos. Dado los estrechos márgenes terapéuticos del fármaco, las interacciones farmacocinéticas y la elevada variabilidad entre pacientes, se recomienda monitorizar el fármaco en sangre total a todos los pacientes en tratamiento con trasplantes de órganos sólidos, para una mejor eficacia, (ver Figura N°1).

Características farmacocinéticas

- Absorción: Se absorbe rápidamente tras su administración oral, alcanzando su concentración máxima en sangre al cabo de 1-2 hrs.
- Unión a proteínas: Aproximadamente un 74%.
- Vida media: Su vida media de eliminación es de 28+/- 7 hrs.
- Metabolización: El everolimus es un sustrato de CYP3A4 y de la glicoproteína-P, su metabolización da lugar a monohidroxilaciones y O-dealquilaciones, ninguno de estos metabolitos contribuyen de manera significativa a la actividad inmunosupresora del everolimus.
- Eliminación: 80% vía heces y 5% vía renal.

Métodos analíticos para Everolimus

ACMIA

EMIT

CLIA

ECLIA

Intervalos de medición analítica

Los intervalos de medición para everolimus para los diferentes sistemas analíticos indicados van desde 0,5 a 30 ng/mL.

Intervalo de referencia

No existe un intervalo terapéutico fijo para el everolimus en sangre total. Para determinar el nivel óptimo de everolimus en sangre deben considerarse numerosos factores, como la complejidad del estado clínico, las diferentes sensibilidades individuales frente a los efectos inmunosupresores y nefrotóxicos del everolimus, la coadministración de otros inmunosupresores, el tipo de trasplante, el tiempo transcurrido desde el trasplante y diversos otros factores. Los valores individuales de everolimus no pueden utilizarse como único indicador para justificar la modificación del tratamiento. Cada paciente se deberá evaluar meti-

culosamente desde el punto de vista clínico antes de hacerse cualquier ajuste al tratamiento y cada usuario del ensayo debe establecer sus propios límites en base a la experiencia clínica. Estos intervalos varían de acuerdo a la prueba analítica comercial de diagnóstico in-vitro usado.

Rango terapéutico general: 3 – 15 ng/mL.

Nivel de toxicidad: > 15 ng/mL.

Niveles y correlaciones sanguíneas

El everolimus produce sus efectos de inmunosupresor y antiproliferativo a través del complejo FKBP-12 y la posterior inhibición de la señal mediada por mTOR, al igual que el mecanismo del sirolimus. Su actividad in vivo es idéntica a la del sirolimus.

Al interior celular el everolimus se une a la inmunofilina FKBP-12 y este complejo se une al mTOR activando la cinasa p70 S6, enzima clave para la transducción y síntesis de ADN, y la unión del factor que da inicio al eucarionte eIF-4E a la proteína fosforilada y ácido estable PHAS-I, vía que interviene en la síntesis proteica. El everolimus al unirse al mTOR bloquea su función, inhibiendo que se active la cinasa p70 S6, provocando que se detenga el ciclo celular en las fases G1 a S. Esta unión mTOR inhiben las vías de señales dependientes del receptor para la IL-2 y dependientes de CD28.

La concentración máxima de everolimus postadministración se alcanza 1 a 2 horas de su administración oral. El everolimus, al igual que el sirolimus es un sustrato de la glucoproteína P y de la enzima CYP34A. Por lo anterior su metabolismo a nivel gastrointestinal puede afectar de forma importante la biodisponibilidad total. El profármaco se metaboliza principalmente a nivel hepático e intestino, mediante desmetilación, hidroxilación y degradación del anillo dando lugar a 6 metabolitos principales. La fracción circulante del everolimus está unido principalmente a los eritrocitos, aproximadamente en un 75% y el resto unido a proteínas. La semivida de su eliminación en pacientes con trasplantes renales es de 18 a 35 horas, lo que corresponde a una mitad de lo que ocurre con el sirolimus. Esta semivida de eliminación es un poco superior en pacientes con trasplantes de hígado.

Las reacciones adversas de mayor importancia del everolimus son el edema periférico, hipertensión, estreñimiento, náuseas, infección urinaria, anemia y hiperlipidemia. Otros efectos colaterales incluyen el desarrollo de linfomas, incremento del riesgo de infecciones, trombosis del injerto, nefrotoxicidad, mayores tiempos de cicatrización de heridas, trombosis del injerto, infecciones oportunistas y diabetes de nueva aparición post-trasplante.

7.5.- Micofenolato (MPA)

Medicamento inmunosupresor derivado de *Penicillium stoloniferum* que se administra bajo la forma de micofenolato sódico o micofenolato mofetilo, los cuales se transforman en el fármaco activo ácido micofenólico (MPA) dentro del organismo. Este fármaco se administra junto con ciclosporina A y corticoides para prevenir el rechazo en los trasplantes de riñón. El micofenolato asociado a ciclosporina A no muestra beneficios superiores a los de un tratamiento estándar, su nefrotoxicidad es menor que la de la ciclosporina A, lo que permite reducir la dosis de esta.

Mecanismo de Acción

El ácido micofenólico inhibe la síntesis de las purinas en los linfocitos por inhibición no competitiva de la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa, que participa en la síntesis de novo de las purinas, siendo un factor limitante en la conversión de inosina monofosfato a guanosina monofosfato, impidiendo la proli-

feración de los linfocitos y la formación de moléculas de adhesión, en respuesta a un estímulo antigénico o mitógeno, (ver Figura N°1).

Características Farmacocinéticas

- Absorción: Luego de la ingestión oral la biodisponibilidad varía de 70 a 95 %.
- Unión a proteínas: Mayor a un 98 %.
- Vida Media: Varía de 8 a 16 horas, mientras que para los metabolitos de ácido micofenólico es de 13 a 17 horas.
- Metabolización: El ácido micofenólico es metabolizado principalmente por la glucoronil transferase a metabolitos glucuronados, principalmente glucuronido fenólico de ácido glucurónico (MPAG) el cual no presenta actividad farmacológica.
- Eliminación: Vía renal. En pacientes trasplantados renales es de 140 +/- 30 mL/min.

Métodos analíticos para Micofenolato

Total MPA

HPLC

Análisis de ácido micofenólico CEDIA

Análisis de ácido micofenólico CEDIA para otros sistemas

Intervalos de medición analítica

Los intervalos de medición para micofenolato para los diferentes sistemas analíticos van de 0,3 a 10 µg/mL.

Intervalo de referencia

No existe un intervalo terapéutico fijo para micofenolato en sangre total, dado que este varía en función del análisis específico utilizado y su reactividad cruzada con metabolitos.

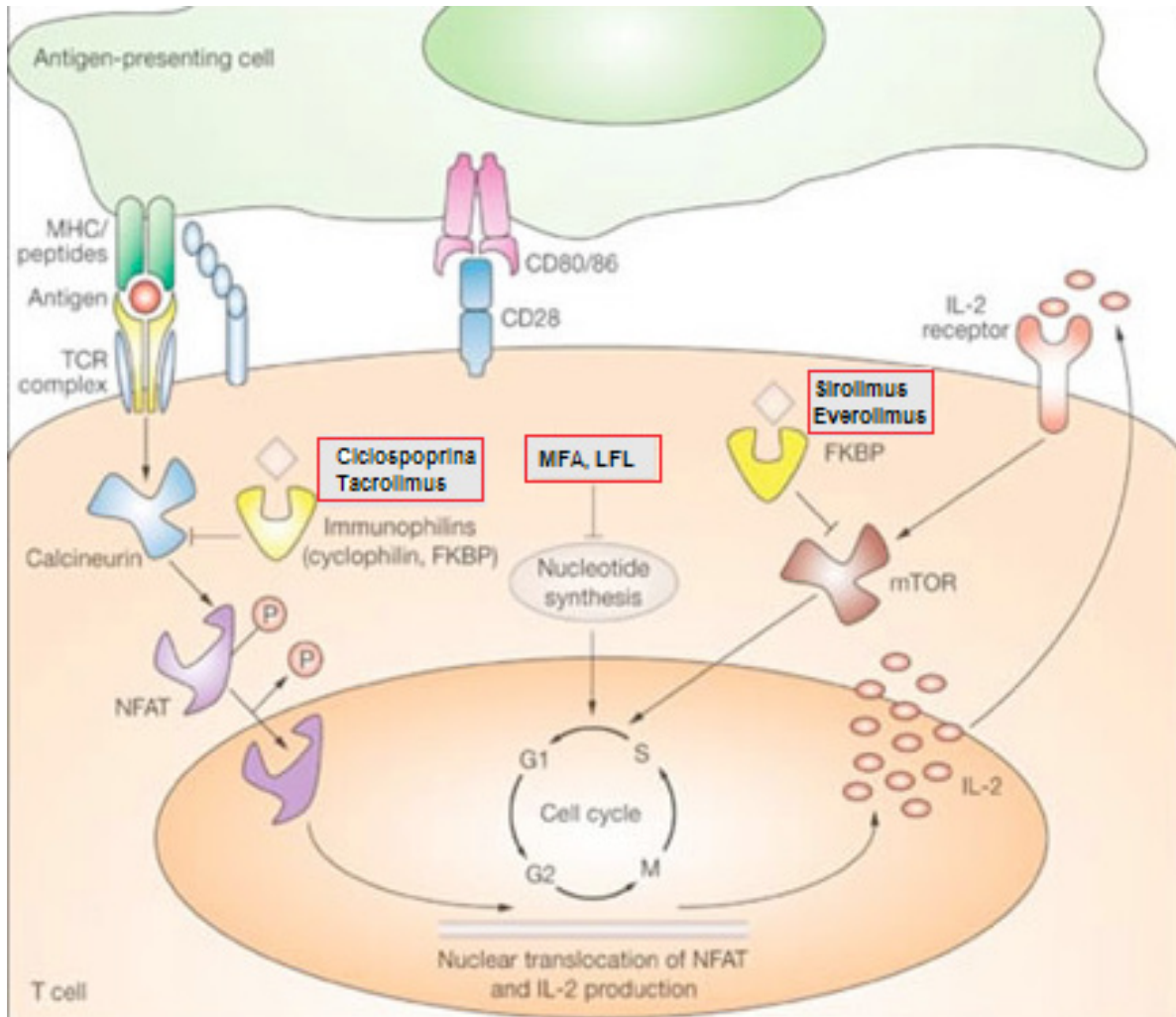
Los rangos terapéuticos óptimos están sujetos a diferentes factores, tales como el tipo de trasplante, medicamentos concomitantes administrados, estado clínico del paciente, tiempo transcurrido de tratamiento, toma de muestra, diferencias individuales de los pacientes, sensibilidad a los efectos inmunosupresores y toxicidad del medicamento, entre otros.

Rango terapéutico general: 1,3 – 3,5 µg/mL.

Nivel de toxicidad: > 12 µg/mL.

Figura N°1:

Mecanismos de acción de los siguientes inmunosupresores:



1. Ciclosporina, Tacrolimus
2. Sirolimus, Everolimus
3. Micofenolato (MFA).

Modificado de: Clinical Pharmacokinetics and Therapeutic Drug Monitoring of Sirolimus. Clin Ther 2000; 22 (Suppl. B): B 101-121.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Murray JE. Ronald Lee Herrick Memorial: June 5, 1931-December 27, 2010. *Am J Transplant* 2011; 11 (3): 419
2. Kahan, BD, Keown, P., Levy, GA, Johnston, A., Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clinical Therapeutics* 24 (2002) 330.
3. Holt DW, Denny K, Lee TD, et al. Therapeutic monitoring of sirolimus: its contribution to optimal prescription. *Transplant Proc* 2003; 35 (Suppl 3A):157S-161S.
4. Sedrani R, Cottens S, Kallen J, et al. Chemical modification of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplant Proc* 1998;(30) 2192-2194.
5. Holt DW, Armstrong VW, Griesmacher A, Morris RG, Napoli KL, Shaw LM. International Federation of Clinical Chemistry / International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology working group on immunosuppressive drug monit. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 59-67.
6. Tietz. *Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood and David E. Bruns. Fifth edition. Ed. Elsevier, 2012.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). *Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline - Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004. NCCLS Document H18-A3.
8. Jimenes V, Casabó V y Sancho V (1997) *Manual de procedimientos para Farmacocinética Clínica*. Valencia:AFAHPE.
9. Masatomo M, Satoshiro M, Hiroto E, Yuzawa K, Matsubara K. Inter -Laboratory variability of current immunoassay methods for Tacrolimus among Japanese hospitals. *Biol. Pharm. Bull.* 2016; (39)1331-1337.
10. Christians U, Vinks A, Longman L, Clarke W, Wallemacq P, Gelder T, Renjen V, Marquet P, Meyer E. Impact of Laboratory practices on interlaboratory variability in therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs. *Therapeutic drugs monitoring* 2015; 37:718-24.
11. Wallemacq P, Armstrong V, BrunetM, Haufroid V, Holt D, Johnson A, Kuypers D, Le Meur Y, Marquet P, Oellerich M, Thervet E, Toenshoff B, UndreN, Weber L, Westley I, Mourad M. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation :Report of the European Consensus Conference. *Therapeutic drugs monitoring* 2009; 31:139-152.
12. Slatter M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U, Sewing KF. Cytochrome P450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rats. *Drug Metab Dispos* 1992; 20: 753-61.
13. Mac Donald A., Scaola J., Bunke JT, et al. Clinical Pharmacokinetics and Therapeutic Drug Monitoring of Sirolimus. *Clin Ther* 2000; 22 (Suppl. B): B 101-121.
14. Levy GA and col. C2 monitoring strategy for optimizing cyclosporine immunosuppression from the Neoral formulation. *BioDrugs* 2001; 15 (5); 279-290.