

# Monitoramento dos níveis de ciclosporina em sangue total em transplantes renais

P.V. BOTTINI, F.A. ALVES-CUNHA, M.A. MODA, M.I. SOUZA, C.R. GARLIPP

Departamento de Patologia Clínica – Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, Campinas, SP.

**RESUMO — INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.** Ciclosporina A é uma droga imunossupressora potente e efetiva no combate à rejeição de órgãos transplantados. No presente estudo, os autores avaliaram o emprego de um imunoenensaio monoclonal com fluorescência polarizada (FPIAm), como um método alternativo ao radioimunoensaio (RIA) para determinação dos níveis de ciclosporina em sangue total.

**MATERIAL E MÉTODOS.** Amostras de sangue de 65 pacientes submetidos a transplante renal foram colhidas em frascos com EDTA 12 horas após a última dose de ciclosporina, via oral. Os níveis de ciclosporina foram avaliados por meio de radioimunoensaio com anticorpo monoclonal e imunoenensaio monoclonal com fluorescência polarizada.

**RESULTADOS E CONCLUSÃO.** A análise estatística revelou um coeficiente de correlação entre os métodos de  $r = 0,9817$  e o teste  $t$  de Student pareado mostrou haver diferença estatisticamente significativa entre eles ( $p < 0,05$ ). A análise da regressão revelou que os métodos poderiam ser comparáveis por meio da equação  $Cya_{(FPIAm)} = 1,06 \times Cya_{(RIA)} + 5,8$ , mostrando que FPIAm é um excelente método alternativo ao RIA, com as vantagens de ser rápido, de fácil execução, reprodutível e com resultados comparáveis aos obtidos por RIA.

**UNITERMOS:** Ciclosporina. Transplante renal. Radioimunoensaio. Fluorescência de luz polarizada.

## INTRODUÇÃO

Ciclosporina A (Cya A) é uma droga imunossupressora potente e efetiva no combate à rejeição de órgãos transplantados. A dosagem a ser administrada ao paciente requer ajustes individuais, sendo, então, necessário um monitoramento constante de seu nível sérico a fim de se obter o máximo de efeito imunossupressor com um mínimo de efeitos tóxicos<sup>1</sup>.

Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) fornece determinações bastante precisas e específicas da concentração da droga, mas, por tratar-se de um método complexo, não é utilizada na rotina laboratorial<sup>2</sup>. O método laboratorial mais utilizado para o monitoramento de ciclosporina, até o momento, tem sido o radioimunoensaio com anticorpos monoclonais (RIA), por ser pouco influenciado pela concentração dos metabólitos da droga em questão. Apesar de o RIA apresentar resultados geralmente superiores aos obtidos por HPLC, a correlação entre esses resultados é bastante satisfatória<sup>3</sup>.

Em 1990, foi desenvolvido um imunoenensaio monoclonal específico para a ciclosporina (droga-mãe), utilizando fluoresceína como marcador e o sistema TDx — Abbott<sup>4</sup>. Tal metodologia somente recentemente passou a ser utilizada em nosso país. Assim sendo, o presente estudo teve por objetivo avaliar o

emprego de um imunoenensaio monoclonal, com fluorescência polarizada, como um método alternativo ao radioimunoensaio para determinação dos níveis de ciclosporina em sangue total de pacientes submetidos a transplante renal.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 65 amostras de sangue total de 65 pacientes (55% do sexo masculino e 45% do feminino) submetidos a transplante renal e em uso de ciclosporina por via oral. As amostras de sangue foram colhidas, em frascos com EDTA, 12 horas após a última dose da medicação e conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um período máximo de sete dias. Os níveis de ciclosporina em sangue total foram avaliados por meio de radioimunoensaio com anticorpo monoclonal (*Cyclo-Trac*<sup>®</sup> - Incstar Corporation) e por meio de imunoenensaio monoclonal com fluorescência polarizada (*TDxFLx*<sup>®</sup> — Abbott Laboratories).

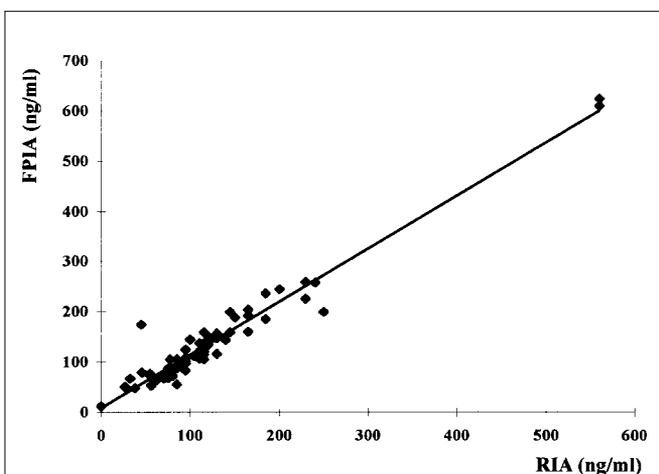
O coeficiente de variação intra-ensaio foi obtido a partir da dosagem de dez replicatas de três diferentes amostras de sangue. O cálculo do coeficiente de variação interensaio foi realizado a partir de 30 determinações, em dias consecutivos da concentração, de três controles comerciais com valores médios de 150ng/mL (120 a 180ng/mL),

**Tabela 1 – Precisão do ensaio FPIAm - TDx - Coeficiente de variação intra-ensaio**

Replicatas	10	10	10
Concentração média (ng/ml)	80	145	647
Desvio padrão (ng/ml)	1,3	1,1	12,3
Coeficiente de variação (%)	1,6	0,7	1,9

**Tabela 2 – Reprodutibilidade do ensaio FPIAm – TDx – Coeficiente de variação inter-ensaio**

Número de ensaios	30	30	30
Concentração média (ng/ml)	148	400	788
Desvio padrão (ng/ml)	5,5	12,7	38,3
Coeficiente de variação (%)	3,7	3,2	4,9



**Fig. – Correlação entre os valores de ciclosporina obtidos por RIA e FPIAm**

400ng/mL (360 a 440mg/mL) e 800ng/mL (680 a 920ng/mL).

A análise estatística foi realizada por meio do teste *t* de Student pareado, cálculo da matriz de correlação e análise da regressão. O nível de significância foi definido como  $\alpha$  igual a 0,05.

**RESULTADOS**

O estudo da precisão do FPIAm mostrou coeficiente de variação intra-ensaio inferior a 2% para as três amostras analisadas (tabela 1) e interensaio inferior a 5% para todos os controles testados (tabela 2).

A análise estatística dos resultados obtidos revelou um coeficiente de correlação entre os dois métodos de  $r = 0,9817$ , mostrando excelente concordância entre os métodos, embora o teste *t* de Student pareado tenha revelado uma diferença estatisticamente significativa entre eles ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3 – Comparação da FPIAm com RIA e HPLC**

Autor	Inclinação (slope)	Intersecção (intercept)	Coeficiente de correlação	Método comparado
Fuller <sup>9</sup>	0,98	37,3	0,98	RIA
McBride <sup>10</sup>	1,20	19,9	0,981	HPLC
Moyer <sup>11</sup>	1,19	79	0,97	HPLC
Sabate <sup>12</sup>	1,12	4,2	0,987	RIA
Winkler <sup>1</sup>	1,08	17,9	0,988	RIA
Yatscoff <sup>7</sup>	1,03	5,49	0,987	RIA
presente estudo	1,06	5,8	0,982	RIA

Por outro lado, a análise da regressão revelou que os métodos poderiam ser comparáveis por meio da equação  $Cya_{(FPIAm)} = 1,06 \times Cya_{(RIA)} + 5,8$ . (fig.).

**DISCUSSÃO**

As principais recomendações, com relação à dosagem de ciclosporina, dizem respeito a<sup>5,6</sup>:

1) Tempo de coleta: 11 a 12 horas após a última dose, se estiver fazendo uso da medicação duas vezes ao dia, ou 23 a 24 horas após a última dose, se estiver fazendo uso de dose única diária;

2) Periodicidade da dosagem: na maioria dos casos, no pós-transplante imediato, a frequência máxima recomendada é de uma dosagem a cada 24 horas;

3) Material: sangue total. O anticoagulante recomendado é o EDTA;

4) Estabilidade da amostra: ciclosporina em sangue com EDTA é estável por até sete dias em temperatura ambiente ou geladeira; para períodos de armazenagem superiores a sete dias, deve-se manter o material a -20°C;

5) Método de dosagem: deve-se utilizar um método específico e validado para a droga-mãe;

6) Metabólitos da Cya: não devem ser utilizados como referência para o ajuste de dose da medicação, uma vez que sua atividade terapêutica e tóxica ainda não é bem estabelecida.

O ensaio por FPIA com anticorpos monoclonais foi o primeiro ensaio semi-automatizado desenvolvido para a dosagem de ciclosporina<sup>4,7</sup> e, a partir daí, vários estudos foram realizados com a finalidade de se estabelecer a correlação dessa metodologia com aquelas anteriormente utilizadas (RIA e HPLC), empregando-se, na maioria das vezes, o cálculo do coeficiente de correlação para validar o novo ensaio.

É importante deixar claro que o coeficiente de correlação mostra a relação existente entre os resultados obtidos por dois métodos e não a concordância entre eles<sup>8</sup>. Além disso, a análise de regres-

são deve indicar sempre a inclinação da curva e o ponto de intersecção, e estes devem se situar em valores de 0,90 a 1,10 para a inclinação (*slope*) e de até 15ng/mL para a intersecção (*intercept*)<sup>6</sup>. No caso do presente trabalho, nossos resultados mostram boa correlação entre os métodos ( $r = 0,982$ ) e, embora haja diferenças significativas entre eles ( $p < 0,05$ ), a análise da regressão revela que eles podem ser comparados entre si, uma vez que os dados referentes à inclinação e à intersecção da curva obedecem aos critérios acima. A tabela 3 resume alguns estudos realizados, mostrando boa correlação entre os métodos analisados.

Vários estudos sobre precisão e reprodutibilidade do FPIAM foram realizados, mostrando tratar-se de um ensaio bastante preciso, com coeficientes de variação intra e interensaios inferiores a 5%<sup>1,7,9,10,11</sup>, sendo o mesmo observado no presente trabalho.

Ainda com relação ao FPIAM, é importante ressaltar que se trata de uma metodologia de rápida execução (demora média de 40 minutos para cada 20 amostras, contra 6 a 8 horas na determinação por radioimunoensaio), possibilitando maior agilidade na emissão de seus resultados, além de permitir a realização de dosagens em caráter de urgência em curto período de tempo. Embora seus custos sejam mais elevados do que quando se utiliza o RIA, estes são plenamente cobertos pelos honorários propostos na Lista de Procedimentos da Associação Médica Brasileira (AMB), bem como pelo próprio Sistema Único de Saúde (SUS).

Diante do exposto, os dados apresentados permitem concluir que a FPIAM é um excelente método alternativo ao RIA, com as vantagens de ser rápido, de fácil execução, reprodutível e com resultados comparáveis aos obtidos por RIA, sem apresentar as desvantagens do radioimunoensaio (tempo de validade dos reagentes, manipulação e descarte de material radioativo).

## SUMMARY

### Measuring cyclosporine in whole blood in kidney transplantation

**BACKGROUND.** Cyclosporin A is a potent immunosuppressive drug effective in combatting rejection following organ transplantation. In an effort to replace a radioimmunoassay (RIA) for whole blood determination of cyclosporine (Cya) we compared RIA with fluorescence polarization immunoassay (FPIAM).

**METHOD.** 65 blood samples were analysed from kidney transplanted patients. The samples were

collected into tubes containing EDTA as anti-coagulant and analysed by RIA and FPIAM.

**RESULTS.** The statistical analysis revealed a difference between both methods ( $p < 0.05$ ). The linear-regression comparison of Cya concentration measured by RIA and FPIAM showed the following relationship:  $Cya_{(FPIAM)} = 1.06 \times Cya_{(RIA)} + 5.8$  ( $r=0.9817$ ).

**CONCLUSION.** We conclude that FPIAM provides an alternative method for measuring cyclosporine in whole blood with the added advantages of being reasonably rapid, precise and easy to perform. [Rev Ass Med Brasil 1998; 44(3): 176-8.]

**KEY WORDS:** Cyclosporine. Kidney transplantation. Radioimmunoassay. Fluorescence polarization immunoassay.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Winkler M, Schumann G, Petersen D, Oellerich M, Wonigeit K. Monoclonal fluorescence polarization immunoassay evaluated for monitoring cyclosporine in whole blood after kidney, heart and liver transplantation. *Clin Chem* 1992; 38: 123-6.
2. Holt DW, Marsden JT, Johnston A. Measurement of cyclosporine: methodological problems. *Transplant Proc* 1986; 6 (suppl. 5): 101-10.
3. Johnston A, Marsden JT, Holt DW. The continuing need for quality assessment of cyclosporine measurement. *Clin Chem* 1989; 35: 1.309-12.
4. Wang P, Meucci V, Simpson E *et al.* A monoclonal antibody fluorescent polarization immunoassay for cyclosporine. *Transplant Proc* 1990; 22: 1.186-8.
5. Kahan BD, Shaw LM, Holt D, Grevel J, Johnston A. Consensus document: Hawk's Cay meeting on therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Clin Chem* 1990; 36: 1.510-6.
6. Shaw LM, Yatscoff RW, Bowers LD *et al.* Canadian consensus meeting on cyclosporine monitoring: report of the consensus panel. *Clin Chem* 1990; 36: 1.841-6.
7. Yatscoff RW, Copeland KR, Faraci CJ. Abbott Tdx monoclonal antibody assay evaluated for measuring cyclosporine in whole blood. *Clin Chem* 1990; 36: 1.969-73.
8. Kivistö KT. Misleading use of correlation and regression in method-comparison studies of cyclosporine. *Clin Chem* 1993; 39: 167-8. 167-8.
9. Fuller KA, Brown WS, Koenig JW, Eveland BJ, Scott MG. Specific measurement of cyclosporine concentration in whole blood: radioimmunoassay and fluorescence polarization immunoassay compared. *Clin Chem* 1991; 37: 2.150-2.
10. McBride JH, Kim SS, Rodgerson DO, Reyes AF, Ota MK. Measurement of cyclosporine by liquid chromatography and three immunoassays in blood from liver, cardiac and renal transplant recipients. *Clin Chem* 1992; 38: 2.300-6.
11. Moyer TP, Winkels J, Krom R, Wiesner R. Evaluation of Abbott Tdx monoclonal assay of cyclosporine in whole blood. *Clin Chem* 1991; 37: 1.120-1.
12. Sabaté I, Grácia S, Diez O, Alia P, Moliner R. Comparison of cyclosporine blood concentrations measured by radioimmunoassay and two nonisotopic immunoassays using monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1992; 38: 1.187-8.