

# MyCare™ Oncology Busulfan Assay Kit



Saladax Biomedical Inc.  
116 Research Dr.  
Bethlehem, PA 18015 EUA

Apoio ao Cliente  
Telefone: +1 (610) 419-6731  
Fax: +1 (484) 547-0590  
E-mail: Techsupport@saladax.com  
MyCareTests.com

<b>IVD</b>	Dispositivo de diagnóstico <i>in vitro</i>	<b>LOT</b>	Código do lote
	Consultar as Instruções de utilização		Fabricante
	Limitação de temperatura		Prazo de validade
<b>REF</b>	Número de catálogo	<b>EC</b> <b>REP</b>	Representante autorizado na Comunidade Europeia
<b>R1</b>	Reagente 1	<b>R2</b>	Reagente 2
(N) x	Inverta suavemente os reagentes (R1 e R2) N vezes antes de utilizar.		

## Indicações de utilização

O MyCare Oncology Busulfan Assay Kit é destinado à medição quantitativa *in vitro* de bussulfano em plasma humano heparinizado, utilizando analisadores de química clínica automatizados. As medidas obtidas podem ser utilizadas para ajudar na gestão de pacientes administrados com bussulfano por via intravenosa.

## Resumo e explicação do teste

O bussulfano (1,4-butanodiol dimetanosulfonato; Busulfex®) é um agente alquilante bifuncional indicado para utilização combinada com ciclofosfamida (CY) como um regime condicionante antes do transplante alogénico de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH) para leucemia mieloide crónica (LMC).<sup>1</sup> O bussulfano é também utilizado para mieloablação antes do transplante de células estaminais hematopoiéticas para outras doenças malignas, tais como a leucemia mieloide aguda, síndromes mielodisplásicas, leucemia linfática aguda e doenças não malignas, como síndromes metabólicas, hemoglobinopatia, imunodeficiência, entre outras.<sup>2</sup>

Para mieloablação anterior ao transplante, o bussulfano é frequentemente administrado como uma infusão de duas horas a cada seis horas durante quatro dias, para um total de 16 doses. A monitorização da terapêutica medicamentosa para o ajuste da dose de bussulfano é recomendada no folheto informativo de Busulfex para o primeiro ciclo de tratamento.<sup>1</sup> O objetivo terapêutico é a área abaixo da curva (AUC) de 56–86 mgxh/l (900-1350 µM min) para pacientes pediátricos.<sup>1</sup> Para calcular a AUC, são recolhidas amostras de sangue no final da infusão, quatro horas antes do início da infusão e antes da dose seguinte (mínima). Deve-se considerar a monitorização da terapêutica medicamentosa (TDM) do bussulfano, a fim de minimizar a síndrome de obstrução sinusoidal, diminuir as taxas de rejeição de enxertos e reduzir as taxas de recidivas.<sup>3</sup>

O MyCare Oncology Busulfan Assay Kit (patente dos EUA n.º 7,893,220) é um imunoensaio homogéneo de aglutinação de nanopartículas de dois reagentes utilizado na deteção de bussulfano em plasma humano. É baseado no princípio de avaliar as alterações na luz difusa ou absorvância que ocorrem quando as nanopartículas se agregam. Esta agregação é avaliada em comprimentos de onda entre 400 e 650 nm, utilizando analisadores de química clínica automatizados. A conjugação de medicamentos multivalentes serve como elo de ligação para anticorpos seletivos em termos de bussulfano que estão ligados de forma covalente à superfície das nanopartículas. Na ausência de bussulfano livre, esta reação cria amplos agregados, resultando numa solução que difunde a luz incidente e leva a um aumento da absorção observada da solução. Quando uma amostra que contém bussulfano é introduzida, a reação de aglutinação é parcialmente inibida. O anticorpo ligado ao medicamento de amostra já não está disponível para promover a agregação de nanopartículas, resultando numa menor difusão da luz incidente e numa redução da absorção observada da solução. Desta forma, a curva de inibição clássica respeitante à concentração de bussulfano é obtida

com a absorção máxima que ocorre com baixos níveis de medicamentos e com a absorção mínima que ocorre com elevados níveis de medicamentos. A monitorização destas alterações na luz difusa ou absorvância em função dos níveis de medicamento resulta numa curva dependente da concentração.<sup>4-5</sup>

## Reagentes

O kit contém reagente suficiente para 100 testes.\*

MyCare Oncology Busulfan Assay Kit <b>REF</b> BSF-RGT	Quantidade x Volume
Reagente 1 <b>R1</b> Tampão de reação que contém medicamentos conjugados e proteína numa solução tamponada	1 x 9,5 ml
Reagente 2 <b>R2</b> Reagente de nanopartículas que contém anticorpo monoclonal ligado a nanopartículas numa solução tamponada	1 x 9,5 ml

\*Dependente do analisador

## Advertências e precauções

- Apenas para utilização em diagnóstico in vitro.
- Tenha as precauções normais necessárias para o manuseamento de todos os reagentes laboratoriais.
- Siga as instruções de manuseamento do reagente. A mistura imprópria de reagentes pode afetar o desempenho do teste.
- Os materiais de origem humana foram testados em relação a VIH-1 e VIH-2, Hepatite B e Hepatite C através de métodos aprovados pela FDA e os resultados foram considerados negativos. No entanto, dado que nenhum método de teste pode eliminar o risco potencial de infeção com certeza absoluta, o material deve ser manuseado com o mesmo cuidado que uma amostra de um paciente. No caso de exposição, deverão ser seguidas as diretivas das autoridades de saúde responsáveis.
- Todos os componentes do teste de bussulfano contêm menos de 0,1% de azida de sódio. Evite o contacto com a pele e as membranas mucosas. Lave as áreas afetadas com água abundante. Procure assistência médica de imediato se os reagentes forem ingeridos ou entrarem em contacto com os olhos. Aquando da eliminação destes reagentes, lave sempre com água abundante para prevenir a acumulação de azida.

## Manuseamento do reagente

Os reagentes do teste de bussulfano estão prontos a utilizar.

Antes de utilizar, misture os reagentes invertendo-os delicadamente cinco vezes e evitando a formação de bolhas.

Misture os reagentes antes de os verter para qualquer transportador de reagente específico do analisador (secundário). Antes de colocar no analisador líquidos de transporte de reagente específicos do analisador (secundário), misture os reagentes invertendo-os delicadamente cinco vezes e evitando a formação de bolhas.

## Armazenamento e estabilidade

Armazene os reagentes refrigerados a uma temperatura entre 2 e 8 °C. Não congele.

Quando armazenados e manuseados conforme indicado, os reagentes não abertos permanecem estáveis até ao final do prazo de validade indicado no rótulo. O armazenamento impróprio de reagentes pode afetar o desempenho do teste.

## Recolha e manuseamento de amostras

É necessário plasma heparinizado com sódio.

Recolha amostras imediatamente após o final da infusão, a 4 horas do início da infusão, e imediatamente antes da infusão seguinte.

O bussulfano é instável. Mantenha amostras de sangue total em gelo triturado ou refrigeradas entre 2 e 8 °C. Centrifugue o sangue total e processe-o para plasma dentro de duas horas após a colheita. O plasma pode ser mantido refrigerado entre 2 e 8 °C por até 24 horas antes da análise.

Para um armazenamento mais prolongado do plasma, congele a amostra a -80 °C por até 12 meses e a -20 °C por até 3 meses. Não congele amostras de sangue total.

Certifique-se de que a amostra de plasma está descongelada e devidamente misturada antes de avaliar.

## Procedimento

### Teste

Para realizar o teste, consulte a folha de aplicação específica do instrumento e o manual do operador do analisador adequado.

### Instrumentos

Poderá ser necessário transferir os reagentes para recipientes de reagente específicos do analisador (consulte Manuseamento de reagentes).

### Materiais fornecidos:

**REF** BSF-RGT – MyCare Oncology Busulfan Assay Kit

### Materiais necessários – Fornecidos separadamente

**REF** BSF-CAL – MyCare Oncology Busulfan Calibrator Kit

**REF** BSF-CON – MyCare Oncology Busulfan Control Kit

### Procedimento de diluição de amostras

As amostras que contenham bussulfano em concentrações superiores a 2000 ng/ml podem ter uma diluição automática ou manual de 1:2 (1 parte de amostra mais duas partes de água) para a obtenção de um intervalo superior de 6000 ng/ml.

### Calibração

Para realizar a calibração, consulte a folha de aplicação específica do instrumento e o manual do operador do analisador adequado.

Realize uma calibração completa utilizando os seis calibradores do Busulfan Calibrator Kit. Verifique a calibração testando os controlos baixo, médio e elevado no Busulfan Control Kit.

### Frequência de calibração

A calibração é recomendada:

- Após a alteração do lote do kit reagente,
- Após a realização da manutenção mensal do instrumento,
- Conforme indicado, segundo os procedimentos de controlo de qualidade.

### Controlo de qualidade

Cada laboratório deverá estabelecer os seus próprios procedimentos de CQ para o teste de bussulfano. Todos os requisitos e testes de controlo de qualidade deverão ser efetuados em conformidade com os regulamentos locais, estaduais e/ou federais ou os requisitos de acreditação. Segundo as boas práticas laboratoriais, devem ser testadas, pelo menos, duas concentrações de controlo de qualidade em cada dia que sejam testadas amostras de pacientes e de cada vez que seja efetuada a calibração. Reavalie os objetivos e intervalos de controlo a seguir a uma alteração de lote de reagente (kit) ou controlo.

### Resultados

Os resultados do MyCare Oncology Busulfan Assay Kit são utilizados para calcular uma AUC ou  $C_{ee}$  (concentração em estado estável).

$$C_{ee} = \frac{AUC}{\text{frequência de dosagem}}$$

Os resultados são apresentados em ng/ml. O fator de conversão para  $\mu\text{M}$  é  $0,0041 \times \text{ng/ml} = 1 \mu\text{mol/l}$ .

### Limitações do procedimento

Tal como com todas as determinações de analito, o MyCare Oncology Busulfan Assay Kit deverá ser utilizado em conjunção com as informações disponíveis da avaliação clínica e outros procedimentos de diagnóstico.

O teste de bussulfano foi validado para plasma de heparina de sódio. Não utilize tubos de separação de plasma.

Não utilize amostras de controlo de proficiência ou de avaliação externa da qualidade que contenham solventes orgânicos.

À semelhança de qualquer teste que utiliza anticorpos de rato, existe a possibilidade de interferência por anticorpos antirrato humanos (HAMA) na amostra. As amostras que contenham este tipo de anticorpos podem potencialmente produzir resultados de bussulfano erróneos, inconsistentes com o perfil clínico do paciente.

Citalopram em concentrações de 5500, 3700 e 1900 ng/ml testado com 325 ng/ml de bussulfano elevou o resultado de bussulfano em 48%, 29% e 17%, respetivamente. Concentrações terapêuticas elevadas de citalopram podem provocar um desvio nos resultados.

## Valores esperados

A monitorização da terapêutica medicamentosa do bussulfano é utilizada para personalizar a dose para uma exposição-alvo como a área abaixo da curva de concentração-tempo (AUC) do plasma ou a concentração em estado estável. As concentrações são utilizadas para calcular a exposição do bussulfano como AUC.<sup>3</sup> As concentrações do fármaco bussulfano não devem ser a única forma de gestão medicamentosa terapêutica. O teste deve ser utilizado em conjunção com as informações disponíveis das avaliações clínicas e outros procedimentos de diagnóstico.

A AUC pode ser calculada através de várias formas, tais como a análise não compartimental utilizando a regra dos trapézios e modelos farmacocinéticos.<sup>2</sup>

## Dados de desempenho específico

Os dados de desempenho específico para o teste de bussulfano são indicados abaixo. Os resultados obtidos em laboratórios individuais podem diferir destes dados.

### Precisão

A precisão intralaboratorial e a repetibilidade foram observadas através do intervalo de medição, de acordo com a Diretriz EP05-A3 do CLSI.<sup>6</sup> Foram testados três controlos do Busulfan Control Kit e quatro conjuntos de plasma humano normal marcado com bussulfano (Enriquecimento 1, 2, 3, 4). As amostras foram testadas duas vezes por dia durante vinte dias, utilizando três lotes de reagentes e dois analisadores.

De seguida, são apresentados dados representativos de um lote de reagentes processados num analisador.

Tipo de amostra		Valor atribuído (ng/ml)	N	Média (ng/ml)	Repetibilidade	Intralaboratório
					%CV	%CV
Controlos	Baixo	225	80	250	4,6%	6,1%
	Médio	450	80	461	3,1%	3,9%
	Elevado	900	80	910	1,8%	2,8%
Plasma	Enriquecimento 1	325	80	328	4,7%	5,7%
	Enriquecimento 2	600	80	615	4,0%	4,8%
	Enriquecimento 3	1100	80	1124	2,1%	2,9%
	Enriquecimento 4	1500	80	1531	2,6%	3,1%

## Limite de quantificação (LoQ) e Limite de deteção (LoD)

Os limites inferiores de quantificação e deteção foram estabelecidos utilizando a Diretriz EP17-A2 do CLSI.<sup>7</sup>

LoQ

O LoQ foi determinado com um objetivo de precisão no LoQ de  $\leq 35\%$  de erro total (modelo Westgard). O LoQ do teste de bussulfano é de 187 ng/ml.

LoD

O LoD é o montante mais reduzido de analito que pode ser fiavelmente detetado ( $\geq 95\%$  de resultados superiores ao limite das amostras em branco). O LoD do teste de bussulfano é de 96 ng/ml.

## Intervalo de medição

O intervalo de medição do teste de bussulfano é de 187 a 2000 ng/ml.

## Especificidade

### Metabolismo

O bussulfano é predominantemente metabolizado pela conjugação com glutathione, tanto espontaneamente como por catálise da glutathione S-transferase (GST). Este conjugado é metabolizado oxidativamente de forma extensiva pelo fígado.<sup>1</sup> Os metabolitos observados no plasma e na urina incluem tetrahidrotiofeno (THT), THT-1-óxido, sulfolano e 3-hidroxi-sulfolano.<sup>8,9</sup>

A especificidade dos seguintes metabolitos e reagentes de reação cruzada foi testada na ausência e presença de bussulfano a 325 e 1500 ng/ml.

Composto	Testado a (ng/ml)	% de desvio
THT	100	2%
THT-1-óxido	500	3%
Sulfolano	800	3%
3-hidroxi-sulfolano	500	3%

Não foi observado qualquer desvio significativo em amostras com os seguintes interferentes endógenos nos níveis indicados.

Interferente	Nível	
Fator reumatoide	508 UI/ml	
Albumina de soro humano	10,7 g/dl	107 g/l
Imunoglobulina humana G	11,7 g/dl	117 g/l
Anticorpos antirrato humanos	100 ng/ml	
Interferência icterica	44 mg/dl	752 µmol/l
Interferência lipémica	711 mg/dl	8 mmol/l
Hemolisado	1025 mg/dl	
Ácido úrico	1,5 mg/dl	89 mmol/l

#### Reatividade cruzada

Os seguintes compostos não interferiram com o teste de bussulfano: o desvio do teste foi < 23%.

Composto	Testado a (ng/ml)	Composto	Testado a (ng/ml)
Acetaminofeno	200 000	Ácido acetilsalicílico	500 000
Aciclovir	66 000	Albuterol	1000
Alendronato de sódio	1000	Alopurinol	60 000
Alfatocoferol	129 300	Alprazolam	2000
Amantadina	10 000	Sulfato de amicacina	144 000
Amissulprida	1200	Amitriptilina	1000
Besilato de amlodipina	100	Amoxicilina	80 000
S (+)-anfetamina	1000	Azatioprina	2600
Baclofeno	3000	Benzatropina	600
Biotina	3600	Bupropiona	3000
Buspirona	20	Cafeína	108 000
Carbonato de cálcio	315 000	Carbamazepina	45 000
Cefalexina	200 000	Ceftriaxona	84 000
Celecoxib	10 000	Dicloridrato de cetirizina	4400
Clordiazepóxido	6900	8-cloroteofilina	3000
Cloridrato de clorpromazina	3300	Cimetidina	30 000
Ciprofloxacina	12 000	Clindamicina	51 000
Clofarabina	13 200	Clonazepam	300
Clotrimazol	2400	Codeína	2000
Cortisol	300	(-)-Cotina	2000
Ciclofosfamida	549 000	Ciclosporina	1800
Deferasirox	75 000	Desloratadina	600
Dextrometorfano	1000	Diazepam	30 000
Cloridrato de difenidramina	6000	Éster etílico de ácido docosaheptaenoico	150 000

Composto	Testado a (ng/ml)	Composto	Testado a (ng/ml)
Cloridrato de doxiciclina	35 000	Duloxetina	200
Eritromicina	138 000	Estradiol	1,2
Etanol	6 000 000	Etopósido	42 000
Fentanil	600	Fluconazol	25 500
Fludarabina	5200	Cloridrato de fluoxetina	1000
Flurazepam	500	Propionato de fluticasona	10
Ácido fólico	15	Gemcitabina	16 000
Sulfato de gentamicina	30 000	Ibuprofeno	500 000
Sulfato de indinavir	400	Itraconazol	6000
Canamicina	90 000	Lamivudina	10 500
Ácido L-ascórbico	60 000	Levetiracetam	180 000
Lidocaína	15 000	Lorazepam	1000
Meclizina	500	Melfalano	4500
Metotrexato	1 360 000	Metilprednisolona	7900
Metronidazol	123 000	Morfina	7800
Naproxeno sódico	500 000	Nicotina	1000
Ácido nicotínico	54 000	Nordazepam	5000
Omeprazol	8400	Ondansetrona	350
Oxazepam	5000	Oxicodona	500
Ácido pantoténico	1800	Penicilina G	30 000
Penicilina V	42 000	Fenobarbital	690 000
Fenitoína	60 000	Posaconazol	2100
Potássio EDTA	1000	Prednisolona	3000
Pregabalina	22 500	Procainamida	48 000

Composto	Testado a (ng/ml)	Composto	Testado a (ng/ml)
Proclorperazina	3500	Prometazina	1200
R,R-(-)-pseudoefedrina	10 000	S,S-(+)-pseudoefedrina	10 000
Cloridrato de piridoxina	100	Quinidina	15 000
Ranitidina	10 500	Retinol	4000
Riboflavina	200	Rifampicina	48 000
Ácido salicílico	500 000	Fluoreto de sódio	900
Heparina de sódio	50 U/ml	Sulfato de estreptomicina	258 000
Sulfametoxazol	400 000	Temazepam	5000
Cloridrato de tiamina	500	Tiotepa	30 000

Composto	Testado a (ng/ml)	Composto	Testado a (ng/ml)
Tobramicina	33 000	Topiramato	30 000
Cloridrato de trazodona	10 000	Triazolam	40
Trimetoprim	42 000	Ácido valproico	500 000
Vancomicina	120 000	Vitamina B12	1
Vitamina D2	1200	Vitamina K1	10
Voriconazol	18 000	Vorinostat	2800
Varfarina	75 000	Hemitartrato de zolpidem	5000
Zonisamida	120 000	Zopiclona	400

## Recuperação

A recuperação de bussulfano foi avaliada nos 3 controlos e foram medidos conjuntos clínicos para o estudo de desempenho de precisão EP05-A3. A percentagem de recuperação foi determinada dividindo a média da concentração observada de cada amostra pela concentração esperada de bussulfano. A média do desvio de recuperação foi de -1% a 4%.

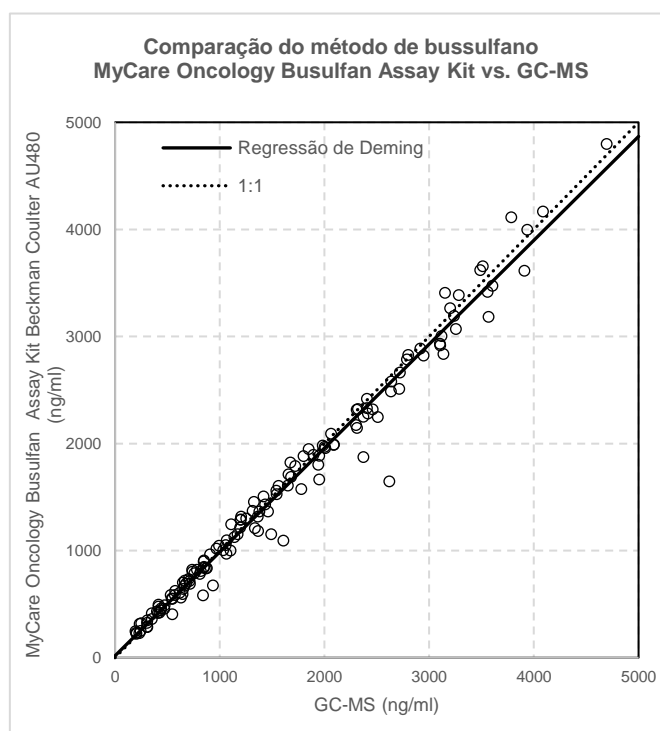
## Linearidade

A linearidade do teste de bussulfano foi verificada de acordo com a diretriz EP6-A do CLSI.<sup>6</sup> Onze amostras de linearidade abrangendo o intervalo de medição foram preparadas em plasma humano enriquecido com bussulfano. A regressão linear demonstrou uma inclinação de 1,000 (IC de 95%: 0,988–1,013) e uma interseção de 29 (IC de 95%: 14–45) com um R = 0,999. O desvio da linearidade (n=5) foi -12%. O teste foi linear ao longo do intervalo de medição de 187 a 2000 ng/ml.

## Comparação de métodos

Os resultados do teste de bussulfano foram comparados com um GC-MS validado, utilizando amostras de pacientes administrados com bussulfano, de acordo com a Diretriz EP09c do CLSI.<sup>10</sup> Foi realizada uma análise de regressão de Deming com 208 amostras de pacientes de bussulfano. Os resultados são apresentados para um lote.

Estatísticas de regressão Busulfan Assay Kit vs. GC-MS	
Inclinação	0,97
Interseção	18
Coefficiente de correlação (R)	0,9917
N	208
Intervalo de concentração (GC-MS)	171–4696



### **Referências no folheto informativo:**

1. Otsuka America Pharmaceutical I. Folheto informativo de Busulfex.
2. Bartelink IH, Lalmohamed A, van Reij EML, et al. Association of busulfan exposure with survival and toxicity after haemopoietic cell transplantation in children and young adults: a multicentre, retrospective cohort analysis. *Lancet Haematol.* 2016;3(11):e526-e536.
3. Palmer J, McCune JS, Perales MA, et al. Personalizing Busulfan-Based Conditioning: Considerations from the American Society for Blood and Marrow Transplantation Practice Guidelines Committee. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(11):1915-1925.
4. McNally AJ, Goc-Szcutnicka K, Li Z, Pilcher I, Polakowski S, Salamone SJ. An online immunoassay for LSD: Comparison with GC-MS and the Abuscreen RIA. *Journal of analytical toxicology.* 1996;20(6):404-408.
5. Li Z, Goc-Szcutnicka K, McNally AJ, et al. New synthesis and characterization of (+)-lysergic acid diethylamide (LSD) derivatives and the development of a microparticle-based immunoassay for the detection of LSD and its metabolites. *Bioconjugate chemistry.* 1997;8(6):896-905.
6. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
7. CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
8. Baselt RC. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 11th ed: Biomedical Publications; 2017.
9. Myers AL, Kawedia JD, Champlin RE, et al. Clarifying busulfan metabolism and drug interactions to support new therapeutic drug monitoring strategies: a comprehensive review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017;13(9):901-923.
10. CLSI. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. 3<sup>rd</sup> ed. CLSI guideline EP09c. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2018.

© 2023, Saladax Biomedical, Inc.

MyCare™ é uma marca comercial da Saladax Biomedical, Inc. Todos os outros nomes de produtos e marcas comerciais são propriedade dos seus respetivos proprietários.