

# MyCare™ Oncology Busulfan Assay Kit



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



Assistenza ai clienti  
Telefono: +1 (610) 419-6731  
Fax: +1 (484) 547-0590  
E-mail: Techsupport@saladax.com  
MyCareTests.com

<b>IVD</b>	Dispositivo diagnostico in vitro	<b>LOT</b>	Codice lotto
	Prima dell'utilizzo, consultare le istruzioni d'uso		Produttore
	Limiti di temperatura		Data di scadenza
<b>REF</b>	Codice prodotto	<b>EC REP</b>	Rappresentante autorizzato per la Comunità europea
<b>R1</b>	Reagente 1	<b>R2</b>	Reagente 2
(N) x	Prima dell'uso capovolgere delicatamente N volte i reagenti (R1 e R2)	<b>CE</b>	Marchio CE

## Istruzioni per l'uso

Il MyCare Oncology Busulfan Assay Kit è destinato alla misurazione quantitativa in vitro del busulfano nel plasma umano eparinizzato mediante analizzatori di chimica clinica automatizzati. Le rilevazioni ottenute possono essere utilizzate come ausilio nella gestione dei soggetti a cui è stato prescritto il busulfano per via endovenosa.

## Sommario e spiegazione del test

Il busulfano (1,4-butandiolo dimetansolfonato; Busulfex®) è un agente alchilante bifunzionale indicato per l'uso in combinazione con la ciclofosfamida (CY) come regime di condizionamento pre-trapianto allogenico di cellule staminali progenitrici ematopoietiche (HPCT) per la leucemia mieloide cronica (LMC).<sup>1</sup> Il busulfano viene utilizzato anche per la mieloablazione prima del trapianto di cellule staminali emopoietiche per altre malattie maligne come la leucemia mieloide acuta, le sindromi mielodisplastiche, la leucemia linfatica acuta e malattie non maligne come le sindromi metaboliche, l'emoglobinopatia e l'immunodeficienza.<sup>2</sup>

Per la mieloablazione pre-trapianto, il busulfano viene spesso somministrato mediante un'infusione di due ore ogni sei ore per quattro giorni, per un totale di 16 dosi. Il monitoraggio terapeutico per l'aggiustamento della dose di busulfano è raccomandato nel foglietto illustrativo del Busulfex per il primo ciclo di trattamento.<sup>1</sup> Il target terapeutico è l'area sotto la curva concentrazione/tempo (AUC) di 56- 86 mgxh/L (900-1350 µM min) per i pazienti pediatrici.<sup>1</sup> Per calcolare l'AUC, vengono prelevati campioni di sangue alla fine dell'infusione, quattro ore dopo l'inizio dell'infusione e prima della dose successiva (trough o livello minimo). Il monitoraggio terapeutico (TDM) del busulfano deve essere preso in considerazione per ridurre al minimo la sindrome da ostruzione sinusoidale, abbassare i tassi di rigetto del trapianto e ridurre i tassi di recidiva.<sup>3</sup>

Il MyCare Oncology Busulfan Assay Kit (brevetto USA n. 7.893.220) è un immunodosaggio omogeneo a due reagenti con agglutinazione di nanoparticelle utilizzato per la rilevazione del busulfano nel plasma umano. Il dosaggio si basa sul principio della misurazione delle variazioni della luce diffusa o dell'assorbanza risultante dall'aggregazione delle nanoparticelle. Questa aggregazione si misura a lunghezze d'onda comprese tra 400 e 650 nm, con l'ausilio di analizzatori automatici di chimica clinica. I coniugati multivalenti del farmaco fungono da elemento legante con gli anticorpi selettivi per il busulfano, con legame covalente alla superficie delle nanoparticelle. In assenza di busulfano libero, questa reazione crea grossi aggregati, generando una soluzione che diffonde la luce incidente e determina un aumento nell'assorbimento osservato della soluzione stessa. L'introduzione di un campione contenente busulfano inibisce parzialmente la reazione di agglutinazione. Gli anticorpi legati al campione di farmaco non sono più disponibili per indurre l'aggregazione di nanoparticelle, con conseguente minore diffusione di luce incidente e riduzione dell'assorbimento osservato della soluzione. Si ottiene quindi una classica curva di inibizione rispetto alla concentrazione di busulfano, in cui l'assorbimento massimo ha luogo a bassi livelli di farmaco mentre l'assorbimento minimo si verifica a livelli elevati. Il monitoraggio delle variazioni nella luce diffusa o nell'assorbanza in funzione dei livelli di farmaco, determina una curva concentrazione-dipendente.<sup>4-5</sup>

## Reagenti

Il contenuto di reagente del kit è sufficiente per 100 test

MyCare Oncology Busulfan Assay Kit <b>REF</b> BSF-RGT	Quantità × Volume
Reagente 1 <b>R1</b> Tampone di reazione che contiene farmaco-coniugato e proteina in una soluzione tamponata	1 x 9,5 mL
Reagente 2 <b>R2</b> Nanoparticella reattiva contenente un anticorpo monoclonale legato a nanoparticelle in una soluzione tamponata	1 x 9,5 mL

\*Dipendente dall'analizzatore

## Avvertenze e precauzioni

- Per solo uso diagnostico in vitro.
- Adottare le precauzioni convenzionali richieste per la manipolazione di tutti i reagenti da laboratorio.
- Seguire le istruzioni per la manipolazione dei reagenti. Una inadeguata miscelazione dei reagenti può influenzare negativamente il risultato della prova.
- I materiali di origine umana sono stati testati per HIV1 e HIV2, epatite B e C con metodiche approvate dall'FDA e sono risultati negativi. Tuttavia, dato che nessun metodo di analisi può escludere con assoluta certezza il rischio potenziale di infezione, il materiale deve essere manipolato con la stessa cautela riservata ai campioni clinici. In caso di esposizione, seguire le direttive prescritte dalle autorità sanitarie competenti.
- Tutti i componenti del saggio di busulfano contengono meno dello 0,1% di azoturo di sodio. Evitare il contatto con la pelle e con membrane mucose. In caso di contatto, lavare le aree interessate con abbondanti quantità d'acqua. In caso di ingestione dei reagenti, o di loro contatto con gli occhi, consultare immediatamente un medico. Smaltire i reagenti usando sempre abbondanti quantità di acqua per evitare accumuli di azoturo.

## Manipolazione dei reagenti

I reagenti del saggio del busulfano sono pronti per l'uso.

Prima dell'uso, miscelare i reagenti rovesciando delicatamente il contenitore cinque volte, evitando la formazione di bolle.

Miscelare i reagenti prima di versarli in qualsiasi contenitore di reagenti (secondari) specifico per analizzatori. Prima di posizionare i contenitori dei reagenti (secondari) specifici dell'analizzatore, miscelare i reagenti rovesciando delicatamente il flacone cinque volte, evitando la formazione di bolle.

## Conservazione e stabilità

Conservare i reagenti in un ambiente refrigerato, a 2-8 °C. Non congelare.

Quando conservati e manipolati come indicato, i reagenti non ancora aperti rimarranno stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Una conservazione non corretta dei reagenti può influire sulle prestazioni del saggio.

## Raccolta e manipolazione dei campioni

È necessario plasma eparinizzato al sodio.

Raccogliere i campioni subito dopo la fine dell'infusione, a 4 ore dall'inizio dell'infusione e subito prima dell'infusione successiva.

Il busulfano è instabile. Conservare i campioni di sangue intero in una soluzione di ghiaccio umido o in frigorifero a 2-8°C. Centrifugare il sangue intero e convertirlo in plasma entro due ore dal prelievo. Il plasma può essere conservato in frigorifero a 2-8 °C per un massimo di 24 ore prima dell'analisi.

Per una conservazione più lunga del plasma, congelare il campione a -80 °C per un massimo di 12 mesi e a -20 °C per un massimo di 3 mesi. Non congelare i campioni di sangue intero.

Assicurarsi che il campione di plasma sia scongelato e accuratamente miscelato prima della misurazione.

## Procedura

### Saggio

Per l'analisi del saggio, si rimanda alla scheda di applicazione specifica dello strumento e all'appropriato manuale per l'operatore dell'analizzatore.

## Strumenti

Potrebbe essere necessario trasferire i reagenti in contenitori di reagenti specifici per l'analizzatore (vedere Manipolazione dei reagenti).

### Materiali forniti:

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

### Materiali necessari – Forniti separatamente

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

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

### Procedura di diluizione del campione

I campioni contenenti più di 2.000 ng/mL di busulfano possono essere diluiti automaticamente o manualmente in rapporto 1:2 (1 parte di campione più 2 parti di acqua) per ottenere un intervallo superiore di 6.000 ng/mL.

### Calibrazione

Per eseguire una calibrazione fare riferimento alla scheda di applicazione dello strumento specifico e all'appropriato manuale per l'operatore dell'analizzatore.

Eseguire una calibrazione completa utilizzando i sei calibratori del Busulfan Calibrator Kit. Verificare la calibrazione testando i controlli basso, medio e alto del Busulfan Control Kit.

### Frequenza di calibrazione

La calibrazione è raccomandata:

- dopo la sostituzione di un lotto di kit di reagenti;
- dopo l'esecuzione della manutenzione mensile dello strumento;
- quando necessario, dopo le procedure di controllo di qualità.

### Controllo di qualità

Ogni laboratorio deve stabilire le proprie procedure di QC per il saggio del busulfano. Tutti i requisiti e i test di controllo qualità devono essere eseguiti in accordo con le normative e i requisiti di accreditamento locali, statali e/o federali. Secondo la buona pratica di laboratorio, almeno due concentrazioni di controllo di qualità devono essere analizzate ogni giorno in cui si esegue il dosaggio dei campioni dei pazienti e ogni volta che si esegue la calibrazione. Rivalutare i target e i range dei controlli dopo la sostituzione di un lotto di controlli o di (kit) reagenti.

### Risultati

I risultanti del MyCare Oncology Busulfan Assay Kit sono usati per calcolare un'AUC (area sotto la curva) o una  $C_{ss}$  (concentrazione allo stato stazionario).

$$C_{ss} = \frac{\text{Frequenza di dosaggio}}{AUC}$$

I risultati sono espressi in ng/mL. Il fattore di conversione da  $\mu\text{M}$  è:  $0,0041 \times \text{ng/mL} = 1 \mu\text{mol/L}$ .

### Limiti della procedura

Come per tutte le determinazioni degli analiti, il MyCare Oncology Busulfan Assay Kit deve essere utilizzato insieme alle informazioni disponibili provenienti dalla valutazione clinica e da altre procedure diagnostiche.

Il dosaggio del busulfano è stato convalidato per il plasma di eparina sodica. Non usare provette per la separazione del plasma.

Non utilizzare campioni di controllo qualità esterni o di laboratorio contenenti solventi organici.

Come per qualsiasi dosaggio che utilizza anticorpi murini, esiste la possibilità di interferenze da parte degli anticorpi umani antimurini (HAMA) nel campione. Potenzialmente è possibile che i campioni che contengono tali anticorpi producano risultati erronei, non in linea con il profilo clinico del paziente.

Il citalopram a concentrazioni di 5500, 3700 e 1900 ng/mL testato con 325 ng/mL di busulfano ha aumentato il risultato del busulfano rispettivamente del 48%, 29% e 17%. Elevate concentrazioni terapeutiche di citalopram possono causare uno scostamento nei risultati.

### Valori attesi

Il TDM del busulfano viene utilizzato per personalizzare la dose in base a un'esposizione target come area sotto la curva concentrazione-tempo (AUC) o concentrazione allo stato stazionario del plasma. Le concentrazioni di busulfano vengono utilizzate per calcolare l'esposizione al busulfano come AUC.<sup>3</sup> Le concentrazioni di Busulfano non devono essere l'unico strumento di gestione terapeutica del farmaco. Il dosaggio deve essere usato in combinazione con i dati forniti dalla valutazione clinica e da altre procedure diagnostiche.

L'AUC può essere calcolata con diversi metodi, come l'analisi non compartimentale con la regola trapezoidale e la modellazione farmacocinetica (PK).<sup>2</sup>

## Dati prestazionali specifici

Di seguito sono riportati i dati prestazionali tipici del saggio del busulfano. È possibile che i risultati ottenuti in altri laboratori differiscano da questi dati.

### Precisione

La precisione e la ripetibilità all'interno del laboratorio sono state verificate per tutto l'intervallo di misurazione secondo la linea guida EP05-A3 del CLSI.<sup>6</sup> Sono stati analizzati tre kit di controllo del busulfano e quattro gruppi di plasma umano normale addizionati con busulfano (Spike 1, 2, 3, 4). I campioni sono stati analizzati due volte al giorno per venti giorni, utilizzando tre lotti di reagenti e due analizzatori.

Di seguito sono riportati i dati rappresentativi di un lotto di reagenti testati su un analizzatore.

Tipo di campione		Valore assegnato (ng/mL)	N	Media (ng/mL)	Ripetibilità	
					%CV	In laboratorio %CV
Controlli	Basso	225	80	250	4,6%	6,1%
	Medio	450	80	461	3,1%	3,9%
	Alto	900	80	910	1,8%	2,8%
Plasma	Spike 1	325	80	328	4,7%	5,7%
	Spike 2	600	80	615	4,0%	4,8%
	Spike 3	1100	80	1124	2,1%	2,9%
	Spike 4	1500	80	1531	2,6%	3,1%

### Limite di quantificazione (LoQ) e Limite di rilevazione (LoD)

I limiti inferiori di quantificazione e di rilevazione sono stati definiti adottando le linee guida CLSI EP17-A2.<sup>7</sup>

LoQ

Il LoQ è stato determinato con un obiettivo di precisione del LoQ con errore totale  $\leq 35\%$  (Modello Westgard). Il LoQ del saggio di busulfano è di 187 ng/mL.

LoD

Il LoD corrisponde al valore più basso di analita correttamente rilevabile ( $\geq 95\%$  dei risultati superiori al limite di bianco). Il LoQ del saggio di busulfano è di 96 ng/mL.

### Gamma di misurazione

La gamma di misurazione del saggio di busulfano è di 187-2.000 ng/mL.

### Specificità

#### Metabolismo

Il busulfano viene prevalentemente metabolizzato per coniugazione con il glutatone, sia spontaneamente che per catalisi della glutatone S-transferasi (GST). Tale coniugato è sottoposto a un esteso metabolismo ossidativo nel fegato.<sup>1</sup> I metaboliti segnalati nel plasma e nelle urine includono il tetraidrotiofene (THT), il THT-1-ossido, il solfolano e il 3-idrossisolfurano.<sup>8,9</sup>

La specificità dei seguenti metaboliti e dei reagenti incrociati è stata testata in assenza e in presenza di busulfano a 325 e 1500 ng/mL.

Composto	Testato a (ng/mL)	% scostamento
THT	100	2%
Ossido THT-1	500	3%
Solfolano	800	3%
3-idrossisolfurano	500	3%

Non è stato osservato alcuno scostamento significativo dei campioni con i seguenti interferenti endogeni a livelli noti.

Interferente	Livello	
Fattore reumatoide	508 IU/mL	
Albumina sierica umana	10,7 g/dL	107 g/L
Immunoglobulina G umana	11,7 g/dL	117 g/L
Anticorpo umano antimurino	100 ng/mL	
Interferenza da ittero	44 mg/dL	752 $\mu$ mol/L
Interferenza da lipemia	711 mg/dL	8 mmol/L
Emolisato	1.025 mg/dL	

Interferente	Livello	
Acido urico	1,5 mg/dL	89 mmol/L

### Reattività incrociata

I componenti seguenti non hanno interferito con il saggio del busulfano: scostamento del saggio <23%.

Composto	Testato a (ng/mL)	Composto	Testato a (ng/mL)
Acetaminofene (Paracetamolo)	200.000	Acido acetilsalicilico	500.000
Aciclovir	66.000	Albuterolo (Salbutamolo)	1.000
Alendronato sodico	1.000	Allopurinolo	60.000
Alfatocoferolo	129.300	Alprazolam	2.000
Amantadina	10.000	Amikacina solfato	144.000
Amisulpride	1200	Amitriptilina	1.000
Amlodipina besilato	100	Amoxicillina	80.000
S (+)-amfetamina	1.000	Azatioprina	2.600
Baclofene	3.000	Benzatropina	600
Biotina	3.600	Bupropione	3.000
Buspirone	20	Caffeina	108.000
Carbonato di calcio	315.000	Carbamazepina	45.000
Cefalexina	200.000	Ceftriaxone	84.000
Celecoxib	10.000	Cetirizina dicloridrato	4.400
Clordiazepossido	6.900	8-cloroteofillina	3.000
Clorpromazina HCl	3.300	Cimetidina	30.000
Ciprofloxacina	12.000	Clindamicina	51.000
Clofarabina	13.200	Clonazepam	300
Clotrimazolo	2.400	Codeina	2.000
Cortisolo	300	(-)-cotinina	2.000
Ciclofosamide	549.000	Ciclosporina	1.800
Deferasirox	75.000	Desloratadina	600
Destrometorfano	1.000	Diazepam	30.000
Difenidramina HCl	6.000	Acido docosaesaenoico etile estere	150.000
Doxiciclina HCl	35.000	Duloxetina	200
Eritromicina	138.000	Estradiolo	1,2
Etanolo	6.000.000	Etoposide	42.000
Fentanil	600	Fluconazolo	25.500
Fludarabina	5.200	Fluoxetina HCl	1.000
Flurazepam	500	Fluticasone propionato	10
Acido folico	15	Gemicitabina	16.000
Gentamicina solfato	30.000	Ibuprofene	500.000

Composto	Testato a (ng/mL)	Composto	Testato a (ng/mL)
Indinavir solfato	400	Itraconazolo	6.000
Kanamicina	90.000	Lamivudina	10.500
Acido L-ascorbico	60.000	Levetiracetam	180.000
Lidocaina	15.000	Lorazepam	1.000
Meclozina	500	Melfalan	4.500
Metotrexato	1.360.000	Metilprednisolone	7.900
Metronidazolo	123.000	Morfina	7.800
Naproxene sodico	500.000	Nicotina	1.000
Acido nicotinico	54.000	Nordazepam	5.000
Omeprazolo	8.400	Ondansetron	350
Oxazepam	5.000	Oxicodone	500
Acido pantotenico	1.800	Penicillina G	30.000
Penicillina V	42.000	Fenobarbital	690.000
Fenitoina	60.000	Posaconazolo	2.100
Potassio EDTA	1.000	Prednisolone	3.000
Pregabalina	22.500	Procainamide	48.000
Prochlorperazina	3.500	Prometazina	1200
R,R (-)-pseudoefedrina	10.000	S,S (+)-pseudoefedrina	10.000
Piridossina HCl	100	Chinidina	15.000
Ranitidina	10.500	Retinolo	4.000
Riboflavina	200	Rifampicina	48.000
Acido salicilico	500.000	Sodio fluoruro	900
Eparina sodica	50 U/mL	Streptomicina solfato	258.000
Sulfametoxazolo	400.000	Temazepam	5.000
Tiamina HCl	500	Tiotepa	30.000
Tobramicina	33.000	Topiramato	30.000
Trazodone HCl	10.000	Triazolam	40
Trimetoprim	42.000	Acido valproico	500.000
Vancomicina	120.000	Vitamina B12	1
Vitamina D2	1200	Vitamina K1	10
Voriconazolo	18.000	Acido idrossamico suberoylanilide	2.800
Warfarina	75.000	Zolpidem emitartrato	5.000
Zonisamide	120.000	Zopiclone	400

### Recupero

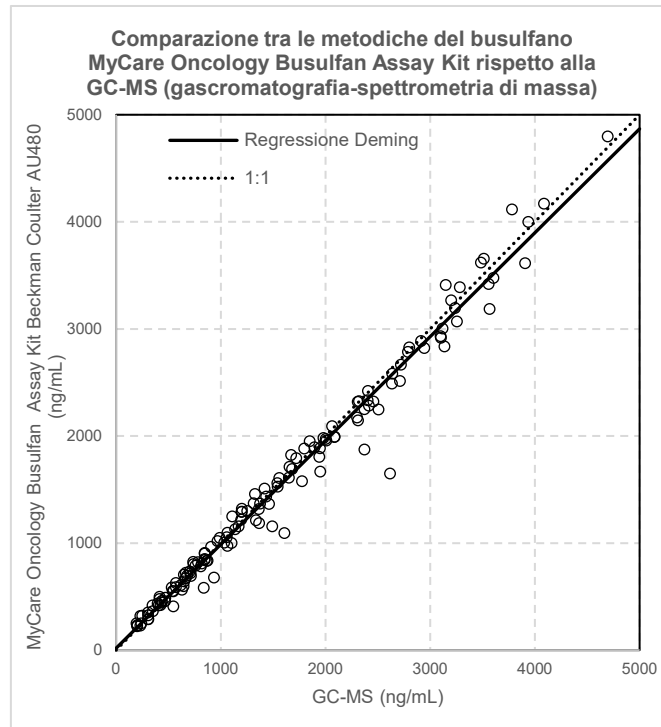
Nei 3 controlli è stato rilevato il recupero del busulfano e due serie di campioni clinici misurati per lo studio delle performance di precisione EP05-A3. Il recupero percentuale è stato determinato dividendo la concentrazione misurata di ogni campione per la concentrazione attesa di busulfano. La scostamento medio del recupero variava da -1% a 4%.

### Linearità

La linearità del saggio del busulfano è stata verificata attenendosi alle linee guida CLSI EP6-A.<sup>6</sup> Undici campioni di linearità che ricoprivano la gamma di misurazione sono stati preparati in siero umano rafforzato con busulfano. La regressione lineare ha fornito una pendenza di 1,000 (IC 95%: 0,988 - 1,013) e un'intercetta di 29 (IC 95%: 14 - 45) con un R = 0,999. La deviazione dalla linearità (n=5) è stata <12%. Il saggio è risultato lineare entro la gamma di misurazione da 187 a 2000 ng/mL.

## Comparazione delle metodiche

I risultati del saggio del busulfano sono stati confrontati con una GC-MS convalidata, utilizzando campioni di pazienti che assumevano busulfano secondo la linea guida EP09c del CLSI.<sup>10</sup> L'analisi della regressione di Deming è stata eseguita con 208 campioni di pazienti trattati con busulfano. Vengono qui riportati i risultati di un solo lotto.



Statistica di regressione Busulfan Assay Kit rispetto a GC-MS	
Curva	0,97
Intercettazione	18
Coefficiente di correlazione (R)	0,9917
N	208
Gamma di concentrazione (GC-MS)	171 – 4.696

## Bibliografia per il foglietto illustrativo

1. Otsuka America Pharmaceutical I. Busulfex Package Insert.
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-Szkutnicka 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-Szkutnicka 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.

© 2024, Saladax Biomedical, Inc.

MyCare™ è un marchio commerciale di Saladax Biomedical, Inc. Tutti gli altri nomi di prodotto e i marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi produttori.