

Confronto tra metodica FPIA su strumento TDx/FLx e metodica CLIA su strumento ADVIA Centaur per la determinazione della Ciclosporina A

A. Colatutto^a, M. Miatton^b, G. Barbina^a, U. Qualizza^a, L. Isola^a, E. Gianoli^c, F. Sirianni^b,
B. Della Vedova^b, C. Lazzi^b, P. Sala^a

^aDipartimento di Diagnostica di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Udine

^bLaboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Azienda Ospedaliera n°5, Palmanova (UD)

^cLaboratorio Analisi Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Trieste

Riassunto

Premesse. L'introduzione in terapia della Ciclosporina A ha rivoluzionato l'approccio terapeutico alla patologia trapiantologica oltre che a molte affezioni disreattive ed autoimmuni. Purtroppo il ristretto margine terapeutico della terapia con ciclosporina A ha reso necessario il monitoraggio terapeutico allo scopo di ottimizzarne il dosaggio e di razionalizzarne la posologia al fine di minimizzare gli effetti collaterali. La gran parte dei metodi di determinazione sono stati d'altro canto sempre gravati da una serie di complessi passaggi pre-analitici che ne hanno reso difficoltoso l'utilizzo soprattutto in regime di urgenza. In particolare, il dosaggio in HPLC (High Performance Liquid Chromatography), che rimane la metodica "gold standard", non è alla portata di tutti i laboratori ed è particolarmente indaginoso. **Metodi.** Nel nostro studio abbiamo determinato il dosaggio della ciclosporina nel sangue di 100 campioni per confrontare due metodiche, FPIA (Fluorescent Polarized Immuno Assay) su strumentazione TDx/FLx (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064 USA), che pure presenta una fase preanalitica relativamente complessa,

versus CLIA (Chemo Luminescent Immuno Assay) su strumentazione ADVIA Centaur (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY 10591-5097 USA), in cui la fase preanalitica è ridotta al minimo, allo scopo di verificare la correlazione dei due metodi.

Ciò al fine di valutare la possibilità rendere il dosaggio della ciclosporina monoclonale attuabile anche da laboratori operanti in realtà più ridotte, soprattutto in regime di urgenza, e di verificare altresì l'attuabilità di un'efficace automazione per le grosse serie.

Risultati. Dai dati ottenuti emerge un'ottima correlazione tra le due metodiche, soprattutto per valori di Ciclosporina >190 ng/ml. Il metodo CLIA inoltre presenta, oltre alla prospettata semplicità delle fasi pre-analitiche, una ottima sensibilità funzionale (36 ng/ml).

Conclusioni. Alla luce dei nostri risultati, abbiamo ragione di ritenere che il metodo CLIA per le sue caratteristiche di affidabilità, ripetibilità, facile ed immediata esecuzione con minima fase preanalitica possa adeguatamente sostituire nella routine la procedura in HPLC e la metodica in FPIA.

Summary

Cyclosporin A dosage: A comparison between FPIA (Fluorescent Polarized Immunoassay) and CLIA (Chemo Luminescent Immuno Assay) methods

Background. Cyclosporin A (CsA) has revolutionized the

management of allografts since the early 1980s, and has been used clinically to treat numerous conditions, including uveitis, psoriasis and nephrotic syndrome. However, the drug's narrow therapeutic window and variable pharmacokinetics have made it difficult to establish the drug's optimal use and dosage.

Therefore, it is critical to monitor CsA blood concentrations to ensure the establishment and maintenance of an appropriate dosing regimen. Methods currently in use for monitoring CsA concentration in whole blood include HPLC, EMIT, RIA, FPIA (Fluorescent Polarized Immuno Assay), and recently CLIA (Chemo Luminescent Immuno Assay). Although the HPLC method has been considered the gold standard, the new FPIA and CLIA methods have replaced HPLC because they are more suitable for small laboratories.

Methods. the purpose of our study was to compare the CLIA method to the FPIA method. We tested 100 blood samples, collected in K₂EDTA, obtained from patients undergoing immunosuppressive therapy. Blood samples were collected both before, and in 16 pa-

tients two hours after drug administration of the next dose of CsA. The samples were analysed within two hours or were frozen at -20 °C.

Results. the sensitivity results from the two methods were superimposed on each other. Plotting the data on Bland Altman and elaborating them by linear regression revealed very good correlation between the methods.

Conclusions. we believe that the CLIA method, because of its easy and immediate execution and total automation, could replace the FPIA procedure and could be used even in small laboratories.

Key-words: Cyclosporin A, immunosuppressive therapy, FPIA, fluorescent polarized immunoassay, CLIA, chemoluminescent immunoassay

Introduzione

La ciclosporina (CsA) è un undecapeptide ciclico idrofobico che a partire dagli anni '80 ha trovato ampio impiego nella terapia delle patologie disreattive e autoimmuni, ma è nella prevenzione del rigetto post trapianto che ha determinato una vera e propria rivoluzione¹⁻⁶.

Il ristretto margine terapeutico della ciclosporina ha d'altro canto spinto i patologi clinici e i farmacologi clinici sia allo studio della dose ottimale di somministrazione, che della migliore metodica di determinazione del farmaco per il monitoraggio terapeutico.

Infatti, una delle maggiori difficoltà insite nell'ottimizzazione del dosaggio della terapia con la ciclosporina è data proprio dalla difficoltà di definire il range terapeutico più appropriato per le varie patologie.

Tale oggettiva difficoltà è in relazione anche con la metodica di laboratorio adottata per la determinazione del farmaco. Allo stato attuale delle conoscenze il gold standard per il dosaggio della ciclosporina è il metodo in HPLC (Cromatografia Liquida ad Elevata Prestazione), che senza dubbio è il più specifico ed il più sensibile ed è in grado di identificare i diversi metaboliti, però non è un metodo adattabile all'urgenza, non è alla portata di tutti i laboratori di analisi e presenta una fase preanalitica complessa ed indaginoso che mal si adatta a grossi carichi di lavoro.

Recentemente è stata introdotta sul mercato, in aggiunta alle note determinazioni in RIA, ACMA, CEDIA, EMIT e FPIA una metodica alternativa per il dosaggio della ciclosporina, ovvero la determinazione CLIA (Chemo Luminescent Immuno Assay)⁷⁻¹¹.

Tra le varie caratteristiche favorevoli che possono determinare il successo del metodo in valutazione quella che ha suscitato maggiore interesse è il fatto che si possa utilizzare anche in regime di urgenza e soprattutto non necessiti di una fase preanalitica particolarmente indaginoso.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare la metodica in FPIA (Abbott) che è utilizzata sul

TDx/FLx con la metodica CLIA su analizzatore ADVIA Centaur, per la determinazione della ciclosporina monoclonale in soggetti in terapia cronica immunosoppressiva.

Materiali e metodi

Il dosaggio della ciclosporina è stato eseguito su 100 campioni di sangue intero prelevati in provette contenenti K₂EDTA da pazienti afferenti al dipartimento di Diagnostica di Laboratorio dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Udine.

I campioni sono stati dapprima aliquotati e poi una parte del campione è stata analizzata con il TDx FLx/ (Abbott) con metodica FPIA, la seconda aliquota è stata congelata a -20 °C e successivamente testata in CLIA con la strumentazione ADVIA Centaur.

Il pre-trattamento del campione di sangue per la determinazione in FPIA prevede diverse fasi preanalitiche ovvero l'aggiunta di una soluzione precipitante, l'aggiunta di una soluzione permeabilizzante, il passaggio al vortex, la centrifugazione a 10.000 giri/min per 5 minuti ed infine il passaggio del surnatante nella cuvetta che sarà posta nello strumento per l'analisi.

Il dosaggio ADVIA Centaur della Ciclosporina A è un immunodosaggio competitivo che utilizza la tecnica della chemiluminescenza diretta. La CsA presente nel campione compete con un derivato del farmaco marcato con estere di acridinio presente nel reagente Lite per una limitata quantità di anticorpo monoclonale anti - ciclosporina accoppiato a particelle paramagnetiche.

Alla fine della reazione, che utilizza 7,5 minuti di incubazione a 37 °C, vengono aggiunti un reattivo acido e poi uno basico per innescare la reazione chemiluminescente.

Il valore di unità relative di luce (RLU) rilevate dal detector è inversamente proporzionale alla concentrazione di CsA.

Il reattivo è pronto all'uso e necessita solo di una blanda agitazione prima di essere caricato sullo stru-

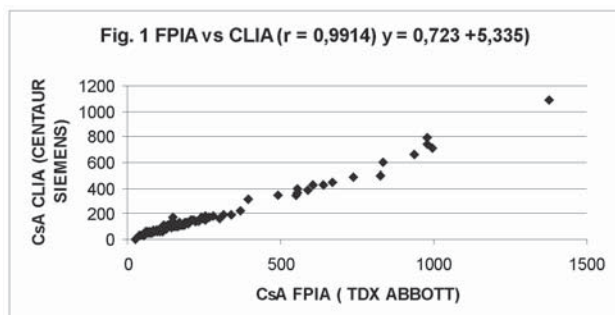


Figura 1. Correlazione delle due metodiche CLIA vs FPIA.

mento per rendere omogenea la fase solida.

Il dosaggio in CLIA è sottoposto ad un'unica fase preanalitica che consiste nell'agitazione e nell'aggiunta di 400 μ L di reagente pre-trattamento al campione, il tutto viene passato al vortex per una decina di secondi dopo di che si può passare direttamente alla fase analitica.

Per la determinazione dell'imprecisione del metodo su ADVIA CENTAUR sono stati utilizzati campioni di due livelli di concentrazione, e più precisamente il livello 2 e 3 del controllo Lyphocheck Whole Blood Biorad di valore rispettivamente 86 e 190 ng/mL.

È stato inoltre utilizzato un campione di concentrazione 37,86 ng/mL con valore prossimo a quello della sensibilità funzionale dichiarata dalla ditta fornitrice. Per la valutazione della variabilità interserie si è utilizzato il controllo 3 Lyphocheck Whole Blood Biorad (valore 190 ng/mL) eseguendo 14 ripetizioni in altrettante sedute analitiche.

Sono state eseguite altresì le prove di diluizione di 5 campioni di sangue a concentrazione di 408, 558, 776, 866, e 1054 ng/mL.

È stata infine aggiunta ciclosporina a varie concentrazioni fino ad un massimo di 1.900 ng/mL in campioni privi di farmaco, per calcolare successivamente i relativi recuperi.

La calibrazione è stata effettuata su due punti e rapportata alla master curve che fornisce una linearità fino a 2000 ng/mL e garantisce una stabilità di 28 giorni.

Risultati

La popolazione di dati di concentrazione forniti dalla metodica FPIA di campioni dosati per la CsA e la CsA 2 (dosaggio dopo 2 ore dall'assunzione del farmaco) varia nell'intervallo tra 25 e 1376 ng/mL; il dosaggio CLIA fornisce invece concentrazioni sensibil-

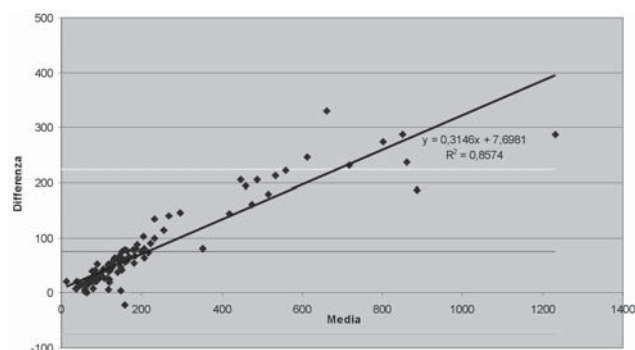


Figura 2. Analisi statistica secondo il test di Bland Altman.

mente meno elevate spaziando nell'intervallo tra 3 e 1089 ng/mL. La ragione per cui il valore della ciclosporina in FPIA è costantemente più elevato rispetto a quello fornito da CLIA come da altre metodiche è con ogni probabilità da ascrivere al fatto che in FPIA vengono determinati anche i metaboliti. Infatti, se si confrontano i risultati ottenuti con il metodo di riferimento, che è rappresentato dalla metodica in HPLC-MS, si nota come la sovrastima sia costituita dai vari metaboliti AM9, AM1 e AM4N, che sono ben definiti in HPLC-MS.

Elaborando le coppie di dati si verifica l'ottima correlazione dei metodi ($r=0,991$), riferita alla curva risultante dall'equazione ottenuta dai dati delle misurazioni in CLIA (Fig. 1).

Prendendo in considerazione solamente i dosaggi della CsA dopo 2 ore si rileva una correlazione minore ($r = 0,9836$), che però è rapportata ad una popolazione di numerosità assai ridotta ($n=16$).

La valutazione di imprecisione intra serie su campioni di diversa concentrazione (37,86 e 190 ng/mL) ha fornito CV da 3,146 % (campione 190 ng/dl) a 5,498 % (campione 37,86) (Tab. I).

Per quanto riguarda la valutazione della variabilità interserie, si è ottenuto su 14 ripetizioni in altrettante sedute analitiche un CV di 2,35 % (Tab. II).

I risultati delle prove di recupero e di diluizione sono riportati in Tabella III e IV.

Le due metodiche sono state infine confrontate con il test di Bland Altman, con il quale si evidenziano le differenze tra i due metodi presi in considerazione (Fig. 2).

Discussione

La Ciclosporina A, oltre ad essere a tutt'oggi il far-

Tabella I. Dati di imprecisione intra serie.

Campione	Media	Min	Max	σ	CV%
37 ng/mL	36,085	32,72	39,57	1,984	5,498
86 ng/mL	87,619	81,09	93,81	4,26	4,86
190 ng/mL	193,82	187,07	202,69	6,099	3,146

Tabella II. Dati di imprecisione inter serie.

<i>Campione</i>	<i>Media</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	σ	<i>CV%</i>
190 ng/mL	195,38	187,07	202,96	4,60	2,35

Tabella III. Risultati dei test di recupero.

<i>Aggiunta (ng/ml) conc iniziale 11</i>	<i>Valore osservato</i>	<i>Recupero %</i>
150	162	100.6
500	508	99.4
1000	1026	101.4
1900	1917	100.3
Media		100.7
<i>Aggiunta (ng/ml) conc iniziale 13</i>	<i>Valore osservato</i>	<i>Recupero %</i>
150	152	93.2
500	496	96.7
1000	1041	102.8
1900	1932	101
Media		98.4
<i>Aggiunta (ng/ml) conc iniziale 15</i>	<i>Valore osservato</i>	<i>Recupero %</i>
150	162	98.1
500	514	99.8
1000	999	98.4
1900	1939	101.2
Media		99.4
<i>Aggiunta (ng/ml) conc iniziale 14</i>	<i>Valore osservato</i>	<i>Recupero %</i>
150	154	93.9
500	510	99.2
1000	1026	101.2
1900	1874	97.9
Media		98.1

Media totale del recupero 99.15%

maco principe nella terapia antirigetto è utilizzata con successo in molte affezioni di natura disreattiva a probabile patogenesi autoimmune^{12,13}.

L'utilizzo terapeutico della ciclosporina nella pratica clinica quotidiana ha contribuito, in sinergia con l'affinamento delle tecniche chirurgiche, al concreto successo della terapia trapiantologica. Infatti, se è vero che allo stato attuale delle conoscenze il trapianto può essere considerato la terapia definitiva ed ideale per molte affezioni potenzialmente letali, il successo finale risulta pesantemente condizionato dalla possibilità di ottenere un'ottimale immunosoppressione¹³⁻¹⁹.

La terapia immunosoppressiva consente, infatti, di controllare la maggiore delle complicanze della terapia trapiantologica, cioè il rigetto, per la terapia del quale vi sono molti protocolli in uso nei vari istituti¹⁷.

Ogni protocollo comprende varie associazioni farmacologiche più o meno efficaci e più o meno tossiche, ma in ogni caso il ridotto margine terapeutico dei

singoli farmaci immunosoppressivi impone sempre un rigoroso e preciso monitoraggio terapeutico.

L'utilizzo sempre più esteso del monitoraggio farmacologico del trapianto e l'uso estensivo della terapia immunosoppressiva rendono pertanto necessari dei metodi semplici, affidabili e rapidi per il laboratorio²⁰⁻²⁴.

La ciclosporina in particolare è un farmaco con un ristretto margine terapeutico e pertanto sono frequenti le situazioni in cui vi è un reale pericolo di sovra-dosaggio e sotto-dosaggio, e rappresenta il prototipo del farmaco per il quale si rende necessario il monitoraggio terapeutico di laboratorio. Sino a pochi anni fa l'unico metodo di dosaggio che si poteva utilizzare per determinare la ciclosporina era costituito dalla Cromatografia Liquida ad Elevata Prestazione (HPLC)²⁴⁻²⁹.

La metodica in HPLC, pur rappresentando a tutt'oggi dal punto di vista analitico il "gold standard", non è proponibile quale metodo in urgenza per una

Tabella IV. Risultati dei test di diluizione.

<i>Diluizione</i>	<i>Osservato</i>	<i>Atteso</i>	<i>Recupero%</i>
		408	
1/2	212	204	103.9
1/4	100	102	98
1/8	56	51	109.8
Media recupero			103.9

<i>Diluizione</i>	<i>Osservato</i>	<i>Atteso</i>	<i>Recupero %</i>
		558	
1/2	284	279	101.7
1/4	144	139.75	103.2
1/8	67	69.75	96
Media recupero	100.3		

<i>Diluizione</i>	<i>Osservato</i>	<i>Atteso</i>	<i>Recupero%</i>
		1054	
1/2	539	527	102.3
1/4	272	263.5	103.2
1/8	138	131.75	104.7
Media recupero	103.4		

<i>Diluizione</i>	<i>Osservato</i>	<i>Atteso</i>	<i>Recupero%</i>
		866	
1/2	430	433	99.3
1/4	229	216.5	105.8
1/8	106	108.25	97.9
Media recupero			101

<i>Diluizione</i>	<i>Osservato</i>	<i>Atteso</i>	<i>Recupero%</i>
		776	
1/2	397	388	102.3
1/4	201	194	103.6
1/8	94	97	96.9
Media recupero			100.9

Media totale 101.9

serie di fattori quali la lunghezza e la complessità della fase pre-analitica: sono sempre più frequenti, infatti, le condizioni cliniche in cui è necessaria la determinazione del farmaco in regime di urgenza o comunque in tempi non compatibili con tale metodica.

Per velocizzare e semplificare la determinazione della Ciclosporina, sono stati immessi nel tempo sul mercato molti metodi immunometrici, che pur essendo fruibili anche in laboratori privi di strumentazione HPLC, presentano comunque per lo più problemi dovuti all'indaginosità della fase preanalitica (RIA, AC-MIA, CEDIA, EMIT e FPIA). E' stato recentemente introdotto un kit per la determinazione della ciclosporina A con fase preparativa estremamente ridotta (con tempi inferiori al minuto) e misurazione in CLIA su ADVIA CENTAUR con un Turn Around Time (TAT) che, data la mancanza di centrifugazione, è inferiore a trenta minuti²⁹⁻³⁵.

Pur tenendo conto della limitatezza della coorte di

pazienti che sono stati presi in considerazione nel nostro lavoro, va rimarcato il fatto che il risultato della comparazione tra la metodica CLIA versus FPIA che emerge dai dati statistici dei campioni analizzati è decisamente favorevole³⁶⁻⁴².

Analogamente ci sembra di poter affermare per quanto riguarda le prove di diluizione e di recupero effettuate.

La metodica CLIA ha dimostrato indubbi vantaggi operativi rispetto al metodo FPIA in quanto il campione ha un ridotto iter pre-analitico, inferiore ai 30 minuti (pescata da provetta primaria con sangue intero, aggiunta di reattivo di pre trattamento, agitazione e caricamento strumentale), mentre nell'altro metodo (FPIA), la fase di preparazione del campione è più articolata con aggiunta di soluzione precipitante e/o li-sante, centrifugazione ad elevato numero di giri, con separazione del surnatante e travaso dello stesso su coppette per l'analisi.

Un ulteriore aspetto positivo è offerto dalla linearità del metodo CLIA (fino a 2000 ng/ml) come evidenziato dai valori superiori (1900 ng/ml), ottenuti nelle prove di recupero; ciò consente, nel caso del dosaggio della concentrazione di CsA a due ore dalla somministrazione, di ridurre considerevolmente la necessità di diluizione del campione, in quanto il valore di fondo scala della curva di calibrazione viene superato raramente.

Infine è sicuramente positivo il fatto che la determinazione in CLIA avvenga su una strumentazione di grossa routine, con ottimi tempi di risposta che possono garantire la possibilità di richiedere questo test in regime di urgenza, considerando tra l'altro la criticità del tipo di paziente che viene sottoposto a questi dosaggi.

Non va trascurato infine il vantaggio offerto da questa metodica nell'impiego della risorsa umana, che viene sollevata dalla fase preanalitica, particolarmente gravosa nelle grandi serie.

Riteniamo, in conclusione, possibile ed auspicabile l'adozione di questa metodica, tenendo però prudentialmente attiva per un periodo la determinazione in doppio dell'analita, allo scopo di permettere ai clinici una familiarizzazione con i nuovi valori e intervalli terapeutici.

Bibliografia

1. Modry DL, Oyer PE, Jamieson SW, Stinson EB, Baldwin JC, Reitz BA, et al. Cyclosporine in heart and heart-lung transplantation. *Can J Surg* 1985; 28:274-80.
2. Iwatsuki S, Starzl TE, Todo S, Gordon RD, Esquivel CO, Tzakis AG, et al. Experience in 1000 liver transplants under cyclosporine-steroid therapy: a survival report. *Transplant Proc* 1988; 20 (Suppl 1):498-504.
3. Koo J. Cyclosporine in dermatology. Fears and opportunities. *Arch Dermatol* 1995; 131:842-5.
4. Meyrier A. Use of cyclosporin in the treatment of idiopathic nephrotic syndrome in adults. *Contrib Nephrol* 1995; 114:28-48.
5. Fathman CG, Myers BD. Cyclosporine therapy for autoimmune disease. *New Engl J Med* 1992; 326:1654-60.
6. De Smet MD, Nussenblatt RB. Clinical use of cyclosporine in ocular disease. *Int Ophthalmol Clin* 1993; 33:31-45.
7. Huet E, Morand K, Blanchet B, Astier A, Hulin A. Evaluation of the new heterogeneous ACMIA immunoassay for the determination of whole-blood cyclosporine concentrations in bone marrow, kidney, heart, and liver transplant recipients. *Transpl Proc* 2004; 36:1317-20.
8. Stettin M, Halwachs-Baumann G, Genser B, Fruehwirth F, Maerz W, Khoschrorur GA. Determination of cyclosporine A in whole blood: Comparison of a chromatographic method with three different immunological methods. *Talanta* 2006; 69:1100-1105. Disponibile su URL: <http://www.sciencedirect.com/locate/talanta> (data di consultazione: 5.2.2008).
9. Khoschrorur GA, Erwa W, Fruehwirth F, Stettin M, Meinitzer A, Hoebarth G, et al. High performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of cyclosporine A and its four major metabolites in whole blood. *Talanta* 2005; 65:638-43. Disponibile su URL: <http://www.sciencedirect.com/locate/talanta> (data di consultazione: 5.2.2008).
10. Niederberger W, Schaub P, Beveridge T. High-performance liquid chromatographic determination of cyclosporin A in human plasma and urine. *J Chromatogr* 1980; 182:454-8.
11. Vermillet L, Keller HP, Le Bigot JF, Humbert H. Determination of cyclosporine in plasma: specific radioimmunoassay with a monoclonal antibody and liquid chromatography compared. *Clin Chem* 1989; 35:608-11.
12. Johnston A, Holt DW. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 47:339-50.
13. Dumont RJ, Ensom MH. Methods for clinical monitoring of cyclosporin in transplant patients. *Clin Pharmacokinet* 2000; 38:427-47.
14. Lensmeyer GL, Fields BL. Improved liquid-chromatographic determination of cyclosporine, with concomitant detection of cell bound metabolite. *Clin Chem* 1985; 31:196-201.
15. Abisch E, Beveridge T, Grathwohl A, Niederberger W, Nussbaumer K, Schaub P, et al. Cyclosporin A: correlation between HPLC and RIA serum levels. *Pharm Weekbl Sci* 1982; 4:84-6.
16. Warrens AN, Waters JB, Salama AD, Lechler RI. Improving the therapeutic monitoring of cyclosporin A. *Clin Transplant* 1999; 13:193-200.
17. Gross AS. Best practice in therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 46:95-9.
18. Safarik K, Brozmanova H, Bartos V, Jegorov A, Grundmann M. Evaluation and comparison of whole blood levels of cyclosporin A and its metabolites in renal transplantation by HPLC and RIA methods. *Clin Chim Acta* 2001; 310:165-71.
19. Holt DW, Johnston A. Cyclosporin A: analytical methodology and factors affecting therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 1995; 17:625-30.
20. Price A, Gray TA, Bennet K, Cruise M. Comparison of three immunoassays methods for the measurement of cyclosporin. *Clin Chem Enzymol Commun* 1994; 6:163-74.
21. Steimer W. Performance and specificity of monoclonal immunoassays for cyclosporin monitoring: how specific is specific? *Clin Chem* 1999; 45:371-81.
22. Garraffo R. Critical analysis of the immunosuppressive activity and of the toxicity of cyclosporin metabolites. *Therapie* 1992; 47:311-7.
23. Wacke R, Drewlow B, Hehl EM, Riethling AK. Measurement of cyclosporin A in whole blood by RIA, EMIT and FPIA: a comparative study. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1992; 30:502-3.
24. Shah AK, Sawchuk RJ. Improved liquid-chromatographic determination of cyclosporine and its metabolites in blood. *Clin Chem* 1988; 34:1467-71.
25. Forre O. Cyclosporine in rheumatoid arthritis: an overview. *Clin Rheumatol* 1995; 14(S2):33-6.
26. Kahan BD, Grevel J. Optimization of cyclosporine therapy in renal transplantation by a pharmacokinetic strategy. *Transplantation* 1988; 46:631-44.
27. Ryffel B, Foxwell BM, Mihatsch MJ, Donatsch P, Maurer G. Biologic significance of cyclosporine metabolites. *Trans-*

- splant Proc 1988; 20:575-84.
28. Akhlaghi F, Trull AK. Distribution of cyclosporin in organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 615-37.
 29. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351:2715-29.
 30. Clase CM, Mahalati K, Kiberd BA, Lawen JG, West KA, Fraser AD, et al. Adequate early cyclosporin exposure is critical to prevent renal allograft rejection: patients monitored by absorption profiling. *Am J Transplant* 2002; 2: 789-95.
 31. Zucchelli GC, Pilo A, Chiesa MR, Scarlattini M, Bizollon CA. Progress report of an external quality assessment scheme for cyclosporine assay. *Ther Drug Monit.* 1996; 18: 273-9.
 32. Kahn GC, Shaw LM, Kane MD. Routine monitoring of cyclosporin in whole blood and in kidney tissue using high performance liquid chromatography. *J Anal Toxicol* 1986; 10:28-36.
 33. Brozmanova H, Grundmann M, Safarcik K, Jegorov A. High-performance liquid chromatography method for therapeutic drug monitoring of cyclosporin A and its two metabolites in renal transplant patients. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; 749:93-100.
 34. Andert SE, Grimm M, Schreiner MM, Muller MM. Therapeutic whole-blood levels of cyclosporin A in heart and lung transplantation. *Clin Chim Acta* 1994; 224: 159-66.
 35. Moyer TP, Johnson P, Faynor SM, Sterioff S. Cyclosporine: a review of drug monitoring problems and presentation of a simple, accurate liquid chromatographic procedure that solves these problems. *Clin Biochem* 1986; 19:83-9.
 36. Wallemacq PE, Alexandre K. Evaluation of the new AxSYM Cyclosporine assay: comparison with TDx monoclonal whole blood and Emit cyclosporine Assay. *Clin Chem* 1999; 45:432-5.
 37. Armijo JA, de Cos MA. Parent cyclosporin in whole blood by FPIA and EMIT after kidney, heart and liver transplantation. *Clin Biochem* 1994; 27:498-501.
 38. Shaw LM, Kaplan B, Kaufman D. Toxic effects of immunosuppressive drugs: mechanisms and strategies for controlling them. *Clin Chem* 1996; 42:1316-21.
 39. Hollis S. Analysis of method comparison studies. *Ann Clin Biochem* 1996; 33:1-4.
 40. Beresini MH, Davalian D, Alexander S, Toton-Quinn R, Barnett B, Cerelli MJ, et al. Evaluation of EMIT Cyclosporine assay for use with whole blood. *Clin Chem* 1993; 39:2235-41.
 41. Rosano TG, Freed BM, Cerilli B, Lempert N. Immunosuppressive metabolites of cyclosporin in the blood of renal allograft recipients. *Transplantation* 1986; 42:262-7.
 42. Kohlhaw K, Wonigeit K, Schafer O, Ringe B, Bunzendahl H, Pichlmayr R. Association of very high blood levels of cyclosporin metabolites with clinical complications after liver transplantation. *Transplant Proc* 1989; 21:2232-3.