

Cyclosporin A: Vergleichende Untersuchungen mit vier verschiedenen automatisierbaren monoklonalen Immunoassays zur Therapiekontrolle nach Nieren-, Knochenmark-, Herz-/Lungen- und Lebertransplantation

Cyclosporin A: Comparison of Four Automated Monoclonal Immunoassays in Patients after Kidney, Bone Marrow, Heart/Lung, and Liver Transplantation

A. Hamwi^{1,2}, Monika Fritzer-Szekeres¹, G. Männer¹, T. Szekeres¹

Zusammenfassung: Cyclosporin A (CsA) ist ein potentes Immunsuppressivum mit enger therapeutischer Breite und deutlicher intra- und interindividueller pharmakokinetischer Variabilität. Deshalb ist ein regelmäßiges Monitoring der CsA Spiegel notwendig. Im Routinelabor erfolgt dies aus dem Vollblut durch den Einsatz von automatisierbaren monoklonalen immunologischen Methoden, und zwar meist durch einen Fluoreszenz Polarisation Immunoassay (FPIA) von Abbott (Chicago, IL, USA) sowie einen „Enzyme Multiplied Immunoassay“ (EMIT) von Dade Behring (Frankfurt, Deutschland). Vor kurzem wurden zwei neue monoklonale CsA Immunoassays, nämlich ein modifizierter FPIA am AxSYM (Abbott) und ein „Cloned Enzyme Donor Immunoassay“ (CEDIA) von Roche (Mannheim, Deutschland), eingeführt. Zusätzlich wurde der bisherige EMIT Test von Dade Behring modifiziert. In dieser Studie wurden die 3 neuen CsA Immunoassays mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und der etablierten FPIA/TDx Methode verglichen. Wir analysierten CsA in 179 Vollblutproben von 127 Patienten nach Nieren-, Knochenmark-, Herz/Lungen- und Lebertransplantation. Alle 4 untersuchten CsA Immunoassays korrelierten gut mit der HPLC. Allerdings waren die CsA Meßwerte mit CEDIA, EMIT, FPIA/AxSYM und FPIA/TDx signifikant höher als die HPLC Werte, wobei der FPIA/TDx Test die größte Abweichung von der HPLC zeigte. Im Vergleich zu den anderen Patientengruppen zeigten Lebertransplantierte die größten Abweichungen zwischen dem immunologisch gemessenen CsA Konzentrationen und den HPLC Werten. Nachteilen einzelner Methoden, wie eine höhere Kreuzreaktivität mit CsA

Metaboliten (FPIA/TDx, CEDIA) oder ein eingeschränkter linearer Meßbereich (EMIT), stehen Vorteile, wie hohe Präzision (FPIA/TDx) oder eine einfache Probenvorbereitung (CEDIA), gegenüber.

Schlüsselwörter: Cyclosporin A/Blut; Transplantation; Antikörper, monoklonale; Chromatographie, Hochdruckflüssigkeits-; Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay; Immunozyntechniken.

Summary: Cyclosporin A (CsA) is a potent immunosuppressant drug with a narrow therapeutic index and intra- and interindividual variability in pharmacokinetics and metabolism. Therefore CsA concentrations have to be closely monitored. Presently, the 2 major automated monoclonal immunoassays for determination of whole blood CsA concentrations are a fluorescence polarization immunoassay (FPIA, TDx, Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA) and an enzyme multiplied immunoassay (EMIT, Dade Behring, Frankfurt, Germany). Recently, two new monoclonal immunoassays, an FPIA for the AxSYM by Abbott and a cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA, Roche, Mannheim, Germany) were introduced. In addition, Dade Behring improved their EMIT assay. The present study evaluated all three new methods in comparison with high performance liquid chromatography (HPLC) and the FPIA for the TDx analyzer. We measured whole blood CsA concentration of 179 samples obtained from 127 patients after kidney, bone marrow, heart/lung and liver transplantation. All 4 automated immunological methods tested correlated well with HPLC. However, CsA results with CEDIA, EMIT, FPIA/TDx and FPIA/AxSYM were significantly higher than HPLC values, whereby FPIA/TDx yielded highest deviation from HPLC. In comparison with other patient groups, liver recipients showed highest deviation of their CsA whole blood concentrations from the HPLC results. Disadvantages like higher crossreactivity (FPIA/TDx, CEDIA) or a limited linearity range (EMIT) are accompanied by advantages like a high precision (FPIA/TDx) or an easy sample handling procedure (CEDIA).

¹Klinisches Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik, Universität Wien

²Korrespondenzadresse: Dr. med. Ahmad Hamwi, KIMCL, Allgemeines Krankenhaus, Währinger Gürtel 18-20, A-1090 Wien, Österreich. Fax: +43-1-40400-5389

Eingegangen: 20. August 1999/Angenommen: 30. November 1999
Eine Arbeit ähnlichen Inhalts erscheint in englischer Sprache im American Journal of Clinical Pathology

Keywords: Cyclosporin A/blood; Transplantation; Antibodies, Monoclonal; Chromatography, High Pressure Liquid -; Fluorescence Polarization Immunoassay; Immunoenzyme Techniques.

Cyclosporin A (CsA) ist eines der potentesten Immunsuppressiva und wird weltweit zur Prävention von Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen eingesetzt. Außerdem findet CsA Verwendung in der Behandlung von verschiedenen Autoimmunerkrankungen [1]. Sein Einsatz wird allerdings durch eine hohe Toxizität und eine enge therapeutische Breite eingeschränkt. Darüber hinaus wird die Dosierung von CsA durch intra- und interindividuell unterschiedliche Pharmakokinetik und Metabolismus erschwert. Um das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen durch Überdosierung bzw. um die Abstoßung der transplantierten Organe bei Unterdosierung von CsA zu verhindern, ist ein regelmäßiges Monitoring der CsA Spiegel notwendig [2].

Im Routinelabor erfolgt das CsA Monitoring im Vollblut hauptsächlich durch den Einsatz von automatisierbaren monoklonalen immunologischen Methoden. Bis dato waren dies ein Fluoreszenz Polarisation Immunoassay (FPIA) von Abbott (Chicago, IL, USA) sowie ein „Enzyme Multiplied Immunoassay“ (EMIT) von Dade Behring (Frankfurt, Deutschland). Die Schwierigkeit bei der Bestimmung des CsA Spiegels mittels immunologischer Methoden sind die Kreuzreaktivitäten mit den verschiedenen Metaboliten [3]. Dies sind hauptsächlich die hydroxilierten AM1 und AM9, sowie die Metaboliten AM4n (demethyliert) und AM19 (dihydroxiliert). Als Referenzmethode zur Bestimmung von CsA Spiegeln gilt die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), da mittels HPLC die Muttersubstanz spezifisch bestimmt werden kann und die Miterfassung von CsA Metaboliten im Gegensatz zu immunologischen Methoden keine Rolle spielt [4].

Zuletzt wurden zwei neue monoklonale Immunoassays zur Bestimmung von CsA, nämlich ein modifizierter FPIA zur CsA Messung am AxSYM (Abbott) und ein „Cloned Enzyme Donor Immunoassay“ (CEDIA) von Roche (Mannheim, Deutschland) eingeführt. Zusätzlich wurde der bisherige EMIT Test von Dade Behring modifiziert, indem ein neues Reagenz zur Vorbehandlung der Vollblutprobe die Methanol-Extraktion ersetzt. Dieses neue Reagenz erlaubt die unproblematische Bestimmung von CsA aus offenen Probengefäßen an den verschiedenen klinisch-chemischen Analyzern. Die hauptsächlichsten Schwierigkeiten bei der Interpretation der CsA Meßergebnisse mit den verschiedenen Immunoassays liegen in den unterschiedlichen Kreuzreaktivitäten der eingesetzten Antikörper mit den CsA Metaboliten bzw. in den verschie-

denen Metabolitenmustern, die bei den unterschiedlichen Organtransplantationen auftreten [5].

In der vorliegenden Arbeit haben wir die zwei neuen monoklonalen Immunoassays zur Bestimmung von CsA Spiegeln, den CEDIA Test am Hitachi 911 (Roche) und die FPIA Methode am AxSYM, sowie den modifizierten EMIT Test am Hitachi 911 mit der Referenzmethode (HPLC) und mit der etablierten monoklonalen FPIA Methode am TDx verglichen. Es wurden insgesamt 179 Vollblutproben nach Nieren-, Knochenmark-, Herz/Lungen- sowie Lebertransplantation untersucht. Außerdem wurden die Kreuzreaktivitäten der verschiedenen CsA Immunoassays mit den Hauptmetaboliten AM1 und AM9 sowie AM4n und AM19 untersucht.

Material und Methoden

Patientenproben

Es wurden 179 Vollblutproben von transplantierten Patienten (Niere: 49 Proben; Knochenmark: 40 Proben; Herz/Lunge: 50 Proben; Leber: 40 Proben), die eine immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin A erhielten, analysiert. Die Probenabnahme erfolgte, zwecks Bestimmung des Talspiegels, am Morgen vor der Gabe der nächsten Dosis. Das Vollblut wurde in mit EDTA beschichteten Vacutainer Röhrchen der Firma Becton Dickinson abgenommen. Die Proben wurden dann bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und die Analysen innerhalb von 5 Tagen durchgeführt.

Kontrollproben

Für die Ermittlung der Präzision in der Serie verwendeten wir Vollblutpools mit Konzentrationen im niedrigen, mittleren und hohen Bereich. Zur Messung der Präzision von Tag zu Tag verwendeten wir kommerziell erhältliche Lyphocheck CsA Kontrollen (Levels 1-3) der Firma Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

CsA Metabolite

Cyclosporin A Metabolite mit einer Reinheit von >95% wurden freundlicherweise von der Firma Dade Behring zur Verfügung gestellt.

HPLC Methode

Für die HPLC Bestimmung von CsA im Vollblut verwendeten wir einen kommerziell erhältlichen Testkit der Firma Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland). Diese Methode basiert auf dem bereits beschriebenen HPLC-Verfahren nach Kabra et al. [6]. Der Test wurde auf einer HPLC Anlage von Bio-Rad entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die HPLC Methode wurde täglich rekaliert (Ein-Punkt-Kalibration, Standard: 395 µg/L).

CEDIA Immunoassay

Die Reagenzien für diesen neuen monoklonalen Cyclosporin A CEDIA Test stammten von der Firma Roche, Mannheim. Der Test wurde auf einem Hitachi 911 (Roche) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt [7]. Das Lysereagenz wurde dem

Nicht standardisierte Abkürzungen: AM, Cyclosporin A Metabolit; CEDIA, cloned enzyme immunoassay; CsA, Cyclosporin A; EMIT, enzyme-multiplied immunoassay test; FPIA, fluorescence-polarization immunoassay; HPLC, high-performance liquid chromatography.

Vollblut im Hitachi-Probengefäß direkt zugesetzt. Nach Mischen der Probe wurde das Hitachi-Probengefäß ohne Zentrifugationsschritt ins Gerät zur Analyse gestellt. Der Test basierte auf einer 2-Punkt Kalibration und hatte einen Meßbereich bis 620 µg/L (höchster Standard). Über einen Zeitraum von 8 Wochen waren 8 Kalibrationen notwendig.

EMIT Immunoassay

Die Reagenzien für diesen monoklonalen Cyclosporin A EMIT Test stammten von der Firma Dade Behring. Die Vorbehandlung des Vollblutes erfolgte mit dem neuen Reagenz (EMIT-NPT) als Ersatz für die bisherige Methanol-Extraktion. Der Test wurde auf einem Hitachi 911 entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt [8]. Der Test basierte auf einer 5-Punkt-Kalibration und hatte einen Meßbereich bis 500 µg/L (höchster Standard). Über einen Zeitraum von 8 Wochen waren 7 Kalibrationen notwendig.

FPIA/AxSYM Immunoassay

Die Reagentien für diesen neuen monoklonalen CsA FPIA Test stammten von Abbott Laboratories. Der Test wurde auf einem Abbott AxSYM Analyzer entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt [7]. Der Test basierte auf einer 6-Punkt-Kalibration und hatte einen Meßbereich bis 800 µg/L. Über einen Zeitraum von 8 Wochen waren 4 Kalibrationen notwendig, wobei 2 Reagenzienchargen verwendet wurden.

Monoklonaler FPIA/TDx Immunoassay

Die Reagentien für diesen monoklonalen CsA FPIA Test stammen von Abbott Laboratories. Der Test wurde auf einem Abbott TDx Analyzer entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt [5]. Der Test basierte auf einer 6-Punkt-Kalibration und hatte einen Meßbereich bis 1500 µg/L. Der Test wurde routinemäßig einmal pro Woche kalibriert (die von Tag-zu-Tag Variationskoeffizienten (VK%) waren 5,22%, 4,55%, 2,31% und 2,46% bei Konzentrationen von 70, 150, 400 bzw. 800 µg/L).

Statistische Auswertung

Die CsA Meßwerte der HPLC und der anderen 4 Bestimmungsmethoden wurden mit Hilfe der „EVAPAK for Windows“ (Version 3.0.2) Software basierend auf der Passing-Bablok Methode verglichen [9]. Der t-

Test und ANOVA-Test wurden zum Vergleich der verschiedenen Patientengruppen und Methoden angewandt. Dafür verwendeten wir das „JMP Software Package“ des SAS Institutes (Cary, NC, USA).

Ergebnisse

Präzision der Methoden

Zur Bestimmung der Präzisionen in der Serie wurden von drei Patientenprobenpools jeweils 20 Wiederholungen mit allen 5 Methoden durchgeführt. Die Variationskoeffizienten lagen für die niedrigste Konzentration zwischen 3,07% (FPIA/TDx) und 10,6% (CEDIA), für die mittlere Konzentration zwischen 1,90% (FPIA/TDx) und 6,84% (FPIA/AxSYM) bzw. für die hohe Konzentration zwischen 1,73% (FPIA/TDx) und 6,45% (FPIA/AxSYM) (Tabelle 1).

Zur Bestimmung der Präzisionen von Tag zu Tag wurden die Lyphocheck CsA Kontrollproben (Levels 1-3) jeweils an 20 verschiedenen Tagen mit allen 5 Methoden analysiert. Die Resultate sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Variationskoeffizienten lagen im niedrigen Bereich zwischen 4,25% (FPIA/TDx) und 8,9% (EMIT), im mittleren Bereich zwischen 3,04% (FPIA/TDx) und 8,01% (FPIA/AxSYM) bzw. im hohen Bereich zwischen 3,12% (FPIA/TDx) und 6,77% (FPIA/AxSYM).

In allen Kontrollbereichen zeigte die FPIA/TDx Methode, sowohl in der Serie als auch von Tag zu Tag, die beste Präzision.

Linearitätsbereiche der Methoden

Um die Linearität der CsA Methoden beurteilen zu können, wurde eine Patientenprobe mit einem Cyclosporinspiegel von 650 µg/L in einer Verdünnungsreihe (n=6) mit Vollblut eines gesunden Probanden analysiert. Jede Verdünnung wurde jeweils doppelt mit allen 5 Methoden analysiert. Die HPLC Methode war bis zu einer Verdünnung von 1:32 (25 µg/L) linear, der FPIA/TDx bis zu einer Verdünnung von 1:32 (30 µg/L), der FPIA/AxSYM bis zu einer Verdünnung von 1:16 (40 µg/L), der EMIT bis zu einer Verdünnung von 1:16 (60 µg/L) bzw. der CEDIA bis zu einer Verdünnung von 1:8 (70 µg/L) linear (lineare Regression mit Korrelationskoeffizient (r) = 0,99). Zuverlässige Messungen unterhalb dieser Werte waren mit der jeweiligen Methode nicht mehr möglich.

Tabelle 1 Präzision in Serie (n= 20). Zur Bestimmung der Präzisionen in der Serie wurden von 3 Patientenprobenpools mit niedriger, mittlerer und hoher CsA Konzentrationen, jeweils 20 Wiederholungen mit allen 5 Methoden gefahren. Mittelwert (µg/L), Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient% (VK%) sind angegeben.

	Niedrig Mittelwert	SD	VK%	Mittel Mittelwert	SD	VK%	Hoch Mittelwert	SD	VK%
HPLC	50,4	3,07	6,09	131,5	7,33	5,57	260,7	8,76	3,36
CEDIA	48,1	4,98	10,6	152,9	5,06	3,29	312,7	8,67	2,74
EMIT	78,6	4,09	5,35	153,5	7,56	4,05	307,7	16,7	4,88
FPIA (AxSYM)	68,2	4,17	6,27	174,6	10,2	6,84	292,9	20,0	6,45
FPIA (TDx)	106,5	3,23	3,07	215,0	4,08	1,90	397,2	7,19	1,73

Tabelle 2 Präzision von Tag zu Tag (n=20). Zur Bestimmung der Präzisionen von Tag zu Tag wurden die Lyphocheck CsA Kontrollen (Levels 1-3) jeweils an 20 verschiedenen Tagen mit allen 5 Methoden gemessen. Mittelwert ($\mu\text{g/L}$), Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient% (VK%) sind angegeben.

	Level 1			Level 2			Level 3		
	Mittelwert	SD	VK%	Mittelwert	SD	VK%	Mittelwert	SD	VK%
HPLC	86,3	6,53	7,56	187,7	12,0	6,37	387,0	21,8	5,63
CEDIA	78,5	6,87	8,75	200,6	10,9	5,41	447,9	14,0	3,13
EMIT	81,7	7,27	8,9	200,9	9,76	4,86	412,0	24,9	6,05
FPIA (AxSYM)	81,8	6,63	8,10	185,3	14,9	8,01	383,5	26,0	6,77
FPIA (TDx)	147,6	6,27	4,25	396,7	12,1	3,04	777,2	24,3	3,12

Tabelle 3 Kreuzreaktivität der Immunoassays mit CsA Metaboliten. Die angegebenen Ergebnisse (%) sind Mittelwerte (SD) von Doppel-Bestimmungen.

	AM1	AM9	AM4n	AM19
CEDIA	4,5 (0,4)	23,0 (0,8)	16,0 (0,5)	2,2 (0,2)
EMIT	<1 (0,4)	9,2 (0,8)	3,7 (0,1)	<1 (0,2)
FPIA (TDx)	7,1 (0,3)	18,2 (0,5)	1,4 (0,6)	1,8 (0,3)
FPIA (AxSYM)	5,5 (1,6)	13,7 (1,7)	2,1 (0,9)	2,5 (0,8)

Kreuzreaktivität mit CsA Metaboliten

Um die Kreuzreaktivitäten der 4 Immunoassays mit den CsA Metaboliten zu überprüfen, wurde ein Vollblutpool von gesunden Probanden mit 200 $\mu\text{g/L}$ CsA sowie mit jeweils 1000 $\mu\text{g/L}$ folgender Metaboliten aufgestockt: AM1 (M-17), AM9 (M-1), AM4n (M-21) und AM19 (M-8). Anschließend wurden die aufgestockten Proben mit und ohne Zusatz von Metaboliten in Doppelbestimmung untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Die FPIA/TDx Methode zeigte die höchste Kreuzreaktivität mit AM1 (7,1%), gefolgt von FPIA/AxSYM (5,5%) und CEDIA (4,5%). Im Gegensatz dazu zeigte der EMIT Test keine meßbare Kreuzreaktivität mit AM1 (<1%) bis zu einer Konzentration von 1 mg/L. Alle Immunoassays zeigten eine Kreuzreaktivität mit AM9, die bei der CEDIA Methode am höchsten (23%) und beim EMIT Test am niedrigsten (9,2%) war, FPIA/TDx, FPIA/AxSYM und EMIT zeigten vergleichbare Kreuzreaktivitäten mit AM4n (von 1,4% bis 3,7%), hingegen wies die CEDIA Methode eine Kreuzreaktivität von 16% auf. Alle Immunoassays zeigten geringe Kreuzreaktivitäten mit AM19, die von nicht meßbar (EMIT) bis 2,5% (FPIA/AxSYM) reichten.

Die EMIT Methode zeigte die geringsten Kreuzreaktivitäten mit den CsA Metaboliten AM1, AM9 und AM19. Außerdem zeigte der FPIA/AxSYM Test lediglich mit AM9 eine niedrigere Kreuzreaktivität als der FPIA/TDx Test (13,7 $\pm$ 1,7% versus 18,2 $\pm$ 0,5%), während beide Tests vergleichbare Kreuzreaktivitäten

mit den anderen Metaboliten (AM1, AM4n und AM19) aufwiesen.

Methodenvergleich

Die CsA Ergebnisse mittels CEDIA, EMIT, FPIA/AxSYM bzw. FPIA/TDx wurden mit den HPLC-Werten verglichen. Es wurden insgesamt 179 Patientenproben mit allen 5 Methoden analysiert. Die Korrelationskoeffizienten zwischen dem jeweiligen Immunoassay und der HPLC lagen zwischen 0,974 (CEDIA) und 0,979 (FPIA/TDx), wobei die Steigung der Regressionsgeraden zwischen 1,12 (EMIT versus HPLC) und 1,4 (FPIA/TDx versus HPLC) lag (Abbildung 1). Die Mittelwerte ($\pm$ SD) aller gemessenen CsA Spiegel waren zwischen CEDIA (136,5 $\pm$ 81,9), EMIT (135,6 $\pm$ 72,4) und FPIA/AxSYM (136,5 $\pm$ 75) vergleichbar, allerdings waren die Meßwerte, die mit FPIA/TDx erhoben wurden, signifikant ($p<0,01$) höher (Mittelwert $\pm$ SD: 176,6 $\pm$ 89,3) als die der anderen Assays. Alle Immunoassays lieferten allerdings signifikant ($p<0,001$) höhere CsA Ergebnisse als die HPLC (Mittelwert $\pm$ SD: 117,2 $\pm$ 66,0) (Abbildung 2).

Vergleich der CsA Spiegel in verschiedenen Patientengruppen

In Tabelle 4 sind die Patienten in vier verschiedenen Gruppen je nach transplantiertem Organ unterteilt worden (Niere, Knochenmark, Herz/Lunge und Leber). Die mit CEDIA, EMIT, FPIA/AxSYM und FPIA/TDx gemessenen CsA Spiegel in den verschiedenen Patientengruppen wurden jeweils mit den HPLC-Werten verglichen. In allen Gruppen fanden wir eine gute Korrelation zwischen den Immunoassays und der HPLC ($r=0,923$ bis 0,982). Allerdings lag die Steigung der Regressionsgeraden zwischen 1,03 (FPIA/AxSYM versus HPLC in der Gruppe der Nierentransplantierten) und 1,5 (FPIA/TDx versus HPLC in der Gruppe der Lebertransplantierten). Die CsA Mittelwerte der verschiedenen Patientengruppen waren stets höher als die gemittelten HPLC-Werte, wobei mit der FPIA/TDx Methode die höchsten Abweichungen von der HPLC gefunden wurden (51%-66% höher als HPLC-Werte). Die mit EMIT, FPIA/AxSYM und FPIA/TDx gemessenen CsA Spiegel zeigten bei Lebertransplantierten höhere Abweichungen von der HPLC-Werten als bei

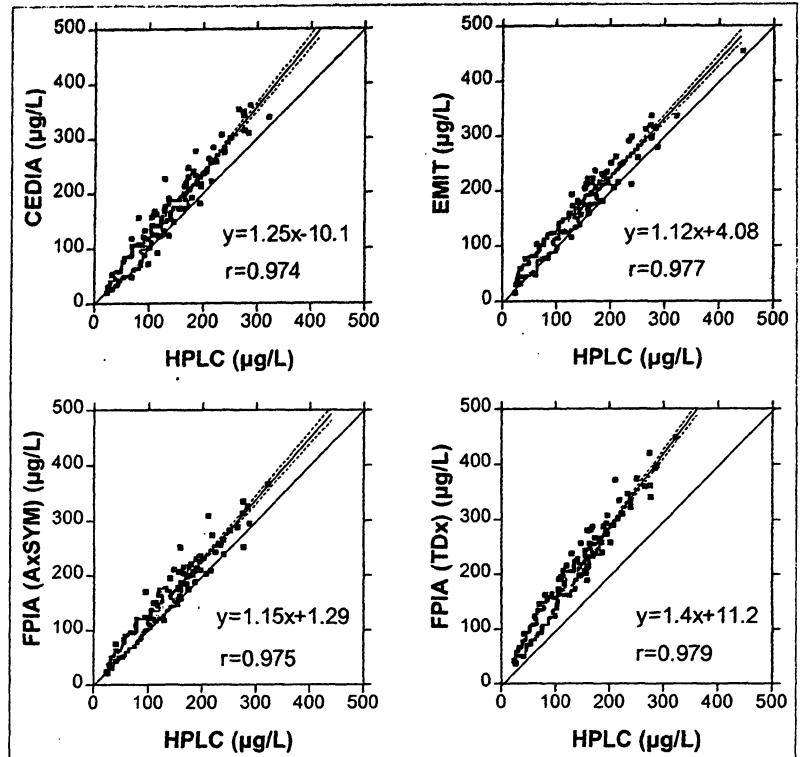


Abbildung 1 Methodenvergleich (Regressionsgerade nach Passing-Bablok) zwischen den verschiedenen CsA Immunoassays (CEDIA, EMIT, FPIA/AxSYM, FPIA/TDx) und der HPLC als Referenzmethode ($n=179$). Regressionsgleichungen und Korrelationskoeffizienten (r) sind angegeben.

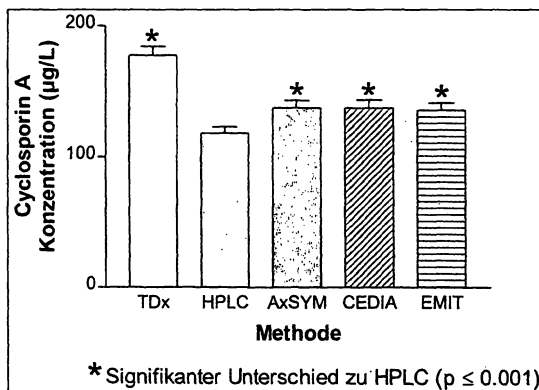


Abbildung 2 Graphische Darstellung der Mittelwerte (SEM) der CsA Konzentrationen ($n=179$) gemessen mit den verschiedenen Methoden. Die Mittelwerte ($\pm$ SD) waren für FPIA/AxSYM ($136,5 \pm 75,0$ µg/L), CEDIA ($136,5 \pm 81,9$ µg/L) und EMIT ($135,6 \pm 72,4$ µg/L) vergleichbar. Die TDx Meßwerte ($176,6 \pm 89,3$ µg/L) waren signifikant ($p < 0,01$) höher als die der anderen Immunoassays. Alle Immunoassays lieferten signifikant ($p < 0,001$) höhere Werte als die HPLC ($117,2 \pm 66,0$ µg/L).

Diskussion

Cyclosporin A ist das wichtigste Immunsuppressivum und wird daher weltweit zur Prävention der Abstoßung von Organtransplantaten eingesetzt. Aufgrund des engen therapeutischen Bereiches einerseits und der unterschiedlichen intra- und interindividuellen Pharmakokinetik andererseits, ist ein regelmäßiges Monitoring der CsA Spiegel notwendig. Die Referenzmethode zur Bestimmung von CsA ist die HPLC, weil nur diese Methode die Muttersubstanz von den Metaboliten unterscheiden kann [4]. Immunologische Methoden haben den Vorteil, daß sie automatisierbar sind; sie zeigen jedoch signifikante Kreuzreaktivitäten mit den CsA Metaboliten. Da diese Metabolite nur einen abgeschwächten immunsuppressiven Effekt haben, müssen immunologisch gemessene Konzentrationen mit der tatsächlichen biologischen Aktivität des CsA nicht immer übereinstimmen. Beispielsweise zeigt AM1 als aktivster Metabolit einen immunsuppressiven Effekt von nur 10-20% von CsA [10]. Die Kreuzreaktivität der FPIA/TDx Methode mit den CsA Metaboliten wurde früher beschrieben [11, 12]. Obwohl manche Autoren behaupteten, daß eine höhere Spezifität der anti-CsA Antikörper nicht unbedingt von klinischem Vorteil wären [13], empfehlen Consensus Richtlinien trotzdem den Einsatz von Immunoassays mit hoher Spezifität für die Muttersubstanz [14]. Aus diesem Grund setzen neuere Immunoassays Antikörper mit höherer Spezifität für CsA ein [14].

Tabelle 4 CsA Spiegel, gemessen mit verschiedenen Immunoassays (CEDIA, EMIT, FPIA/AxSYM, FPIA/TDx) im Vergleich zu HPLC Werten in 179 Vollblutproben von 127 Patienten nach Nieren-, Knochenmark-, Herz/Lungen- und Lebertransplantation

Gruppe	N	y = ax + b	Regressionsgerade (Passing / Bablock)					
			x (Mittelwert)	y (Mittelwert)	(y - x)% of x (Mittelwert)	95% Vertrauens- bereich für a	95% Vertrauens- bereich für b	r
y=CEDIA, x=HPLC								
Niere	49	y=1,31x - 14,22	89,6	104,5	14,1	1,219 - 1,407	-22,7 - -6,45	0,976
Knochenmark	40	y=1,25x - 2,54	144,8	177,3	22,2	1,123 - 1,366	-17,1 - +10,5	0,955
Herz/Lunge	50	y=1,24x - 13,33	147,0	168,2	13,4	1,144 - 1,315	-25,3 - +0,97	0,972
Leber	40	y=1,24x - 12,68	78,1	85,8	9,3	1,104 - 1,431	-24,3 - -1,59	0,923
y=EMIT, x=HPLC								
Niere	49	y=1,17x + 0,80	89,6	105,0	18,8	1,019 - 1,276	-7,11 - +11,8	0,968
Knochenmark	39	y=1,19x - 7,36	147,3	167,3	11,5	1,095 - 1,290	-19,2 - +1,92	0,976
Herz/Lunge	50	y=1,08x + 7,07	147,0	166,7	15,2	0,988 - 1,187	-5,43 - +18,1	0,962
Leber	40	y=1,15x + 7,70	78,1	95,5	24,6	1,021 - 1,304	-5,07 - +16,1	0,953
y=FPIA (AxSYM), x= HPLC								
Niere	49	y=1,03x + 5,07	89,6	97,5	10	0,971 - 1,117	-2,18 - +9,15	0,982
Knochenmark	40	y=1,14x + 3,66	144,8	170,7	18,6	1,061 - 1,246	-8,96 - +16,3	0,965
Herz/Lunge	50	y=1,13x + 2,50	147,0	170,5	17,5	1,036 - 1,213	-7,59 - +14,2	0,958
Leber	40	y=1,31x - 5,14	78,1	98,3	26,6	1,182 - 1,435	-13,4 - +5,0	0,961
y=FPIA (TDx), x=HPLC								
Niere	49	y=1,29x + 13,86	89,6	131,3	50,7	1,189 - 1,418	+4,6 - +19,6	0,973
Knochenmark	40	y=1,41x + 10,70	144,8	219,0	55,0	1,313 - 1,539	-2,1 - +23,9	0,972
Herz/Lunge	50	y=1,36x + 17,51	147,0	219,3	51,6	1,281 - 1,430	+7,7 - +29,4	0,981
Leber	40	y=1,50x + 7,25	78,1	127,2	65,6	1,393 - 1,660	-3,7 - +16,5	0,965

Wir fanden auch, daß die FPIA/TDx Methode signifikant ($p < 0,015$) höhere CsA Spiegel bei länger transplantierten Patienten (> 3 Monate nach Transplantation) als bei frisch transplantierten (< 3 Monate nach Transplantation) lieferte (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse könnten auf die relativ hohe Kreuzreaktivität des FPIA/TDx Assays mit den CsA Metaboliten (AM1: 7,1%, AM9: 18,2%) zurückzuführen sein. Das Metabolitenmuster in der Posttransplantationsphase ist Ziel weiterer Untersuchungen. Allerdings zeigt der FPIA/TDx wesentlich bessere Präzision ($VK = 1,73 - 4,25\%$) als alle anderen in dieser Studie untersuchten Immunoassays. Dies ist in Übereinstimmung mit den von *Gulbis* und Mitarbeitern veröffentlichten Daten [12].

Die Präzisionsstudie des neuen FPIA/AxSYM Immunoassays zeigte Variationskoeffizienten von 6,27% bis 8,1%; FPIA/AxSYM wies jedoch eine geringere Kreuzreaktivität mit dem Metaboliten AM9 und eine einfachere Handhabung als der FPIA/TDx Test auf. Obwohl beide FPIA Assays den gleichen Antikörper verwenden, wurden die Fällungsreagenzien und die Inkubationszeiten für die AxSYM Methode so modifiziert, daß eine bessere CsA Extraktion aus dem Vollblut und eine spezifischere Bindung des Analyten an den Antikörper erzielt werden konnten. Der verbesserte EMIT Test zeigte die geringste Kreuzreaktivität mit AM1, AM9 und AM19, während der CEDIA Immunoassay die höchsten Kreuzreaktivitäten mit AM9 und AM4n aufwies (AM9: 23%, AM4n: 16%).

Alle 4 Immunoassays (CEDIA, EMIT, FPIA/AxSYM und FPIA/TDx) korrelierten gut mit der HPLC Referenzmethode. Die Korrelationskoeffizienten reichten von 0,974 (CEDIA) bis 0,979 (FPIA/TDx). Der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung aller CsA Meßergebnisse war ähnlich für CEDIA, EMIT und FPIA/AxSYM und signifikant ($p < 0,01$) höher mit der FPIA/TDx Methode. Allerdings haben alle Immunoassays signifikant ($p < 0,001$) höhere Ergebnisse als die HPLC geliefert.

In den verschiedenen Patientengruppen (Nieren-, Knochenmark-, Herz/Lungen- und Lebertransplantierte) zeigten die CsA Meßergebnisse eine gute Korrelation zwischen den verschiedenen Immunoassays und der HPLC; die Korrelationskoeffizienten lagen zwischen 0,923 und 0,982. Die mit EMIT, FPIA/AxSYM und FPIA/TDx gemessenen CsA Spiegel zeigten bei Lebertransplantierten höhere Abweichungen von den HPLC-Werten als bei allen anderen Gruppen. Dies könnte auf einen gestörten Metabolismus nach Lebertransplantation zurückgeführt werden.

Beide FPIA Immunoassays zeigten einen akzeptablen linearen Meßbereich (FPIA/TDx: 30-1500 $\mu\text{g/L}$; FPIA/AxSYM: 40-800 $\mu\text{g/L}$). Hingegen war CEDIA lediglich zwischen 70 und 610 $\mu\text{g/L}$ bzw. EMIT zwischen 60 und 500 $\mu\text{g/L}$ linear. Obwohl der CEDIA einen eingeschränkten linearen Bereich aufwies, hat dieser Test als einziger von den untersuchten Methoden den Vorteil, daß die Probenvorbereitung keinen Zentrifugationsschritt beinhaltet.

Tabelle 5 Reihung der CsA Assays*

Methode	Einfachheit des Handling	Präzision von Tag zu Tag	Spezifität	Meßbereich	Korrelation mit HPLC
HPLC	4	3	1	2	-
CEDIA	1	3	4	3	1
EMIT	2	3	2	4	1
FPIA (AxSYM)	2	3	3	2	1
FPIA (TDx)	3	1	4	1	1

*1=sehr gut, 2=gut, 3=akzeptabel, 4=weniger akzeptabel

Schlussfolgerung

Alle untersuchten Immunoassays (CEDIA, EMIT, FPIA/AxSYM, FPIA/TDx) eignen sich für die routinemäßige CsA Spiegelbestimmung im Vollblut. Nachteile, wie eine höhere Kreuzreaktivität mit CsA Metaboliten (FPIA/TDx, CEDIA) oder ein eingeschränkter linearer Meßbereich (EMIT), können durch Vorteile, wie hohe Präzision (FPIA/TDx) oder eine einfache Probenvorbereitung (CEDIA), kompensiert werden. Vor- und Nachteile der 4 verschiedenen Immunoassays wurden in Tabelle 5 zusammengefaßt. Die FPIA/TDx Methode liefert signifikant höhere Werte als alle anderen untersuchten Methoden. Deshalb ist es wichtig, die verwendete Meßmethode zu wissen, um eine falsche Interpretation von CsA Konzentrationen im Vollblut zu vermeiden. Außerdem muß betont werden, daß die CsA Meßwerte mit EMIT, FPIA/AxSYM und FPIA/TDx bei Lebertransplantierten Patienten höhere Abweichungen von den HPLC-Werten als bei allen anderen Patientengruppen zeigten. Wünschenswert wäre eine internationale Standardisierung der verschiedenen CsA Assays. Außerdem würde eine höhere Spezifität der eingesetzten Antikörper maßgeblich zur Vereinheitlichung beitragen. Zusätzlich sollte eine höhere Präzision von CEDIA, EMIT und FPIA/AxSYM erreicht werden, da diese Tests aufgrund der von uns erhobenen von Tag-zu-Tag Daten den Richtlinien des „Lake Louise Consensus“ nicht entsprechen ($VK \leq 10\%$ bei $50 \mu\text{g/L}$ bzw. $VK \leq 5\%$ bei $300 \mu\text{g/L}$) [14].

Wir empfehlen, daß die CsA Therapiekontrolle bei einem Patienten immer mit derselben Methode erfolgt, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den Vorbefunden zu gewährleisten. Unsere Arbeit sollte Klinikern und Laborärzten einen Überblick über die derzeit verfügbaren automatisierbaren CsA Immunoassays liefern.

Danksagung

Wir danken Abbott Laboratories, Dade Behring und Roche Mannheim für ihre technische Unterstützung und für die Bereitstellung der Reagenzien. Wir danken auch recht herzlich *Elfriede Kretzel, Evelyn Piegler*

und *Harald Hajek* für Ihre ausgezeichnete technische Unterstützung.

Literatur

1. Kahan BD. Cyclosporin A. N Engl J Med 1989;32:1725-38.
2. Lindholm A. Therapeutic monitoring of cyclosporin A - an update. Eur J Clin Pharmacol 1991;41:273-83.
3. Beutler D, Molteni S, Zeugin T, et al. Evaluation of instrumental nonisotopic immunoassays (fluorescence polarization immunoassay and enzyme-multiplied immunoassay technique) for cyclosporin A monitoring in whole blood after kidney and liver transplantation. Ther Drug Monit 1992;14:424-32.
4. Kahan BD, Shaw LM, Holt D, et al. Consensus document: Hawk's Cay meeting on therapeutic drug monitoring of cyclosporine. Clin Chem 1990;36:1510-6.
5. Duscil LJ, Hackett LP, Chiswell GM, et al. Comparison of cyclosporin A measurement in whole blood by high-performance liquid chromatography, monoclonal fluorescence polarization immunoassay, and monoclonal enzyme-multiplied immunoassay. Ther Drug Monit 1992;14:327-32.
6. Kabra PM, Wall JH, Blanckaert N. Solid-phase extraction and liquid chromatography for improved assay of cyclosporin A in whole blood or plasma. Clin Chem 1985;31:1717-20.
7. Schütz E, Svinarov D, Schipkova M, Niedmann PD, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M. Cyclosporin whole blood immunoassays (AxSYM, CEDIA, and EMIT): a critical overview of performance characteristics and comparison with HPLC. Clin Chem 1998;44:2158-64.
8. Steimer W. Performance and specificity of monoclonal immunoassays for cyclosporine monitoring: how specific is specific? Clin Chem 1999;45:371-81.
9. Passing H, Bablock W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Eur J Clin Chem Biochem 1983;21:709-20.
10. De Groen PC. Cyclosporine and the liver: how one effects the other. Transpl Proc 1990;22:1197-1202.
11. Winkler M, Schumann G, Petersen D, et al. Monoclonal fluorescence polarization immunoassay evaluated for monitoring cyclosporin A in whole blood after kidney, heart and liver transplantation. Clin Chem 1992;38:123-6.
12. Gulbis B, van der Haaijden J, van As H, et al. Whole blood cyclosporin A monitoring in liver and heart transplant patients: evaluation of the specificity of a fluorescence polarization immunoassay and an enzyme-multiplied immunoassay technique. J Pharm Biomed Anal 1997;15:957-63.
13. Witzke O, Heemann U, Thesing A, et al. A comparison of EMIT and FPIA methods for the detection of cyclosporin A blood levels: does impaired liver function make a difference? Eur J Clin Pharmacol 1997;52:413-6.
14. Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B, et al. Lake Louise Consensus Conference on cyclosporin monitoring in organ transplantation: report of the consensus panel. Ther Drug Monit 1995;17:642-54.