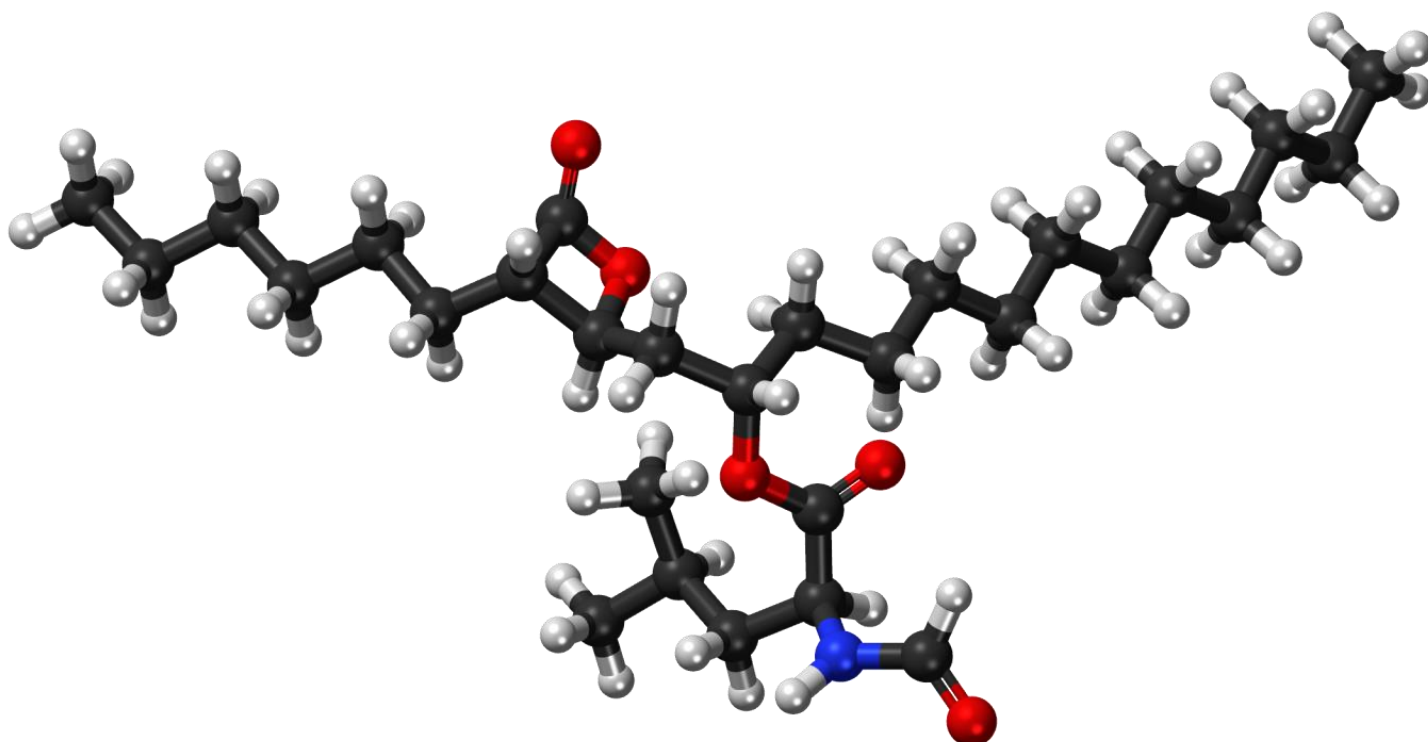


## Guía de Procedimiento de determinación Cuantitativa de Tacrolimus

Servicio de Patología Clínica  
Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento



Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Equipo Técnico del área de Inmunología Especializada del Servicio de Patología Clínica	<ul style="list-style-type: none"><li>• Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento</li><li>• Unidad de Gestión de la Calidad</li></ul>	Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director (e) del Instituto Nacional de Salud del - Niño San Borja

Fecha: Marzo 2019	GP -029/INSN-SB/ USDXT-PC/V.01	Página 1 de 11
-------------------	-----------------------------------	----------------

## Guía de Procedimiento de determinación Cuantitativa de Tacrolimus

I.	Título.....	3
II.	Finalidad .....	3
III.	Objetivo .....	3
IV.	Ámbito de aplicación .....	3
V.	Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT .....	3
VI.	Consideraciones Generales .....	3
	a. Definiciones Operativas .....	3
	1. Definición del Procedimiento.....	3
	b. Conceptos Básicos .....	4
	c. Requerimientos Básicos .....	4
VII.	Consideraciones Específicas .....	6
	a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento.....	6
	b. Indicaciones.....	10
	1. Indicaciones Absolutas .....	10
	c. Riesgos o complicaciones frecuentes.....	10
	d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes .....	10
	e. Contraindicaciones.....	10
VIII.	Recomendaciones .....	10
IX.	Autores, fecha y lugar.....	10
X.	Anexos .....	11
XI.	Bibliografía.....	11

## Guía de Procedimiento de determinación cuantitativa de Tacrolimus

### I. Título

Determinación cuantitativa de Tacrolimus.

### II. Finalidad

El manual de procedimientos operativos estandarizados (POE) tiene por finalidad describir el procedimiento técnico en detalle para determinar cuantitativamente la concentración de Tacrolimus en sangre humana total, lo cual permitirá al personal de laboratorio cumplir con un procedimiento de trabajo estandarizado y requerido en la norma NTP-ISO 15189:2014.

### III. Objetivo

Estandarizar los procedimientos pre-analíticos, analíticos y post-analíticos de laboratorio para detectar la concentración de Tacrolimus en sangre total, para el control y adecuado manejo de la terapia con Tacrolimus en pacientes con trasplante de riñón e hígado.

### IV. Ámbito de aplicación

La presente prueba se aplica en el área de Inmunología especializada del servicio de Patología Clínica, Unidad de soporte al diagnóstico y tratamiento del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja (INSN-SB).

### V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT

Dosaje de Tacrolimus (CPT: 80197).

### VI. Consideraciones Generales

#### a. Definiciones Operativas

##### 1. Definición del Procedimiento

El ensayo de Tacrolimus Emit® 2000 utiliza una técnica de inmunoensayo enzimático homogéneo para el análisis de Tacrolimus en la sangre total. El ensayo contiene anticuerpos monoclonales de ratón con una alta especificidad por el Tacrolimus. El ensayo de Tacrolimus se basa en la competencia por los sitios de unión del anticuerpo de tacrolimus. El tacrolimus de la muestra compete con el tacrolimus en el reactivo de enzima que se marca con la enzima recombinante glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDHr). La enzima activa no unida convierte la forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) del reactivo de anticuerpo frente al NADH, lo que da lugar a un cambio cinético de la absorbancia que puede medirse espectrofotométricamente. La actividad de la enzima se reduce

## GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TACROLIMUS

en función de la unión con el anticuerpo, de tal manera que la concentración de la Tacrolimus de la muestra puede medirse en términos de actividad enzimática.

**b. Conceptos Básicos**

- ✓ **Tacrolimus:** Es un fármaco inmunosupresor usado principalmente después de trasplantes alogénicos para reducir la actividad del sistema inmunitario y así disminuir el riesgo de rechazo. Este reduce la actividad de células T e interleucina 2 (IL-2).
- ✓ **EMIT:** Técnica de inmunoensayo de enzimas multiplicadas, técnica que utiliza anticuerpos para detectar la presencia de drogas en sangre.
- ✓ **Inmunoensayo:** Es un conjunto de técnicas inmunoquímicas analíticas de laboratorio que tienen en común el usar complejos inmunes, es decir los resultantes de la conjugación de anticuerpos y antígenos, como referencias de cuantificación de un analito (sustancia objeto de análisis) determinado.
- ✓ **Antígeno:** Es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria.
- ✓ **Anticuerpo:** Son glicoproteínas del tipo gamma globulina, los cuales reaccionan contra un antígeno específico.
- ✓ **Enzimas:** Son biomoléculas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula, son altamente específicos ya que cada uno de ellos induce la transformación de un sólo tipo de sustancia.

**c. Requerimientos Básicos****➤ Equipos Biomédicos**

- Equipo Viva Pro E
- Centrifuga de tubos al vacío
- Centrifuga de mesa de laboratorio para tubos de polipropileno de 2,0 ml capaz de alcanzar 14.000 rpm.
- Agitador Vórtex.
- Refrigerador-congelador de laboratorio

**➤ Material Médico no Fungible**

- Gafas protectoras.
- Micropipeta, 1 canal, 50 ul para dispensar reactivo de pretratamiento.
- Micropipeta, 1 canal, 200 ul para dispensar metanol.
- Micropipeta, 1 canal, 300 ul para dispensar muestra.
- Portamicropipetas.
- Gradilla de microtubos de 1.5-2.0 ml.
- Timer digital de 1 alarma.

## GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TACROLIMUS

➤ **Material Médico Fungible**• **Reactivos**

- Kit de Reactivo Tacrolimus Emit® 2000 Contiene: Reactivo de anticuerpos 1, Reactivo Tampón 2 y Reactivo de enzima 3.
- Reactivo de pretratamiento de muestras para tacrolimus Emit®2000.
- Calibradores específicos de Tacrolimus. Emit®2000 (0, 2.5, 5, 10, 20, 30 ng/mL).
- Controles de Sangre Total multinivel.
- Metanol HPLC.

• **Materiales**

- Tubo de extracción de sangre al vacío con EDTA K3, 2ml
- Agujas de extracción de sangre
- Algodón
- Papel absorbente.
- Campo de Trabajo.
- Guantes de Nitrilo.
- Mascarilla médica desechable
- Gorro desechable
- Tubo de microcentrifuga capacidad de 1.5-2.0 ml
- Copas de muestra

• **Soluciones**

- Alcohol medicinal 70°
- Agua destilada o desionizada para lavado del Equipo.
- Hipoclorito sódico (lejía) al 10% para lavado de aguja de muestra.
- Hipoclorito sódico (lejía) al 40% para los contenedores de residuos (eliminación de efluentes).
- Solución de Hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 N para lavado de aguja del reactivo.
- Solución de Ácido clorhídrico (HCL) al 0.1 N para lavado de sistema.

• **Responsables:**

- Médico Patólogo Clínico.
- Tecnólogo Médico con especialidad en Laboratorio Clínico
- Técnico de laboratorio.

## VII. Consideraciones Específicas

### a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento

Tiempo: 60 minutos

#### a.1. Indicaciones pre-analíticas

1. La orden médica deberá ser entregada a la recepción del servicio de Patología Clínica, con los datos completos del paciente, sello y firma del médico, sello del SIS (si corresponde) (ver anexo 1).
2. Los factores farmacocinéticos influyen en el momento adecuado de toma de muestra, la última dosis del fármaco. Estos factores influyen la dosificación, el modo de administración, el tratamiento farmacológico y las variaciones biológicas que afectan a la farmacocinética.

#### a.2. Toma de muestras, conservación y almacenamiento:

1. La sangre debe recogerse en tubos con anticoagulante EDTA, recomendable como anticoagulante de elección para el ensayo de la tacrolimus en muestra en sangre total. No se recomienda muestras heparinizadas debido a que pueden formarse coágulos durante el almacenamiento.
2. Se requiere un volumen de 200 ul de sangre total para el procesamiento.
3. Utilice muestras recién tomadas. Si las muestras no se van analizar en las 8 hrs posteriores a la toma de muestra, pueden almacenarse a una temperatura ambiente de 18-25°C.
4. A temperatura de refrigeración de 2-8°C pueden almacenarse hasta una semana, para almacenamientos más prolongados las muestras deben congelarse a -20°C.
5. La ciclosporina es estable en muestras de sangre total durante al menos en 3 meses si se conserva a -20°C. Descongelar y mezclar bien las muestras congeladas antes de analizarlas.
6. Debe evitar congelar y descongelar las muestras repetidamente.
7. Al congelarse, en algunas muestras se forman materiales insolubles que deben descartarse al pipetear.
8. Todas las muestras deben manipularse como potencialmente transmisoras de enfermedades. Seguir las normativas de precaución estándar para la manipulación de agentes infecciosos durante todos los procedimientos.

#### a.3. Preparación, almacenamiento y estabilidad de los componentes del ensayo:

1. Los reactivos del ensayo de tacrolimus Emit@2000 se proporcionan listos para usar. Cerrar las botellas de reactivos cuando no las utilice. Vuelva a colocar siempre en sus recipientes originales la tapa de rosca de los reactivos.

## GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TACROLIMUS

2. Si el anticuerpo se vuelve amarillo significa que se ha deteriorado, en cuyo caso debe desecharse junto con los reactivos tampón y de enzima suministrado con dicho anticuerpos.
3. No congelar los reactivos ni los exponga a temperatura superior de 32°C. Los reactivos sin abrir permanecen estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta, se almacenan a una temperatura de 2-8°C. Una vez abiertos, los reactivos permanecen estables durante 12 semanas o hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta, lo que se produzca primero, siempre y cuando se almacenen verticalmente cerrados y a temperatura de 2-8°C.
4. El almacenamiento incorrecto de reactivos y calibradores puede afectar al rendimiento del ensayo

**a.4. Procedimiento de extracción:****A. Procedimiento de preparación**

1. Dejar reposar los calibradores, controles y las muestras a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
2. Utilizar el reactivo para pretratamiento de las muestras de Tacrolimus Emit®2000 y metanol a temperatura ambiente (18-25°C). Conservar de 2-30°C.
3. Preparar, almacenar y utilizar los controles de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
4. Preparar y etiquetar el tubo de microcentrífuga para cada calibrador, control y muestra a pretratar.

**B. Pretratamiento y procedimiento de ensayo**

El procedimiento se ha dividido en 2 sesiones, pasos y notas técnicas a fin de simplificar su consulta. Las notas técnicas son una parte fundamentalmente de las instrucciones y deben leerse detenidamente antes de realizar cada paso del procedimiento.

**Pasos:**

1. Mezclar suave pero minuciosamente todos los calibradores, controles y las muestras inmediatamente antes de utilizarlas.
2. Transferir 200 µl de cada calibrador, control y muestra al tubo de microcentrífuga debidamente marcado utilizando una micropipeta de 200 ul.
3. Añadir 200 µl de metanol a cada tubo de microcentrífuga con una pipeta de 200 ul.
4. Añadir 50 µl del reactivo pretratamiento (sulfato cúprico) a cada tubo de microcentrífuga con una micropipeta, tapar inmediatamente cada tubo. (consulte Nota del paso 5).
5. Agitar y homogenizar en un vórtex cada tubo de microcentrífuga durante al menos 10 segundos.

## GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TACROLIMUS

6. Incubar el contenido de los tubos de microcentrifuga a temperatura ambiente (18-25°C) durante 5 minutos después que haya terminado la agitación con un vórtex de la última muestra.
7. Colocar los microtubos a la centrifuga a una velocidad de 14000 rpm durante 5 minutos.
8. Colocar el sobrenadante en una copa o tubo apropiado.
9. La muestra está lista para ser analizada en el equipo Viva Pro-E.

**a.5. Dilución de muestras de concentraciones elevadas:**

Si los análisis de las muestras pretratadas de un paciente tienen una cantidad superior a 30 ng/mL de tacrolimus, la muestra debe diluirse siguiendo estos pasos:

1. Tomar 100 µl de la muestra y 200 µl de una muestra negativa mezclarla bien.
2. Tomar 200 µl de la mezcla.
3. Proceder como el paso N° 2 hasta el paso N°9.

**a.6. Notas Técnicas**

1. No realice una mezcla vorticial. Los líquidos pueden mezclarse manualmente o un inversor o agitador de vaivén rotatorio. Los calibradores son hemolizados de sangre total y su aspecto puede diferir ligeramente de las muestras de sangre total.
2. Puede utilizarse un tubo capilar único (Rainin Microman M250 o equivalente) para dispensar todas las muestras, calibradores y controles, siempre que el cilindro capilar y la punta de émbolo se limpien minuciosamente con un paño de laboratorio humedecido entre una muestra y otra.
3. Se puede utilizar una pipeta de desplazamiento positivo o Eppendorf Repeater (Combitip 2.5 mL o 5 mL) para la dispensación del metanol ya que la viscosidad del metanol es baja si se compra con el agua.
4. Se recomienda el uso de una pipeta de desplazamiento positivo o Eppendorf Repeater (Combitip 2.5 mL o 5 mL). Algunas matrices de control gelifican con rapidez si se añade sulfato cúprico o metanol.
5. La agitación vorticial temprana después de la adición del metanol y sulfato cúprico minimizará el tiempo necesario para deshacer el sedimento. La mezcla de las muestras debe ser completamente homogénea inmediatamente después de la agitación vorticial.
6. Los tubos de microcentrifuga se pueden incubar hasta 1 hora después de la agitación vorticial y antes del centrifugado.
7. Si el sobrenadante es turbio o se vuelve turbio al dejarlo reposar, debe volverse a centrifugar (14000 rpm x 5 minutos). Asegúrese de que todas las copas de la muestra contienen muestra.



## GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TACROLIMUS

**a.7. Calibración del equipo:**

1. Calibrar cada vez que se utilice un nuevo lote de reactivos, o bien según indiquen los resultados del control de calidad. Pueda que sea necesario volver a calibrar cuando se produzcan cambios significativos en el instrumento (por ejemplo cambios en los sistemas de fotometría y pipeteado) durante el proceso del mantenimiento del equipo.
2. Compruebe que el sistema funcione correctamente siguiendo las instrucciones del manual del operador del instrumento.
3. Realice un pretratamiento de los calibradores específicos de Ciclosporina Emit® 2000 de acuerdo al “Procedimiento de extracción” de la muestra. Los calibradores deben tratarse previamente a las muestras y los controles.
4. Situar los calibradores pre tratados en las ubicaciones adecuadas del analizador.
5. Aceptar la calibración si cada control de dos o tres niveles está dentro de los límites de control.

**a.8. Control de Calidad**

Al menos una vez por día de uso, analizar dos niveles de un material de control de calidad interno (CCI) con concentraciones conocidas de tacrolimus. Seguir los procedimientos internos de CC del laboratorio si los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites aceptables.

**a.9. Interpretación de resultados**

Rango terapéutico:

Nivel C0: 1 – 20 ng/ml

**a.10. Informe de resultados**

1. Los resultados son ingresados al sistema de registros de pacientes del área de Inmunología, por el Tecnólogo Médico de turno y posteriormente impresos.
2. El Médico Patólogo valida los resultados y los ingresa al sistema hospitalario Galenos (solo los resultados de los pacientes del INSN-SB).
3. Los resultados impresos y validados son entregados al personal técnico del Servicio de Patología para su informe según corresponda la procedencia de la solicitud médica:
4. A la oficina de Archivos del INSN-SB: los resultados de las solicitudes procedentes de consultorios del INSN-SB.
5. Al servicio de hospitalización: los resultados de las solicitudes procedentes de hospitalización.

## GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TACROLIMUS

6. Al archivo del Servicio de Patología: los resultados de las solicitudes externas al INSN-SB

**b. Indicaciones****1. Indicaciones Absolutas**

La prueba está indicada para el monitoreo de dosis de tacrolimus en pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos, trasplante de hígado y riñón.

**c. Riesgos o complicaciones frecuentes**

Ninguno

**d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes**

Ninguno

**e. Contraindicaciones**

Este ensayo no está previsto para la medición de Tacrolimus en suero o plasma.

**VIII. Recomendaciones**

- No usar sangre de catéter venoso central, obtener la muestra solo por punción venosa de sangre periférica.
- No usar sangre entera heparinizada debido a que pueden formar coágulos durante el almacenamiento.

**IX. Autores, fecha y lugar**

Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja  
Laboratorio de Inmunología Especializada-Servicio de Patología Clínica.  
Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Fecha de Elaboración: Marzo 2019  
Vigencia: 02 años

**Autores:**

- |                                       |                          |
|---------------------------------------|--------------------------|
| 1. Dr. Emilio Aguilar Huauya          | eaguilar@insnsb.gob.pe   |
| 2. Lic. T.M. Yaquelina Chirinos Saire | yachirinos@insnsb.gob.pe |
| 3. Lic. T.M. Robert Reyna García      | rreyna@insnsb.gob.pe     |

Fecha: Marzo 2019	GP -029/INSN-SB/ USDXT-PC/V.01	Página 10 de 11
-------------------	-----------------------------------	-----------------

## GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TACROLIMUS

### X. Anexos

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO SAN BORJA (INSNSB)**  
AV. AGUSTIN DE LA ROSA TORO 1399 URB. JACARANDA II SAN BORJA  
TELÉFONO : 51-1-2300600

**ORDEN MEDICA 463901**

**PATOLOGIA CLINICA** (303656)

**N° H.C.** : 71673606 **Cuenta** : 591010 **Fecha Solicitud** : 16/09/2018 11:07:00a.m **Tipo Ate**: Hospitalización  
**Paciente** : CARRIZO CAVELLO LUCERO Nicol **Procedencia**: HOSPITALIZACION TRASPLANTES DE PROGENITOR  
**Edad** : 10 años 3 meses 24 días **Sexo** : MASCULINO **N° Cama** : 86B  
**Tipo Plan** : SIS N° filac.(200 2 71673606) **N° FUA** : 20647166 **Prof de la Salud**: SILDARRIAGA VALIENTE TATIANA  
**Resumen H** : **CMP**: 41072  
**N° Movimiento**: 303656

**Diagnóstico** : Z94.8 OTROS ORGANOS Y TEJIDOS TRASPLANTADOS

CodCPT	Cod SIS	Procedimiento	Fecha Programada	Tipò Prov.	Cant.
80197		DOSAJE DE TACROLIMUS Diag: Z94.8 -OTROS ORGANOS Y TEJIDOS TRASPLANTADOS Just: dosaje para ajuste de dosis	17/09/2018 05:00:00 a.m.	INSTITUCIONAL	1

DEBE LLEGAR UNA HORA ANTES DE SU HORA PROGRAMADA

SILDARRIAGA VALIENTE TATIANA  
SELLO Y FIRMA DEL PRESCRIPTOR

YCHIRINOS INSNB-05754 29/09/2018 05:16:04p.m. Page 1 of 1

### XI. Bibliografía

1. Wallemacq PE, Reding R. A novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. Clin Chem. 1993;39(11):2219-2228.
2. Laskow DA, Neylan JF III, Shapiro RS, Pirsch JD, Vergne-Marini PJ, Tomlanovich SJ. The role of tacrolimus in adult kidney transplantation: a review. Clin Transplant. 1998;12:489-503.
3. Oellerich M, Armstrong VW, Schutz E, Shaw LM. Therapeutic drug Monitoring of cyclosporine and tacrolimus. Clin Biochem. 1998;31(5):309-316.
4. Jusko WJ, Thomson AW, Fung J, et al. Consensus document: therapeutic drug monitoring of tacrolimus (FK-506). Ther Drug Monit. 1995;17:606-614.
5. Trull AK. Therapeutic Monitoring of tacrolimus. Ann Clin Biochem. 1998;35:167-180.
6. Venkataramanan R, Swaminathan A. Prasad T, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. Clin Pharmacokinet. 1995; 29(6): 404-430.
7. Kelly Pa, Buckart GJ, Venkataramanan R. Tacrolimus: a new immunosuppressive agent. Am J Health Syst Pharm. 1995;52:1521-1535.

Fecha: Marzo 2019	GP -029/INSN-SB/ USDXT-PC/V.01	Página 11 de 11
-------------------	-----------------------------------	-----------------