

## Immunsuppressiva-Medikamentenspiegelmessung – reine Routine?

### Immunosuppressant drug monitoring: a routine undertaking?

Christoph Seger<sup>1,\*</sup> und Michael Vogeser<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zentralinstitut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik (ZIMCL), Universitätskliniken Innsbruck, Innsbruck, Österreich

<sup>2</sup> Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München-Großhadern, München, Deutschland

#### Zusammenfassung

Die Erfassung von Immunsuppressivaspiegel ist eine der anspruchsvollsten Medikamentenspiegelmessungen in der klinischen Routine. Die vergangenen Jahre haben eine Reihe von technologischen Fortschritten gebracht. Neben neuen immunologischen Analysesystemen hat sich die LC-MS/MS zu einem fixen Bestandteil des Geschehens entwickelt. Der vorliegende Beitrag soll helfen, Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Assayformate zu erkennen. UKNEQAS-Ringversuchsergebnisse werden zur vergleichenden Assaybeurteilung herangezogen.

**Schlüsselwörter:** Immunoassays; Immunsuppressiva; LC-MS/MS; Medikamentenspiegelmessungen; Ringversuche; Tandem-Massenspektrometrie.

#### Abstract

The quantitative assessment of immunosuppressant drug levels is still one of the most challenging therapeutic drug monitoring procedures in clinical routine. During the past years, several technical developments matured to useable methods. In addition to immunoassays, liquid chromatography-tandem mass spectrometry has become a key method in immunosuppressant therapeutic drug monitoring. This overview should aid in understanding the advantages and disadvantages of the various assays and methods. UKNEQAS proficiency testing results are used for an inter-assay comparison approach.

**Keywords:** immunoassays; immunosuppressant drugs; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

\*Korrespondenz: Christoph Seger, Zentralinstitut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik (ZIMCL), Universitätskliniken Innsbruck, Innsbruck, Österreich  
Tel.: +43 51250481155  
Fax: +43 51250424088  
E-Mail: Christoph.Seger@uki.at

MS); proficiency testing; tandem mass spectrometry; therapeutic drug monitoring.

#### Einleitung

Es ist unbestreitbar und muss daher an dieser Stelle auch nicht weiter ausgeführt werden, dass die Medikamentenspiegelmessung (TDM, therapeutic drug monitoring) immunsupprimierender Medikamente eine zentrale Rolle in der diagnostischen Versorgung von Transplantatempfängern spielt. Von den ersten post-operativen Tagen bis zur ambulanten Nachsorge langjährig stabil transplantierte Patienten hat das Immunsuppressiva-TDM einen entscheidenden Anteil an den in den vergangenen Jahren beobachteten steigenden Organ- und Empfängerüberlebenszeiten [1–5], wengleich die Problematik des chronischen Organversagens (chronic allograft failure, CAF) und das Auftreten von massiven Langzeit-Nebenwirkungen weiterhin ungelöste Probleme darstellen [6–8].

Was aus der Sicht des Laboratoriums weniger klar ist und bei Betrachtung des in den letzten Jahrzehnten bereits Geleisteten auch leicht in Vergessenheit geraten kann, ist die sich durch die Konfrontation mit neuen Technologien immer wiederkehrende Frage, mit welchen Mitteln ein den klinischen Bedürfnissen ideal angepasstes Monitoringprogramm erbracht werden soll. Die zu treffende Assaywahl wird sich zwar in der Regel primär nach den lokalen Gegebenheiten und der Ausstattung des Laboratoriums richten, andererseits ist nicht zu vergessen, dass selbstverständlich ein Verfahren zu wählen ist, welches hinsichtlich der Datenqualität den Ansprüchen der Aufgabenstellung gewachsen ist.

Wie auch bei der Erfassung vieler anderer Medikamente, stehen dem Analytiker beim Immunsuppressiva-TDM in der Hauptsache immunologische oder chromatographische Verfahren zur Verfügung. Während die Realisierung der immunologischen Verfahren die Domäne der großen industriellen Hersteller ist und zu einer Reihe von mehr oder weniger automatisierten IVD-CE [9] zertifizierten Assayapplikationen auf Hoch-Durchsatz-Maschinen geführt hat, wird bei der chromatographischen Analyse zumeist mangels Alternative das Heil in Eigenentwicklungen gesucht. Hier hat gerade in den letzten Jahren die LC-MS/MS – der Einsatz von Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) als Detektor in der Flüssig-Chromatographie (LC) – einen fulminanten Aufschwung genommen [10–13]; eine Entwicklung, welche den

bereits weit verbreiteten Einsatz dieser Technologie in der pharmazeutischen Industrie widerspiegelt. So wurde beispielsweise im Bereich der Immunsuppressiva die erst wenige Jahre zurückliegende klinische Erprobung und Markteinführung von Everolimus (Zulassung 2004) bereits von LC-MS/MS-basierenden Spiegelmessungen (und daraus abgeleiteten therapeutischen Bereichen) begleitet, während bei den in den 1990ern zur Marktreife gebrachten Medikamenten Tacrolimus und Sirolimus (Zulassung 1996 bzw. 2001) noch Immunoassays zur Spiegelüberwachung entwickelt worden sind.

Der vorliegende Übersichtsbeitrag wird versuchen, die generellen Vor- und Nachteile der Analyse-Plattformen aufzuzeigen. Neben kurzen methodischen Abrissen werden grundsätzliche Probleme der Messplattformen beleuchtet und mit Beispielen aus Praxis und Literatur untermauert. Da Immunsuppressiva-TDM technologisch gesehen nicht isoliert betrachtet werden kann und soll, wird dabei auch auf andere Beispiele aus dem TDM und aus der quantitativen Analyse endokriner Metabolite eingegangen.

## Anforderungen

Ein geringer therapeutischer Quotient, daraus resultierende enge therapeutische Bandbreiten (Faktor rund 2–5), drastische Nebenwirkungen bei Verlassen derselben (Abstoßungsgefahr bzw. toxische Nebenwirkungen), massive Arzneimittel-Interaktionen sowie die hohe intra- und interindividuelle Variabilität bei der Verstoffwechslung und der daraus resultierende Verlust der Dosis-Expositionsbeziehung erfordern eine engmaschige Kontrolle der Vollblut-Medikamentenspiegel bei der Therapie mit Cyclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus und des Serum-Medikamentenspiegels der Mycophenolsäure. Speziell in den ersten Wochen nach der Transplantation gestaltet sich die Dosisfindung oftmals schwierig. Entsprechend wird von den Klinikern eine zeitnahe Befunderstellung gefordert; *total turnaround* – Zeiten von maximal 3 bis 4 Stunden sind typischerweise erwünscht. Die Messungen haben präzise und richtig zu sein; nur möglichst geringe laborinterne Fehler – eine möglichst vernachlässigbare Unrichtigkeit und eine geringe Ungenauigkeit – erlauben es, Dosisanpassungen bei einem engen therapeutischen Zielbereich vorzunehmen. So ist zum Beispiel bei einem Everolimus Spiegelwert von  $C_0 = 5$  ng/mL (empfohlener therapeutischer Bereich 3 bis 8 ng/mL) [14, 15] und einem relativen Messfehler von  $VK = 10\%$  (inter-assay VK) die für die klinische Entscheidungsfindung relevante kritische Differenz ( $D_{krit} \sim 2,8 \cdot SD$  für  $p < 0,05$ ) [16] noch ohne Berücksichtigung der biologischen Variabilität bereits  $D_{krit} \sim 1,4$  ng/mL, womit das therapeutische Band bereits zu rund 55% abgedeckt ist.

Wenn zu dieser in der Praxis durchaus gängigen Messwertstreuung noch systematische (z.B. Kalibrationsbias) und intra-individuelle (biologische) Variabilität hinzukommen, sind derartige Analysen-Plattformen den klinischen Ansprüchen nicht mehr gewachsen [17, 18]. Wenig präzise (hohe Variabilität der Ergebnisse) und schlecht kalibrierte (systemischer Methodenbias)

Mess-Systeme lassen innerhalb der Schranken des therapeutischen Bereiches keinen Spielraum für therapeutische Interventionen, wie z.B. Dosisanpassungen.

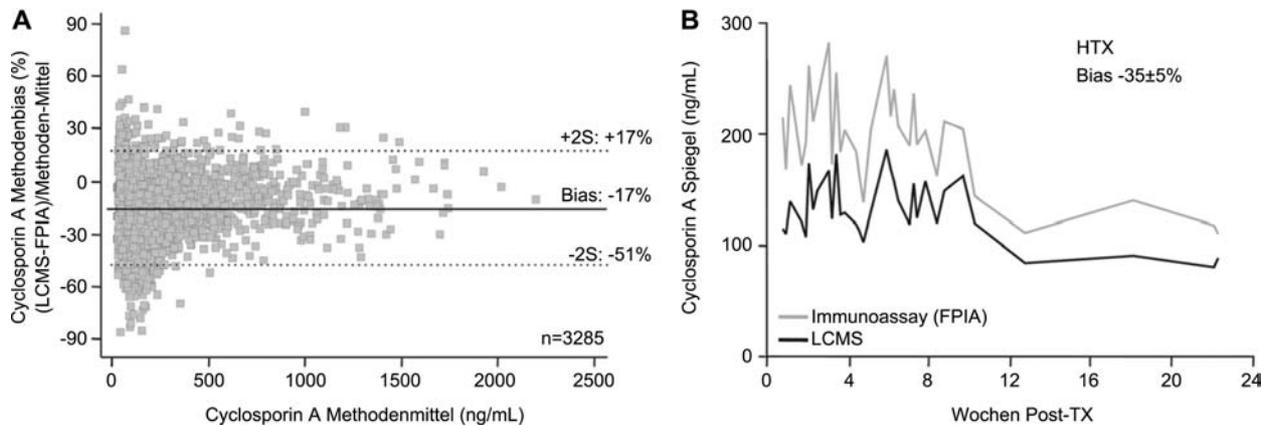
Die zusätzliche Anforderung aufgrund von modernen Therapieschemata (z.B. Kombinationstherapien, Dosisreduktion bei partieller immunologischer Toleranz) [19, 20] niedrigere Medikamentenspiegel korrekter als in der Vergangenheit messen zu müssen, stellt eine Herausforderung dar, der sich kommerzielle Anbieter und Hersteller von „in house assays“ gleichermaßen stellen müssen. Generell kann angemerkt werden, dass therapiegerechte Immunsuppressivaspiegel (LC-MS/MS Werte)  $< 3$  ng/mL für Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus bzw.  $< 75$  ng/mL für Cyclosporin A keine Seltenheit mehr darstellen. Um dem gerecht zu werden, wird, z.B. in einem rezenten Konsensdokument für Tacrolimus-TDM, gefordert, dass Testsysteme ein Quantifizierungslimit (funktionelle Sensitivität) von zumindest 1 ng/mL aufweisen müssen [21]. Es ist davon auszugehen, dass ältere Konsensdokumente in näherer Zukunft analoge Adaptationen erfahren werden [22, 23].

## Neue Immunoassays – neue Hoffnungsträger?

Die Verwendung von Immunoassays zur quantitativen Erfassung kleiner organischer Moleküle (Medikamente, Drogen, endogene Analyte) wirft eine Reihe von analytischen Problemen auf, welche nicht immer befriedigend gelöst werden können. In vielen Fällen – die anführbaren Beispiele reichen weit über die Immunsuppressiva hinaus – sorgen schlecht ausgewählte oder ungenügend entwickelte Antikörper für die zusätzliche Erfassung strukturell ähnlicher Analyte. Dazu zählen Metabolite der Zielsubstanz (z.B. hydroxylierte Cyclosporin A Metabolite [17], Mycophenolsäure-Glucuronide [24, 25], 17-OHP-sulfat in 17-OHP Assays [26]) ebenso wie strukturelle Analoga (z.B. Cortison in Cortisol Assays [27, 28], Oleandrin und andere Steroide in Digoxin-Assays [29, 30]).

Wenn eine gewisse strukturelle Streuung in der Antigenerkennung nicht ausdrücklich erwünscht ist (wie es z.B. bei toxikologischen Gruppentests der Fall ist), sorgt diese Kreuzreaktivität für unklare Analyseergebnisse (Abbildung 1). Im Vergleich zu substanzspezifischen Messverfahren wie GC-MS, LC-MS oder enzymatischen Verfahren werden dadurch systematisch unrichtige höhere Substanzspiegel vorgeschätzt, welche sich aus der Erfassung des Zielanalyten und einer in der Regel unklaren Zahl von Metaboliten/Analoga zusammensetzt. Aufgrund der substanzspezifischen Kreuzreaktivitäten und dem daraus resultierenden Methodenbias [31] kann das Analyseergebnis entsprechend schlecht interpretiert werden; in der Folge kann es durchaus zu klinischen Konsequenzen kommen [32, 33].

Ein weiterer gravierender Nachteil von Immunoassays besteht darin, dass die auf einer nicht-kovalenten Antikörper-Antigenwechselwirkung beruhende Analyterkennung bei mehr oder weniger physiologischen Bedingungen stattfinden muss. Da die Analyten aber aufgrund ihrer Lipophilie



**Abbildung 1** Globale Bias Analyse (A) und individuelles Patientenprofil (B) als Werkzeuge zur Beurteilung von Messwertabweichungen. (A) Der Vergleich zweier Analysesysteme in der relativen Darstellung nach Bland und Altman [31] zeigt, dass der relative Messfehler über das Kollektiv (n 3285, C0 und C2 Spiegelmessungen) eine Funktion der Messgröße ist. Ferner kann eine durchschnittliche systematische Messabweichung beobachtet werden (die LC-MS/MS-Plattform misst im Schnitt 17% tiefer als der Immunoassay). Das Kollektiv zeigt in den klinisch relevanten Messbereichen (Talspiegel <400 ng/mL) aber eine derart breite Streuung (2S Bereich reicht von -51% bis +17% Bias), dass eine vernünftige Kommunikation eines „Umrechnungsfaktors“ oder einer „Korrekturformel“ nicht möglich ist. (B) In individuellen Patientenprofilen zeigt sich ein außerordentlich stabiler intra-individueller Bias, die Schwankungsbreite der Messwerte, welche in diesem Fall die gesamte post-TX Zeit bis zur ambulanten Nachsorge umfassen, ist mit 2S = 10% weitaus geringer als die globale Schwankungsbreite von 2S = 34%. Mit der Kommunikation derartiger Daten ist eine ausreichende Sicherheit bei Assaywechsel eher gegeben.

zumeist an Proteine, wie z.B. Albumin oder SHBP (steroid hormone binding protein), gebunden vorliegen bzw. in zelluläre Bestandteile eingebettet sind (z.B. Immunsuppressiva in Erythrozytenmembranen), müssen diese vor der Erfassung durch den Antikörper aus diesen Bindungen gelöst werden. Da eine Freisetzung durch Bindeprotein- oder Zell-Zerstörung aber immer unphysiologisch ist, muss in der Regel entweder die Ablösung durch Verdrängung versucht oder auf physiologische Messbedingungen verzichtet werden [34]. Bei auf chromatographischen Methoden basierenden Assays spielt dies keine Rolle, da bei unphysiologischen Bedingungen gemessen wird. Daher können hier eine Vielzahl von Freisetzungsstrategien verfolgt werden.

Der Einsatz von Verdrängungsreaktion (wie z.B. beim MPA-MEIA-Testformat [35, 36]) kann zu systematischen Fehlmessungen führen, wenn sich die Bindungsstärke des Analyten an das Bindungsprotein (z.B. auf Grund von Mutationen) verändert. Auch hat sich vielfach gezeigt, dass es bei einer derartigen Probenvorbereitungsstrategie unmöglich ist, Messungen bei veränderter Probenmatrix durchzuführen. Daher sind unter anderem Aufstockexperimente zur Überprüfung der analytischen Wiederfindung oder zum Vergleich mit anderen Analysesystemen kaum durchführbar.

In den vergangenen Jahren haben verschiedene Immunoassayhersteller neue Assay-Formate unterschiedlicher Qualität auf den Markt gebracht (Tabelle 1). Die Einführung von CMIA (Chemiluminescent Magnetic Microparticle Immunoassay)-Assays für Tacrolimus, Sirolimus und Cyclosporin A löst FPIA (Fluoreszenz-Polarisation-Immunoassay)- und MEIA (microparticle-enzyme-immunoassay)-Testformate des gleichen Herstellers ab, welche, mit diversen analytischen Problemen behaftet, den Anforderungen des modernen Immunsuppressiva-TDM nicht mehr genügen.

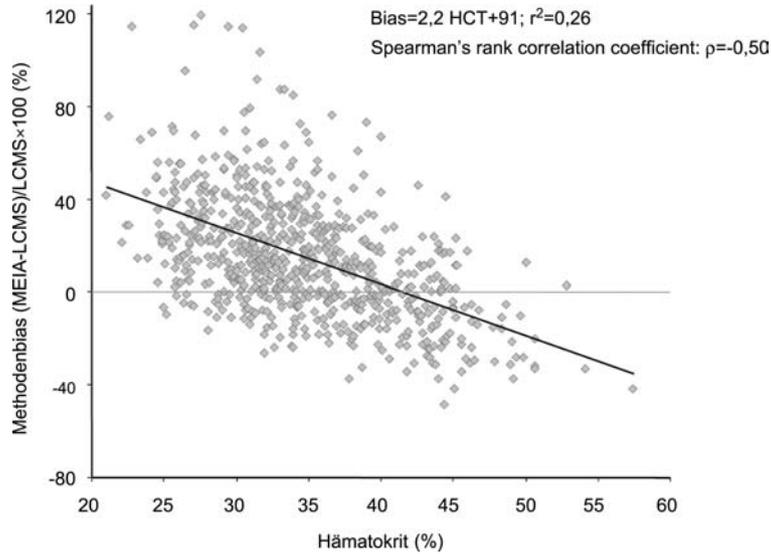
So hat zum Beispiel der auf der IMX-Plattform realisierte Tacrolimus-MEIA-Assay neben ungenügender Sensitivität und einem nicht kommunizierten LOQ (limit of quantification) [37] ein zusätzliches ungewöhnliches analytisches Problem gezeigt. Es konnte wiederholt nachgewiesen werden [37–41], dass die Messwertdifferenz des IMX II – MEIA zur Referenzmethode LC-MS/MS vom Hämatokrit (HKT) der Probe abhängt. Bei pathologisch erniedrigtem HKT (<35%) sind MEIA-Messwerte systematisch höher als LC-MS/MS-Messwerte (ein falsch hoher Tacrolimus-Spiegel wird vorgetäuscht); bei normalem HKT sind MEIA-Messwerte systematisch tiefer als LC-MS/MS-Messwerte (Abbildung 2). Die Überschätzungen bei niedrigem HKT ist so gravierend, dass in tacrolimusfreien Blutproben mit erniedrigtem HKT (<30%) Messwerte bis zu 4,5 ng/mL (n=68; Median 2,2 ng/mL; 95. Percentile 3,4 ng/mL) erzielt werden konnten [37]. Der ursächliche Grund für dieses Assayverhalten ist unklar geblieben, die Konsequenzen sind jedoch klar – die Patientenführung mit einem derartigen TDM-Assay ist außerordentlich schwierig; Fehlinterpretationen sind leicht möglich.

Bei dem neuen CMIA-Tacrolimustest wurde Sorge getragen, dass nicht nur die mangelnde Richtigkeit bei unterschiedlichem HKT beseitigt worden ist, sondern dass auch die Assaysensitivität (LOQ <1 ng/mL) den Anforderungen des neuen Konsensus-Statements entspricht [21]. Entsprechend gut schneidet der Test in Ringversuchen ab (siehe unten), die Vergleichbarkeit der ermittelten Medikamentenspiegel mit der LC-MS/MS ist ebenfalls sehr gut (Abbildung 3A). Der neue Sirolimus-CMIA zeigt ebenfalls akzeptable analytische Leistungsdaten [42], während für den Cyclosporin CMIA noch kaum Vergleichsdaten zu LC-MS/MS-Plattformen vorliegen. Erste Untersuchungen erlauben aber den

**Tabelle 1** Praxisermittelte Richtigkeits- und Genauigkeitsdaten (Präzision) der wichtigsten Immunsuppressiva-Testsysteme. Auszug aus den UKNEQAS-Ringversuchsdaten (Prof. David Holt) Ende 2009/Anfang 2010. Richtigkeit auf Einwaage bezogen.

Analyt	Testbezeichnung	Hersteller	Probe 1				Probe 2			
			Konzentration, ng/mL	Richtigkeit, % Einwaage	Genauigkeit, % VK	Teilnehmer, n	Konzentration, ng/mL	Richtigkeit, % Einwaage	Genauigkeit, % VK	Teilnehmer, n
Cyclosporin	FPIA AxSym™	Abbott	77,9	97,4	11,0	43	204,9	102,5	8,1	43
	FPIA TDX™	Abbott	86,6	108,3	10,2	50	212,4	106,2	6,6	50
	CMIA Architect™	Abbott	85,3	106,6	9,1	66	203,9	102,0	10,3	66
	EMIT®	Siemens	82,4	103,0	13,4	64	203,9	102,0	10,2	64
	ACMIA-Dimension®	Siemens	70,2	87,7	15,7	139	205,6	102,8	6,5	139
	CEDIA® PLUS	Thermo-Fisher	65,4	81,7	17,4	69	195,5	97,8	9,3	69
Tacrolimus	HPLC-MS	–	82,5	103,1	9,3	91	202,7	101,3	6,7	91
	MEIA IMX®	Abbott	3,5	116,6	16,1	76	10,3	103,0	8,7	76
	CMIA Architect™	Abbott	3,2	106,6	9,3	82	10,6	106,0	5,9	82
	EMIT®	Siemens	4,1	136,6	23,9	45	11,3	113,0	13,4	45
	ACMIA-Dimension®	Siemens	3,5	116,6	21,2	78	10,5	105,0	10,6	78
	CEDIA® PLUS	Thermo-Fisher	3,5	116,6	40,5	13	9,7	97,0	14,6	13
Sirolimus	HPLC-MS	–	3,3	110,0	9,1	107	10,6	106,0	7,4	107
	MEIA IMX®	Abbott	1,4	33,4	37,7	46	4,3	53,7	11,1	46
	CMIA Architect™	Abbott	2,6	86,7	7,8	26	6,3	78,7	4,7	26
Everolimus	HPLC-MS	–	2,5	83,4	17,7	107	6,4	80,0	13,5	107
	FPIA	Thermo-Fisher	2,2	110,0	68,4	52	4,3	86,0	36,8	52
MPA	HPLC-MS	–	1,7	85,0	20,0	68	4,3	86,0	14,2	68
	EMIT®	Siemens	4,2	105,0	7,6	53	13,4	111,7	11,8	49
	HPLC-UV	–	3,9	97,5	7,9	47	12,1	100,8	7,9	47
MPA	HPLC-MS	–	4,0	100,0	11,9	37	12,3	102,5	14,7	38

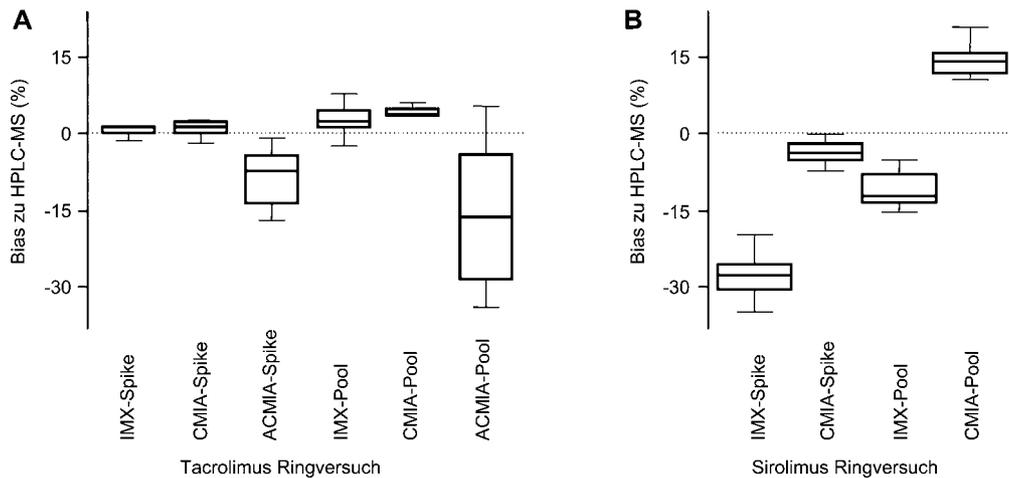
Datenbasis: Cyclosporin A: UKNEQAS RV 310 (1/2010) 80 bzw. 200 ng/mL; Tacrolimus: UKNEQAS RV 175 (12/2009) 3 bzw. 10 ng/mL; Sirolimus: UKNEQAS RV 132 (12/2009) 3 bzw. 8 ng/mL; Everolimus: UKNEQAS RV 52 (1/2010) 2 bzw. 5 ng/mL; MPA UKNEQAS RV 51 (12/2009) 4 ng/mL, UKNEQAS RV 50 (9/2009) 12 ng/mL. Alle Daten von <http://www.bioanalytics.co.uk>, abgerufen 2/2010.



**Abbildung 2** Ein Methodenvergleich zwischen dem Tacrolimus IMX-II Assay (MEIA Format) und der LC-MS/MS zeigt einen auffallenden Zusammenhang zwischen Methodenbias und Hämatokrit (HKT) der Probe. Während bei Proben mit niedrigem HKT der MEIA-Tacrolimusspiegel überschätzt wird, ist bei Proben mit normalem HKT eine Spiegelunterschätzung zu beobachten [37].

Schluss, dass es in diesem Fall ein nicht vernachlässigbarer Bias zur LC-MS/MS vorliegt [43–45]. Im Falle dieses Assays kann daher angenommen werden, dass die Antikörperentwicklung nicht so fortgeschritten ist wie im Fall des

Tacrolimus CMIA, für welchen offenbar ein neuer Antikörper entwickelt worden ist [46]. Bei allen CMIA-Assays muss kritisch angemerkt werden, dass die aus Vollblut zu erfolgende Probenvorbereitung für diese Testformate ausgespro-



**Abbildung 3** Methodenbias einiger Immunoassays zur LC-MS/MS. Tacrolimus (A) und Sirolimus (B) Gruppenresultate der UKNEQAS-Ringversuche aus 2008/2009.

(A) Bias der Tacrolimus Plattformen. Die Spikeproben zeigen, dass die Kalibration der MEIA- und CMIA-Plattformen an die LC-MS/MS angepasst wurden. Entsprechend weisen die Messungen der Poolproben einen (geringen) Methodenbias auf, welcher vermutlich auf Kreuzreaktionen mit Tacrolimus-Metaboliten zurückzuführen ist. Der ACMA-Assay kann bereits die Zielkonzentrationen der Spikeproben nicht wiederfinden, diese Spiegelunterschätzung manifestiert sich auch in den Patienten-Poolproben. Datenbasis 10 Spikeproben (LC-MS/MS Wert:  $8,8 \pm 1,3$  ng/mL), 15 Patienten-Poolproben (LC-MS/MS Wert:  $8,8 \pm 0,3$  ng/mL). (B) Bias der Sirolimus-Plattformen. Während beim MEIA-Assay aufgrund des massiven negativen Kalibrationsbias zur LC-MS/MS der Methodenbias bei der Quantifizierung von Patientenpool-Proben nur gering ist, zeigt der anders kalibrierte CMIA-Assay eine deutliche Überschätzung der Patientenpool-Proben im Vergleich zur LC-MS/MS. Da die relative Biasdifferenz zwischen Spike- und Poolproben praktisch ident ist ( $\sim 20\%$ ), kann vermutet werden, dass idente oder zumindest sehr ähnliche primäre Antikörper zum Einsatz kommen. Datenbasis 9 Spike-Proben (LC-MS/MS Wert:  $9,9 \pm 2,4$  ng/mL), 12 Patienten-Poolproben (LC-MS/MS Wert:  $10,5 \pm 1,8$  ng/mL).

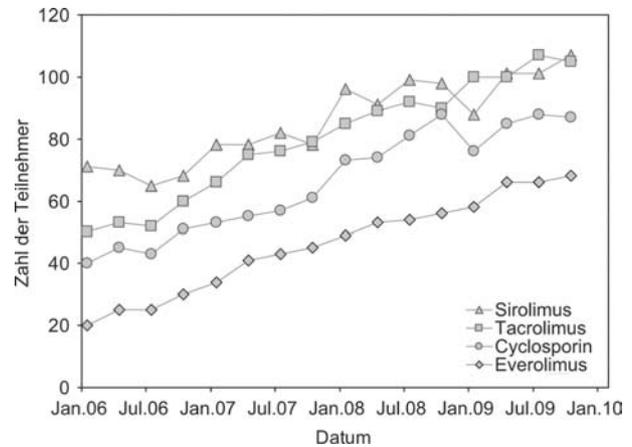
chen arbeitsintensiv ist (keine subjektive Verbesserung zu den TDX-/IMX-Formaten) und die eines LC-MS/MS-Assays durchaus übertreffen kann [47].

Bei einem anderen ebenfalls erst relativ rezent auf den Markt gebrachten Tacrolimus-Assay (Antibody Conjugated Magnetic Immunoassay Testformat, ACMIA), welcher über eine einfachere Probenvorbereitung verfügt, hat es sich in den letzten Jahren wiederholt gezeigt, dass es in seltenen Fällen zu gravierend falsch-positiven Spiegelbestimmungen kommen kann [48–50], welche – falls nicht durch sorgfältige Zusammenschau der diagnostischen und klinischen Daten oder durch Kontrolle mit einem anderen Assay entdeckt – gravierende Folgen (z.B. Absetzen der Medikation bis zum Einsetzen einer nachweisbaren Organ-Abstoßungsreaktion) nach sich ziehen können. Wengleich der exakte Mechanismus der Störung noch nicht klar bekannt ist, so haben doch verschiedene Kontrollexperimente zu der Annahme geführt, dass es sich um ein immunologisches Problem handelt. Unter Umständen handelt es sich um heterophile Antikörper; auch konnte gezeigt werden, dass hohe Rheuma-Faktor Titer zu falsch hohen Tacrolimus-Spiegel führen können [51]. Des Weiteren zeigt dieser Assay im Ringversuch massive Probleme in der Richtigkeit und Genauigkeit der Analyseergebnisse (Abbildung 3A, Tabelle 1).

Die teilweise guten Leistungsdaten neuer Immunoassays dürfen aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass all diese auf Antigen/Antikörper-Interaktionen beruhenden Messplattformen generelle analytische Probleme aufweisen, von denen einige bereits in den letzten Absätzen vorgestellt worden sind. Neben diesen analytischen Einschränkungen ist der Einsatz eines Immunoassays auch oftmals strikt auf die Verwendung von unverändertem humanem Probenmaterial beschränkt, was zu Problemen bei Aufstockexperimenten und bei der Verwendung von nicht humanen Kontroll- und Referenzmaterialien führen kann. Die oftmals von den Assayherstellern selbst produzierten und mit den Kits vertriebenen Kalibrations- und Kontrollmaterialien bestehen allerdings vielfach auch aus nicht humanen Surrogat-Materialien. Konsequenterweise ist die Wertermittlung in diesen Matrices oftmals mehr eine Wertezuweisung, wie Ringversuchergebnisse beweisen (Abbildungen 3, 4; Tabelle 1). Da Antikörper biologischen Ursprunges sind, ist mangelnde Chargenkonstanz der Reagenzien ein weiteres nicht zu unterschätzendes Problem. Ein plötzlicher Verlust von Assaywiederholbarkeit und -richtigkeit kann die Folge sein. Das mögliche Vorliegen von Antikörpern, welche gegen den Bindungsantikörper gerichtet sind (z.B. humane anti-Maus Antikörper, HAMA), stellt eine weitere nie auszuschließende Gefahr beim Einsatz von Immunoassays dar. Dieses Problem ist selbstverständlich wiederum nicht auf Immunsuppressiva-TDM-Assays beschränkt.

### Spezialfall MPA – TDM

Für die Überwachung der Mycophenolsäure-Exposition, dessen Durchführung in rezenten Konsensudokumenten [52, 53] angeraten, aber von anderer Seite auch kritisch hinter-



**Abbildung 4** Zahlenmäßige Entwicklung der LC-MS-Untergruppe des UKNEQAS-Ringversuches.

Innerhalb der letzten vier Jahre konnte ein starker Zuwachs an LC-MS/MS-Installationen verzeichnet werden. Die rund 100 LC-MS/MS-Zentren, welche gegenwärtig Cyclosporin- und Tacrolimus-Ringversuchsergebnisse kommunizieren, entsprechen ~20% bzw. ~27% des Gesamtkollektivs. Beim Sirolimus- und Everolimus-TDM wird LC-MS/MS gegenwärtig von der Mehrzahl der Ringversuchsteilnehmer eingesetzt (Sirolimus ~60%, Everolimus ~57%).

fragt wird [54], gibt es neben den ausgezeichneten, trivial realisierbaren, aber manuell aufwändigen, chromatographischen Methoden (kommerzielle HPLC-UV-Lösungen verfügbar) sowohl zwei Immunoassays (EMIT oder CEDIA Format), wie auch einen neuartigen Enzym-Inhibitionsassay (EIA, Roche). Letzterer beruht auf der in vitro Inhibition von Inosin Monophosphate Dehydrogenase II (IMPD II), dem in vivo MPA Effektor-Enzym der MPA-Wirkung. Rekombinantes IMPD II wird eingesetzt, um die reduktive NADH generierende Reaktion von Inosin Monophosphat zu Xanthosin Monophosphat zu verfolgen. Beim Vorliegen von MPA wird die Reaktion inhibiert, die NADH-Bildung ist verringert. Beide Immunoassays weisen deutliche analytische Probleme auf; neben eingeschränkten Linearitäten sind aufgrund von Kreuzreaktivitäten massive stark schwankende Spiegelüberschätzungen im Vergleich zu den chromatographischen Methoden zu beobachten [55, 56]. Der EIA hingegen korreliert außerordentlich gut mit LC-Methoden [57, 58].

### LC-MS/MS – eine Routinemethode?

Das letzte Jahrzehnt hat immense technologische Entwicklungen im Bereich der LC-koppelbaren Massenspektrometer gebracht – speziell im Bereich der Ionenquellen und der Ionenselektoren [59, 60]. Das Ende der Entwicklung ist nicht absehbar, auch die Möglichkeiten bei der Automatisierung der Anlagen und die Anbindung an moderne Labor-EDV-Systeme sind bei Weitem nicht ausgereizt [12]. Fast jeder der Marktführer im Bereich der instrumentellen Bioanalytik (z.B. AB Sciex, Agilent, Bruker, Thermo-Fisher, Waters) verfügt über ein ausreichend bestücktes MS-Portfolio, um

die LC-MS/MS-Analytik im Applikationszielbereich (Quantifizierungs-Limits  $< 1 \text{ ng/mL}$ ) zu gewährleisten. Allerdings erlaubt die Marktbeobachtung den Schluss, dass Anbieter dazu tendieren, die jeweils leistungsschwächeren (und damit billigeren) Geräte aus einer Tandem MS-Palette als hinreichend sensitiv für das Immunsuppressiva-TDM darzustellen. Leider musste festgestellt werden, dass sich diese optimistische Sichtweise beim Betrieb unter klinischen Routinebedingungen oftmals nicht bestätigt.

Es haben sich in den letzten Jahren zwei distinkt unterschiedliche LC-MS/MS Gerätekonfigurationen als für das Immunsuppressiva-TDM geeignet herauskristallisiert. In allen Fällen wird der chromatographischen Analyse eine Probenvorbereitung durch Fällung von zellulären Bestandteilen und Serum-Proteine vorangestellt. Hier hat sich – ähnlich wie bei einigen Immunoassays – eine Mischung aus einer Zink-Sulfat-Lösung mit Methanol bewährt. Die nachfolgende LC-Trennung der Analyten dient ebenfalls der Probenaufreinigung. In diesem Schritt werden die Immunsuppressiva einerseits von hydrophilen nicht gefällten Matrix-Komponenten (z.B. Zinksulfat) und andererseits von lipophilen Matrixkomponenten (z.B. Phospholipide) abgetrennt. Es wird dringend angeraten, für eine ausreichende chromatographische Abtrennung von Metaboliten, welche nachweislich Interferenzen darstellen können [61, 62], zu sorgen. Bereits mit einer einfachen einzelnen chromatographischen Stufe (LC-MS/MS) können hinreichend gute Assay-Ergebnisse erzielt werden. Gerade bei einer derartigen Assay-Realisierung ist es aber unumgänglich, die Richtigkeit, Genauigkeit und Sensitivität des Assay an einer ausreichenden Vielzahl von Patientenproben nachzuweisen [61, 62]. Der Einsatz einer ebenfalls einfach zu realisierenden zusätzlichen chromatographischen Dimension (online-SPE-LC-MS/MS) [63, 64] stellt in unseren Augen aber zweifelsfrei den analytischen „State of the art“ im Immunsuppressiva-TDM dar. Für die Detektion und Quantifizierung der Analyten werden nunmehr fast ausschließlich „Triple-Quadrupol“ (Synonym Tandem) MS-Geräte eingesetzt. Die Analytdetektion erfolgt im „Selected reaction monitoring“ (SRM, Synonym MRM)-Modus. Je nach eingesetzter Instrumentation können Analysezeiten zwischen zwei und vier Minuten realisiert werden.

Generell ist festzustellen, dass gegenwärtig keiner der MS-Hersteller Komplettlösungen anbieten kann, welche den hohen analytischen Ansprüchen eines Routinelabors gerecht werden. Keines der Massenspektrometer, geschweige denn der komplexen LC-MS/MS Gerätekombinationen, ist IVD-CE zertifiziert. Es ist in der Regel keine bidirektionale Anbindung der MS-Steuer- und Auswertesoftware an die Labor-EDV gegeben. Die Verwendung selbst erstellter Skripts zur Übertragung von Arbeitslisten an das MS bzw. zur Rückübermittlung der Messwerte ist weiterhin eher die Regel denn die Ausnahme. Ebenso ist bis auf wenige Ausnahmen (MassTrak Assay von Waters und MassTox Assay von Chromsystems, beide mit IVD-CE Kennzeichnung) die Herstellung der Verbrauchsmaterialien (Laufmittel, Fällungslösungen, etc.) in den Händen des individuellen Anwenders. Entsprechend aufwändig gestaltet sich die Etablierung und

Validierung einer lokalen LC-MS/MS Installation, welche als Leistungsbewertungsprüfung gestaltet, auf gängige Empfehlungen und Guidelines internationaler Gremien wie CLSI ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)), FDA ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)) oder ICH ([www.ich.org](http://www.ich.org)) zurückgreifen sollte. Bereits bei der Auswahl der Gerätschaft (Design Qualification, DQ) und der Ausstattung des Arbeitsplatzes (Installation Qualification, IQ) sind LC-MS/MS spezifische Ansprüche zu berücksichtigen, welche in einem gängigen Routinelabor unter Umständen nicht einfach zu realisieren sind [12]. Erst nach erfolgreicher Geräteeinrichtung (gegebenenfalls dokumentiert durch eine Operation Qualification; OQ) kann mit der Erstellung eines Assays begonnen werden (Performance Qualification; PQ). Die Limitationen des Assays werden festgelegt, eine abschließende Validierung und Risikoanalyse schließen den mehrmonatigen Prozess der LC-MS/MS Immunsuppressiva TDM Etablierung für gewöhnlich ab. Nicht zu vergessen ist, dass aufgrund des oftmals beträchtlichen Methodenbias zu immunologischen Methoden eine zumindest mehrwöchige wenn nicht mehrmonatige Parallel-Messphase notwendig sein kann, um die Zuweiser an die neuen Messwerte zu gewöhnen (Abbildung 1) [64, 65].

Das bedeutendste analytische Problem der Massenspektrometrie ist unter dem Schlagwort Ionenunterdrückung (ion suppression) über den engeren Anwenderkreis hinaus bekannt geworden. Es wird gemeinhin als einer der größten Nachteile der Anwendung von Massenspektrometrie als Detektor in der Bioanalytik betrachtet [66, 67]. Bei der Ionenunterdrückung handelt es sich um verschiedene in der Ionenquelle (das ist das technisch komplexe Verbindungsstück zwischen Chromatographie und Massenspektrometer [60]) ablaufende Prozesse, welche zu einem kompletten Verlust der Ionenbildung oder zu einer Veränderung der Ionisierungsausbeute der Analyt-Moleküle (der „ion yield attenuation“) führen können. Gemeinsam mit dem Analyten in der MS-Quelle befindliche Matrixbestandteile sind in allen Fällen die kausativen Agentien. Die Elution von Detergenzien, Salzen oder von Laufmitteln der falschen Zusammensetzung (z.B. hoher Wasseranteil statt hohem Methanolanteil) führt in der Regel zu einem kompletten Zusammenbruch der Ionen-Bildung. Diese Effekte können über dutzende Sekunden andauern und betreffen in der Regel den Zeitraum der Elution von hydrophilen Probenanteilen (Matrix, Probenvorbereitungslösung). Zur Modulation der Analyt-Ionenausbeute kann es jederzeit kommen, es ist nur die zeitgleiche Elution von störenden Matrixbestandteilen (Metabolite, Xenobiotika ...) notwendig. Bei Molekülen, welche gute Ionen-Akzeptoren darstellen, ist mit einer Signalverminderung des beobachteten Analyten zu rechnen, während Ionen-Donatoren zu einer Signalverstärkung führen können. Da Schwankungen in der Ionenausbeute konzentrationsabhängige Effekte sind, unterdrücken höher konzentrierte Analyte weniger stark präsenzte Analyte. Dies ist speziell bei nicht ausreichend selektiven LC-Methoden bzw. bei der FIA-MS/MS (flow injection analysis MS/MS) ein nicht zu vernachlässigendes Problem.

Der Einsatz eines internen Standards (IS) kann diese Effekte in der LC-MS/MS nur dann ausgleichen, wenn Ana-

lyt und IS zeitgleich die Quelle des Massenspektrometers erreichen (Koelution aus der LC) und (zumindest hinsichtlich der Ionisierbarkeit) idente Eigenschaften aufweisen. Im Allgemeinen ist dies bei stabil-isotopen markierten internen Standards ausreichend gut gewährleistet [68]; wengleich dieses „Dogma der IDMS“ (IDMS, isotope dilution mass spectrometry) durch erste Fallbeispiele erschüttert wird [69, 70]. Analoge Verbindungen, die sind Substanzen mit identischem Grundkörper und geringen Veränderungen in den Substituenten, wie z.B. R = Ethyl statt Methyl, können auch verwendet werden. Hier ist aber immer Vorsicht geboten, besonders sorgfältige Validierungsexperimente werden empfohlen. Im Bereich des Immunsuppressiva-TDM kann Ascmycin als guter analoger interner Standard für Tacrolimus empfohlen werden, während bei Cyclosporin, Sirolimus und Everolimus die Situation nicht ganz so klar ist [71–73].

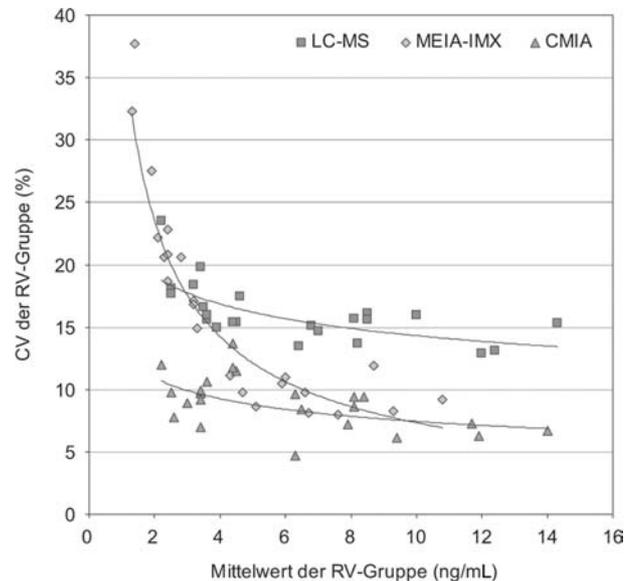
Trotz all der in den vorangegangenen Absätzen geschilderten Mühen bei der Assayetablierung und der Limitationen der Methode ist die LC-MS/MS eine durchaus wertvolle analytische Alternative zu Immunoassays. Die Statistik der UKNEQAS-Ringversuche (<http://www.bioanalytics.co.uk>), des größten und bedeutendsten Ringversuches im Immunsuppressiva-TDM zeigt, dass es mittlerweile zumindest an die einhundert operativ tätige LC-MS/MS-Installationen gibt, was einem relativen Anteil von 20 bis 50% entspricht (Abbildung 4). Neben den klaren analytischen Vorteilen wie

- i. Messung aller Immunsuppressiva mit einer Plattform
- ii. Substanz-spezifische Analyseergebnisse
- iii. bessere Assaysensitivität
- iv. geringe Ungenauigkeit der Ergebnisse
- v. hohe Analyserichtigkeit

können speziell in Zentren mit mehr als 10.000 Spezimen/Jahr finanzielle Überlegungen ins Treffen geführt werden, da nach erfolgter Anschaffung (Kostenrahmen rund 300.000 €) pro Analyse nur geringe laufende Kosten anfallen.

### Neue Analyse – Plattformen im Spiegel der Ringversuche

Wie oben bereits erwähnt, steht für das Immunsuppressiva-TDM neben den von DGKL ([www.dgkl-rfb.de](http://www.dgkl-rfb.de)) und INSTAND ([www.instandev.de](http://www.instandev.de)) angebotenen Ringversuchen im europäischen Bereich in erster Linie der international außerordentlich anerkannte UKNEQAS Ringversuch mit mehr als 500 Teilnehmern (bei Cyclosporin und Tacrolimus) zur Verfügung. Die außerordentlich hohe Dichte an Aussendungen (pro Jahr 12 für Cyclosporin, Tacrolimus und Sirolimus, 6 für Everolimus, 4 für MPA) und der regelmäßige Einschluss von Patientenproben (Poolproben) machen die UKNEQAS-Ringversuchsergebnisse zu einer wertvollen Datenbasis, um die Leistungsfähigkeit der Assayplattformen kritisch zu evaluieren. Da in der Auswertung die gängigen Immunoassays sowie die LC-MS/MS-Plattformen zu separaten Untergruppen zusammengefasst werden, können diese Vergleiche einfach vorgenommen werden. Sowohl die Analyse der Richtigkeit (Vergleich zur Einwaage bei aufgestock-



**Abbildung 5** Relative Standardabweichungen der UKNEQAS-Sirolimus-Ringversuchsergebnisse aufgetragen gegen das gefundene Gruppenmittel.

Für die Abschätzung der Analyserichtigkeit siehe Abbildung 3B und Tabelle 1. Die Plattformumstellung von MEIA auf CMIA hat eine deutliche Verbesserung der Wiederholbarkeit gebracht. Datenbasis: 23 Spikeproben aus 2009, Gruppenstärken: LC-MS ~ 100, MEIA ~ 50, CMIA ~ 25.

ten Proben bzw. Vergleich zur Substanz-spezifisch messenden LC-MS/MS-Gruppe) wie auch die Analyse der Streuung innerhalb einer Gruppe (Abschätzung der Assaygenauigkeit) erlauben wertvolle Rückschlüsse auf die Leistungsfähigkeit der Mess-Systeme unter Routinebedingungen.

So kann zum Beispiel für Sirolimus gezeigt werden (Abbildung 5), dass ein prospektierter Wechsel vom MEIA auf den CMIA Assay mit einer drastischen Verbesserung der Assayreproduzierbarkeit bei niedrigeren Messwerten einhergehen wird. Aus einer Studie ist bekannt [74], dass es möglich ist, aus den Variationskoeffizienten der RV-Gruppenergebnissen (Inter-Laboratory CV) die Analysegenauigkeit innerhalb eines einzelnen Labors (Intra-Laboratory CV) abzuschätzen, ohne selbst derartige Untersuchungen anstellen zu müssen. Nach diesen aus dem CAP (College of American Pathologists) Ringversuch abgeleiteten Daten ist  $CV_{intra} \sim 0.85 \cdot CV_{inter}$ .

Dies bedeutet, dass bei einer Gruppenstreuung im Ringversuch von  $CV_{inter} \sim 25\%–30\%$  die als LOQ anerkannte Fehlergrenze von  $CV = 20\%$  innerhalb eines Labors mit großer Sicherheit bereits überschritten wird. In diesem Beispiel bedeutet dies, dass die funktionelle Sensitivität des MEIA bei rund 2 bis 3 ng/mL liegt, während der CMIA ebenso wie die LC-MS-Plattformen Analysen bis weit unter 1 ng/mL erlauben. Analog können die Ringversuchsergebnisse von Cyclosporin, Tacrolimus und Everolimus beurteilt werden (Tabelle 1). Während es bei den Cyclosporin Assays keine Probleme hinsichtlich der Messpräzision gibt, sind einige der für Tacrolimus, Sirolimus oder Everolimus ange-

botenen Immunoassayplattformen nicht geeignet, reproduzierbare Analysen bei 3 ng/mL durchzuführen.

Auffallend ist beim Vergleich der Sirolimus-Assays auch, dass der CV der LC-MS-Gruppe deutlich über dem der Sirolimus-CMIA-Gruppe liegt (Abbildung 5). Da die zusätzliche Assayungenauigkeit, welche rund 7% beträgt, von der Analytkonzentration unabhängig ist, handelt es sich nicht um einen Verlust an Assaysensitivität bei verminderter Analytkonzentration (wie im MEIA/CMIA-Vergleich), sondern um einen zusätzlichen Beitrag zur Messunsicherheit, welcher sich nur in der Gesamtschau des Ringversuches manifestiert. Die Ursachen dafür sind unklar. Es darf aber spekuliert werden, dass speziell im Bereich des Sirolimus-TDM, bei welchem schon vor mehreren Jahren ein hoher Anteil der Laboratorien mangels Alternativen [75] zum Einsatz von chromatographischen Methoden gegriffen haben, veraltete Technologien (z.B. LC-MS statt LC-MS/MS) und heterogene (hausgemachte) Kalibrationssysteme (Ein-Punkt vs. Mehr-Punkt-Kalibrationen, unterschiedliche interne Standards etc.) im Einsatz sind.

Neben mangelnder Reproduzierbarkeit ist die aufgrund von Kreuzreaktivitäten prinzipiell fehlende Richtigkeit immunologischer Assays ebenfalls leicht aus Ringversuchsdaten abzulesen. Hier hilft speziell der Vergleich von aufgestockten Proben mit Patienten-Poolproben ähnlicher Konzentration, da letztere neben den zu analysierenden Substanzen auch noch deren Metabolite in unterschiedlicher Menge und Anzahl enthalten. Bereits aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass es bei einigen Immunoassays (z.B. Sirolimus MEIA, Cyclosporin CEDIA) bei der Quantifikation von Reinsubstanzen zu etwas tieferen Wertelagen kommt als bei der als Referenzmethode anerkannten LC-MS/MS. Bei entsprechend tiefer messender Kalibration (negativer Kalibrationsbias) wird auf diese Weise versucht, die aufgrund von unsauberer Analyterkennung durch den Antikörper auftretende Messwertüberschätzung (positiver Methodenbias) im Populationsmittel (ausschließlich dieses wird üblicherweise in Publikationen kommuniziert) auszugleichen (Abbildung 3). Das grundsätzliche Problem des Immunoassays – die Kreuzreaktivität vom Metaboliten mit dem primären Antikörper, welcher das Medikament erkennen soll – wird dadurch nicht ausgeglichen. Bei Patienten, welche nur geringe Metabolitkonzentrationen aufweisen, kann es durch diese nicht sachgerechten Korrekturversuche sogar zu Immunoassay-basierten Spiegelbestimmungen kommen, welche deutlich unter den LC-MS/MS-Messwerten liegen, während Patienten mit hohen Metabolitkonzentrationen nach wie vor zu hohe Werte aufweisen – ein an sich unplausibles und fragwürdiges Ergebnis (Abbildungen 1A, 3B).

## Ausblick

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es gegenwärtig eine gute Auswahl an Methoden gibt, um Immunsuppressiva-TDM zu gewährleisten. Keine der Techniken – seien es Immunoassays oder LC-MS/MS sind frei von analytischen Problemen und Fehlermöglichkeiten, beide bieten

distinkte Vor- und Nachteile. Aufgrund der großen Heterogenität in den Laborstrukturen ist damit zu rechnen, dass beide Lösungsmöglichkeiten weiterhin parallel existieren werden. Im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Analyseergebnisse haben die neuen CMIA-Assays einen Richtwert vorgegeben, an dem sich alle anderen Immunsuppressiva-TDM-Realisierungen zu messen haben. Einen Ringversuchsgruppen CV von maximal 7% bis 10% im therapeutischen Bereich zu erreichen, muss das mittelfristige Ziel aller Assays sein. Hinsichtlich der Assayrichtigkeit ist die bereits vor Jahrzehnten in der Laboratoriumsdiagnostik erkannte Problematik [76–78] weiterhin – und nicht nur beim Immunsuppressiva-TDM – weitgehend ungelöst [79].

Systematische Messabweichungen verhindern es, über die Schranken der Assays hinaus Patientenspiegelmessungen zu vergleichen. Dieses oftmals für den Kliniker nicht zu erkennende (weil nicht kommunizierte) Problem erschwert selbstverständlich die langfristige Patientenführung. Die Sensitivität der Assays wurde von den Immunoassay-Herstellern in den letzten Jahren klar vernachlässigt; das jahrelange Hin- und Herzögern einer dem klinischen Bedürfnis angepassten Assaygestaltung kann nicht akzeptiert werden. Ebenso inakzeptabel ist es, wenn LC-MS/MS-Assays ungenügend validiert als „lokale Einzelanfertigungen“ zum Einsatz kommen. Erst jüngst hat sich gezeigt, dass eine regelkonforme Validation und die Teilnahme an Ringversuchen nicht notwendigerweise ausreichen, um valide LC-MS/MS Assays zu generieren [80]. Es ist daher die Definition von technischen Mindeststandards für Chromatographie und MS/MS dringend notwendig, ebenso wie eine Harmonisierung der Assaykalibration gewährleistet werden muss.

## Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass kein Interessenkonflikt besteht.

## Literatur

1. Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther* 2002;24:330–50.
2. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later – progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* 2004;351:2761–6.
3. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715–29.
4. Oellerich M, Armstrong VW. The role of therapeutic drug monitoring in individualizing immunosuppressive drug therapy: recent developments. *Ther Drug Monit* 2006;28:720–5.
5. Golshayan D, Pascual M. Tolerance-inducing immunosuppressive strategies in clinical transplantation: an overview. *Drugs* 2008;68:2113–30.
6. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004;4:378–83.

7. Marcen R. Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. *Drugs* 2009;69:2227–43.
8. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004;4:1289–95.
9. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1998L0079:20031120:de:PDF>. Abfrage am 17.3.2010.
10. Vogeser M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry-application in the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:117–26.
11. Vogeser M, Parhofer KG. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)-technique and applications in endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007;115:559–70.
12. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory – goals for further developments. *Clin Biochem* 2008;41:649–62.
13. Korecka M, Shaw LM. Review of the newest HPLC methods with mass spectrometry detection for determination of immunosuppressive drugs in clinical practice. *Ann Transplant* 2009;14:61–72.
14. Chapman TM, Perry CM. Everolimus. *Drugs* 2004;64:861–72.
15. Bocchi E, Ahualli L, Amuchastegui M, Boullon F, Cerutti B, Colque R, et al. Recommendations for use of everolimus after heart transplantation: results from a Latin-American Consensus Meeting. *Transplant Proc* 2006;38:937–42.
16. Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Larsen ML. Setting goals for random analytical error in specific clinical monitoring situations. *Clin Chem* 1990;36:1625–8.
17. Steimer W. Performance and specificity of monoclonal immunoassays for cyclosporine monitoring: how specific is specific? *Clin Chem* 1999;45:371–81.
18. Schütz E, Svinarov D, Shipkova M, Niedmann PD, Armstrong VW, Wieland E, et al. Cyclosporin whole blood immunoassays (AxSYM, CEDIA, and Emit): a critical overview of performance characteristics and comparison with HPLC. *Clin Chem* 1998;44:2158–64.
19. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gürkan A, et al. ELITE-Symphony study. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007;357:2562–75.
20. Srinivas TR, Meier-Kriesche HU. Minimizing immunosuppression, an alternative approach to reducing side effects: objectives and interim result. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:S101–16.
21. Wallemaq P, Armstrong VW, Brunet M, Haufroid V, Holt DW, Johnston A, et al. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit* 2009;31:139–52.
22. Yatscoff RW, Boeckx R, Holt DW, Kahan BD, LeGatt DF, Sehgal S, et al. Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring of rapamycin: report of the consensus panel. *Ther Drug Monit* 1995;17:676–80.
23. Holt DW, Armstrong VW, Griesmacher A, Morris RG, Napoli KL, Shaw LM. International federation of clinical chemistry/international association of therapeutic drug monitoring and clinical toxicology working group on immunosuppressive drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2002;24:59–67.
24. Schütz E, Shipkova M, Wieland E, Niedmann PD, Armstrong VW, Oellerich M. Evaluation of an immunoassay for mycophenolic acid. *Ther Drug Monit* 2000;22:141–2.
25. Shipkova M, Schutz E, Armstrong VW, Niedmann PD, Wieland E, Oellerich M. Overestimation of mycophenolic acid by EMIT correlates with MPA metabolite. *Transplant Proc* 1999;31:1135–7.
26. Makela SK, Ellis G. Nonspecificity of a direct 17alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassay kit when used with samples from neonates. *Clin Chem* 1988;34:2070–5.
27. Perogamvros I, Owen LJ, Newell-Price J, Ray DW, Trainer PJ, Keevil BG. Simultaneous measurement of cortisol and cortisone in human saliva using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application in basal and stimulated conditions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:3771–5.
28. Lacey JM, Minutti CZ, Magera MJ, Tauscher AL, Casetta B, McCann M, et al. Improved specificity of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by second-tier steroid profiling using tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2004;50:621–5.
29. Steimer W, Müller C, Eber B. Digoxin assays: frequent, substantial, and potentially dangerous interference by spironolactone, canrenone, and other steroids. *Clin Chem* 2002;48:507–16.
30. Dasgupta A. Herbal supplements and therapeutic drug monitoring: focus on digoxin immunoassays and interactions with St. John's wort. *Ther Drug Monit* 2008;30:212–7.
31. Dewitte K, Fierens C, Stöckl D, Thienpont LM. Application of the Bland-Altman plot for interpretation of method-comparison studies: a critical investigation of its practice. *Clin Chem* 2002;48:799–801.
32. Fingerhut R. False positive rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia (CAH)-ether extraction reveals two distinct reasons for elevated 17alpha-hydroxyprogesterone (17-OHP) values. *Steroids* 2009;74:662–5.
33. Petersen PH, de Verdier CH, Groth T, Fraser CG, Blaabjerg O, Horder M. The influence of analytical bias on diagnostic misclassifications. *Clin Chim Acta* 1997;260:189–206.
34. Siegel RW, Baugher W, Rahn T, Drenkler S, Tyner J. Affinity maturation of tacrolimus antibody for improved immunoassay performance. *Clin Chem* 2008;54:1008–17.
35. Staples MA. Reagents for assays for mycophenolic acid. WO9803876.
36. Staples MA, Haley CJ, Parrish RF, Zmolek WW. Releasing reagents for assays for ligands, and application to determination of mycophenolic acid. WO9803877.
37. Seger C, Tentschert K, Griesmacher A. Evaluating performance limitations of a tacrolimus immunoassay by comparison with a HPLC-MS/MS platform. *Ther Drug Monit* 2007;29:509.
38. Napoli KL. Is microparticle enzyme-linked immunoassay (MEIA) reliable for use in tacrolimus TDM? Comparison of MEIA to liquid chromatography with mass spectrometric detection using longitudinal trough samples from transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2006;28:491–504.
39. Brown NW, Gonde CE, Adams JE, Tredger JM. Low hematocrit and serum albumin concentrations underlie the overestimation of tacrolimus concentrations by microparticle enzyme immunoassay versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2005;51:586–92.
40. Bouzas L, Ortega FJ, Casado P, Arranz MI, Carcas A, Tutor JC. Effect of the hematocrit and its correction on the relationship between blood tacrolimus concentrations obtained using the microparticle enzyme immunoassay (MEIA) and enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT). *Clin Lab* 2007;53:591–6.
41. Tomita T, Homma M, Hasegawa Y, Kojima H, Ohkohchi N, Hori T, et al. Use of sample hematocrit value to correct blood

- tacrolimus concentration derived by microparticle enzyme immunoassay. *Biol Pharm Bull* 2008;31:1250–3.
42. Schmid RW, Lotz J, Schweigert R, Lackner K, Aimo G, Friese J, et al. Multi-site analytical evaluation of a chemiluminescent magnetic microparticle immunoassay (CMIA) for sirolimus on the Abbott ARCHITECT analyzer. *Clin Biochem* 2009;42:1543–8.
  43. Maine GT, Edwards M, Haverstick DM, Sluss P, Young J, Schmidt E, et al. Analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT cyclosporine assay in comparison to LC/MS/MS and Abbott TDX/FLX. *Clin Biochem* 2008;41:1274.
  44. Maine GT, Wallemacq P, Ait-Youcef H, Berg K, Young J, Schmidt E, et al. Analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT cyclosporine assay in comparison to LC/MS/MS and Dade Dimension Xpand. *Clin Biochem* 2008;41:1274–5.
  45. Boer K, Brehmer-Streck S, Deufel T, Schmidt D, Kiehnopf M. Automated monitoring of C2 and C0 blood levels of mycophenolic acid and cyclosporine on the Abbott Architect c8000. *Clin Biochem* 2007;40:1163–7.
  46. Siegel RW, Baugher W, Rahn T, Drengler S, Tyner J. Affinity maturation of tacrolimus antibody for improved immunoassay performance. *Clin Chem* 2008;54:1008–17.
  47. Schmid S, Gruber B, Schmid RW. Semi-automated & automated sample preparation for the immunological immunosuppressant monitoring on the Architect analyzer. *Ther Drug Monit* 2009;51:650.
  48. Hermida J, Tutor JC. Falsely increased blood tacrolimus concentrations using the ACMIA assay due to circulating endogenous antibodies in a liver transplant recipient: a tentative approach to obtaining reliable results. *Ther Drug Monit* 2009;31:269–72.
  49. Altinier S, Varagnolo M, Zaninotto M, Boccagni P, Plebani M. Heterophilic antibody interference in a non-endogenous molecule assay: an apparent elevation in the tacrolimus concentration. *Clin Chim Acta* 2009;402:193–5.
  50. Moscato D, Nonnato A, Adamo R, Vancheri M, Caropreso A. Therapeutic monitoring of tacrolimus: aberrant results by an immunoassay with automated pre-treatment. *Clin Chim Acta* 2010;411:77–80.
  51. Martin BB, Marquet P, Ferrer JM, Puig BC, Bennisar AB, Prieto MR, et al. Rheumatoid factor interference in a tacrolimus immunoassay. *Ther Drug Monit* 2009;31:743–5.
  52. van Gelder T, Le Meur Y, Shaw LM, Oellerich M, DeNofrio D, Holt C, et al. Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in transplantation. *Ther Drug Monit* 2006;28:145–54.
  53. Kuypers DR, Meur YL, Cantarovich M, Tredger MJ, Tett SE, Cattaneo D, et al. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:341–58.
  54. Kaplan B. Mycophenolic acid trough level monitoring in solid organ transplant recipients treated with mycophenolate mofetil: association with clinical outcome. *Curr Med Res Opin* 2006;22:2355–64.
  55. Premaud A, Rousseau A, Le Meur Y, Lachatre G, Marquet P. Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a commercial enzyme-multiplied immunoassay for the determination of plasma MPA in renal transplant recipients and consequences for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2004;26:609–19.
  56. Shipkova M, Schütz E, Besenthal I, Fraunberger P, Wieland E. Investigation of the crossreactivity of mycophenolic acid glucuronide metabolites and of mycophenolate mofetil in the Cedia MPA assay. *Ther Drug Monit* 2010;32:79–85.
  57. van Gelder T, Domke I, Engelmayr J, de Fijter H, Kuypers D, Budde K, et al. Clinical utility of a new enzymatic assay for determination of mycophenolic acid in comparison with an optimized LC-MS/MS method. *Ther Drug Monit* 2009;31:218–23.
  58. Brandhorst G, Marquet P, Shaw LM, Liebisch G, Schmitz G, Coffing MJ, et al. Multicenter evaluation of a new inosine monophosphate dehydrogenase inhibition assay for quantification of total mycophenolic acid in plasma. *Ther Drug Monit* 2008;30:428–33.
  59. Kebarle P, Verkerk UH. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom Rev* 2009;28:898–917.
  60. Covey TR, Thomson BA, Schneider BB. Atmospheric pressure ion sources. *Mass Spectrom Rev* 2009;28:870–97.
  61. Vogeser M, Spöhrer U. Pitfall in the high-throughput quantification of whole blood cyclosporin A using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:400–2.
  62. Vogeser M, Zachoval R, Spöhrer U, Jacob K. Potential lack of specificity using electrospray tandem-mass spectrometry for the analysis of mycophenolic acid in serum. *Ther Drug Monit* 2001;23:722–4.
  63. Ceglarek U, Lembcke J, Fiedler GM, Werner M, Witzigmann H, Hauss JP, et al. Rapid simultaneous quantification of immunosuppressants in transplant patients by turbulent flow chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2004;346:181–90.
  64. Seger C, Tentschert K, Stögl W, Griesmacher A, Ramsay SL. A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus and everolimus in human blood samples. *Nat Protoc* 2009;4:526–34.
  65. Napoli KL. Is microparticle enzyme-linked immunoassay (MEIA) reliable for use in tacrolimus TDM? Comparison of MEIA to liquid chromatography with mass spectrometric detection using longitudinal trough samples from transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2006;28:491–504.
  66. Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* 2003;49:1041–4.
  67. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005;38:328–34.
  68. Thienpont LM, Van Uytvanghe K, Blincko S, Ramsay CS, Xie H, Doss RC, et al. State-of-the-art of serum testosterone measurement by isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2008;54:1290–7.
  69. Wang S, Cyronak M, Yang E. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2007;43:701–7.
  70. Lindegardh N, Annerberg A, White NJ, Day NP. Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of piperazine in plasma stable isotope labeled internal standard does not always compensate for matrix effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;862:227–36.
  71. Taylor PJ. Internal standard selection for immunosuppressant drugs measured by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2007;29:131–2.
  72. Taylor PJ, Brown SR, Cooper DP, Salm P, Morris MR, Pillans PI, et al. Evaluation of 3 internal standards for the measurement of cyclosporin by HPLC-mass spectrometry. *Clin Chem* 2005;51:1890–3.

73. Hoogtanders K, van der Heijden J, Stolk LM, Neef C, Christiaans M, van Hooff J. Internal standard selection for the high-performance liquid chromatography tandem mass spectroscopy assay of everolimus in blood. *Ther Drug Monit* 2007;29:673–4.
74. Steele BW, Wang E, Soldin SJ, Klee G, Elin RJ, Witte DL. A longitudinal replicate study of immunosuppressive drugs. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:283–8.
75. Holt D, Moreton M, Laamanen K, Johnston A. A microparticle enzyme immunoassay to measure sirolimus. *Transplant Proc* 2005;37:182–4.
76. Tietz NW. Accuracy in clinical chemistry – does anybody care? *Clin Chem* 1994;40:859–61.
77. Müller MM. Implementation of reference systems in laboratory medicine. *Clin Chem* 2000;46:1907–9.
78. Thienpont LM. Accuracy in clinical chemistry – who will kiss sleeping beauty awake? *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1220–2.
79. Stöckl D, Sluss PM, Thienpont LM. Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. *Clin Chim Acta* 2009; 408:8–13.
80. Anonymous. Quality Review Investigating the Underestimation of Cyclosporine Levels Preliminary Report (Eastern Health, Canada 2010). <http://www.easternhealth.ca/viewNewsPDF.aspx?d=1&id=61&p=52&nid=235>. Abfrage am 17.3.2010.