

Etude comparative de deux techniques de dosage de l'acide Mycophénolique

Comparative study of two techniques of Mycophenolate mofetyl monitoring

Nadia Jebabli, Emna Gaïes, Rim Charfi, hanène El Jebari, Mouna Ben Sassi, Issam Salouage, Riadh Daghfous, Sameh Trabelsi

Centre National de pharmacovigilance/ Tunis El Manar

RÉSUMÉ

Introduction : Le Mycophénolate mofétile est un promédicament de l'acide mycophénolique (AMP). L'AMP possède une fourchette thérapeutique étroite et sa pharmacocinétique est caractérisée par une variabilité inter et intra individuelle et une faible corrélation entre la concentration sanguine résiduelle et la dose administrée. Son suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est devenu pratique courante après des greffes rénales, hépatiques et cardiaques.

Objectif : Comparer deux méthodes de dosage de l'AMP (Cloned enzyme donor immunoassay Enzyme Multiplied Immunoassay Technique : CEDIA vs la chromatographie liquide couplée à un détecteur UV : CLHP -UV).

Méthodes : Cent quatorze échantillons issus de 114 patients adultes transplantés rénaux ont été analysés selon les deux méthodes.

Résultats : Les concentrations d'AMP ont été sur-estimées par la méthode CEDIA par rapport à la méthode HPCL-UV avec un biais de 37 %. Les études statistiques ont montré que les deux techniques sont répétables et reproductibles. La comparaison des résultats trouvés par les deux techniques a montré une bonne corrélation.

Conclusion : La technique CEDIA plus rapide a été adoptée pour le STP chez les patients traités par ce médicament.

Mots-clés

Acide mycophénolique, suivi thérapeutique pharmacologique, Cloned enzyme donor immunoassay

SUMMARY

Introduction: Mycophenolic acid (MPA) requires routine therapeutic drug monitoring.

Aim: To evaluate the suitability of a MPA Immunoassay CEDIA performed on Indiko® analyzer (Thermo fisher) for monitoring of MPA by comparing values obtained by HPLC-UV method.

Methods: This study was carried out on 114 blood samples collected from renal transplant, using high performance liquid chromatography combined with ultraviolet detection (HPLC-UV, reference method) and the new immunoassay on CEDIA.

Results: The assay was linear for a mycophenolic acid concentration up to 10 µg/mL. When MPA concentrations in all 114 transplant recipients obtained by the HPLC-UV (x-axis) method were compared with corresponding values obtained by the CEDIA® method (y-axis), the following regression equation was obtained: $CEDIA® = 1.558 HPLC + 0.49$ ($r = 0.86$). However more significant positive bias was observed (37 %).

Conclusion: The data presented suggest that the CEDIA® MPA immunoassay, run on the Indiko® analyzer, over-estimates plasma MPA concentrations. However, CEDIA® immunoassay is less laborious and time consuming than chromatographic techniques.

Key-words

Mycophenolic acid, therapeutic drug monitoring, Cloned enzyme immunoassay

INTRODUCTION

L'acide Mycophénolique (AMP) est le produit de fermentation de plusieurs souches de *Penicillium* [1]. Il est utilisé pour prévenir les rejets de greffes chez les patients transplantés. L'AMP est principalement utilisé en transplantation rénale, mais également en transplantation hépatique, pulmonaire et cardiaque. Il est la plupart du temps associé à au moins une autre classe d'immunosuppresseurs tels que la ciclosporine (CsA) et le tacrolimus. Le suivi thérapeutique et pharmacologique (STP) de l'AMP est recommandé vu la forte variabilité inter- et intra-individuelle [2-3], ainsi que la relation entre la concentration plasmatique de l'AMP et l'apparition de rejet aigu ou d'effets indésirables. Malgré son efficacité confirmée, ce médicament peut donc exposer au risque d'échec thérapeutique par sous dosage (concentration inférieure au seuil d'efficacité) ou au risque de toxicité par sur dosage (concentration supérieure au seuil de toxicité) pouvant être à l'origine de troubles d'ordre digestif (douleurs abdominales, vomissements, diarrhées), hématologique (leucopénie) et infectieux avec, notamment, une augmentation des infections à cytomégalovirus [3]. Dans certains cas, ces troubles nécessitent une réduction des doses ou l'arrêt du traitement. On note également des cas de leucopénies, favorisant les complications infectieuses. Pour éviter ces risques, une adaptation individuelle de la posologie du mycophénolate mofétil, en fonction des concentrations plasmatiques de l'AMP, est nécessaire.

Plusieurs techniques de dosage ont été utilisées. Les premières méthodes utilisées étaient des méthodes chromatographiques, méthode de référence, car elles sont spécifiques et sensibles. Toutefois, ces méthodes sont longues, nécessitent des étapes d'extraction complexes et un personnel qualifié. Ces techniques chromatographiques ont été délaissées au profit des techniques immunologiques qui sont aujourd'hui les plus utilisées [2-4].

Dans le laboratoire de Pharmacologie Clinique du Centre National de Pharmacovigilance, le dosage de l'AMP a débuté en 2002 par méthode chromatographique à détection UV-Visible. A partir de 2014 le dosage de l'AMP est réalisé par une technique immunoenzymatique : (CEDIA) moyennant l'automate Indiko® vu le nombre élevée de prélèvements.

L'objectif de cette étude était de comparer les concentrations plasmatiques de l'AMP obtenues par

la technique de référence (HPLC) avec la technique automatisée (CEDIA) avant d'instaurer cette dernière en routine pour une prise en charge plus rapide des patients greffés qui nous sont adressés pour ce dosage.

MÉTHODES

Cette étude a été réalisée au Service de Pharmacologie Clinique, au Centre National de Pharmacovigilance, durant une période de six mois allant d'Août 2014 à Janvier 2015. Le dosage de l'AMP a été réalisé sur du plasma. Les prélèvements sanguins ont été effectués sur tubes héparinés ou EDTA (Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique). Le prélèvement se fait le matin à T0 juste avant la prise de l'AMP.

Le dosage de l'AMP a été effectué par deux techniques :

Méthode CLHP (chromatographie Liquide à Haute Performance) choisi comme technique de référence.

Appareillage : Le système de CLHP utilisé dans notre travail est composé d'une Pompe Prostar 240, d'un détecteur UV-visible Prostar 325 LC, d'un four Prostar 510 et d'un auto-sampler Prostar 410. Les chromatogrammes sont enregistrés et les calculs de concentration effectués à l'aide d'un intégrateur D-2500. Tous ces matériaux sont commercialisés par la Société Varian®. L'acquisition et l'intégration des résultats ont été réalisées à l'aide du logiciel Galaxie version 1.9.3.2 Pentium 4HT.

Solvants et réactifs : Tous les réactifs et les solvants utilisés dans notre travail sont de qualités CLHP. Nous avons utilisé, de l'acétonitrile, du méthanol, de l'acide acétique, du dichlorométhane, du diéthylether et de l'eau bidistillée. Le plasma de référence provient du laboratoire d'hématologie de l'Hôpital Charles-Nicolas de Tunis.

Etape chromatographique : La phase mobile est composée de tampon phosphate à 0,05 Mol/L pH = 3, et d'acétonitrile (60/40 : V/V). Elle subit une filtration type Büchner sur filtre 0,45 µm fourni par Millipore. La phase mobile est dégazée et le débit est de 0,8 mL/min. Le volume d'injection est de 50 µL et la durée totale de l'injection est de 10 min. Une fois l'identification des composés réalisée, leur quantification est faite par la mesure de l'aire des pics obtenus qui est proportionnelle à la quantité du produit analysé. Le calcul de la concentration de l'AMP dans l'échantillon se fait grâce à l'ajout de l'étalon interne (l'indométacine).

Préparation des échantillons : Le protocole de déprotéinisation/extraction s'applique à la gamme

d'étalonnage et au plasma des patients. À une prise d'essai de 200 µL de plasma introduite dans un tube à fond conique, sont ajoutés et mélangés 25 µL d'étalon interne et 200 µL d'acétonitrile ; les tubes sont ensuite centrifugés à 4000 tours/min pendant 10 min. Le surnageant est transféré dans un autre tube est évaporée sous flux d'azote à 40 °C. Le résidu est repris par 100 µL de phase mobile et le volume injecté est de 50 µL.

Méthode CEDIA (Cloned enzyme donorimmunoassay) par Indiko®.

Le dosage CEDIA MPA utilise les techniques de l'ADN recombinant (brevet américain n° 4708929) pour produire un système de dosage immunoenzymatique en phase homogène unique. Le dosage repose sur une enzyme, la galactosidase, qui a été scindée par génie génétique en deux fragments inactifs appelés enzyme donneur (ED) et enzyme accepteur (EA). Ces fragments se réunissent spontanément pour former un enzyme totalement active, qui dans le cadre du dosage, clive un substrat, ce qui entraîne un changement de couleur que l'on peut mesurer par spectrophotométrie. Dans le dosage, l'analyte de l'échantillon entre en compétition avec l'analyte conjugué à l'ED de la galactosidase pour un nombre limité de sites de liaison de l'anticorps. Si l'analyte est présent dans l'échantillon, il se lie à l'anticorps, laissant ainsi le conjugué ED former des enzymes actives avec l'EA. Si l'analyte n'est pas présent dans l'échantillon, l'anticorps se lie à l'analyte conjugué à l'ED, inhibant la réunification de l'ED à l'EA, et aucune enzyme active n'est formée. La quantité d'enzyme active formée et la modification de l'absorbance correspondante sont directement proportionnelles à la quantité de drogue dans l'échantillon.

La technique CEDIA est linéaire dans un intervalle de concentration de l'AMP allant de 0 à 10 µg/mL.

- Le dosage de l'AMP par cette technique nécessite une étape d'extraction de l'AMP à partir du plasma en utilisant des réactifs de précipitation et de solubilisation spécifiques de l'automate.

- La calibration consiste à analyser les deux calibrateurs en double pour tracer la courbe d'étalonnage. La plage de calibration est de 0,3 à 10 µg/mL.

- Le contrôle qualité recommandée pour le dosage CEDIA de l'AMP consiste à analyser un échantillon de chaque niveau de contrôle, chaque jour d'utilisation. Si les résultats d'un contrôle ne se situent pas dans ces limites, les résultats des échantillons analysés dans la même

série ne sont pas valides et ces échantillons devront être réanalysés. Une recalibration peut alors être nécessaire.

Au cours de notre travail, nous avons utilisé des contrôles qualité disponibles dans le commerce : contrôles Thermo FisherScientific. Les valeurs moyennes de ces contrôles ainsi que de leurs limites inférieures et supérieures sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Valeur vraie de chaque contrôle

	Valeur moyenne (ng/mL)	Limite inférieure (ng/mL)	Limite supérieure (ng/mL)
Contrôle Low	1,1	0,8	1,4
Contrôle Medium	3,2	2,2	4,2
Contrôle High	6,9	4,8	9

- Méthode HPLC -UV a été choisie comme technique de référence de cette étude puisque c'est la technique utilisée pour le dosage de routine de l'AMP dans le laboratoire. Cette technique est linéaire dans un intervalle de concentrations allant de 0 à 25 µg/mL.

Le dosage effectué par les deux techniques est un dosage quantitatif. Afin d'obtenir des résultats optimaux, il est nécessaire de suivre avec précision le processus de prétraitement manuel décrit par le fournisseur.

La fourchette thérapeutique de l'AMP varie de 1-3,5µg/mL. Les concentrations sanguines inférieures à 1µg/mL sont des concentrations infra thérapeutiques et exposent le patient au risque d'échec thérapeutique et les concentrations supérieures à 5µg/mL sont supra thérapeutiques et exposent le patient au risque de toxicité.

Le résultat du dosage du contrôle qualité est accepté si

- le résultat est compris entre la limite supérieure et inférieure spécifiée pour chaque contrôle

- le biais < à 20%

Biais (%) = [(Concentration trouvée – concentration théorique)/concentration théorique]* 100

Différentes étapes du travail

La répétabilité

La répétabilité est la mesure de la variabilité minimale des résultats. Elle se rapporte à des essais de la même grandeur effectués dans des conditions aussi stables que possible et à de courts intervalles de temps dans un même laboratoire par un même opérateur employant le même équipement.

L'étude de la répétabilité, selon le protocole de validation

publié par la Food and Drug Administration, consiste à :

- doser les standards (trois niveaux) six fois, le même jour, par le même opérateur et par la même technique
- calculer le coefficient de variation pour chaque technique et pour chaque niveau :

$$CV = (\text{Ecart-type} / \text{la moyenne}) * 100$$

Tous les CV doivent être < 10 %.

La reproductibilité

C'est la mesure de la variabilité maximale des résultats. Elle se rapporte à des essais effectués dans des conditions fortement variables dans différents laboratoires et/ou par différents opérateurs et/ou avec des équipements différents à des jours différents.

L'étude de la reproductibilité, selon le protocole de validation publié par la Food and Drug Administration, consiste à :

- doser les standards (trois niveaux) six fois, par le même opérateur et par la même technique, mais pendant trois jours différents.
- calculer le coefficient de variation pour chaque technique et pour chaque niveau : $CV = (\text{Ecart-type} / \text{la moyenne}) * 100$

Tous les CV doivent être < 10 % ; Comparaison inter journalière : CV% pour les 3 moyennes de chaque niveau

Dosage des échantillons sanguins par les deux techniques

Chaque échantillon sanguin a été dosé deux fois :

- la première fois par l'CLHP (technique de référence)
- la deuxième fois par la méthode CEDIA

Les résultats des dosages ne sont validés et acceptés que si le contrôle qualité utilisé avec ces dosages étaient dans les limites spécifiées.

Comparaison des résultats trouvés par les deux méthodes

La mesure est donnée par la moyenne arithmétique de différentes valeurs de la série :

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

L'écart-type, ou S, est défini comme la racine carrée de la variance V:

$$\sigma^2 = V = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2$$

d'où

$$\Delta x = \sigma = \sqrt{V} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

L'erreur sur la moyenne de mesures effectuées :

$$\Delta \bar{x} = \frac{1}{\sqrt{N}} \Delta x$$

L'intervalle de confiance est une estimation de la confiance à accorder à une valeur mesurée ou estimée, elle est souvent assimilée à la précision de la mesure. Il définit la probabilité que la valeur réelle de la mesure soit contenue dans cet intervalle par rapport à la valeur déjà obtenue.

On exprime P% par $\alpha = 1 - P/100$ avec α est le risque.

L'intervalle de confiance :

$$\left[\bar{x} - \frac{t.s}{\sqrt{N}}, \bar{x} + \frac{t.s}{\sqrt{N}} \right]$$

S est l'écart type, t est le t statistique de Student avec DDL = N-1 et N est le nombre de mesures.

RÉSULTATS

Etude de la répétabilité

Chaque contrôle qualité a été dosé 10 fois par chaque technique, le même jour et par le même opérateur. Trois contrôles ont été utilisés L, M et H.

Les résultats sont représentés dans le tableau 2.

Toutes les valeurs ont été acceptées puisque les concentrations trouvées étaient comprises dans les limites spécifiées des contrôles. Le biais calculé pour chaque valeur était < à 20%.

Pour la méthode CEDIA par Indiko®, le calcul des CV pour les trois contrôles (L, M, H) a donné des valeurs inférieures à 10%. Donc cette technique est répétable.

Pour la méthode HPLC-UV, le calcul des CV pour les trois contrôles (L, M, H) a donné des valeurs inférieures à 10%. Donc cette technique est aussi répétable.

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des CV des contrôles qualité de l'étude de la répétabilité pour le dosage des concentrations de l'AMP par HPLC-UV et par CEDIA.

Technique de dosage	Niveau de contrôle	Effectif	Moyenne (ng/mL)	Ecart-type (ng/mL)	Min (ng/mL)	Max (ng/mL)	CV (%)
HPLC-UV	L	10	1,13	0,10	1	1,29	8,85
	M	10	3,04	0,26	2,76	3,65	8,55
	H	10	6,97	0,60	6,74	7,82	8,60
CEDIA par Indiko®	L	10	0,84	0,074	0,76	0,76	8,80
	M	10	2,78	0,12	2,59	2,95	4,31
	H	10	7,26	0,24	7,04	7,77	3,30

En conclusion cette étape a montré que les deux techniques qui vont être comparées au cours de ce travail sont répétables.

Etude de la reproductibilité

Dans cette étude trois contrôles ont été dosés par les deux méthodes (un contrôle par jour)

Les résultats sont détaillés dans le tableau ci-dessous.

Chaque concentration représente la valeur trouvée suite au dosage d'un contrôle qualité (L, M ou H) à des jours différents. Toutes ces concentrations ont été validées puisque le biais était < 20%.

L'étude des CV est résumée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des CV des contrôles qualité de l'étude de la reproductibilité pour le dosage des concentrations de de l'AMP par HPLC-UV et par CEDIA.

Technique de dosage	Niveau de contrôle	Effectif	Moyenne (ng/mL)	Ecart-type (ng/mL)	Min (ng/mL)	Max (ng/mL)	CV (%)
HPLC-UV	L	10	1,15	0,077	1,03	1,31	6,69
	M	10	3,5	0,30	2,13	3,93	8,57
	H	10	7,35	0,39	6,83	7,94	5,3
CEDIA par Indiko®	L	10	0,82	0,062	0,76	0,94	7,56
	M	10	2,80	0,14	2,59	2,95	5
	H	10	7,51	0,38	7,045	7,94	5

En conclusion cette étape a montré que les deux techniques CLHP-UV et CEDIA qui sont utilisées au cours de ce travail sont reproductibles puisque le calcul des CV pour les trois contrôles (L, M, H) a donné des valeurs inférieures à 10%.

Résultats du dosage des échantillons sanguins

Dans cette étude, 114 échantillons sanguins provenant de patients ayant bénéficié d'une transplantation rénale ont été analysés par les deux techniques. Chaque échantillon a été analysé par les 2 techniques le même jour. Ce travail a été réalisé par série de 10 à 15 échantillons par jour. Chaque série comporte un contrôle qualité. Les résultats trouvés n'ont été acceptés que si la valeur du contrôle qualité était comprise dans les limites spécifiées du contrôle utilisé.

Les résultats trouvés ont varié de 0 à 14,61 µg/mL. Cette répartition était faite en prenant les valeurs obtenues par l'HPLC comme valeurs de référence. L'analyse statistique a porté sur l'ensemble des résultats.

Etude comparative des résultats obtenus par HPLC et par CEDIA

Afin d'étudier la corrélation entre les deux techniques, nous avons tracé la courbe de régression linéaire où les concentrations trouvées par la méthode de référence HPLC étaient représentées sur l'axe des abscisses et les concentrations trouvées par CEDIA (Indiko®) étaient représentées sur l'axe des ordonnées (Figure 1).

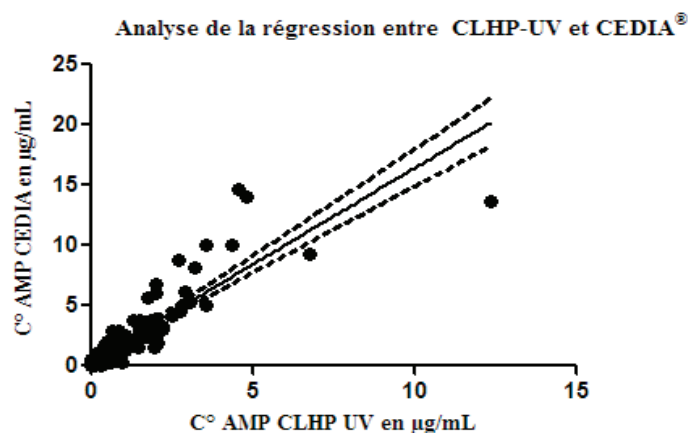


Figure 1 : Régression linéaire entre les concentrations d'AMP déterminées par CEDIA et HPCL-UV sur des prélèvements provenant de patients transplantés rénaux ($n = 114$)

Cette étude a permis d'établir la fonction suivante :

$$AMP_{CEDIA}^{\otimes} = 1,558AMP_{HPLC}^{\otimes} + 0,49 \text{ (en } \mu\text{g/mL)}$$

D'où, il existe une corrélation acceptable entre les deux méthodes avec un coefficient de corrélation $r = 0,86$.

Ensuite, nous avons effectué une étude statistique par le test de student et en ANOVA, 1 facteur et série appariée, qui n'a pas montré de différence significative entre les deux techniques avec $p = 0,47$.

DISCUSSION

Les résultats de notre étude ont montré une concordance entre les deux méthodes, avec une surestimation des concentrations en AMP par la technique CEDIA. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment publiés. En effet de nombreux auteurs ont montré que les méthodes immunologiques surestimaient les concentrations d'AMP par rapport à celles obtenues par CLHP-UV, de 12 % selon Vogl et al. [9], 11 % selon Hosotsubo et al. [10], 18,8 % selon Beal et al. [11] et jusqu'à 35 % selon Irtan et al. [6]. Cette surestimation serait due à une réaction croisée entre les anticorps de détection utilisés dans la méthode EMIT et l'AMP-acyl-glucuronate (AMPaG), métabolite actif de l'AMP [7-8-12]. En effet les méthodes immunologiques reposent sur l'utilisation d'un anticorps spécifique de la molécule à doser. Elles présentent le gros avantage d'être rapides car entièrement automatisables et ne nécessitant pas de phase préliminaire d'extraction. Le résultat peut donc être obtenu rapidement dans les cas de surdosage. Leur spécificité et leur sensibilité sont bonnes. Cependant ces méthodes ne permettent pas le dosage des métabolites, qui peuvent dans certains cas être actifs et participer à l'activité pharmacologique, à l'origine parfois de discordance entre concentration plasmatique et effet clinique. Contrairement aux méthodes chromatographiques, qui sont des techniques de séparation qui permettent l'analyse d'un mélange en individualisant les différents constituants de ce mélange. L'étape chromatographique, nécessite au préalable une phase d'extraction de l'échantillon, rendant ces techniques longues. Elles nécessitent par ailleurs un équipement particulier réservé à certains laboratoires. Les méthodes chromatographiques sont très sensibles et spécifiques, pouvant permettre le dosage des métabolites.

L'objectif de cette étude était de comparer les résultats du dosage de l'AMP obtenus par HPLC et par CEDIA afin

d'adopter cette dernière en routine. Pour cela cette étude a comporté une première partie où la répétabilité et la reproductibilité ont été étudiées, et une deuxième partie concernant le dosage comparatif de 114 échantillons plasmatiques moyennant les deux techniques de dosage. Les études statistiques ont montré que les deux techniques sont répétables et reproductibles. La comparaison des résultats trouvés par les deux techniques a montré une bonne corrélation entre les résultats trouvés par l'CLHP et les résultats trouvés par CEDIA ($r = 0,86$), dans la littérature ce coefficient était variable de 0,83 à 0,97 (tableau 5). Les résultats trouvés par CEDIA sont légèrement supérieurs à ceux obtenus par l'CLHP mais la différence n'est pas significative.

Tableau 4 : Résultats du dosage par CEDIA par Indiko®

Technique de dosage	Effectif	Moyenne ($\mu\text{g/mL}$)	Ecart-type ($\mu\text{g/mL}$)	Médiane ($\mu\text{g/mL}$)	Min ($\mu\text{g/mL}$)	Max ($\mu\text{g/mL}$)
HPLC-UV	114	1,24	1,57	0,79	0	12,36
CEDIA par Indiko®	114	2,39	2,9	1,63	0	14,61

Table 5: Les equations de corrélation entre CEDIA et CLHP.

Study	Equation of the linear correlation curve	R	N
Notre étude	$AMP(CEDIA) = 0.49 + 1.558 AMP(HPLC)$	0,86	114
Westley et al. [5]	$AMP(CEDIA) = 0.45 + 1.18 AMP(HPLC)$	0,83	142
Dagusta et al. [7]	$AMP(CEDIA) = 1,083 AMP(HPLC) - 0.0099$	0,99	20
Dagusta et al. [8]	$AMP(CEDIA) = 0.28 + 1,15 AMP(HPLC)$	0,97	60

CONCLUSION

Les études statistiques ont montré que malgré la surestimation de la technique CEDIA par rapport à l'HPLC les deux techniques sont répétables et reproductibles. La comparaison des résultats trouvés par les deux techniques a montré une bonne corrélation entre les résultats trouvés par CEDIA et les résultats trouvés par HPLC. Les résultats trouvés par CEDIA ont légèrement supérieurs à ceux obtenus par HPLC mais la différence est non significative. Donc on peut conclure que CEDIA peut être utilisé pour le dosage de l'AMP en remplacement de l'HPLC.

REFERENCES

1. Wu JC. Mycophenolatemofetil: molecular mechanisms of action. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 1994; 2:185-204.
2. Tredger JM, Brown NW, Adams JE, Gondé G, Dhawan A, Rela M, et al. Monitoring mycophenolate in liver transplant recipients: toward a therapeutic range. *Liver Transplantation* 2004; 10:492-502.
3. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *ClinPharmacokinet* 2007;46:13-58.
4. Shipkova M, Schutz E, Besenthal I, Fraunberger P, Weiland E. Investigation of the crossreactivity of mycophenolic acid glucuronide metabolites and of mycophenolic acid mofetil in the CEDIA MPA assay. *Therapeutic Drug Monitoring* 2010;32:79-85.
5. Westley IS, Ray JE, Morris RG. CEDIA mycophenolic acid assay compared with HPLC-UV in specimens from transplant recipients. *Therapeutic Drug Monitoring* 2006;28:632-6.
6. Irtan S, Azougagh S, Monchaud C, Popon M, Baudouin V, Jacqz-Aigrain E. Comparison of high performance liquid chromatography and enzyme multiplied immunoassay technique to monitor mycophenolic acid in pediatric renal recipients. *Pediatric Nephrology* 2008;23:1859-65.
7. Dasgupta A, Johnson M, Tso G. Mathematical equations to calculate true mycophenolic acid concentration in human plasma by using two immunoassays with different cross-reactivities with acyl glucuronide metabolite: comparison of calculated values with values obtained by using an HPLC-UV method. *Journal of Clinical Laboratory analysis*. 2013;27(4):290-3.
8. Dasgupta A, Johnson M. Positive bias in mycophenolic acid concentrations determined by the CEDIA assay compared to HPLC-UV method: is CEDIA assay suitable for therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid? *Journal of Clinical Laboratory analysis*. 2013;27(1):77-80.
9. Vogl M, Weigel G, Seebacher G, Griesmacher A, Laufer G, Müller MM. Evaluation of the EMIT Mycophenolic Acid Assay from Dade Behring. *Ther Drug Monit*. 1999; 21(6): 638–643.
10. Hosotsubo H, Takahara S, Imamura R, Kyakuno M, Tanaka T, Yazawa K, et al. Analytic validation of the enzyme multiplied immunoassay technique for the determination of mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatographic assay. *Ther Drug Monit*. 2001; 23(6): 669–674.
11. Beal JL, Jones CE, Taylor PJ, Tett SE. Evaluation of an immunoassay (EMIT) for mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatography assay. *Ther Drug Monit*. 1998; 20(6): 685–690.
12. Shipkova M, Schütz E, Armstrong VW, Niedmann PD, Wieland E, Oellerich M. Overestimation of mycophenolic acid by EMIT correlates with MPA metabolite. *Transplant Proc*. 1999; 31(1-2): 1135–1137.