

ARKTM *Levetiracetam Assay*

Este folheto informativo da ARK Diagnostics, Inc. para o Ensaio do Levetiracetam ARK deve ser lido atentamente antes da utilização. Devem seguir-se rigorosamente as instruções contidas no folheto informativo. A fiabilidade dos resultados do ensaio não pode ser garantida se houver quaisquer desvios das instruções contidas neste folheto informativo.

Serviço de atendimento ao cliente














ARK Diagnostics, Inc.
 48089 Fremont Blvd
 Fremont, CA 94538 USA
 Tel: 1-877-869-2320
 Fax: 1-510-270-6298
 customersupport@ark-tdm.com
 www.ark-tdm.com



Emergo Europe
 Prinsessegracht 20
 2514 AP Haia
 Países Baixos

Símbolos utilizados

	Código do lote	 AAAA- MM-DD	Consumir até/Data de validade
	Número do catálogo		Fabricante
	Representante autorizado		Marca CE
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Limite de temperatura
	Consulte as instruções de utilização	 	Reagente 1/Reagente 2
Rx Only	Requer prescrição médica		

1 Nome

ARKTM Levetiracetam Assay

2 Utilização prevista

O Ensaio do Levetiracetam é um imunoenensaio enzimático homogêneo que se destina à determinação quantitativa do levetiracetam no soro ou plasma humano em analisadores bioquímicos automatizados. As concentrações de levetiracetam podem ser utilizadas como auxiliares na gestão de pacientes tratados com levetiracetam.

3 Resumo e explicação do teste

O levetiracetam (KEPPRA[®], (S)- α -etil-2-oxo-1-pirrolidina acetamida) é um medicamento anticonvulsivo aprovado para a utilização como tratamento adjuvante no tratamento da epilepsia.¹

4 Princípios do procedimento

O Ensaio do Levetiracetam ARK é um imunoenensaio enzimático homogêneo baseado na concorrência entre o fármaco na amostra e o levetiracetam rotulado com a enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) para ligar ao reagente de anticorpos. Na medida em que este liga anticorpos, a atividade enzimática diminui. Na presença do fármaco na amostra, a atividade enzimática aumenta e é diretamente proporcional à concentração do fármaco. A enzima ativa converte a nicotinamida adenida dinucleotídeo (NAD) em NADH que é medida espectrofotometricamente dimensionada como taxa de alteração da absorção. O soro endógeno G6PDH não interfere com os resultados porque a coenzima NAD funciona apenas com a enzima bacteriana usada no ensaio.

5 Reagentes

REF	Descrição do produto	Quantidade/Volume
5024-0001-00	ARKTM Levetiracetam Assay Reagente R1 – Anticorpo/Substrato anticorpos policlonais do coelho ao levetiracetam, glicose-6-fosfato, nicotinamida adenida dinucleotídeo, soroalbumina bovina, conservantes e estabilizadores	1 X 28 mL
	Reagente R2 – Enzima levetiracetam rotulado com G6PDH bacteriano, tampão, soroalbumina bovina, conservantes e estabilizadores	1 X 14 mL

Manuseamento e armazenamento do reagente

Os reagentes do Ensaio do Levetiracetam ARK são disponibilizados líquidos, prontos para a utilização e podem ser usados diretamente após retirados do frigorífico. Quando não forem utilizados, os reagentes devem ser armazenados a 2–8°C (36–46°F), na vertical e com as tampas com roscas firmemente fechadas. Se armazenados conforme indicado, os reagentes são estáveis até à data de validade que consta no rótulo. Não congele os reagentes. Evite uma exposição prolongada a temperaturas superiores a 32°C (90°F). **O armazenamento impróprio de reagentes pode afetar o desempenho do ensaio.**

6 Advertências e precauções

- Para utilização de **diagnóstico In Vitro**. Apenas para utilização prescrita.
- Os reagentes **R1** e **R2** são disponibilizados como um conjunto e não devem ser trocados por reagentes de lotes com números diferentes.

7 Recolha de amostra e preparação para a análise

- É necessário soro ou plasma. Para fins de consistência, usar a mesma matriz da amostra para pacientes individuais é uma boa prática. De modo geral é aceite uma amostra estável em concentração mínima (pré-dose) como muito consistente para o monitoramento terapêutico do medicamento do levetiracetam. Deve anotar-se a hora da recolha de sangue desde a última dose.
- Não deve ser utilizado sangue total. Os seguintes anticoagulantes podem ser utilizados neste ensaio.
 - Heparina de sódio
 - Heparina de lítio
 - Potássio EDTA
- **Processe o sangue o quanto antes após a recolha para preparar o soro ou o plasma, pois a hidrólise do levetiracetam pode ocorrer na presença prolongada de sangue total.**²⁻³
- **NÃO UTILIZE SEPARADORES DE GEL.**
- Não induza a formação de espuma e evite congelamento e descongelamento repetidos para preservar a integridade da amostra desde o momento da recolha até ao momento em que for utilizado no ensaio.
- Fibrina, células sanguíneas vermelhas, e outros materiais particulados podem causar um resultado incorreto. Assegure uma centrifugação adequada.
- Amostras clarificadas podem ser armazenadas até uma semana a 2 a 8°C. Se o teste for atrasado por mais de uma semana, as amostras

podem ser armazenadas congeladas ($\leq -10^{\circ}\text{C}$) até quatro semanas antes de serem testados. Deve-se tomar cuidado no sentido de limitar o número de ciclos de congelamento-descongelamento.

- **Manuseie todas as amostras dos pacientes como se fossem potencialmente infecciosas.**

8 Procedimento

Materiais fornecidos

Ensaio Levetiracetam ARK – **REF** 5024-0001-00

Materiais necessários – Fornecidos em separado

Calibrador Levetiracetam ARK – **REF** 5024-0002-00

Controlos de qualidade – Controlo Levetiracetam ARK – **REF** 5024-0003-00

Instrumentos

Pode ser necessário transferir os reagentes **R1** e **R2** para recipientes específicos do analisador antes da utilização. Evite a contaminação cruzada de **R1** e **R2**.

Sequência do ensaio

Para realizar ou calibrar o ensaio, consulte o manual específico do instrumento.

Calibração

Efetue um procedimento de calibração completa (6 pontos) utilizando os calibradores Levetiracetam ARK A, B, C, D, E e F. Teste os calibradores duas vezes. É necessária uma calibração para cada número de lote de kit de reagente novo. Verifique a curva da calibração com no mínimo dois níveis de controlos da qualidade de acordo com o plano de garantia da qualidade de laboratório estabelecido. CAL A é o branco da calibração.

Quando recalibrar

- Sempre que sejam utilizados reagentes de um número de lote novo
- Sempre que seja indicado pelos resultados dos controlos da qualidade
- Sempre que seja requerido pelos protocolos laboratoriais padrão

Controlo da Qualidade (CQ)

Os laboratórios devem estabelecer procedimentos de CQ para o Ensaio de Levetiracetam ARK. Todos os requisitos e testes de controlo da qualidade devem ser realizados em conformidade com regulamentos locais, estaduais e/ou federais ou requisitos de acreditação.

As boas práticas de laboratório sugerem que no mínimo dois níveis (pontos de decisão médica baixo e alto) de controlo de qualidade sejam testados a cada dia em que as amostras diárias do paciente sejam ensaiadas e toda vez que a calibração for realizada. Monitore os valores de controlo para todas as tendências ou mudanças. Se forem detetados tendências ou mudanças, ou se o controlo não se recuperar dentro da gama especificada, revise todos os parâmetros operacionais de acordo com os seus procedimentos de qualidade laboratoriais clínicos. Contacte o serviço de assistência ao cliente para obter mais ajuda.

Protocolo de diluição manual

Para estimar níveis de medicação em amostras que excedam o limite superior da quantificação, dilua a amostra manualmente com calibrador zero (CAL A). Multiplique o resultado do ensaio pelo fator de diluição.

$$\text{Fator de diluição manual} = \frac{\text{volume da amostra} + \text{volume de CAL A}}{\text{Volume da amostra}}$$

9 Resultados

Registe as unidades do resultado como µg/mL ou µmol/L. Para converter resultados de µg/mL para µmol/L de levetiracetam, multiplique µg/mL por 5,88. O valor do levetiracetam deste ensaio deve ser utilizado junto com outras informações clínicas. Consulte o manual de instruções específico do operador para ver os códigos de erro dos resultados.

10 Limitações do procedimento

Este ensaio foi desenvolvido apenas para a utilização com soro ou plasma. Consulte as secções **Recolha de amostras e preparação para análise**. De modo geral é boa prática utilizar o mesmo método (e matriz) consistentemente para o cuidado individual de cada paciente em função do potencial para variações de método para método. Consulte a secção **Valores esperados** abaixo.

11 Valores esperados

Não há gama terapêutica bem estabelecida para o levetiracetam. Foram propostos intervalos de referência provisórios para o controlo de convulsões, que incluem concentrações de 6 a 46 µg/mL (35 a 270 µmol/L; amostras em concentrações mínimas). No entanto, estes intervalos não foram validados por estudos controlados apropriados, e de modo geral a relação entre estas concentrações no soro e o efeito clínico

ainda não foram bem definidas.⁴⁻⁸ As concentrações do fármaco levetiracetam deviam ser utilizadas junto com informações disponíveis de avaliações clínicas e outros procedimentos de diagnóstico. Níveis circulantes de levetiracetam (concentrações no soro do sangue) podem ser afetados por conformidade, função renal, gravidez, interações medicamentosas e momento da recolha da amostra. Além do mais, o efeito clínico destas concentrações no soro sanguíneo podem ser ainda alteradas através de alterações na progressão da severidade da doença e a adição ou remoção de medicamentos concomitantes que possam interagir farmacodinamicamente com níveis circulantes de levetiracetam.

A gama de referência de concentrações medicamentosas que são mencionadas apenas devem implicar um limite inferior abaixo do qual uma resposta terapêutica é relativamente improvável de ocorrer e um limite superior acima do qual a toxicidade é relativamente provável de ocorrer nas populações de pacientes específicas estudadas. De modo geral, os clínicos que apliquem gamas de referência como estas devem estar conscientes de que por causa de variação individual os pacientes podem obter benefício terapêutico com concentrações do fármaco no soro fora destes intervalos ou podem experimentar toxicidade com níveis abaixo do limite inferior da gama de referência. O tempo de amostragem deve ser padronizado de modo que as concentrações do soro em concentração mínima sejam medidas pouco antes da próxima dosagem, preferencialmente de manhã.

12 Características específicas de desempenho

Cada laboratório é responsável pela verificação do desempenho utilizando os parâmetros de instrumento estabelecidos para o seu analisador. As seguintes características de desempenho foram obtidas no sistema Roche/Hitachi 917.

Sensibilidade

Limite de Quantificação (LOQ)

O LOQ do Ensaio Levetiracetam ARK foi determinado de acordo com CLSI EP17-A e é definido como a concentração mais baixa para a qual se observa precisão inter-ensaio e recuperação aceitáveis ($\leq 20\%$ CV com recuperação $\pm 15\%$). O LOQ foi determinado como 2,0 $\mu\text{g/mL}$ e pode depender do desempenho específico do analisador.

Gama do ensaio

O intervalo do ensaio é de 2,0 a 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Registe resultados abaixo desta gama como $< 2,0 \mu\text{g/mL}$ ou abaixo do LOQ inferior específico do

analisador estabelecido no seu laboratório. Registe resultados acima desta gama como >100,0 µg/mL ou acima do LOQ inferior específico do analisador estabelecido no seu laboratório.

Recuperação

A exatidão (recuperação analítica) foi testada adicionando levetiracetam concentrado em soro humano sem levetiracetam. Um estoque concentrado de levetiracetam de alta pureza foi adicionado volumetricamente ao soro humano sem levetiracetam, representando as concentrações do fármaco em toda a gama do ensaio. Foram analisadas seis repetições de cada amostra em um analisador bioquímico automatizado. Foi calculada a média dos ensaios e comparada à concentração alvo e calculada a percentagem de recuperação. Os resultados são exibidos abaixo.

$$\% \text{ Recuperação} = 100 \times \frac{\text{Concentração recuperada média}}{\text{Concentração teórica}}$$

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração recuperada média (µg/mL)	Percentagem de recuperação
2,0	1,9	95,8
4,0	3,8	94,6
10,0	10,0	100,0
20,0	19,2	95,9
45,0	44,1	98,0
80,0	79,3	99,1
100,0	105,3	105,3

Linearidade

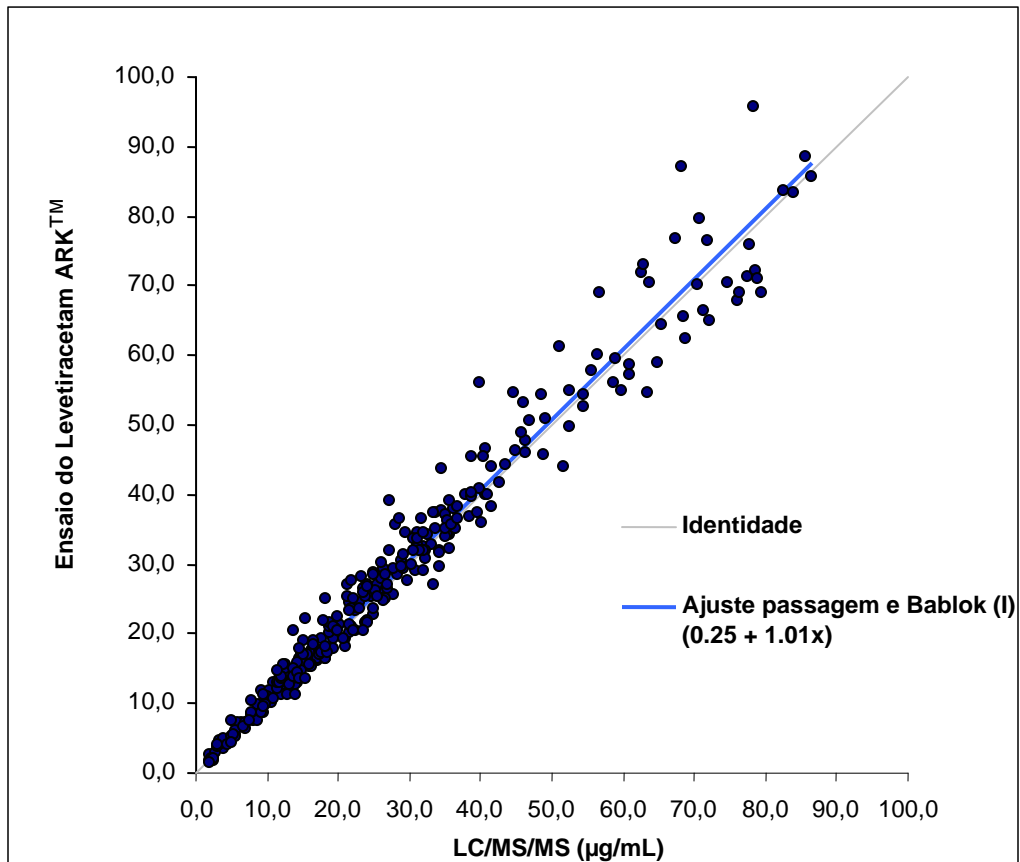
Os estudos de linearidade foram realizados conforme sugerido no Protocolo CLSI/NCCLS EP6-A. Foi preparada uma amostra de 100,0 µg/mL de soro e foram feitas diluições proporcionais com soro humano sem levetiracetam. As concentrações de levetiracetam variaram entre 1,0 a 100,0 µg/mL. A linearidade em diluições específicas foi considerada aceitável quando a diferença percentual foi $\pm 10\%$ entre os valores regredidos de 1.^a e 2.^a ordem previstos ou $\pm 15\%$ abaixo de 3,0 µg/mL. Foi demonstrada uma relação linear entre 2,0 e 100,0 µg/mL. Os resultados são exibidos abaixo.

Valor estimado (µg/mL)	Resultados (µg/mL)	Resultados previstos 1 ^a ordem	Resultados previstos 2 ^a ordem	Diferença %
2,0	1,9	2,1	2,4	13,2
3,0	3,2	3,1	3,4	7,6
4,0	4,1	4,2	4,3	4,8
5,0	5,3	5,2	5,3	3,1
6,0	6,4	6,2	6,3	2,0
7,0	7,6	7,2	7,3	1,3
8,0	8,4	8,3	8,3	0,7
9,0	9,5	9,3	9,3	0,3
10,0	10,7	10,3	10,3	-0,1
20,0	20,7	20,6	20,4	-1,3
30,0	31,0	31,0	30,5	-1,4
40,0	41,3	41,3	40,8	-1,2
50,0	51,9	51,6	51,1	-0,9
60,0	60,3	61,9	61,6	-0,5
70,0	71,2	72,2	72,1	-0,1
80,0	81,4	82,5	82,8	0,3
90,0	93,7	92,8	93,5	0,7
100,0	104,6	103,1	104,3	1,2

Comparação de métodos

Foram realizados estudos de correlação usando o Protocolo CLSI/NCCLS EP7-A2. Os resultados do Ensaio de Levetiracetam ARK foram comparados com os resultados de LC/MS/MS. As concentrações de levetiracetam variaram entre 2,0 a 86,4 µg/mL. Os resultados da análise de regressão Passing-Bablok⁹ para o estudo são exibidos abaixo (com limites de confiança de 95%).

Inclinação	1,01	(0,99 a 1,03)
Interceção y	0,25	(0,24 a 0,63)
Coefficiente de correlação (r ²)	0,97	(0,96 a 0,97)
Número de amostras	305	



Precisão

A precisão foi determinada conforme descrito no Protocolo CLSI/NCCLS EP5-A2. Foram utilizados neste estudo controles de triplo nível e três amostras de soro humano em lotes contendo levetiracetam. Cada nível foi ensaiado em quadruplicado duas vezes ao dia durante 20 dias. As execuções por dia foram separadas por no mínimo duas horas. Foram calculados valores dentro da execução, dentro do dia, SD total, e CVs percentuais. Os resultados são exibidos abaixo. Critérios de aceitação: <10% CV total.

Amostra	N	Médio ($\mu\text{g/mL}$)	Dentro da execução		No dia		Total	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Controlo do Levetiracetam ARK								
BAIXO	160	7,5	0,25	3,4	0,23	3,2	0,34	4,5
MÉD	160	29,4	0,85	2,9	0,83	2,8	1,08	3,7
ALTO	160	73,4	2,14	2,9	2,03	2,8	3,08	4,2
Soro humano								
BAIXO	160	6,9	0,26	3,8	0,22	3,1	0,33	4,8
MÉD	160	30,2	0,87	2,9	1,10	3,7	1,23	4,1
ALTO	160	75,5	2,19	2,9	2,35	3,1	3,31	4,4

Substâncias interferentes

Foram realizados estudos de interferência usando o Protocolo CLSI/NCCLS EP7-A2 como diretiva. Foram avaliadas concentrações clinicamente altas das seguintes substâncias potencialmente interferentes no soro com níveis conhecidos de levetiracetam (aproximadamente 15 e 50 µg/mL). Cada amostra foi ensaiada utilizando Ensaio Levetiracetam ARK, junto com um controlo de levetiracetam no soro. A medição do levetiracetam resultou num erro de $\leq 10\%$ na presença de substâncias interferentes nos níveis testados.

Substância interferente	Concentração interferente	Percentagem de recuperação	
		15 µg/mL Levetiracetam	50 µg/mL Levetiracetam
Albumina	12 g/dL	99,8	102,6
Bilirrubina - conjugada	70 mg/dL	100,4	102,1
Bilirrubina - não conjugada	70 mg/dL	99,3	107,9
Colesterol	535 mg/dL	105,3	94,0
Gamaglobulina	12 g/dL	99,8	109,5
Hemoglobina	1000 mg/dL	98,6	100,9
Intralipid®	1500 mg/dL	97,1	99,8
Fator Reumatóide	1100 IU/mL	98,1	106,4
Triglicerídeos	1033 mg/dL	96,8	100,2
Ácido úrico	30 mg/dL	99,6	102,5

Especificidade

O levetiracetam é hidrolisado para o seu principal metabólito ácido 2-pirrolidona-*N*-butírico (ucb L057) e dois metabólitos secundários.³ Outras medicações rotineiramente administradas com levetiracetam e medicamentos antiepiléticos também foram testadas a fim de determinar se estes compostos afetam a quantificação das concentrações de levetiracetam ao utilizar o Ensaio Levetiracetam ARK. Níveis altos destes compostos foram adicionados em *pools* de soro contendo níveis terapêuticos baixos (15 µg/mL) e altos (50 µg/mL) de levetiracetam. As amostras foram analisadas e as concentrações de levetiracetam das amostras contendo interferentes foram comparadas com o controlo do soro.

Metabólitos

O metabólito ucb L057 foi testado com relação a reatividade cruzada.

Metabólito	ucb L057 (µg/mL)	Percentagem de reatividade cruzada		Percentagem de interferência	
		Levetiracetam 15 µg/mL	Levetiracetam 50 µg/mL	Levetiracetam 15 µg/mL	Levetiracetam 50 µg/mL
ucb L057:					
Ácido 2-pirrolidona- <i>N</i> -butírico	250,0	-0,2	1,3	-3,0	6,6

Interferência medicamentosa

Anticorpos seletivos de levetiracetam não apresentaram reação cruzada com outros medicamentos antiepiléticos ou co-administrados testados. Administrou-se uma concentração alta de cada composto em soro humano normal com níveis conhecidos de levetiracetam (aproximadamente 15 e 50 µg/mL) e ensaiados junto com um controlo de levetiracetam no soro. A medição do levetiracetam resultou num erro de ≤10% na presença de compostos medicamentosos nos níveis testados.

Composto	Conc. Testada (µg/mL)	Percentagem de recuperação	
		15 µg/mL Levetiracetam	50 µg/mL Levetiracetam
Acetaminofeno	200	99,3	97,5
Ácido acetilsalicílico	1000	103,2	98,9
Amitriptilina	20	98,4	100,7
Cafeína	100	95,4	97,7
Carbamazepina	120	101,1	99,7
Clonazepam	50	100,2	100,4
Ciclosporin A	40	99,9	98,4
Diazepan	50	100,3	98,6
Digoxina	40	92,9	100,2
Eritromicina	200	99,0	97,9
Etosuximida	250	98,1	101,1
Felbamato	250	100,8	97,9
Gabapentina	100	101,3	96,3
Heparina	200 Unidades/mL	97,0	97,2
Hidroclorotiazida	20	98,2	98,9
Ibuprofeno	500	98,5	99,2
Lamotrigina	250	94,3	102,4
Naproxeno	500	99,0	101,3
Nortriptilina	20	99,3	97,8
Oxcarbazepina	50	95,5	100,4
Fenobarbital	200	98,8	99,4

Composto	Conc. Testada (µg/mL)	Percentagem de recuperação	
		15 µg/mL Levetiracetam	50 µg/mL Levetiracetam
Fenitoína	200	97,8	96,8
Primidona	100	97,7	97,3
Probenecida	600	100,5	101,5
Ácido salicílico	500	95,1	98,4
Sulfametoxazol	400	97,9	96,3
Sulfisoxazol	400	100,6	100,4
Teofilina	250	96,6	101,1
Tiagabina	200	99,0	97,5
Topiramato	250	94,7	99,2
Trimetoprim	40	102,0	99,3
Ácido Valpróico	500	98,7	96,2
Verapamil	100	100,3	96,4
Vigabatrina	150	94,0	97,1
Warfarin	250	96,6	102,3
Zonisamida	250	100,3	101,7

13 Referências

1. KEPPRA[®] prescribing information (KEPPRA Tablets, KEPPRA XR[™], KEPPRA Oral Solution and KEPPRA Injection), UCB, Inc., Smyrna, GA (www.keppra.com).
2. Patsalos, P. N. et al. 2006. In situ metabolism of levetiracetam in blood of patients with epilepsy. *Epilepsia* **47**:1818-1821.
3. Benedetti, M. S. et al. 2003. Pharmacokinetics and metabolism of ¹⁴C-levetiracetam, a new antiepileptic agent, in health volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* **59**:621-630.
4. Leppik, I. E. et al. 2002. Effective levetiracetam doses and serum concentrations: Age effects. *Epilepsia* **43** (Suppl 7):240.
5. Johannessen, S. I. et al. 2003. Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit.* **25**:347-363.
6. Splinter, M. Y. 2005. Pharmacokinetic properties of new antiepileptic drugs. *Journal Of Pharmacy Practice* **18**:444–460.
7. Lancelin, F. et al. 2007. Therapeutic drug monitoring of levetiracetam by high-performance liquid chromatography with photodiode array ultraviolet detection: Preliminary observations on correlation between plasma concentration and clinical response in patients with refractory epilepsy. *Ther Drug Monit.* **29**:576-583.
8. Patsalos, P. N. et al. 2008. Antiepileptic drugs – best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* **49**:1239-1276.
9. Bablok W, Passing H, Bender R, Schneider B. 1988. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part III. *J. Clin Chem Clin Biochem.* **26**(11):783-790.

14 Marcas registadas

ARK[™] é marca registada da **ARK** Diagnostics, Inc.

Outras marcas e nomes de produtos são marcas registadas dos seus respetivos proprietários.

Patente EUA nº 8 168 756



ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 USA

Impresso nos EUA
Revisão em Fevereiro de 2017
1600-0169-00PT Rev 03