


ARKTM Topiramate Assay












Leggere attentamente questo foglietto illustrativo di ARK Diagnostics, Inc. prima di effettuare il dosaggio *ARK Topiramate Assay* ed attenersi scrupolosamente alle istruzioni ivi riportate. L'affidabilità dei risultati analitici è garantita soltanto se le istruzioni del foglietto illustrativo vengono seguite attentamente.

Servizio Clienti

 **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

 **EC REP**
 Emergo Europe
 Prinsessegracht 20
 2514 AP The Hague
 The Netherlands

Legenda dei simboli utilizzati

	Numero di lotto	 YYYY-MM-DD	Utilizzare entro/Data di scadenza
	Numero di catalogo		Produttore
	Mandatario		Marchio CE
	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>		Limiti di temperatura
	Consultare le istruzioni per l'uso	 	Reagente 1/Reagente 2
Rx Only	Solo su prescrizione medica		

1 Denominazione

ARKTM *Topiramate Assay*

2 Finalità d'uso

ARK Topiramate Assay è un immunodosaggio enzimatico omogeneo previsto per la determinazione quantitativa di topiramato in campioni di siero o plasma umano con analizzatori di chimica clinica automatizzati. I risultati ottenuti vengono usati nella diagnosi e nel trattamento del sovradosaggio da topiramato e nel monitoraggio dei livelli di topiramato per garantire l'adeguatezza della terapia.

3 Riassunto e spiegazione del test

Il topiramato (2,3:4,5-Di-O-isopropilidene- β -D-fruttopiranosio sulfamato) è un farmaco anticonvulsivante approvato per il trattamento dell'epilessia; viene spesso prescritto in monoterapia o nell'ambito di una terapia antiepilettica multifarmaco.¹

4 Principi del metodo

ARK Topiramate Assay è un immunodosaggio omogeneo basato sul principio di competizione tra il farmaco presente nel campione e l'epitopo di topiramato marcato con l'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH) per il legame con i siti anticorpali. Quando quest'ultimo si lega all'anticorpo, l'attività enzimatica diminuisce. In presenza del farmaco nel campione, l'attività enzimatica aumenta ed è direttamente proporzionale alla concentrazione del farmaco. L'enzima attivo converte il coenzima nicotinamide adenina dinucleotide (NAD) in NADH, misurato spettrofotometricamente come velocità di variazione dell'assorbanza. La G6PDH nel siero endogeno non interferisce con i risultati poiché il coenzima NAD agisce unicamente con l'enzima batterico usato nel dosaggio.

5 Reagenti

REF	Descrizione del prodotto	Quantità/Volume
5015-0001-00	ARK™ Topiramate Assay Reagente [R1] – Anticorpo/Substrato Anticorpi policlonali di coniglio anti-topiramato*, glucosio-6-fosfato, nicotinamide adenina dinucleotide, sieroalbumina bovina, conservanti e stabilizzanti	1 X 28 mL
	Reagente [R2] – Enzima Epitopo di topiramato marcato con G6PDH batterica, tampone, sieroalbumina bovina, conservanti e stabilizzanti	1 X 14 mL

*Gli anticorpi sono prodotti selettivamente per una parte di epitopo di topiramato.

Manipolazione e conservazione dei reagenti

I reagenti *ARK Topiramate Assay* vengono forniti in stato liquido, pronti per l'uso e possono essere utilizzati immediatamente dopo essere stati tolti dal frigorifero. Prima dell'uso, i reagenti devono essere conservati a 2-8°C, in posizione verticale e chiusi ermeticamente con il tappo. Se conservati secondo le istruzioni, i reagenti si mantengono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Non congelare i reagenti. Evitare l'esposizione prolungata a temperature superiori a 32°C.

Se i reagenti non vengono conservati correttamente, le prestazioni del dosaggio possono risultare compromesse.

6 Avvertenze e precauzioni

- Per uso **diagnostico in vitro**.
- I reagenti [R1] e [R2] sono forniti come kit combinato e non devono essere utilizzati in modo intercambiabile con i reagenti contrassegnati da numeri di lotto differenti.

7 Prelievo e preparazione dei campioni per l'analisi

- Va utilizzato un campione di siero o di plasma. Un campione in condizioni di equilibrio dinamico, con livelli minimi (pre-dose) è in genere ritenuto il più idoneo per il monitoraggio terapeutico del topiramato. Annotare l'ora del prelievo di sangue dall'ultima dose.
- Non è possibile usare sangue intero. Con questo dosaggio possono essere utilizzati i seguenti anticoagulanti:
 - eparina di sodio
 - eparina di litio
 - EDTA di potassio
- NON UTILIZZARE GEL SEPARATORI.
- Evitare la formazione di schiuma e ripetuti cicli di congelamento/scongelo per assicurare l'integrità del campione da quando viene prelevato fino a quando viene sottoposto al test.
- La fibrina, i globuli rossi ed altre sostanze particolose possono dare luogo a risultati errati. Assicurare un'adeguata centrifugazione.
- I campioni chiarificati possono essere conservati fino a una settimana a 2-8°C. Se il test verrà eseguito oltre questo intervallo di tempo, i campioni devono essere conservati congelati ($\leq -10^{\circ}\text{C}$) fino a quattro settimane prima di essere sottoposti all'analisi. Ridurre al minimo i cicli di congelamento-scongelo.
- **Trattare tutti i campioni dei pazienti come potenzialmente infettivi.**

8 Procedura

Materiali forniti

ARK Topiramate Assay – **REF** 5015-0001-00

Materiali necessari – forniti a parte

ARK Topiramate Calibrator – **REF** 5015-0002-00

Quality Controls – ARK Topiramate Control – **REF** 5015-0003-00

Strumenti

È possibile che i reagenti **R1** e **R2** debbano essere trasferiti in un contenitore del reagente specifico per l'analizzatore, prima dell'uso. Evitare la contaminazione crociata tra **R1** e **R2**.

Sequenza analitica

Per l'esecuzione o la calibrazione del dosaggio fare riferimento al manuale d'impiego specifico dello strumento.

Calibrazione

Eeguire la procedura di calibrazione completa (a 6 punti) utilizzando i calibratori ARK Topiramate Calibrator A, B, C, D, E e F; analizzare i calibratori in duplicato. È necessario eseguire la calibrazione ogni qualvolta venga utilizzato un kit di reagenti con un nuovo numero di lotto. Verificare la curva di calibrazione con almeno due livelli dei controlli di qualità, conformemente al piano per l'assicurazione della qualità stabilito dal proprio laboratorio. CAL A è il bianco di calibrazione.

Quando ripetere la calibrazione

- Ogni qualvolta venga utilizzato un nuovo numero di lotto dei reagenti
- Se indicato dai risultati del controllo di qualità
- Se richiesto dai protocolli di laboratorio standard

Controllo di qualità (CQ)

Spetta ai laboratori stabilire le procedure CQ per il dosaggio *ARK Topiramate Assay*. Tutti i controlli di qualità e i test devono essere eseguiti in conformità alle disposizioni locali e/o nazionali o ai requisiti per l'accreditamento.

Le buone pratiche di laboratorio prevedono l'analisi di almeno due livelli di controlli di qualità (punti decisionali medici basso ed elevato) ogniqualvolta vengono analizzati i campioni del paziente e quando viene eseguita la calibrazione. Esaminare i valori dei controlli per individuare eventuali tendenze o variazioni. Qualora vengano rilevate tendenze o scostamenti, o se il recupero del controllo non rientra nel range specificato, controllare tutti i parametri operativi conformemente alle procedure di qualità del laboratorio clinico. Contattare il Servizio Clienti per assistenza.

Protocollo di diluizione manuale

Per ottenere una stima dei livelli di farmaco nei campioni contenenti concentrazioni superiori a 60 µg/mL, diluire manualmente i campioni con il calibratore zero (CAL A). Moltiplicare il risultato ottenuto dal dosaggio per il fattore di diluizione.

Fattore di diluizione manuale = $\frac{\text{Volume di campione} + \text{Volume di CAL A}}{\text{Volume di campione}}$

9 Risultati

Riportare i risultati espressi nelle unità $\mu\text{g/mL}$ o $\mu\text{mol/L}$. Per convertire i risultati da $\mu\text{g/mL}$ topiramato a $\mu\text{mol/L}$ topiramato, moltiplicare $\mu\text{g/mL}$ per 2,95. Il valore di topiramato ottenuto con questo dosaggio deve essere utilizzato congiuntamente ad altre informazioni cliniche. Per eventuali codici di errore dei risultati fare riferimento al manuale d'impiego specifico dello strumento.

10 Limiti della procedura

Questo dosaggio è previsto per l'uso unicamente con siero o plasma; fare riferimento alle sezioni "**Prelievo e preparazione dei campioni per l'analisi**" e "**Caratteristiche specifiche di prestazione**".

11 Valori previsti

Un range terapeutico per il topiramato non è stato ben definito. Il range terapeutico proposto (prima dell'assunzione della dose successiva) per il controllo delle crisi epilettiche è compreso tra 2 e 25 $\mu\text{g/mL}$. Esiste una correlazione non uniforme tra i livelli di topiramato in circolo e la tossicità, gli eventi indesiderati e l'efficacia clinica.² Il monitoraggio delle concentrazioni di topiramato nei pazienti è quindi giustificato.

Le concentrazioni di topiramato devono essere usate unitamente alle informazioni ottenute mediante valutazioni cliniche e altre procedure diagnostiche. Il personale medico deve monitorare attentamente i pazienti durante la terapia e nel corso delle regolazioni del dosaggio. La farmacocinetica può variare considerevolmente, in particolare con l'assunzione concomitante di altri farmaci, con l'età e/o in caso di funzionalità renale compromessa. Per determinare la variazione attesa delle concentrazioni (in equilibrio dinamico) ottimali per i singoli pazienti, è possibile che sia necessario prelevare nel tempo più campioni.

12 Caratteristiche specifiche di prestazione

I dati sono rappresentativi delle prestazioni ottenute con gli analizzatori di chimica clinica automatizzati. Ciascun laboratorio è tenuto a verificare le prestazioni usando i parametri stabiliti per il proprio analizzatore. Le caratteristiche di prestazione illustrate di seguito sono state ottenute con un Sistema Roche/Hitachi 917.

Sensibilità

Limite di quantificazione (LOQ)

Il LOQ del dosaggio *ARK Topiramate Assay* è stato determinato secondo le linee guida del protocollo CLSI EP17-A ed è definito come la concentrazione più bassa alla quale si osservano una precisione e un recupero inter-dosaggi accettabili (generalmente, CV ≤20% con recupero ±15%). Il LOQ è risultato pari a 1,5 µg/mL e può dipendere dalle prestazioni specifiche dell'analizzatore.

Range di dosaggio

Il range del dosaggio è compreso tra 1,5 e 54,0 µg/mL. Riportare i risultati inferiori a questo range come <1,5 µg/mL o come inferiori al limite di quantificazione (LOQ) inferiore specifico dell'analizzatore stabilito nel proprio laboratorio. Riportare i risultati superiori a questo range come >54,0 µg/mL o come superiori al limite di quantificazione (LOQ) superiore specifico dell'analizzatore stabilito nel proprio laboratorio.

Accuratezza

L'accuratezza (recupero analitico) è stata verificata aggiungendo il topiramato concentrato al siero umano negativo per il topiramato. Un concentrato stock di topiramato purissimo è stato aggiunto volumetricamente a siero umano negativo per il topiramato, per ottenere le concentrazioni di farmaco dell'intervallo del dosaggio. Sei replicati di ciascun campione sono stati analizzati su un analizzatore di chimica clinica automatizzato. È stata calcolata la media dei risultati, che sono stati confrontati con la concentrazione target e con il recupero percentuale calcolato. I risultati sono illustrati nella seguente tabella.

$$\text{Recupero (\%)} = 100 \times \frac{\text{Concentrazione recuperata media}}{\text{Concentrazione teorica}}$$

Concentrazione teorica (µg/mL)	Concentrazione recuperata media (µg/mL)	Recupero (%)
1,5	1,4	95,6
2,5	2,7	106,7
4,0	4,2	104,2
5,0	5,3	106,0
6,0	6,4	106,7
10,0	10,4	103,8
15,0	15,5	103,4
30,0	30,8	102,6
45,0	47,3	105,0
55,0	58,9	107,1

Linearità

Sono stati condotti degli studi di linearità, come raccomandato nel protocollo EP6-A del CLSI/NCCLS. È stato preparato un campione di siero di 60,0 µg/mL e sono state eseguite delle diluizioni proporzionali con siero umano negativo per il topiramato. Le concentrazioni di topiramato sono risultate comprese tra 0,6 e 60,0 µg/mL. La linearità a diluizioni specifiche è stata considerata accettabile se la differenza percentuale era pari al $\pm 10\%$ rispetto al valore di regressione del 1° e del 2° ordine previsto. È stata dimostrata una relazione lineare tra 1,2 e 54,0 µg/mL. I risultati sono illustrati nella tabella sottostante.

Valore stimato (µg/mL)	Risultati (µg/mL)	Risultati previsti 1° ordine	Risultati previsti 2° ordine	Differenza (%) (criteri di accettazione: $\pm 10\%$)
0,6	0,5	0,56	0,46	-18,14
1,2	1,0	1,19	1,10	-7,42
1,8	1,7	1,83	1,75	-4,16
2,4	2,4	2,46	2,40	-2,60
3,0	3,0	3,09	3,04	-1,68
3,6	3,7	3,73	3,69	-1,09
4,2	4,4	4,36	4,33	-0,68
4,8	4,9	4,99	4,98	-0,38
5,4	5,8	5,63	5,62	-0,15
6,0	6,3	6,26	6,26	0,02
12,0	12,9	12,60	12,68	0,64
18,0	18,9	18,94	19,06	0,66
24,0	25,5	25,28	25,41	0,53
30,0	31,4	31,61	31,72	0,33
36,0	37,9	37,95	37,99	0,11
42,0	44,8	44,29	44,23	-0,14
48,0	50,7	50,63	50,43	-0,39
54,0	56,5	56,96	56,60	-0,65
60,0	62,3	63,30	62,73	-0,91

Confronto dei metodi

Sono stati eseguiti degli studi di correlazione usando il protocollo EP9-A2 NCCLS del CLSI. I risultati del dosaggio *ARK Topiramate Assay* sono stati messi a confronto con quelli di un immunodosaggio a fluorescenza con luce polarizzata (FPIA) disponibile in commercio. Le concentrazioni di topiramato sono risultate comprese tra 1,5 e 53,4 µg/mL. I risultati dell'analisi di regressione Passing-Bablok⁴ dello studio sono riportati qui di seguito.

Pendenza	0,99
Intercetta y	- 0,17
Coefficiente di correlazione (r^2)	0,99
Numero di campioni	113

Precisione

La precisione è stata determinata in base a quanto descritto nel protocollo EP5-A2 del CLSI/NCCLS. Nello studio sono stati usati controlli a tre livelli contenenti topiramato. Ciascun livello di controllo è stato analizzato in quadruplicato due volte al giorno per 20 giorni. Ciascuna analisi giornaliera è stata eseguita ad almeno due ore di distanza dalla precedente. È stato eseguito il calcolo della DS e del CV percentuale intra-dosaggio, inter-giornaliero e totale. I risultati sono illustrati nella tabella sottostante. Criteri di accettazione: CV totale <10%.

Campione	N	Media (µg/mL)	Intra-dosaggio		Inter-giornaliero		Totale	
			DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
1	160	2,4	0,08	3,5	0,05	2,0	0,10	4,3
2	160	10,2	0,24	2,4	0,14	1,4	0,28	2,7
3	160	40,2	1,19	2,9	0,64	1,6	1,29	3,2

Sostanze interferenti

Sono stati condotti studi sulle sostanze interferenti usando il protocollo EP7-A2 NCCLS del CLSI come riferimento. Sono state analizzate concentrazioni clinicamente elevate delle seguenti sostanze potenzialmente interferenti nel siero con livelli noti di topiramato (circa 5 e 20 µg/mL). Ciascun campione è stato analizzato usando il dosaggio *ARK Topiramate Assay* e un controllo sierico di topiramato. La misurazione del topiramato ha dato luogo ad un errore ≤10% con i livelli di sostanze interferenti testate.

Sostanza interferente	Concentrazione della sostanza interferente
Albumina	12 g/dL
Bilirubina	60 mg/dL
Colesterolo	301 mg/dL
Gammaglobuline	10 g/dL
Emoglobina	1000 mg/dL
Eparina	200 unità/mL
Fattore reumatoide	1000 IU/mL
Trigliceridi	1105 mg/dL
Acido urico	25 mg/dL

Specificità

La reattività crociata è stata analizzata per un metabolita noto del topiramato. Altri farmaci regolarmente somministrati con il topiramato e gli antiepilettici sono anch'essi stati sottoposti ad analisi per determinare se tali composti influiscono sulla determinazione quantitativa delle concentrazioni di topiramato mediante il dosaggio *ARK Topiramate Assay*. Livelli elevati di tali composti sono stati aggiunti ai pool di siero che contenevano livelli terapeutici bassi (5 µg/mL) ed elevati (20 µg/mL) di topiramato. I campioni sono stati analizzati e le concentrazioni di topiramato nei campioni contenenti le sostanze interferenti sono state confrontate con il siero di controllo.

Metaboliti

I metaboliti del topiramato sono rilevabili principalmente nell'urina dei pazienti sottoposti a terapia a base di topiramato.³ È improbabile che i risultati forniti da siero e plasma con il dosaggio *ARK Topiramate Assay* subiscano gli effetti del metabolismo del farmaco a base di topiramato, giacché i metaboliti non sono presenti nel plasma a livelli clinicamente significativi. Il seguente metabolita è stato analizzato per rilevare l'eventuale reattività crociata.

Metabolita	Concentrazione del metabolita (µg/mL)	Reattività crociata (%)		Interferenza (%)	
		Bassa concentrazione di topiramato	Alta concentrazione di topiramato	Bassa concentrazione di topiramato	Alta concentrazione di topiramato
9-Idrossi-topiramato	40,0	1,2	1,6	8,6	3,2

Farmaci interferenti

L'anticorpo selettivo per il topiramato non ha dato luogo a reattività crociata con altri antiepilettici o farmaci analizzati, somministrati in concomitanza. Un'alta concentrazione di ciascuno dei composti farmaceutici è stata addizionata a siero umano normale contenente livelli noti di topiramato (circa 5 e 20 µg/mL); i campioni così ottenuti sono stati analizzati unitamente a un controllo sierico per il topiramato. La misurazione del topiramato ha dato luogo ad un errore ≤10% con i livelli di composti farmaceutici testati.

Composto	Concentrazione (µg/mL)	Composto	Concentrazione (µg/mL)
Acetaminofene	50	Levetiracetam	200
Acetozolamide	50	Metisergide	100
Alprazolam	20	Metoprololo	100
Amitriptilina	10	Nadololo	150
Acido acetilsalicilico	100	Naproxene	600
Atenololo	50	Nimodipina	100
Caffeina	100	Nortriptilina	10
Carbamazepina	100	Oxcarbazepina	50
Clortalidone	100	Fenelzina	15
Clonazepam	50	Fenobarbitale	40
Clorazepato	20	Fenitoina	50
Diazepam	50	Primidone	100
Diclorfenamide	40	Protriptilina	20
Etosuccimide	500	Acido salicilico	750
Famotidina	50	Sulfanilamide	2000
Felbamato	500	Tiagabina	200
Flurazepam	20	Tolbutamide	750
Furosemide	10	Acido valproico	200
Gabapentina	100	Verapamil	100
Idroclorotiazide	60	Vigabatrin	150
Ibuprofene	500	Zonisamide	200
Lamotrigina	100		

13 Bibliografia

1. OrthoMcNeil Pharmaceutical, Inc. *Topamax*[®] monograph, Raritan, NJ Revision Date August 2004; www.topamax.com
2. Johannessen, S. I. et al. 2003. Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Antiepileptic Drugs. *Ther Drug Monit.* **25**:347-63.
3. Britzi M, Perucca E, Soback S. et.al. 2005. Pharmacokinetic and Metabolic Investigation of Topiramate Disposition in Healthy Subjects in the Absence and in the Presence of Enzyme Induction by Carbamazepine. *Epilepsia* **46**:378-84.
4. 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):783-90.

14 Marchi commerciali

ARK[™] è un marchio commerciale di **ARK** Diagnostics, Inc.
Altri marchi o nomi di prodotti sono marchi commerciali dei rispettivi proprietari. Brevetto U.S.A. n. 5,952,187



ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 USA

Stampato negli Stati Uniti
Revisione Febbraio 2017
1600-0105-00IT Rev 05