

ARK™ *Levetiracetam Assay*

Lea atentamente el presente folleto ilustrativo de ARK Diagnostics, Inc. antes de usar el Ensayo de levetiracetam de ARK. Aténgase a las instrucciones que figuran en este folleto. No se garantizará la fiabilidad de los resultados del ensayo en caso de que no se observen las instrucciones de este folleto ilustrativo.

Atención al cliente








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



Emergo Europe
 Prinsessegracht 20
 2514 AP La Haya
 Países Bajos

Leyenda de los símbolos empleados

	Código del lote	 AAAA-MM-DD	Fecha de caducidad
	N° de catálogo		Fabricante
	Representante autorizado		Distintivo CE
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>		Límite de temperatura
	Consultar las instrucciones para el uso	 	Reactivo 1/Reactivo 2
Rx Only	Para uso exclusivo bajo prescripción médica		

1 Nombre

ARKTM Levetiracetam Assay

2 Uso previsto

El Ensayo de levetiracetam de ARK es un inmunoensayo enzimático homogéneo concebido para la determinación cuantitativa del levetiracetam en suero o plasma humanos en analizadores químicos clínicos automatizados. Las concentraciones de levetiracetam arrojan informaciones útiles para la gestión de pacientes tratados con levetiracetam.

3 Resumen y explicación de la prueba

Levetiracetam (KEPPRA[®], acetamida de (S)- α -etil-2-oxo-1-pirrolidina) es un fármaco anticonvulsivo homologado para su uso como terapia adicional en el tratamiento de la epilepsia.¹

4 Principios del procedimiento

El Ensayo de levetiracetam ARK es un inmunoensayo homogéneo basado en la competición entre el fármaco presente en la muestra y el levetiracetam marcado con la enzima glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) a la hora de unirse al anticuerpo. Al unirse pues el analito sin marcar al anticuerpo, la actividad enzimática disminuye. En presencia de fármaco de la muestra, la actividad enzimática aumenta y es directamente proporcional a la concentración del fármaco. La enzima activa convierte la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) en NADH cuyo nivel se mide mediante espectrofotometría al estar en relación con la variación de absorbancia. La G6PDH sérica endógena no interfiere en los resultados porque la coenzima NAD funciona sólo con la enzima bacteriana usada en el ensayo.

5 Reactivos

REF	Descripción del producto	Cantidad/Volumen
5024-0001-00	ARK™ Levetiracetam Assay Reactivo R1 – Anticuerpo/Sustrato anticuerpos anti levetiracetam policlonales de conejo, glucosa-6-fosfato, nicotinamida adenina dinucleotide, albumina de suero bovino, conservantes y estabilizantes	1 X 28 ml
	Reactivo R2– Enzima Levetiracetam marcado con G6PDH bacteriano, tampón, albumina de suero bovino, conservantes y estabilizantes	1 X 14 ml

Manipulación y almacenamiento de reactivo

Los reactivos del Ensayo de levetiracetam ARK se suministran en forma líquida, listos para el uso y pueden ser usados justo después de sacarlos del frigorífico. Cuando no se están usando, los reactivos se deben almacenar a una temperatura entre 2°C y 8°C (36-46°F) de pie y con el tapón de rosca bien cerrado. Si se han almacenado correctamente a las condiciones indicadas, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. No congelar los reactivos. Evitar la exposición prolongada a temperaturas superiores a los 32°C (90°F). **Un almacenamiento incorrecto de los reactivos puede comprometer el resultado del ensayo.**

6 Advertencias y precauciones

- Para uso **diagnóstico *in vitro***. Para uso exclusivo bajo prescripción médica.
- Los reactivos **R1** y **R2** se suministran juntos en un kit y no se deberían intercambiar con reactivos que lleven otro número de lote.

7 Recogida de muestras y preparación para el análisis

- Se precisan muestras de suero o de plasma. Es buena práctica usar la misma matriz de muestra para el mismo paciente con el fin de obtener una mayor homogeneidad de los resultados. Hay que tomar una muestra en estado estable (nivel mínimo, antes de la administración) para garantizar una correcta monitorización terapéutica del levetiracetam. . Anotar el tiempo transcurrido del momento de recogida de la sangre desde la última administración.
- No usar sangre entera. Con este ensayo es posible emplear los siguientes anticoagulantes.
 - Heparina de sodio
 - Heparina de litio

- EDTA potásico
- **Procesar la sangre lo más rápidamente posible tras su recogida para preparar el suero o el plasma, con el fin de evitar una posible hidrólisis del levetiracetam en caso de presencia prolongada de sangre entera.**²⁻³
- NO USAR GELES SEPARADORES
- No provocar la formación de espuma y evitar los congelamientos y descongelamientos reiterados con el fin de conservar la integridad de la muestra desde el momento de su recogida hasta el momento en el que se ejecuta el ensayo.
- La presencia de fibrina, de hematíes o de otra materia particulada puede alterar el resultado. Asegurarse de que la centrifugación sea correcta.
- Una vez eliminada la parte sólida, las muestras se pueden almacenar a 2 - 8°C durante una semana como máximo. Si la prueba va a demorarse más de una semana, congelar y almacenar las muestras ($\leq -10^{\circ}\text{C}$) durante un máximo de cuatro semanas. Se recomienda limitar el número de congelaciones y descongelaciones.
- **Manipular todas las muestras procedentes de pacientes como potencialmente infecciosas.**

8 Procedimiento

Material suministrado

Ensayo de levetiracetam ARK – REF 5024-0001-00

Material requerido (se suministra por separado)

Calibrador de levetiracetam ARK – REF 5024-0002-00

Controles de calidad – Control de levetiracetam – REF 5024-0003-00

Instrumentación

Antes del uso, puede ser necesario transferir los reactivos R1 y R2 a recipientes específicos para el analizador en cuestión. Evitar la contaminación cruzada de R1 y R2.

Secuencia del ensayo

Para ejecutar o calibrar correctamente el ensayo, véase el manual específico de la instrumentación.

Calibración

Ejecutar una calibración completa (de 6 puntos) usando los Calibradores de levetiracetam ARK A, B, C, D, E, y F; probar los calibradores por duplicado. Con cada nuevo número de lote del kit de reactivos es preciso ejecutar una nueva calibración. Verificar la curva de calibración con controles de calidad de al menos dos niveles en conformidad con el plan

de aseguramiento de calidad fijado en el laboratorio. CAL A es el valor del blanco de la calibración.

Cuándo repetir la calibración

- Siempre que se vayan a utilizar reactivos de un nuevo lote
- Siempre que resulte necesario en base a los resultados del control de calidad
- Siempre que lo prevean los protocolos estándar del laboratorio

Control de calidad (QC)

Los laboratorios deben establecer procedimientos QC para el Ensayo de levetiracetam ARK. Todos los controles de calidad y las pruebas se deben ejecutar en cumplimiento de las normativas locales, regionales o nacionales y de los requisitos de acreditación.

La buena práctica de laboratorio prevé que sean testados al menos dos niveles (puntos de decisión médica alto y bajo) del control de calidad todos los días, que se realice el ensayo de las muestras del paciente y que se efectúe cada vez una calibración. Monitorizar constantemente si los valores de control presentan alguna tendencia o desviación. Si se detecta alguna tendencia o desviación o si el control no recupera dentro del margen especificado, verificar todos los parámetros operativos siguiendo los procedimientos de calidad clínicos y de laboratorio. Para más información, contactar a nuestro servicio de atención al cliente.

Protocolo de dilución manual

Para calcular los niveles de fármaco en las muestras que superen el límite superior del análisis cuantitativo, diluir la muestra a mano con el calibrador cero (CAL A). Multiplicar los resultados del ensayo por el factor de dilución.

$$\text{Factor de dilución manual} = \frac{(\text{volumen muestra} + \text{volumen CAL A})}{\text{Volumen muestra}}$$

9 Resultados

La unidad para expresar los resultados es $\mu\text{g/ml}$ o $\mu\text{mol/l}$. Para convertir las concentraciones de levetiracetam de $\mu\text{g/ml}$ a $\mu\text{mol/l}$, multiplicar por 5,88 el valor en $\mu\text{g/ml}$. El valor de levetiracetam de este ensayo debería ser usado en relación con otras informaciones clínicas. Si el resultado es algún código de error, consultar el manual de instrucciones del instrumento para interpretarlo correctamente.

10 Limitaciones del procedimiento

Este ensayo está concebido exclusivamente para su uso con suero o plasma; véase el Apartado **"Recogida de la muestra y preparación para el análisis"**. En general se considera buena práctica usar siempre el mismo método (y la misma matriz) para cada paciente, debido al potencial de variabilidad entre método y método. Véase el Apartado **Valores previstos** más abajo.

El brivaracetam (Briviact®)⁴ interfiere con las mediciones de levetiracetam (Keppra®) en el Ensayo de levetiracetam de ARK. Los pacientes que se someten a un cambio de tratamiento con medicamentos que involucran a Keppra y Briviact no deben ser monitorizados para detectar el levetiracetam mediante el ensayo ARK. Los niveles séricos de levetiracetam y/o brivaracetam deben confirmarse mediante un método cromatográfico válido si existe la posibilidad de que estos fármacos coexistan en la circulación.

11 Valores previstos

No se ha definido bien ningún margen de referencia para levetiracetam. Se han propuesto a discreción rangos de referencia para el control de las crisis epilépticas incluyendo concentraciones entre 6 y 46 µg/ml (de 35 a 270 µmol/l; muestras de mínimo). Sin embargo, estos rangos no han sido validados con ensayos controlados adecuados, y, en general, la relación entre dichas concentraciones séricas y el efecto clínico no ha sido definida todavía exhaustivamente.⁵⁻⁹ El valor de concentración de levetiracetam debería ser usado en relación con la información arrojada por las evaluaciones clínicas y otros procedimientos diagnósticos. Los niveles de levetiracetam en circulación, es decir, la concentración sérica, pueden estar condicionados por incumplimientos por parte del paciente, por variaciones de la funcionalidad funcionamiento renal, por un embarazo, por interacciones con otros fármacos o por el momento de toma de la muestra. Además, el efecto clínico de dichas concentraciones séricas puede ser alterado por variaciones en el progreso de la gravedad de la enfermedad y por la adición o la suspensión de la administración de otros fármacos que pueden alterar la farmacodinámica del levetiracetam.

El rango de referencia citado de concentraciones de fármaco solamente debe implicar un límite inferior por debajo del cual es relativamente improbable que se produzca una respuesta terapéutica, y un límite superior por encima del cual es relativamente probable que se manifieste toxicidad en los grupos de pacientes objetos de estudio. En general, los médicos que utilizan rangos de referencia de este tipo deben ser conscientes de que, debido a la variabilidad entre individuo e individuo, algunos pacientes podrían obtener un beneficio terapéutico con

concentraciones séricas del fármaco fuera de estos rangos, y otros pacientes podrían padecer toxicidad con niveles por debajo del límite inferior del rango de referencia. Se recomienda definir un momento "estándar" para la recogida de la muestra de manera que las concentraciones séricas de mínimo se midan justo antes de la administración siguiente, preferiblemente por la mañana.

12 Características de rendimiento específicas

Cada laboratorio es responsable de verificar el rendimiento usando los parámetros establecidos para sus analizadores. Las características de rendimiento que se indican a continuación fueron obtenidas con un analizador Roche/Hitachi 917.

Sensibilidad

Límite de cuantificación (LoQ)

El LoQ del Ensayo del levetiracetam de ARK se calculó en conformidad con EP17-A de CLSI y está definido como la concentración más baja para la que se observa una precisión y una recuperación entre ensayos aceptable ($\leq 20\%$ CV con $\pm 15\%$ de recuperación). Se obtuvo un LoQ de 2,0 $\mu\text{g/ml}$, un valor que está en relación con las características del analizador empleado.

Margen del ensayo

Los márgenes del ensayos son de 2,0 a 100,0 $\mu\text{g/ml}$. Anotar los resultados por debajo de este margen como $< 2,0 \mu\text{g/ml}$ o por debajo del LoQ inferior establecido en su laboratorio para el analizador en cuestión. Anotar los resultados por encima de este margen como $> 100,0 \mu\text{g/ml}$ o por encima del LoQ superior establecido en su laboratorio para el analizador en cuestión.

Recuperación

La recuperación analítica se calculó añadiendo levetiracetam concentrado a suero humano negativo al levetiracetam. Fue añadido un volumen determinado de un concentrado de levetiracetam altamente puro al suero humano negativo al levetiracetam, representándose así las concentraciones del fármaco a través del rango del ensayo. Fueron ensayadas seis réplicas de cada muestra en un analizador químico-clínico automatizado. Fue calculado el promedio de los resultados y comparado con la concentración teórica para calcular el valor porcentaje de la recuperación. Los resultados se muestran a continuación.

$$\% \text{ de recuperación} = 100 \times \frac{\text{Concentración media recuperada}}{\text{Concentración teórica}}$$

Concentración teórica (µg/ml)	Concentración media recuperada (µg/ml)	Porcentaje de recuperación
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

Linealidad

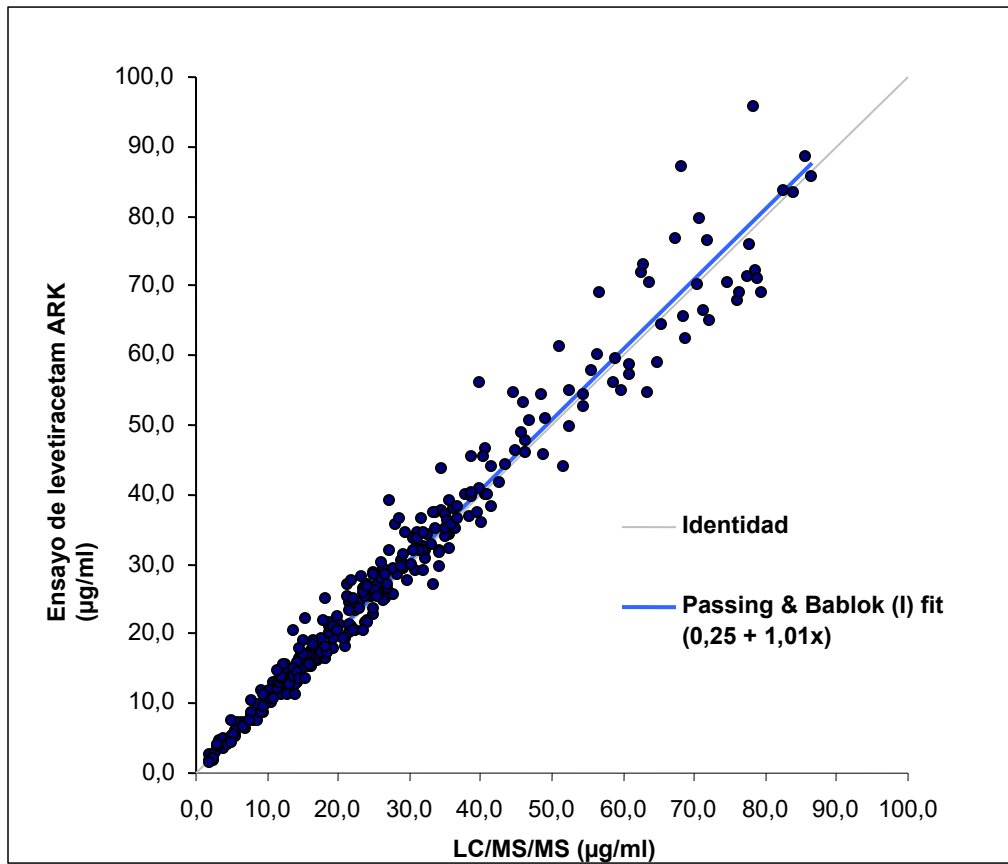
Los estudios de linealidad se realizaron como recomienda el protocolo EP6-A de CLSI/NCCLS. Fue preparada una muestra de suero de 100,0 µg/ml y se hicieron diluciones proporcionales con suero humano negativo al levetiracetam. Las concentraciones de levetiracetam oscilaban entre 1,0 y 100,0 µg/ml. La linealidad a diluciones específicas fue considerada aceptable si la diferencia porcentual era del $\pm 10\%$ entre los valores de regresión previstos de primer y de segundo orden, o $\pm 15\%$ por debajo de 3,0 µg/ml. Se ha constatado una relación lineal entre 2,0 y 100,0 µg/ml. Los resultados se muestran abajo.

Valor estimado (µg/ml)	Resultados (µg/ml)	Resultados previstos (de primer orden)	Resultados previstos (de segundo orden)	Diferencia (en %)
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

Comparación de métodos

Fueron investigadas las correlaciones ateniéndose al protocolo EP9-A2 de CLSI/NCCLS. Fueron comparados los resultados del Ensayo del levetiracetam de ARK con los resultados de LC-MS/MS. Las concentraciones de levetiracetam oscilaban entre 2,0 µg/ml y 86,4 µg/ml. Abajo figuran los resultados del análisis de la regresión de Passing-Bablok¹⁰ para este estudio (con el 95% de límites de confianza).

Pendiente	1,01	(de 0,99 a 1,03)
Intersección en y	0,25	(de - 0,24 a 0,63)
Coefficiente de correlación (r ²)	0,97	(de 0,96 a 0,97)
Número de muestras	305	



Precisión

La precisión fue determinada con el procedimiento descrito en el protocolo EP5-A2 de CLSI/NCCLS. En el estudio fueron usados controles de tres niveles y tres muestras de suero humano que contenían levetiracetam. Cada nivel fue ensayado por cuadruplicado dos veces al día durante 20 días. Las series diarias distaban entre sí al menos dos horas. Fue calculada la precisión intraserial y la interdiaria, la DE total y los CVs porcentuales. Los resultados se muestran abajo. Criterios de aceptación: <10% CV total.

Muestra	N	Promedio (µg/ml)	Intraserial		Interdiario		Total	
			DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)
Control de levetiracetam ARK								
BAJO	160	7,5	0,25	3,4	0,23	3,2	0,34	4,5
MEDIO	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
Suero humano								
BAJO	160	6,9	0,26	3,8	0,22	3,1	0,33	4,8
MEDIO	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

Sustancias interferentes

Fueron realizados estudios de interferencias empleando como guía el protocolo EP7-A2 de CLSI/NCCLS. Fueron evaluadas concentraciones clínicamente altas de las siguientes sustancias potencialmente interferentes en sueros con niveles conocidos de levetiracetam (aprox. 15 y 50 µg/ml). Fue ensayada cada muestra usando el Ensayo del levetiracetam de ARK junto con un control sérico del levetiracetam. La medición del levetiracetam resultó en un error $\leq 10\%$ en presencia de sustancias interferentes a los niveles testados.

Sustancia interferente	Concentración de interferente	Porcentaje de recuperación	
		15 µg/ml de levetiracetam	50 µg/ml de levetiracetam
Albumina	12 g/dl	99,8	102,6
Bilirrubina (conjugada)	70 mg/dl	100,4	102,1
Bilirrubina (no conjugada)	70 mg/dl	99,3	107,9
Colesterol	535 mg/dl	105,3	94,0
Gamma globulina	12 g/dl	99,8	109,5
Hemoglobina	1000 mg/dl	98,6	100,9
Intralipid®	1500 mg/dl	97,1	99,8
Factor reumatoide	1100 UI/ml	98,1	106,4
Triglicéridos	1033 mg/dl	96,8	100,2
Ácido úrico	30 mg/dl	99,6	102,5

Especificidad

El levetiracetam es degradado por hidrólisis en su metabolito principal, el ácido 2-pirrolidona-*N*-butírico (ucb L057) más dos metabolitos menos significativos.³ Otros fármacos que se suelen administrar junto con el levetiracetam y otros fármacos antiepilépticos fueron testados también con la finalidad de comprobar si dichos compuestos influyen sobre la cuantificación de las concentraciones de levetiracetam empleando el Ensayo de levetiracetam ARK. Se añadieron altos niveles de dichos compuestos en las muestras de suero mezclado con nivel terapéutico de levetiracetam bajo (15 µg/ml) y alto (50 µg/ml) . Las muestras fueron analizadas y las concentraciones de levetiracetam de las muestras que contenían el interferente fueron comparadas con el control sérico.

Metabolitos

Fue probada la reactividad cruzada del metabolito ucb L057.

Metabolito	ucb L057 (µg/ml)	Reactividad cruzada en %		Reactividad cruzada en %	
		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

Interferencia con fármacos

Debido a las similitudes estructurales, el brivaracetam (Briviact®) reacciona de forma cruzada sustancialmente en el Ensayo de levetiracetam de ARK. Las mediciones de levetiracetam no deben realizarse con el ensayo ARK cuando ambos fármacos están presentes en la circulación.

El anticuerpo específico para levetiracetam no da reacción cruzada con otros fármacos antiepilépticos ni con otros fármacos coadministrados. Fue añadida una alta concentración de cada compuesto al suero humano normal con los conocidos niveles de levetiracetam (aprox. 15 y 50 µg/ml) para luego realizar un ensayo con un control sérico de levetiracetam. La medición del levetiracetam resultó en un error ≤10% en presencia de compuestos a los niveles testados.

Compuesto	Conc. probada (µg/ml)	Porcentaje de recuperación	
		15 µg/ml de levetiracetam	50 µg/ml de levetiracetam
Acetaminofén	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
Ciclosporina A	40	99,9	98,4
Diazepam	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 unid./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

Compuesto	Conc. probada (µg/ml)	Porcentaje de recuperación	
		15 µg/ml de levetiracetam	50 µg/ml de levetiracetam
Nortriptilina	20	99,3	97,8
Oxcarbazepina	50	95,5	100,4
Fenobarbital	200	98,8	99,4
Fenitoína	200	97,8	96,8
Primidona	100	97,7	97,3
Probenecid	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
Trimetoprima	40	102,0	99,3
Ácido valpróico	500	98,7	96,2
Verapamilo	100	100,3	96,4
Vigabatrina	150	94,0	97,1
Warfarina	250	96,6	102,3
Zonisamida	250	100,3	101,7

13 Bibliografía

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. Briviact®. 2016. Prescribing Information. UCB, Inc. (Smyrna, GA).
5. Leppik, I. E. et al. 2002. Effective levetiracetam doses and serum concentrations: Age effects. *Epilepsia* **43** (Suppl 7):240.
6. Johannessen, S. I. et al. 2003. Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit.* **25**:347-363.
7. Splinter, M. Y. 2005. Pharmacokinetic properties of new antiepileptic drugs. *Journal Of Pharmacy Practice* **18**:444–460.
8. 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.
9. 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.
10. 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 registradas

ARK[™] es una marca registrada de **ARK** Diagnostics, Inc.
Donde aparezcan otros nombres de producto, estos también podrían ser
marcas registradas.
U.S. Patent No. 8,168,756



ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 EE. UU.

Revisado en octubre de 2020
1600-0169-00ES Rev 04