


ARKTM Zonisamide Assay












Leggere attentamente questo foglietto illustrativo di ARK Diagnostics, Inc. prima di effettuare il dosaggio ARK Zonisamide 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

	Codice del lotto	 YYYY-MM-DD	Utilizzare entro/Data di scadenza
	Numero di catalogo		Fabbricante
	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	Uso consentito esclusivamente su prescrizione		

1 Denominazione

ARKTM Zonisamide Assay

2 Finalità d'uso

ARK Zonisamide Assay è un immunodosaggio enzimatico omogeneo previsto per la determinazione quantitativa di zonisamide in campioni di siero o plasma umano con analizzatori di chimica clinica automatizzati. Le concentrazioni di zonisamide possono essere di ausilio nella gestione dei pazienti trattati con tale farmaco.

3 Riassunto e spiegazione del test

Zonisamide (1,2-benzisossazolo-3-metanesulfonamide, ZONEGRAN[®]) è un farmaco anticonvulsivante approvato quale terapia aggiuntiva per il trattamento delle crisi parziali negli adulti affetti da epilessia.¹

4 Principi del metodo

ARK Zonisamide Assay è un immunodosaggio omogeneo basato sul principio di competizione tra il farmaco presente nel campione e la zonisamide marcata con l'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH) per il legame con il reagente anticorpo. 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 cambiamento 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
5022-0001-00	ARK Zonisamide Assay Reagente R1 – Anticorpo/Substrato Anticorpi policlonali di coniglio anti-zonisamide, glucosio-6-fosfato, nicotinamide adenina dinucleotide, sieroalbumina bovina, conservanti e stabilizzanti	1 x 28 mL
	Reagente R2 – Enzima Zonisamide marcata con G6PDH batterica, tampone, sieroalbumina bovina, conservanti e stabilizzanti	1 x 14 mL

Manipolazione e conservazione dei reagenti

I reagenti ARK Zonisamide Assay vengono forniti in stato liquido, pronti per l'uso e possono essere utilizzati immediatamente dopo essere stati tolti dal frigorifero. Quando non vengono utilizzati, 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 stampata 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***. Uso consentito esclusivamente su prescrizione.
- 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. Per garantire la riproducibilità dei risultati, si raccomanda di utilizzare la stessa matrice di campioni per i singoli pazienti. Un campione in condizioni di equilibrio dinamico, con livelli minimi (pre-dose) è in genere ritenuto il più idoneo per il monitoraggio terapeutico di zonisamide. 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
- **Evitare campioni emolizzati. La zonisamide si distribuisce negli eritrociti.**^{2-3,13}
- 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.
- **T trattare tutti i campioni dei pazienti come potenzialmente infettivi.**

8 Procedura

Materiali forniti

ARK Zonisamide Assay – **REF** 5022-0001-00

Materiali necessari – forniti a parte

ARK Zonisamide Calibrator – **REF** 5022-0002-00

Quality Controls – ARK Zonisamide Control – **REF** 5022-0003-00

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

Eseguire la procedura di calibrazione completa (a 6 punti) utilizzando i calibratori ARK Zonisamide 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 Zonisamide 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 oltre il limite superiore di quantificazione, diluire manualmente i campioni con il calibratore zero (CAL A). La concentrazione dopo diluizione deve superare il limite di quantificazione e rientrare nel range di misurazione. Moltiplicare il risultato ottenuto dal dosaggio per il fattore di diluizione.

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

9 Risultati

Riportare i risultati espressi nelle unità µg/mL o µmol/L. Per convertire i risultati di zonisamide da µg/mL a µmol/L, moltiplicare µg/mL per 4,71. 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 alla sezione "**Prelievo e preparazione dei campioni per l'analisi**". È generalmente buona norma utilizzare sempre lo stesso metodo (e la stessa matrice) per il singolo paziente a causa della possibile variabilità da metodo a metodo. Consultare la sezione "**Valori previsti**" sottostante.

11 Valori previsti

Un range terapeutico per la zonisamide non è stato ben definito. Il range di riferimento proposto è compreso tra 10 e 40 µg/mL.⁴⁻⁶ In uno studio condotto, è stata osservata una diminuzione del 50% delle crisi a concentrazioni sieriche comprese tra 7 e 40 mg/L.⁷ Alcuni studi hanno evidenziato una maggiore incidenza di eventi avversi a concentrazioni sieriche superiori a 30 mg/L.⁸⁻¹⁰ In generale, la relazione tra queste concentrazioni sieriche e l'effetto clinico non è stata ben definita e sono state osservate notevoli sovrapposizioni delle concentrazioni di zonisamide tra i pazienti responder e non responder e tra i livelli sierici associati al controllo delle crisi e agli eventi avversi. Le concentrazioni di zonisamide devono essere sempre usate unitamente alle informazioni ottenute mediante valutazioni cliniche e altre procedure diagnostiche.

Il metabolismo della zonisamide può essere influenzato dall'assunzione concomitante di farmaci induttori enzimatici e dal polimorfismo.^{3,11-13} La farmacocinetica può variare considerevolmente, in particolare con l'assunzione concomitante di altri farmaci e a seconda dell'età.⁶ L'emivita della zonisamide è di 50-70 ore nei pazienti in monoterapia e di 25-35 ore nei pazienti che assumono in concomitanza farmaci antiepilettici che provocano induzione enzimatica.

Il range di riferimento indicato per le concentrazioni di farmaco rappresenta unicamente il limite inferiore al di sotto del quale la risposta alla terapia è piuttosto improbabile e il limite superiore al di sopra del quale è probabile che si sviluppi tossicità nelle popolazioni specifiche studiate. I medici che utilizzano detti range devono tenere conto che, in virtù di variazioni individuali, i pazienti possono avere un beneficio terapeutico a concentrazioni sieriche di farmaco che non rientrano in tali range o possono sviluppare tossicità a livelli più bassi rispetto al limite inferiore del range di riferimento.

12 Caratteristiche specifiche di prestazione

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 Zonisamide 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 (CV \leq 20% con recupero \pm 15%). Il LOQ è risultato pari a 2,0 μ g/mL.

Range di dosaggio

Il range del dosaggio è compreso tra 2,0 e 50,0 μ g/mL. Riportare i risultati inferiori a questo range come <2,0 μ g/mL. Riportare i risultati superiori a questo range come >50,0 μ g/mL.

Recupero

Il recupero analitico è stato valutato aggiungendo zonisamide concentrato a siero umano negativo per la zonisamide. Un concentrato stock di zonisamide purissimo è stato aggiunto volumetricamente a siero umano negativo per la zonisamide, per ottenere le concentrazioni di farmaco dell'intervallo del dosaggio. Sono stati analizzati venti replicati di ciascun campione. 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 tabella sottostante.

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

Concentrazione teorica (μ g/mL)	Concentrazione media recuperata (μ g/mL)	Recupero (%)
2,0	1,7	85,3
3,0	3,0	100,0
5,0	5,5	110,0
15,0	15,7	104,5
25,0	25,3	101,0
35,0	35,0	100,0
50,0	49,1	98,1

Linearità

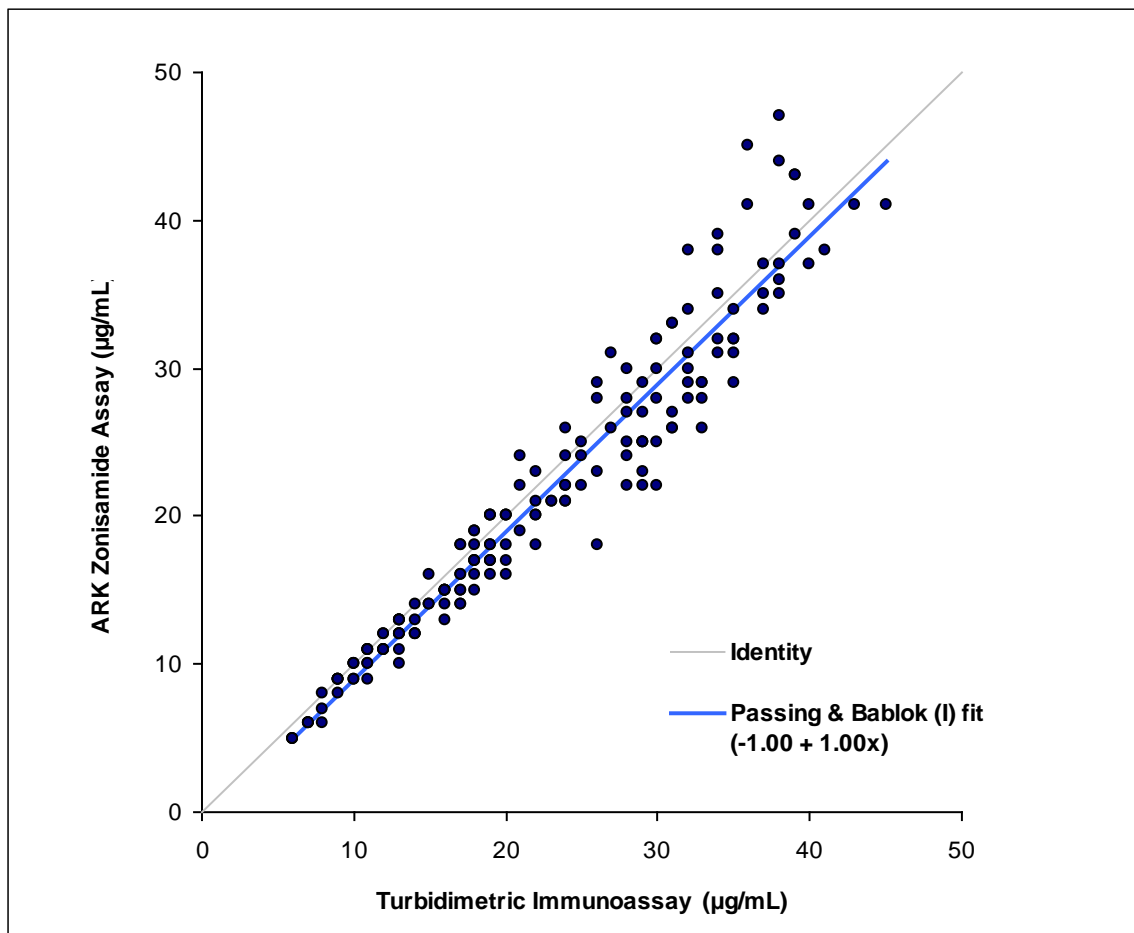
Sono stati condotti degli studi di linearità, come raccomandato nel protocollo EP6-A del CLSI/NCCLS. È stato preparato un campione di siero di 80,0 µg/mL e sono state eseguite delle diluizioni proporzionali con siero umano negativo per la zonisamide. Le concentrazioni di zonisamide sono risultate comprese tra 0,8 e 80,0 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 o $\pm 15\%$ inferiore a 3,0 µg/ml. Una relazione lineare tra 2,4 e 48,0 µg/mL è illustrata di seguito.

Valore stimato (µg/mL)	Risultati (µg/mL)	Risultati previsti 1° ordine	Risultati previsti 2° ordine	Differenza (%)
2,4	2,3	2,5	2,3	-7,0
3,2	3,2	3,3	3,2	-3,8
4,0	4,1	4,1	4,0	-1,8
4,8	4,8	4,8	4,8	-0,6
5,6	5,8	5,6	5,6	0,3
6,4	6,7	6,4	6,5	1,0
7,2	7,4	7,2	7,3	1,4
8,0	8,2	8,0	8,1	1,8
16,0	16,2	15,7	16,2	2,7
24,0	23,4	23,5	24,0	2,3
32,0	32,0	31,3	31,7	1,4
40,0	39,7	39,1	39,2	0,4
48,0	45,8	46,8	46,5	-0,7

Confronto dei metodi

Sono stati eseguiti degli studi di correlazione usando il protocollo EP9-A2 del CLSI/NCCLS. I risultati del dosaggio ARK Zonisamide sono stati messi a confronto con i risultati ottenuti da un dosaggio immunologico turbidimetrico. Le concentrazioni di zonisamide sono risultate comprese tra 6 e 45 µg/mL. I risultati dell'analisi di regressione di Passing-Bablok¹⁴ dello studio sono riportati qui di seguito.

Pendenza	1,00	(0,96 - 1,00)
Intercetta y	- 1,00	(-1,00 - 0,46)
Coefficiente di correlazione (r ²)	0,93	(0,91 - 0,95)
Numero di campioni	176	



Precisione

La precisione è stata determinata in base a quanto descritto nel protocollo EP5-A2 del CLSI/NCCLS. Per lo studio sono stati utilizzati i controlli a tre livelli contenenti zonisamide e campioni di siero umano provenienti da pool. Ciascun livello di controllo è stato analizzato in quadruplicato due volte al giorno per 20 giorni. Ciascuna seduta analitica 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 (%)
ARK Zonisamide Control								
BASSO	160	5,0	0,21	4,1	0,16	3,2	0,25	5,1
MEDIO	160	24,4	0,96	3,8	0,56	2,3	1,12	4,5
ALTO	160	50,6	1,97	3,9	1,33	2,6	2,63	5,3
Siero umano								
BASSO	160	7,0	0,29	4,0	0,21	3,0	0,36	4,9
MEDIO	160	22,6	0,81	3,5	0,59	2,6	1,01	4,4
ALTO	160	51,6	2,47	4,9	1,66	3,2	2,96	5,9

Sostanze interferenti

Sono stati condotti studi sulle sostanze interferenti usando il protocollo EP7-A2 del CLSI/NCCLS come riferimento. Sono state analizzate concentrazioni clinicamente elevate delle seguenti sostanze potenzialmente interferenti nel siero con livelli noti di zonisamide (circa 15 e 45 µg/L). Ciascun campione è stato analizzato usando il dosaggio ARK Zonisamide Assay e un controllo sierico di zonisamide. La misurazione di zonisamide ha dato luogo ad un errore ≤10% con i livelli di sostanze interferenti testate.

Sostanza interferente	Concentrazione della sostanza interferente	Recupero (%)	
		15 µg/mL di zonisamide	45 µg/mL di zonisamide
Albumina	12 g/dL	103,3	97,9
Bilirubina - coniugata	70 mg/dL	102,8	101,0
Bilirubina - non coniugata	70 mg/dL	100,1	98,8
Colesterolo	651 mg/dL	98,5	97,0
Gammaglobuline	12 g/dL	97,3	101,4
Emoglobina	1000 mg/dL	96,6	104,1
Intralipid®	1500 mg/dL	94,8	94,7
Fattore reumatoide	1100 IU/mL	98,4	100,2
Trigliceridi	1204 mg/dL	96,5	96,9
Acido urico	30 mg/dL	98,5	99,4

Specificità

È stata analizzata la reattività crociata per i metaboliti di zonisamide disponibili. Altri farmaci regolarmente somministrati con la zonisamide e gli antiepilettici sono anch'essi stati sottoposti ad analisi per determinare se tali composti influiscono sulla determinazione quantitativa delle concentrazioni di zonisamide mediante il dosaggio ARK Zonisamide Assay. Livelli elevati di tali composti sono stati aggiunti ai pool di siero che contenevano livelli terapeutici bassi (15 µg/mL) ed elevati (45 µg/mL) di zonisamide. I campioni sono stati analizzati e le concentrazioni di zonisamide nei campioni contenenti le sostanze interferenti sono state confrontate con il siero di controllo.

Metaboliti

Sono stati valutati l'N-acetil zonisamide (NAZ) e il 2-sulfamoiil acetilfenolo non glucuronidato (SMAP). I metaboliti NAZ e SMAP-glucuronide sono stati osservati prevalentemente nell'urina dei pazienti sottoposti a terapia con zonisamide.^{3,7,13} Non sono stati rilevati nel plasma. La reattività crociata è stata valutata a concentrazioni basse (15 µg/mL) ed elevate (45 µg/mL) di zonisamide.

Metabolita	Conc. del metabolita (µg/mL)	Reattività crociata (%)		Interferenza (%)	
		Bassa concentrazione di zonisamide	Alta concentrazione di zonisamide	Bassa concentrazione di zonisamide	Alta concentrazione di zonisamide
NAZ	50,0	1,7	5,5	5,4	6,1
	10,0	5,3	3,3	3,3	0,7
SMAP	50,0	18,2	19,5	57,1	20,6
	10,0	14,8	27,3	8,8	5,8

Farmaci interferenti

L'anticorpo selettivo per la zonisamide 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 zonisamide (circa 15 e 45 µg/mL); i campioni così ottenuti sono stati analizzati unitamente a un controllo sierico per la zonisamide. La misurazione di zonisamide ha dato luogo ad un errore ≤10% con i livelli di composti farmaceutici testati.

Composto	Concentrazione (µg/mL)	Recupero (%)	
		15 µg/mL di zonisamide	45 µg/mL di zonisamide
2-etil-2-fenilmalonamide	1000	98,4	100,2
Acetaminofene	200	98,7	98,7
Acido acetilsalicilico	1000	100,3	102,3
Caffeina	100	97,0	97,5
Carbamazepina-10, 11 epossido	120	99,9	100,9
Carbamazepina	120	101,7	100,8
10-Idrossi-carbamazepina	100	96,6	93,5
Clonazepam	50	100,0	99,1
Ciclosporina A	40	101,2	104,9
Diazepam	20	98,0	100,8
Eritromicina	200	101,4	103,9
Etosuccimide	1000	99,9	100,5
Felbamato	1000	94,3	102,4
Gabapentin	100	100,9	105,3
Eparina	200 unità/mL	104,1	102,7
Ibuprofene	500	101,3	105,9
Lamotrigina	300	100,0	99,8
Levetiracetam	400	95,6	97,9
L-triptofano	50	102,9	104,7
Oxcarbazepina	50	99,1	105,2
Fenobarbitale	400	98,6	101,9
Fenitoina	200	105,1	106,7
Primidone	100	98,3	98,8
Acido salicilico	500	104,7	106,6
Sulfametossazolo	400	102,0	105,2
Sulfisoxazolo	1000	95,8	98,3
Teofillina	250	101,7	100,3
Tiagabina	200	102,2	103,5
Topiramato	250	101,7	105,0
Trimetoprim	40	101,1	96,3
Acido valproico	1000	99,8	101,2

13 Bibliografia

1. Foglietto illustrativo di ZONEGRAN®. Eisai Inc., Woodcliff Lake, NJ.
2. Wagner J, Sackellares J, Donofrio P, et al. 1984. Nonlinear pharmacokinetics of CI-912 in adult epileptic patients. *Ther Drug Monit* **6**:277–283.
3. Mimaki T. 1998. Clinical pharmacology and therapeutic drug monitoring of zonisamide. *Ther Drug Monit* **20**:593–597.
4. Johannessen, S. I. et al. 2003. Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Antiepileptic Drugs. *Ther Drug Monit.* **25**:347-363.
5. Splinter, M. Y. 2005. Pharmacokinetic properties of new antiepileptic drugs. *Journal Of Pharmacy Practice* **18**:444–460.
6. 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.
7. Mimaki, T. et al. 1992. Antiepileptic effect and serum levels of zonisamide in epileptic patients with refractory seizures. In Sunshine I (ed) *Recent developments in therapeutic drug monitoring and clinical toxicology*. Marcel Dekker, New York, pp. 437-442.
8. Wilensky, A.J. et al. 1985 Pharmacokinetics of W-554 (ADD 03055) in epileptic patients. *Epilepsia* **26**: 602-606.
9. Berent, S. et al. 1987. Zonisamide (CI-912) and cognition: results from preliminary study. *Epilepsia* **28**: 61-67.
10. Miura, H. et al. 1993. Once daily dose of zonisamide monotherapy in the control of partial seizures in children: Clinical effects and their pharmacokinetic basis. *Jpn J Ther Drug Monit* **10**:240-241.
11. Kaibe, K. et al. 1990. Competitive binding enzyme immunoassay for zonisamide, a new antiepileptic drug, with selected paired-enzyme labeled antigen and antibody. *Clin Chem* **36**:24-27.
12. Okada, Y. et al. 2008. Population estimation regarding the effects of cytochrome P450 2C19 and 3A5 polymorphisms on zonisamide clearance. *Ther Drug Monit* **30**:540–543.
13. Leppik, I. 2004. Zonisamide: chemistry, mechanism of action, and pharmacokinetics. *Seizure* **13S**:S5-S9.
14. 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 Marchi commerciali

ARKTM è un marchio commerciale di **ARK** Diagnostics, Inc.
Altri marchi o nomi di prodotti sono marchi commerciali dei rispettivi proprietari.



ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 USA

Stampato negli Stati Uniti
Revisione Febbraio 2017
1600-0172-00IT Rev 03