

ARKTM Zonisamide Assay

Este folheto informativo da ARK Diagnostics, Inc. para o Ensaio da Zonisamida 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 Zonisamide Assay

2 Utilização prevista

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

3 Resumo e explicação do teste

A zonisamida (1,2-benzisoxazola-3-metanosulfonamida, ZONEGRAN[®]) é um medicamento anticonvulsivo aprovado para a utilização como tratamento adjuvante no tratamento de convulsões parciais em adultos com epilepsia.¹

4 Princípios do procedimento

O Ensaio de Zonisamida ARK é um imunoenensaio enzimático homogêneo baseado na concorrência entre o fármaco na amostra e a zonisamida classificada com a enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) para ligar o reagente ao anticorpo. Na medida em que este liga anticorpos, a atividade da enzima diminui. Na presença do fármaco na amostra, a atividade da enzima aumenta e é diretamente proporcional à concentração do fármaco. A enzima ativa converte a nicotinamida adenida dinucleotídeo (NAD) em NADH que é medida espectrofotometricamente 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
5022-0001-00	ARKTM Zonisamide Assay Reagente R1 – Anticorpo/Substrato anticorpos policlonais produzidos em coelhos* para zonisamida, glicose-6-fosfato, nicotinamida adenida dinucleotídeo, soroalbumina bovina, conservantes e estabilizadores	1 X 28 mL
	Reagente R2 – Enzima Zonisamida classificada com G6PDH bacteriano, tampão, soroalbumina bovina, conservantes e estabilizadores	1 X 14 mL

Manuseamento e armazenamento do reagente

Os reagentes do Ensaio da Zonisamida 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 da 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 a monitorização terapêutica do fármaco da zonisamida. Deve anotar-se a hora da recolha de sangue desde a última dose.
- Não deve ser utilizado sangue total. Os seguintes anticoagulantes podem ser usados neste ensaio.
 - Heparina de sódio
 - Heparina de lítio
 - Potássio EDTA
- **Evite amostras hemolisadas. A zonisamida distribui-se nos eritrócitos.**^{2-3,13}
- **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 utilizada no ensaio.
- Fibrina, células sanguíneas vermelhas, e outros materiais particulados podem causar um resultado incorreto. Assegure uma centrifugação adequada.
- Amostras clarificadas podem ser armazenadas por até uma semana de 2 a 8°C. Se o teste for atrasado por mais de uma semana, as

amostras devem ser armazenadas congeladas ($\leq -10^{\circ}\text{C}$) por até quatro semanas antes de serem testadas. 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 infecciosos.**

8 Procedimento

Materiais fornecidos

Ensaio Zonisamida ARK – **REF** 5022-0001-00

Materiais necessários – Fornecidos em separado

Calibrador Zonisamida ARK – **REF** 5022-0002-00

Controlos da qualidade – Controlo Zonisamida ARK – **REF** 5022-0003-00

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 Zonisamato 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 por protocolos laboratoriais padrão

Controlo da Qualidade (CQ)

Os laboratórios devem estabelecer procedimentos de CQ para o Ensaio de Zonisamida 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 detectados 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 espécimes que excedam o limite superior da quantificação, dilua a amostra manualmente com calibrador zero (CAL A). A concentração após a diluição deve exceder o limite da quantificação e estar dentro da gama de medição. 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 $\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{mol/L}$. Para converter os resultados de $\mu\text{g/mL}$ para $\mu\text{mol/L}$ de zonisamida, multiplique $\mu\text{g/mL}$ por 4,71. 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 espécimes 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 a zonisamida. Tem sido sugerida uma gama de referência de 10 a 40 $\mu\text{g/mL}$.⁴⁻⁶ Num estudo, observou-se uma redução de 50% nas convulsões com concentrações no soro na gama de 7 a 40 mg/L .⁷ Alguns estudos indicam uma incidência aumentada de efeitos adversos com concentrações no soro que excedam 30 mg/L .⁸⁻¹⁰ De modo geral, não definiu-se bem a relação entre estas concentrações no soro e o efeito clínico, e observou-se uma sobreposição

considerável nas concentrações da zonisamida entre respondedores de soro e não respondedores, bem como entre níveis no soro associados com controlo de convulsão e efeitos adversos. As concentrações da zonisamida devem ser utilizadas sempre junto com as informações disponíveis a partir de avaliações clínicas e outros procedimentos diagnósticos.

O metabolismo da zonisamida pode ser influenciado por enzima induzindo co-medicações e polimorfismos.^{3,11-13} A farmacocinética pode variar significativamente, em particular com co-medicação e baseado na idade.⁶ O período de semi-desintegração da zonisamida é 50-70 horas em pacientes com monoterapia e 25-35 horas em pacientes com co-medicação de medicamentos antiepiléticos que induzam enzimas.

A gama de referência de concentrações do fármaco mencionada apenas deve implicar um limite inferior abaixo do qual uma resposta terapêutica é relativamente improvável e um limite superior acima do qual a toxicidade é relativamente provável de ocorrer nas populações específicas estudadas. Os clínicos que apliquem estas gamas propostas devem estar conscientes de que por causa de variações individuais os pacientes podem obter benefício terapêutico com concentrações do fármaco no soro fora destas gamas ou podem experimentar toxicidade com níveis abaixo do limite inferior da gama de referência.

12 Características específicas de desempenho

Cada laboratório é responsável pela verificação do desempenho utilizando os parâmetros do 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 Zonisamida ARK foi determinado de acordo com CLSI EP17-A e é definido como a concentração mais baixa para a qual se observa precisão entre ensaios e recuperação aceitáveis ($\leq 20\%$ CV com recuperação $\pm 15\%$). O LOQ foi determinado como 2,0 $\mu\text{g/mL}$.

Gama do ensaio

O intervalo do ensaio é de 2,0 a 50,0 $\mu\text{g/mL}$. Registe resultados abaixo desta gama como $< 2,0 \mu\text{g/mL}$. Registe resultados acima desta gama como $> 50,0 \mu\text{g/mL}$.

Recuperação

A recuperação analítica foi realizada adicionando zonisamida concentrada em soro humano sem zonisamida. Um estoque concentrado de zonisamida de alta pureza foi adicionado volumetricamente ao soro humano sem zonisamida, representando as concentrações da substância em toda a gama do ensaio. Foram ensaiadas vinte replicados de cada amostra. 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	1,7	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

Linearidade

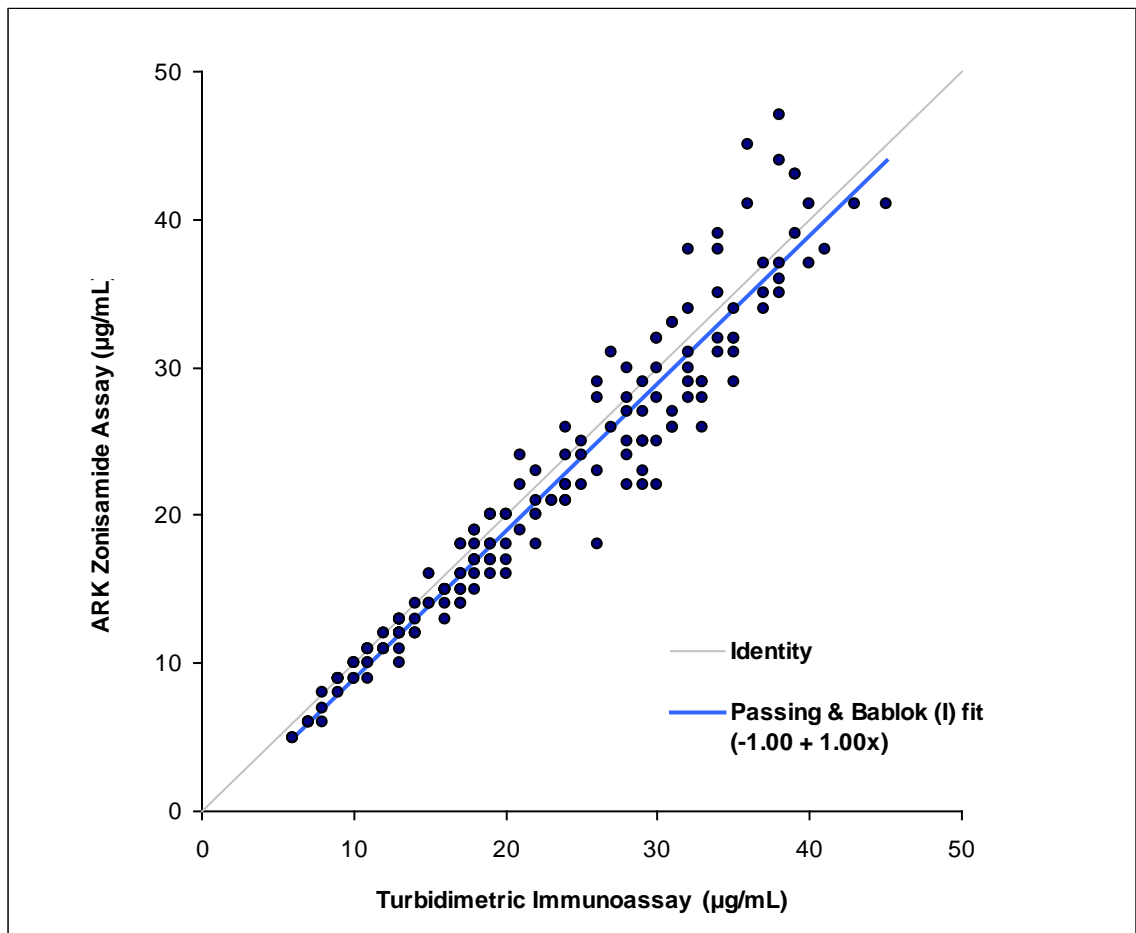
Os estudos de linearidade foram realizados conforme sugerido no Protocolo CLSI/NCCLS EP6-A. Foi preparada uma amostra de 80,0 µg/mL de soro e foram feitas diluições proporcionais com soro humano sem zonisamida. As concentrações da zonisamida variaram entre 0,8 a 80,0 µg/mL. A linearidade em diluições 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. Abaixo é exibida uma relação linear entre 2,4 and 48,0 µg/mL.

Valor estimado (µg/mL)	Resultados (µg/mL)	Resultados previstos 1 ^a ordem	Resultados previstos 2 ^a ordem	% Diferença
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

Comparação de métodos

Foram realizados estudos de correlação usando o Protocolo CLSI/NCCLS EP7-A2. Os resultados do ensaio de zonisamida ARK foram comparados com os resultados de um imunoenensaio turbidimétrico. As concentrações da zonisamida variaram entre 6 a 45 µg/mL. Os resultados da análise de regressão Passing-Bablok¹⁴ para o estudo são exibidos abaixo.

Inclinação	1,00	(0,96 a 1,00)
Interceção y	- 1,00	(1,00 a 0,46)
Coefficiente de correlação (r ²)	0,93	(0,91 a 0,95)
Número de amostras	176	



Precisão

A precisão foi determinada conforme descrito no Protocolo CLSI/NCCLS EP5-A2. Foram utilizados controlos de nível triplo contendo zonisamida e espécimes de soro humano em lotes. Cada nível do controlo foi ensaiado em quadruplicado duas vezes ao dia durante 20 dias. As execuções por dia eram 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 (µg/mL)	Dentro da execução		No dia		Total	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Ensaio da Zonisamida ARK								
BAIXO	160	5,0	0,21	4,1	0,16	3,2	0,25	5,1
MÉD	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
Soro humano								
BAIXO	160	7,0	0,29	4,0	0,21	3,0	0,36	4,9
MÉD	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

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 zonisamida (aproximadamente 15 e 45 µg/mL). Cada amostra foi ensaiada utilizando Ensaio Zonisamida ARK, junto com um controlo da zonisamida no soro. A medição da zonisamida resultou num erro de $\leq 10\%$ na presença de substâncias interferentes nos níveis testados.

Substância interferente	Concentração interferente	Percentagem de recuperação	
		15 µg/mL Zonisamida	45 µg/mL Zonisamida
Albumina	12 g/dL	103,3	97,9
Bilirrubina - conjugada	70 mg/dL	102,8	101,0
Bilirrubina - não conjugada	70 mg/dL	100,1	98,8
Colesterol	651 mg/dL	98,5	97,0
Gamaglobulina	12 g/dL	97,3	101,4
Hemoglobina	1000 mg/dL	96,6	104,1
Intralipid®	1500 mg/dL	94,8	94,7
Fator Reumatóide	1100 IU/mL	98,4	100,2
Triglicerídeos	1204 mg/dL	96,5	96,9
Ácido úrico	30 mg/dL	98,5	99,4

Especificidade

A reatividade cruzada foi testada para metabólitos conhecidos da zonisamida. Outros medicamentos administrados rotineiramente com zonisamida e medicamentos antiepiléticos também foram testados a fim de determinar se estes compostos afetam a quantificação das concentrações de zonisamida usando o Ensaio da Zonisamida ARK. Níveis altos destes compostos foram adicionados em *pools* de soro contendo níveis terapêuticos baixos (15 µg/mL) e altos (45 µg/mL) de zonisamida. As amostras foram analisadas e as concentrações de zonisamida das amostras contendo interferentes foram comparadas com o controle do soro.

Metabólitos

Foram avaliados N-acetil zonisamida (NAZ) e o 2-sulfamoiacetil fenol (SMAP) não glicuronizado. Os metabólitos NAZ e SMAP glucuronida são encontrados em primeiro lugar na urina de pacientes que recebem tratamento com zonisamida.^{3,7,13} Não foram detectados no plasma. A reatividade cruzada foi avaliada na presença de zonisamida baixa (15 µg/mL) e alta (45 µg/mL).

Metabólito	Conc. metabólitos (µg/mL)	Percentagem Reatividade cruzada		Percentagem Interferência	
		Baixa Zonisamida	Alta Zonisamida	Baixa Zonisamida	Alta Zonisamida
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

Interferência medicamentosa

Anticorpos seletivos de zonisamida 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 zonisamida (aproximadamente 15 e 45 µg/mL) e ensaiados junto com um controlo de zonisamida no soro. A medição da zonisamida resultou num erro de ≤10% na presença de compostos do fármaco nos níveis testados.

Composto	Concentração µg/mL)	Percentage, de recuperação	
		15 µg/mL Zonisamida	45 µg/mL Zonisamida
2-Etil-2-fenilmalonamida	1000	98,4	100,2
Acetaminofeno	200	98,7	98,7
Ácido acetil salicílico	1000	100,3	102,3
Cafeína	100	97,0	97,5
Carbamazepina-10, 11-epóxido	120	99,9	100,9
Carbamazepina	120	101,7	100,8
10-Hidroxi Carbamazepina	100	96,6	93,5
Clonazepam	50	100,0	99,1
Ciclosporin A	40	101,2	104,9
Diazepan	20	98,0	100,8
Eritromicina	200	101,4	103,9
Etosuximida	1000	99,9	100,5
Felbamato	1000	94,3	102,4
Gabapentina	100	100,9	105,3
Heparina	200 Unidades/mL	104,1	102,7
Ibuprofeno	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
Fenobarbital	400	98,6	101,9
Fenitoína	200	105,1	106,7
Primidona	100	98,3	98,8
Ácido salicílico	500	104,7	106,6
Sulfametoxazol	400	102,0	105,2
Sulfisoxazol	1000	95,8	98,3
Teofilina	250	101,7	100,3
Tiagabina	200	102,2	103,5
Topiramato	250	101,7	105,0
Trimetoprim	40	101,1	96,3
Ácido Valpróico	1000	99,8	101,2

13 Referências

1. ZONEGRAN[®] Prescribing Information. 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 Marcas registradas

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

Outras marcas e nomes de produtos são marcas registradas dos seus respectivos proprietários.



ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 USA

Impresso nos EUA
Revisão em Fevereiro de 2017
1600-0172-00PT Rev 03