

ARK™ Zonisamide Assay

Lea atentamente el presente folleto ilustrativo de ARK Diagnostics, Inc. antes de usar el Ensayo de zonisamida 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

ARK™ Zonisamide Assay

2 Uso previsto

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

3 Resumen y explicación de la prueba

Zonisamida (1,2-benzisoxazol-3-metanesulfonamida, ZONEGRAN®) es un fármaco anticonvulsivo homologado como terapia adyuvante en el tratamiento de crisis epilépticas parciales en adultos.¹

4 Principios del procedimiento

El Ensayo de zonisamida ARK es un inmunoensayo homogéneo basado en la competición entre el fármaco presente en la muestra y la zonisamida marcada con la enzima glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) a la hora de unirse al reactivo con anticuerpo. Cuando el último se une 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
5022-0001-00	ARK™ Zonisamide Assay Reactivo R1 – Anticuerpo/Sustrato anticuerpos anti zonisamida policlonales de conejo, glucosa-6-fosfato, nicotinamida adenina dinucleotide, albumina de suero bovino, conservantes y estabilizantes	1 X 28 ml
	Reactivo R2– Enzima Zonisamida marcada con G6PDH bacteriana, tampón, albumina de suero bovino, conservantes y estabilizantes.	1 X 14 ml

Manipulación y almacenamiento de reactivo

Los reactivos del Ensayo de zonisamida 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 de la zonisamida. 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
- **Evitar el uso de muestras hemolizadas. La zonisamida entra en los eritrocitos.**^{2-3,13}
- 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 va a transcurrir más de una semana antes de ejecutarse la prueba, congelar 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 zonisamida ARK – REF 5022-0001-00

Material requerido (se suministra por separado)

Calibrador de zonisamida ARK – REF 5022-0002-00

Controles de calidad – Control de zonisamida ARK – REF 5022-0003-00

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 zonisamida 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 al 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 zonisamida 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). La concentración después de diluir debe superar el límite de cuantificación y caer dentro del rango de medición. 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 zonisamida de $\mu\text{g/ml}$ a $\mu\text{mol/l}$, multiplicar por 4,71 el valor en $\mu\text{g/ml}$. 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.

11 Valores previstos

Todavía no se ha definido con precisión ningún margen terapéutico para la zonisamida. Se ha sugerido un rango de referencia entre 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$.⁴⁻⁶ En un estudio se observó una reducción del 50% en las crisis epilépticas a concentraciones séricas que iban de 7 a 40 mg/l .⁷ Según algunos estudios, hay una mayor incidencia de efectos adversos si las concentraciones séricas superan los 30 mg/l .⁸⁻¹⁰ En general, la relación entre dichas concentraciones séricas y el efecto clínico no ha sido

definida bien y se ha observado una considerable coincidencia en la concentraciones de zonisamida entre respondedores y no-respondedores séricos ; además se ha observado una coincidencia entre los niveles séricos asociados al control de las crisis epilépticas y los efectos adversos. Las concentraciones de zonisamida deberían ser usadas siempre en relación a la información arrojada por las evaluaciones clínicas y otros procedimientos diagnósticos.

El metabolismo de la zonisamida puede ser influenciado por polimorfismos y fármacos coadministrados que hagan de inductores enzimáticos.^{3,11-13} La farmacocinética puede variar significativamente, en particular en casos de coadministración de otros fármacos y según la edad.⁶ El tiempo de semivida de la zonisamida es de 50-70 horas en pacientes en régimen de monoterapia y de 25-35 horas en pacientes comedidos con fármacos antiepilépticos que sean inductores enzimáticos.

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 la población objeto de estudio. Los médicos que utilizan los rangos propuestos 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.

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 de la zonisamida 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). El LOQ determinado era de 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

Margen del ensayo

Los márgenes del ensayo son de 2,0 a 50,0 µg/ml. Anotar los resultados por debajo de este margen como <2,0 µg/ml. Anotar los resultados por encima de este margen como >50,0 µg/ml.

Recuperación

La recuperación analítica se calculó añadiendo zonisamida concentrada a suero humano negativo a la zonisamida. Fue añadido un volumen determinado de un concentrado procedente de un lote de zonisamida altamente pura al suero humano negativo a la zonisamida, representándose así las concentraciones del fármaco a través del margen del ensayo. Se ensayaron veinte réplicas para cada muestra. 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)	Recuperación en %
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

Linealidad

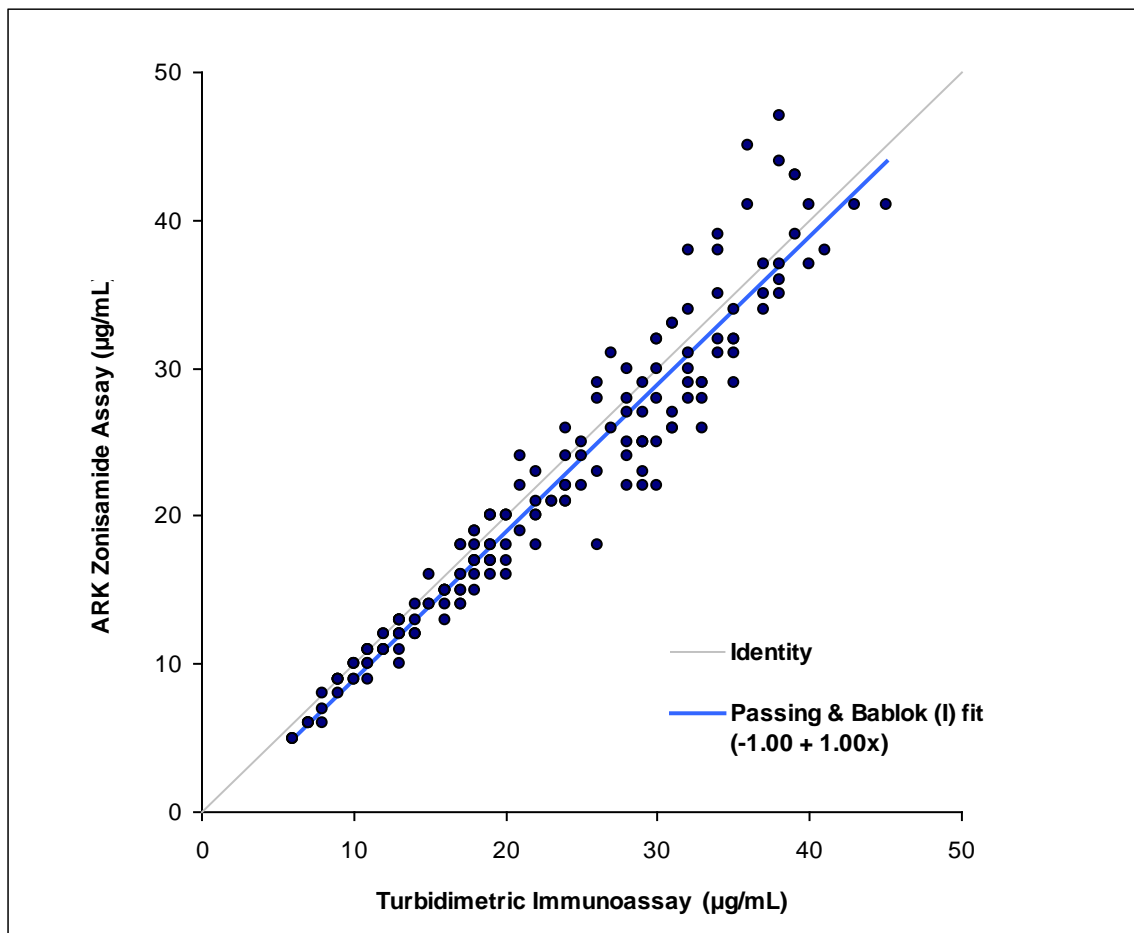
Los estudios de linealidad se realizaron como recomienda el protocolo EP6-A de CLSI/NCCLS. Fue preparada una muestra de suero de 80,0 µg/ml y se hicieron diluciones proporcionales con suero humano negativo a la zonisamida. Las concentraciones de zonisamida oscilaban entre 0,8 y 80,0 µg/ml. La linealidad 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 bien de $\pm 15\%$ por debajo de 3,0 µg/ml. La relación lineal entre 2,4 y 48,0 µg/ml aparece a continuación.

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

Comparación de métodos

Fueron investigadas las correlaciones ateniéndose al protocolo EP9-A2 de CLSI/NCCLS. Fueron comparados los resultados del Ensayo de la zonisamida ARK con los resultados de un inmunoensayo turbidimétrico. Las concentraciones de la zonisamida oscilaban entre 6 µg/ml y 45 µg/ml. Abajo figuran los resultados del análisis de la regresión de Passing-Bablok¹⁴ para este estudio.

Pendiente	1,00	(de 0,96 a 1,00)
Intersección en y	- 1,00	(de -1,00 a - 0,46)
Coefficiente de correlación (r ²)	0,93	(de 0,91 a 0,95)
Número de muestras	176	



Precisión

La precisión fue determinada según el procedimiento descrito en el protocolo EP5-A2 de CLSI/NCCLS. En el estudio se usaron controles de zonisamida de tres niveles y muestras de suero humano. Cada nivel de control 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 a continuación. Criterios de aceptación: <10% CV total.

Muestra	N	Promedio (µg/ml)	Intraserial		Interdiario		Total	
			DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)
Control de zonisamida ARK								
BAJO	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
Suero humano								
BAJO	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

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 zonisamida (aprox. 15 y 45 µg/ml). Fue ensayada cada muestra usando el Ensayo de la zonisamida de ARK junto con un control sérico de la zonisamida. La medición de la zonisamida resultó con $\leq 10\%$ de error en presencia de sustancias interferentes a los niveles testados.

Sustancia interferente	Concentración interferente	Porcentaje de recuperación	
		15 µg/ml de zonisamida	45 µg/ml de zonisamida
Albumina	12 g/dl	103,3	97,9
Bilirrubina (conjugada)	70 mg/dl	102,8	101,0
Bilirrubina (no conjugada)	70 mg/dl	100,1	98,8
Colesterol	651 mg/dl	98,5	97,0
Gamma globulina	12 g/dl	97,3	101,4
Hemoglobina	1000 mg/dl	96,6	104,1
Intralipid®	1500 mg/dl	94,8	94,7
Factor reumatoide	1100 UI/ml	98,4	100,2
Triglicéridos	1204 mg/dl	96,5	96,9
Ácido úrico	30 mg/dl	98,5	99,4

Especificidad

Se probó la reactividad cruzada para los metabolitos de zonisamida. Otros fármacos que se suelen administrar juntos con la zonisamida y otros fármacos antiepilépticos fueron testados también con la finalidad de comprobar si dichos compuestos influyen sobre la determinación de la concentración de zonisamida con el Ensayo de zonisamida ARK. Se añadieron altos niveles de dichos compuestos a las muestras de suero mezclado, con nivel terapéutico bajo de zonisamida (15 µg/ml) y con nivel terapéutico alto (45 µg/ml) de zonisamida. Las muestras fueron analizadas y las concentraciones de zonisamida de las muestras que contenían el interferente fueron comparadas con el control sérico.

Metabolitos

Fueron evaluados la N-acetil zonisamida (NAZ) y el 2-sulfamoilacetil fenol (SMAP); no glucuronizado. Los metabolitos del glucurónido de NAZ y de SMAP se encuentran sobre todo en la orina de pacientes tratados con zonisamida.^{3,7,13} No fueron detectados en el plasma. Se evaluó la reactividad cruzada en presencia de zonisamida a concentración baja (15 µg/ml) y alta (45 µg/ml).

Metabolito	Conc. del metabolito (µg/ml)	Reactividad cruzada (en %)		Interferencia (en %)	
		Baja Zonisamida	Alta Zonisamida	Baja 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

Interferencia con fármacos

El anticuerpo específico para la zonisamida no presenta reacción cruzada con otros fármacos antiepilépticos ni coadministrados. Fue añadida una alta concentración de cada compuesto dentro del suero humano normal con los conocidos niveles de zonisamida (aprox. 15 y 45 µg/ml) para luego realizar un ensayo con un control sérico de zonisamida. La medición de la zonisamida resultó en un error ≤10% en presencia de compuestos a los niveles testados.

Compuesto	Conc. (µg/ml)	Porcentaje de recuperación	
		15 µg/ml de zonisamida	45 µg/ml de zonisamida
2 etil-2-fenil malonamida	1000	98,4	100,2
Acetaminofén	200	98,7	98,7
Ácido acetilsalicílico	1000	100,3	102,3
Cafeína	100	97,0	97,5
10,11 epóxido de carbamazepina	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
Ciclosporina A	40	101,2	104,9
Diazepam	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 unid./ml	104,1	102,7
Ibuprofeno	500	101,3	105,9
Lamotrigina	300	100,0	99,8
Levetiracetam	400	95,6	97,9
L-triptófano	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
Trimetoprima	40	101,1	96,3
Ácido valproico	1000	99,8	101,2

13 Bibliografía

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

ARKTM es una marca registrada de **ARK** Diagnostics, Inc.
Donde aparezcan otros nombres de producto, estos también podrían ser marcas registradas.



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

Impreso en EE.UU.
Revisado en febrero de 2017
1600-0172-00ES Rev 03