

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto – USP

Vânia Casari Mussato

## Monitoração de Drogas Terapêuticas

Ribeirão Preto  
2010

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto – USP

Vânia Casari Mussato

## Monitoração de Drogas Terapêuticas

Monografia apresentada ao programa  
de aprimoramento profissional/ SES  
elaborada no hospital das clínicas da  
faculdade de medicina de Ribeirão Preto  
USP/ Departamento de Apoio Médico  
Área: Análises Clínicas  
Orientador: Gilmar Humberto Bueno

Ribeirão Preto  
2010

BIBLIOTECA CENTRAL DA USP DE RIBEIRÃO PRETO

FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO – USP

TOMBO: \_\_\_\_\_ SYSNO: \_\_\_\_\_

***MONOGRAFIA 2010***

***MONITORAÇÃO DE DROGAS TERAPÊUTICAS***

VÂNIA CASARI MUSSATO

**Orientador: Gilmar Humberto Bueno**

## Resumo

A monitoração das drogas terapêuticas visa auxiliar no tratamento bem como na diminuição da toxicidade das drogas frente ao organismo do paciente, levando em consideração que seu uso se faz por um tratamento de longa duração nas maiorias dos casos. No Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – HCRP, faz-se a monitorização rotineira de quatro drogas de ação antiepilépticas e uma droga de ação antibiótica, sendo elas: Ácido valpróico, Fenitoína, Fenobarbital, Carbamazepina e Vancomicina esta de ação antibiótica utilizada em casos de infecções hospitalares ou de difícil controle. A utilização dos kits auxilia de modo medir a concentração dos níveis da droga no soro do paciente, e assim analisar se a concentração ultrapassa o nível máximo permitido, ou se não chega ao nível mínimo de concentração, sugerindo assim ao médico um abuso no uso do medicamento ou um não seguimento das orientações médicas. Os níveis são analisados levando se em conta a data e horário de ingestão do medicamento, e a data e hora da coleta do sangue, além de analisar a possível interferência de fatores, como bilirrubina, hemólise, lipemia. Para diminuir possíveis erros é seguido rigorosamente um processo de calibração, e um controle diário, seguindo as normas do controle de qualidade. A avaliação da quantidade de droga no soro é feita através do método de imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA), que consiste em utilizar a fluorescência combinada com a reação antígeno anticorpo, medindo polarização da luz emitida, e assim transformando essa medida da polarização da luz em concentração do antígeno no soro do paciente.

## Sumário

1. Introdução .....	8
2. Objetivo .....	9
3. Materiais .....	9
4. Metodologia.....	9
4.1. Princípios da Reação .....	9
4.2. Seqüência de reações FPIA.....	10
5. Definições.....	10
6. Ácido Valpróico .....	12
6.1. Definição .....	12
6.2. Método.....	13
6.3. Aplicação e interpretação clinica.....	13
6.4. Princípios biológicos .....	14
6.5. Calibradores.....	15
6.6. Controles.....	15
6.7. Precauções de manuseio e armazenamento .....	16
6.8. Volume da amostra .....	17
6.9. Controle de qualidade .....	18
6.10. Limitações e valores esperados .....	18
6.11. Precisão, sensibilidade e especificidade .....	19
6.12. Interferência.....	19
7. Fenobarbital .....	20
7.1. Definição .....	20
7.2. Método.....	21
7.3. Aplicação e interpretação clinica.....	21
7.4. Princípios biológicos .....	22
7.5. Calibradores.....	23
7.6. Controles.....	23
7.7. Precauções de manuseio e armazenamento .....	24
7.8. Volume da amostra .....	25
7.9. Controle de qualidade .....	25
7.10. Limitações e valores esperados .....	26
7.11. Precisão, sensibilidade e especificidade .....	27

7.12. Interferência.....	27
8. Fenitoína.....	27
8.1. Definição .....	28
8.2. Método.....	29
8.3. Aplicação e interpretação clínica.....	30
8.4. Princípios biológicos .....	30
8.5. Calibradores.....	31
8.6. Controles.....	31
8.7. Precauções de manuseio e armazenamento .....	32
8.8. Volume da amostra .....	33
8.9. Controle de qualidade.....	33
8.10. Limitações e valores esperados .....	34
8.11. Precisão, sensibilidade e especificidade .....	35
8.12. Interferência.....	36
9. Carbamazepina .....	36
9.1. Definição .....	36
9.2. Método.....	37
9.3. Aplicação e interpretação clínica.....	38
9.4. Princípios biológicos .....	38
9.5. Calibradores.....	39
9.6. Controles.....	39
9.7. Precauções de manuseio e armazenamento .....	40
9.8. Volume da amostra .....	41
9.9. Controle de qualidade.....	41
9.10. Limitações e valores esperados .....	42
9.11. Precisão, sensibilidade e especificidade .....	43
9.12. Interferência.....	43
10. Vancomicina .....	44
10.1. Definição.....	44
10.2. Método .....	45
10.3. Aplicação e interpretação clínica.....	45
10.4. Princípios biológicos .....	46
10.5. Calibradores .....	46

<b>10.6. Controles</b> .....	47
<b>10.7. Precauções de manuseio e armazenamento</b> .....	47
<b>10.8. Volume da amostra</b> .....	48
<b>10.9. Controle de qualidade</b> .....	49
<b>10.10. Limitações e valores esperados</b> .....	49
<b>10.11. Precisão, sensibilidade e especificidade</b> .....	50
<b>10.12. Interferência</b> .....	51
<b>11. Conclusão</b> .....	51
<b>12. Referências Bibliográficas</b> .....	51

# 1. Introdução

Para ser eficaz a monitorização de drogas terapêuticas, necessita da colheita de amostras válidas, seguida de determinações oportunas e confiáveis das concentrações de medicamentos nessas amostras. Os resultados devem ser relatados ou cotejados com um programa de doses, para que sejam interpretados no contexto farmacocinético.

É importante, por tanto, para os bioquímicos clínicos, saber não só como dosar medicamentos em amostras biológicas, mas também como estas medidas são utilizadas para promover uma terapêutica medicamentosa eficaz. A monitoração medicamentosa demanda uma abordagem multidisciplinar, porque se apóia nos esforços cooperativos do médico, enfermeiro, farmacologista e biomédico.

A monitoração surgiu em 1927, quando foi demonstrado o valor da monitoração dos níveis de brometo no soro, para diferenciar o comportamento psicótico induzido por brometo do comportamento psicótico intrínseco.

A utilidade da monitoração da concentração de um medicamento é baseada na premissa de que a previsão de uma resposta farmacológica é correlacionada melhor com a concentração de medicamento enviada ao local de ação (receptor). Os estudos mostraram que, para muitos medicamentos, existe uma forte correlação entre sua concentração no soro e o efeito farmacológico observado. Além do mais, anos de correlação de concentrações sanguíneas com efeitos de drogas demonstraram a utilidade clínica da informação sobre concentração de medicamentos.

Devem-se ter em mente que a concentração de uma droga no soro não é necessariamente igual à concentração no receptor; pode simplesmente refleti-la.

Algumas das principais vantagens da monitoração são: monitorar a cooperação do paciente a respeito do cumprimento ou não do programa pelo paciente, buscar pacientes os quais não se adaptam a disposição do medicamento, realizar programas terapêuticos ajustados durante os períodos de variação fisiológica contínua, identificar as linhas de base de concentrações associadas a um programa terapêutico ótimo e os programas mais adequados de doses de medicamento podem ser iniciados e mantidos para um determinado paciente.



## **2. Objetivo**

Analisar a metodologia da monitoração de drogas terapêuticas através do método de imunoenensaio de fluorescência polarizada (FPIA), realizado no laboratório de bioquímica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.

Demonstrar a utilidade clínica na monitoração dos fármacos: Ácido Valpróico, Fenitoína, Fenobarbital, Carbamazepina e Vancomicina, onde suas concentrações são essenciais pra eficácia do tratamento e sua toxicidade perigosa ao paciente.

## **3. Materiais**

As dosagens são realizadas em soro de pacientes em tratamento pelo Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP. Para a realização dos exames são necessários kits de reagentes específicos para dosagem de cada fármaco, os kits reagentes utilizados são fabricados e distribuídos por ABBOTT laboratórios do Brasil LTDA., e analisados pelo sistema automatizado AxSYM SYSTEM.

## **4. Metodologia**

### **4.1. Princípios da Reação**

A tecnologia de imunoenensaio por fluorescência polarizada (FPIA) combina duas tecnologias para determinar a concentração da substância analisada, através de competição e fluorescência polarizada.

A competição requer dois antígenos: o antígeno da amostra e o antígeno traçador contido no pack. O antígeno da amostra compete com o traçador pelos sítios de ligação no anticorpo, quanto maior a concentração de antígeno presente na amostra, maior será a ligação ao anticorpo deixando o traçador livre.

A tecnologia FPIA é baseada na luz polarizada, que pode ser usada para produzir emissão de fluorescência polarizada do antígeno traçador, a

polarização média da fluorescência emitida é relacionada ao tamanho da molécula, os antígenos pequenos e não ligados tem rotação maior do que partículas maiores. O sistema mede a troca de polarização de fluorescência emitida conforme o complexo antígeno-anticorpo se forma.

O kit de reagentes FPIA contém antígenos ligados ao traçador fluoresceína (ag traçador), anticorpos específicos ao antígeno e reagentes pré tratamento.

## **4.2. Seqüência de reações FPIA**

Uma reação típica FPIA ocorre da seguinte maneira: A amostra, pré tratamento e diluentes são lidos como branco esses três componentes são combinados e incubados. Uma leitura inicial é feita pelo sistema óptico FPIA como um branco para o ensaio.

A ligação de competição ocorre: Anticorpo, traçador, diluente e amostra são adicionados a mistura de reação e incubados, o antígeno da amostra compete como antígeno traçador pelos sítios de ligação dos anticorpos, se uma amostra contém uma alta concentração de antígenos, este se liga ao anticorpo deixando o antígeno traçador livre, se uma amostra contém baixa ou nenhuma concentração de antígeno, então pouco ou nenhuma molécula de antígeno da amostra se liga ao anticorpo, deixando os anticorpos livres para o antígeno traçador se ligar.

A troca de fluorescência polarizada emitida indica concentrações de antígenos: O sistema óptico FPIA detecta e mede a troca de fluorescência polarizada emitida, que é inversamente proporcional a concentração de antígeno no soro, se uma amostra contém uma alta concentração de antígeno, então muitas moléculas de antígeno traçador são deixados livres, quando excitados pela luz polarizada essas pequenas moléculas fluorescentes giram rapidamente emitindo luz em diferentes planos, o resultado é uma diminuição da polarização. Se uma amostra contém uma baixa concentração ou nenhuma concentração de antígeno, então o antígeno traçador se liga aos anticorpos, resultando em poucas moléculas do antígeno traçador livre, essas moléculas grandes (Complexo de antígeno traçador ligados ao anticorpo) giram devagar, a rotação é vagarosa o suficiente para que a luz seja emitida num único plano, o resultado é um aumento na polarização.

## **5. Definições**

A faixa das concentrações que delineiam a resposta máxima define a faixa

terapêutica que, é a relação entre a concentração eficaz mínima (CEM) e a concentração tóxica mínima (CTM).

A menor concentração atingida logo antes da dose seguinte, não deve cair abaixo da concentração eficaz mínima (CEM), e a concentração sanguínea no pico dentro do ciclo da dose não deve ultrapassar a concentração tóxica mínima (CTM).

O estado estacionário é o ponto no qual a concentração do medicamento no organismo encontra-se em equilíbrio com a taxa administrada e a velocidade de eliminação. Concentrações acima da CTM no sangue colocam os pacientes em risco de efeitos tóxicos; concentrações abaixo da CEM expõem o paciente ao risco dos efeitos do distúrbio que se supõe que o medicamento esteja tratando.

As doses devem ser planejadas a fim de atingir concentrações terapêuticas, e estas precisam ser monitoradas, para permitir o ajuste da dose, quando necessário. Quanto menor a diferença entre a CEM e a CTM, menor o índice terapêutico e maior a probabilidade de que seja necessária a monitoração terapêutica.

A excreção de medicamentos ou substâncias químicas do organismo pode ocorrer pela via biliar, intestinal, pulmonar ou renal.

A excreção renal é uma das principais vias de eliminação de medicamentos e de seus metabólitos, sendo a mais importante na monitoração medicamentosa. Portanto, as alterações de função renal podem ter um efeito profundo na depuração e na meia-vida aparente do composto original ou de seus metabólitos ativos. A função renal diminuída provoca concentrações elevadas do medicamento no soro e aumenta a resposta farmacológica.

A função hepática é avaliada, pela dosagem da depuração (clearance) da creatinina, sendo produzida a uma taxa constante pelo organismo e eliminada, pelos rins através mecanismo de filtração glomerular. Há uma forte correlação entre a depuração da creatinina e a depuração corporal total ou a constante de velocidade da eliminação dos medicamentos que dependam principalmente dos rins para sua eliminação.

## 6.Ácido Valpróico

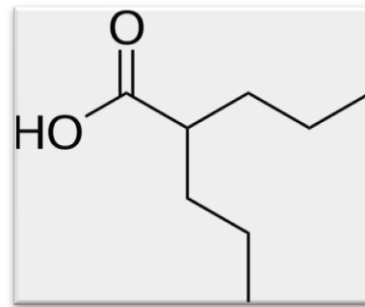
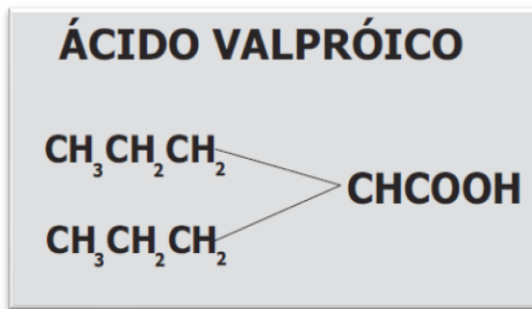


Fig1. Fórmula química do ácido valpróico    Fig2. Estrutura química do Valproato

### 6.1. Definição

O ácido valpróico é usado para o tratamento das crises de ausência. Foi demonstrado ser útil contra as convulsões tônicos-clônicas e parciais, quando usado junto com outros agentes antiepiléticos, tais como fenobarbital e fenitoína. O valproato inibe a enzima gama-aminobutirato (GABA) transaminase, resultando em um aumento da concentração de GABA no cérebro. O GABA é um potente inibidor de descargas pré e pós – sinápticas no sistema nervoso central.

A absorção é rápida e quase que completamente absorvida após a administração oral. Os picos de concentração ocorrem uma a três horas após uma dose oral. A meia vida de uma dose isolada é de dezesseis horas em adultos saudáveis, mas diminui para doze horas no tratamento crônico e pode ser de apenas oito horas em crianças. Nos neonatos e na doença hepática, quando o metabolismo está reduzido, a meia vida é prolongada. O ácido valpróico é muito ligado a proteínas (93%). Em circunstâncias que aumenta a competição pela ligação a proteínas, tais como na uremia ou cirrose, ou com um tratamento em conjunto com outro medicamento, a porcentagem de ácido valpróico livre aumenta.

O intervalo terapêutico é de 50 a 100 µg/ml. As concentrações acima de 100µg/ml tem sido associadas a intoxicação hepática e encefalopatia tóxica aguda. Foi observado que a glicina se acumula nos pacientes em tratamento com o ácido valpróico.

A depuração é rápida, portanto, a dose tem de ser adequada para dar uma concentração no plasma acima de 50 µg/ml, mas devem ser evitadas as

concentrações acima de 100 µg/ml. A amostra ideal para monitorar a concentração no sangue é a colhida logo antes de ser dada a dose seguinte, geralmente no início da manhã, para confirmar que uma dose adequada tenha sido prescrita para a hora de deitar. A dosagem é, em particular, problemática para as crianças pequenas, que podem dormir por mais de uma meia vida completa do medicamento.

O ácido valpróico modula a ação de vários outros medicamentos antiepilépticos. Ele inibe a depuração não-renal do fenobarbital, o que resulta em níveis elevados deste último. O valproato compete com a fenitoína pelos locais de ligação das proteínas. A concentração de fenitoína livre permanece aproximadamente a mesma, mas sua concentração total no plasma diminui. Como a concentração de fenitoína livre permanece inalterada, o efeito farmacológico é mantido. Outros medicamentos antiepilépticos comuns que induzem as enzimas oxidativas hepáticas resultam numa depuração diminuída do ácido valpróico, esta taxa aumentada de depuração requer uma dose maior, para manter níveis terapêuticos eficazes.

## **6.2. Método**

Através do imunoenensaio de fluorescência polarizada, que envolve anticorpos e antígenos, um radical fluoresceína é ligado ao antígeno, que é a droga a ser monitorizada no soro e se nós temos anticorpos contra o antígeno, nós temos um complexo Ag-Ac e radical fluorescente.

Como este complexo é muito grande, o movimento de rotação dele é muito baixo, conduzindo para uma alta polarização. Se nós adicionarmos este complexo em um soro contendo a droga em investigação, alguns dos radicais fluorescentes ligados é liberado. Quanto mais droga se apresenta na amostra, mais drogas ligadas a radicais fluorescentes se soltam.

Assim, a droga ligada a fluoresceína fica livre e seu movimento de rotação é maior, diminuindo a polarização, a comparação dos valores do soro humano com valores de curvas padrão, mostram a concentração deste na amostra.

## **6.3. Aplicação e interpretação clínica**

O ensaio do ácido valpróico é um sistema reagente para a determinação quantitativa de ácido valpróico, uma droga anticonvulsivante, em soro ou

plasma. As determinações obtidas são usadas no monitoramento dos níveis de ácido valpróico, para assegurar terapia adequada, medir o grau de toxicidade e nefrotoxicidade.

O teste utiliza a tecnologia de imunoenensaio por fluorescência polarizada (FPIA). O ácido valpróico é uma droga anticonvulsivante de largo espectro, usada sozinha ou em combinação com outras drogas anticonvulsivantes para o tratamento de ataques epiléticos. Ela tem demonstrado eficiência no gerenciamento de ataques tônicos-clônicos e mioclônicos, bem como epilepsia atípica, ataques simples e parcialmente complexos e mistos do grande mal e do pequeno mal. A capacidade de tratar muitos tipos de ataques com um único anticonvulsivante tem resultado na vasta difusão do uso de ácido valpróico, particularmente em crianças, nas quais os ataques tônicos-clônicos e mioclônicos são mais freqüentes.

O ácido valpróico tem provado eficiência no tratamento de muitos pacientes que são refratários a outros tratamentos anticonvulsivantes. Muitos pacientes que recebem terapia de ácido valpróico não desenvolvem tolerância aos seus efeitos anticonvulsivantes.

## **6.4. Princípios biológicos**

Os reagentes do ácido valpróico e a amostra são pipetados na seguinte seqüência:

No centro de Amostragem a amostra e todos reagentes necessários para um teste são pipetados pela probe de amostragem dentro de vários poços de uma célula de reação. A amostra e o diluente de linha são pipetados dentro de um poço da célula de reação. Uma alíquota da mistura de pré-diluição, da solução pré-tratamento e do diluente de linha são transferidas para a cuveta da célula de reação. A célula de reação é imediatamente transferida para o centro de processamento. Pipetagens adicionais são feitas no centro de processamento com a probe do processamento.

No centro de processamento uma segunda alíquota da mistura de pré-diluição é transferida para a cuveta juntamente com o antisoro de ácido valpróico (Anticorpo) e ácido valpróico marcado com Fluoresceína. O ácido valpróico proveniente da amostra e o ácido valpróico marcado com Fluoresceína competem pelos sítios de ligação na molécula do anticorpo. A intensidade da luz fluorescente polarizada é medida pelo sistema óptico FPIA.

Os reagentes contidos no kit são: 14,5 ml de antisoro de ácido valpróico <25% (policlonal de ovelha), em tampão, com estabilizadores de proteínas. 8,6

ml de solução de Pré-tratamento, surfactante em tampão. 15,1 ml de ácido valpróico marcado com fluoresceína <0,01% em tampão, contendo surfactante. Conservantes: Azida sódica

## 6.5. Calibradores

Os seis frascos de calibradores contém quantidades de ácido valpróico precisamente determinadas, preparadas em soro humano, para resultar as seguintes concentrações;

Frasco	Concentração
A	0,0 µg/ml
B	12,5 µg/ml
C	25,0 µg/ml
D	50,0 µg/ml
E	100,0 µg/ml
F	150,0 µg/ml

Conservante: Azida sódica

Soro humano não reagente para HbsAg, HIV- 1 Ag, anti-HCV e anti-HIV1/HIV2

## 6.6. Controles

Três frascos de 8ml com ácido valpróico preparado em soro humano, para resultar nas seguintes faixas de concentração:

Frasco	Concentração	Intervalo
L	37,5 µg/ml	32,50-42,50 µg/ml

M	75,0 µg/ml	65,00-85,00 µg/ml
H	125,0 µg/ml	106,50-143,50 µg/ml

Conservante: Azida Sódica 0,1%

Soro humano não reagente para HbsAg, HIV- 1 Ag, anti-HCV e anti-HIV1/HIV2

## 6.7. Precauções de manuseio e armazenamento

Não usar embalagem de reagentes após a data de vencimento ou um máximo de 336 horas acumulativas a bordo do aparelho, não misturar reagentes de diferentes embalagens, os reagentes são suscetíveis á formação de bolhas/espuma e requerem inspeção, bem como a remoção das bolhas antes do uso.

Os reagentes são sensíveis a luz, quando a embalagem não estiver no analisador, deve ser armazenada protegida da luz, o kit de reagentes, os calibradores e os controles devem ser armazenados a 2-8°C, a embalagem de reagentes, o calibrador e os controles devem ser usados imediatamente após retirados do refrigerador. Os calibradores e os controles devem ser recolocados ao armazenamento de 2-8°C imediatamente após o uso, não congelar os reagentes.

O kit pode permanecer a bordo do sistema por um máximo de 336 horas acumulativas, por exemplo, 42 turnos de 8 horas, após 336 horas, a embalagem de reagentes deve ser descartada. A solução para limpeza da probe e a solução de diluente de linha devem ser armazenados de 15-30°C.

Para a coleta e preparação da amostra para análise podem ser usados soro (incluindo soro coletado em tubos separadores) ou plasma (coletado em heparina, citrato, EDTA ou tubos de coleta com oxalato). Deve-se seguir as instruções de processamento do fabricante para tubos de coleta de soro ou de plasma.

Amostras contendo partículas em suspensão ou glóbulos vermelhos podem fornecer resultados inconsistentes e devem ser centrifugadas antes da análise (recomenda-se 8.000-10.000 RCF x 10 minutos)

Assegurar-se que houve completa formação de coágulo antes da



centrifugação. Algumas amostras, especialmente aquelas provenientes de pacientes que receberam terapia anticoagulante ou trombolítica, podem apresentar um tempo de coagulação alto. Se uma amostra de soro for centrifugada antes da completa coagulação, a fibrina pode causar resultados errôneos. As amostras podem ser armazenadas por até 24 horas a 2-8°C antes de serem testadas.

Amostras a serem transportadas devem ser embaladas e rotuladas de acordo com a legislação federal e internacional sobre transporte de amostras clínicas e agentes etiológicos, para minimizar os efeitos de evaporação da amostra, todas as amostras (de pacientes, controles e calibradores) devem ser testados dentro de 3 horas após serem colocadas a bordo do sistema, deve-se inspecionar as amostras para detectar a presença de bolhas. Remover as bolhas antes da análise.

## **6.8. Volume da amostra**

O volume da amostra necessário para executar um único ensaio de ácido valpróico não diluído varia de acordo com os diferentes recipientes de amostras usados. Para cálices de amostra, um teste "ROUTINE" necessita de 150 µL e um teste "STAT" necessita de 94 µL, para todos os testes adicionais, executados a partir do mesmo recipiente da amostra, será necessário um volume adicional de 44 µL. O volume mínimo do cálice de amostra para ambos os testes será calculado pelo sistema, ele será exibido na tela no momento em que os testes forem solicitados.

Se o ensaio for configurado para auto reteste/auto diluição, o volume adicional de amostra necessário para o reteste não aparecerá na tela de solicitação na hora em que os testes forem solicitados, por tanto o volume total deve incluir um volume adicional de 44 µL de amostra.

Para requerimentos de volume de amostra em tubos primários ou de alíquotas, bem como para os requerimentos de volume de calibrador e controle, para múltiplos lotes de reagentes consultar manual, para obter os requisitos de volume recomendados para os calibradores e controles, segurar os frascos verticalmente e dispensar quatro gotas de cada dentro do respectivo cálice de amostra.

## **6.9. Controle de qualidade**

Para executar uma calibração padrão, testar os padrões calibradores A,B,C,D,E e F em duplicata. Uma única amostra de todos os níveis de controles deve ser testada como um meio de avaliar a calibração do ensaio. Uma vez aceita e armazenada a calibração, todas as amostras posteriores podem ser testadas sem outra calibração exceto: Nova embalagem de reagentes com novo nº de lote, valores de controle estejam fora do intervalo especificado.

O sistema verifica se os resultados de uma calibração do ensaio atendem as especificações assinaladas aos parâmetros de validade selecionados. Quando a calibração não atende a uma especificação, ocorre uma mensagem de erro.

Os requerimentos de controle recomendados é uma única amostra de pelo menos dois controles de níveis diferentes, testados uma vez a cada 24 horas, a cada dia de uso. Os controles devem ser colocados em qualquer posição do carrossel de amostras. Para realizar o máximo de estabilidade do reagente a bordo, o uso mais freqüente dos controles pode ser necessário para o desempenho do controle do reagente dentro do mesmo lote. Assegurar-se de que os valores dos controles estejam dentro das faixas de concentração especificados nas instruções de uso.

O software calcula uma equação de melhor curva que é usada para gerar uma curva de calibração. Essa curva é armazenada na memória e as concentrações da droga nos controles e nas amostras desconhecidas são calculadas a partir dessa curva, usando valores de polarização gerados.

## **6.10. Limitações e valores esperados**

Como todas as determinações de analíticos, o valor de ácido valpróico deve ser usado em conjunto com as informações disponíveis da avaliação clínica, e outros procedimentos diagnósticos.

No protocolo de diluição manual as amostras de pacientes com concentrações de ácido valpróico, reportadas como superiores a 600,00 µg/mL por um protocolo de diluição automática, devem ser diluídas usando uma diluição manual de 1:10. Adicionar uma parte da amostra do paciente a nove partes do calibrador A. Repetir o teste usando esta amostra diluída manualmente. A concentração reportada pelo sistema deve ser multiplicada pelo fator de diluição manual para obter a concentração final da amostra.

Concentração final da amostra = concentração reportada X fator de diluição manual

Fator de diluição manual = (Vol. De amostra + Vol. Do reagente de diluição) / Vol. Da amostra

Não existe relação precisa entre os níveis de ácido Valpróico no soro e o controle de ataques, embora muitos pacientes necessitem pelo menos um nível sérico de 50ug/mL para terapia eficaz. Tem sido sugerida uma faixa terapêutica de 50 a 100 ug/mL para ac. Valpróico. Devido as grandes diferenças individuais nas necessidades de dosagem, para atingir terapia eficaz, a determinação das concentrações de ac. valpróico no soro é necessária para dirigir a eficácia da terapia.

### **6.11. Precisão, sensibilidade e especificidade**

Usando o soro humano com 37,5, 75,0 e 125,0 µg/mL de ácido valpróico adicionado os resultados desses estudos apresentaram CV's tipicamente menores que 5%.

A sensibilidade do ensaio foi calculada como sendo 0,70 µg/mL. Essa sensibilidade é definida como a mais baixa concentração mensurável que pode ser distinta de zero com 95% de confiança.

Quanto a Especificidade a reação cruzada foi testada para 3-ceto ácido valpróico, o maior metabolito do ácido valpróico. A concentração do metabolito que corresponde a altos níveis plasmáticos em pacientes epiléticos (16 µm/mL), o 3-ceto ácido valpróico mostrou-se efetivo em menos de 10% em ambas concentrações finais de ácido valpróico, tanto baixa (50 µm/mL) como alta (100 µg/mL). O percentual de reação cruzada foi determinada como a diferença da concentração entre amostras contendo droga original e a adicionada e entre amostras contendo apenas a droga original, dividido pela concentração da droga, multiplicado por 100.

Metabolitos menores do ácido valpróico (3-hidroxi ácido valpróico, 4-hidroxi ácido valpróico, 4-en- ácido valpróico, 2 propil glutarato, 5 hidroxi ácido valpróico, testados em concentrações que correspondem a altos níveis plasmáticos em pacientes epiléticos, mostram concentração de ácido valpróico abaixo da sensibilidade do ensaio.

### **6.12. Interferência**

Os componentes listados na tabela abaixo, adicionados ao soro humano,

resultam em uma % erro na detecção da droga adicionada.

Componente	Concentração testada	Resultados
Bilirrubina	20 µg/dL	<15% de erro
Hemoglobina	1,0 g/dL	<10% de erro
Triglicerídeos	1100 µg/dL	<10% de erro
Proteína total	2,0 – 10,0 g/dL	<10% de erro

Devido a estrutura do ácido valpróico (uma longa cadeia de ácidos graxos) e a alta sensibilidade do ensaio, algumas formas de plásticos, vernizes, fumaças coloridas e ácidos graxos podem aderir a cuvetas e interferir com os reagentes, apresentando resultados questionáveis. Para evitar interferências, não armazenar as cuvetas onde possa ocorrer contato com esses materiais ou fumaça dos mesmos.

## 7.Fenobarbital

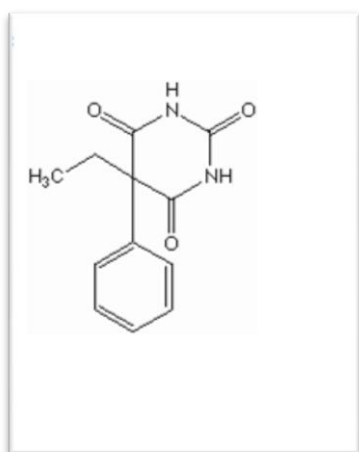


Fig3. Estrutura química do Fenobarbital

### 7.1. Definição

O fenobarbital é usado no tratamento de todas as convulsões, exceto em crises de ausência, sendo útil no caso de convulsões tônico-clônicas, motoras focais, do lobo temporal e febris. Também reduz a transmissão sináptica, resultando em diminuição da excitabilidade de todas as células nervosas, resultando um aumento do limiar de convulsão e a inibição da difusão de descargas a partir dos focos epilépticos.

A absorção do fenobarbital por via oral é lenta, mas completa. O momento em que é atingido o pico de concentração no plasma é variável, indo de 4 a 10 horas após a dose. 40% a 60% do fenobarbital são ligados a proteínas do

plasma. A meia vida de eliminação é de 70 a 100 horas e depende da idade.

Como o metabolismo hepático é uma das principais vias de eliminação, a redução de função do fígado resulta em prolongamento da meia-vida.

A concentração eficaz ótima do fenobarbital é entre 15 e 40 µg/ml. O efeito colateral é a sedação, embora se desenvolva tolerância a este efeito no tratamento crônico.

Quando as funções renal e hepática mostram-se diminuídas, há uma depuração diminuída da droga. A eliminação de fenobarbital poderá estar diminuída na presença de ácido valpróico e salicilato, se ocorrer uma redução do pH da urina. Durante a administração crônica de valproato ou salicilato, a concentração de fenobarbital pode aumentar 10% a 20%, e um ajuste da dose pode ser necessário. O fenobarbital induz as enzimas oxidativas de função mista, resultando em um metabolismo aumentado de outros xenobióticos após aproximadamente uma a duas semanas de tratamento.

Devido a longa meia-vida de eliminação, sua concentração no sangue não se altera rapidamente. Portanto, uma amostra de soro, colhida no final do intervalo entre as doses, é representativa do efeito global. Os resultados das amostras colhidas duas a quatro horas após a dose podem levar a uma interpretação errônea, porque podem ser consideradas como concentração de pico, quando em verdade não são.

## **7.2. Método**

Através do imunoensaio de fluorescência polarizada, que envolve anticorpos e antígenos, um radical fluoresceína é ligado ao antígeno, que é a droga a ser monitorizada no soro e se nos temos anticorpos contra o antígeno, nos temos um complexo Ag-Ac e radical fluorescente.

Como este complexo é muito grande, o movimento de rotação dele é muito baixo, conduzindo para uma alta polarização. Se nos adicionarmos este complexo em um soro contendo a droga em investigação, alguns dos radicais fluorescentes ligados é liberado. Quanto mais droga se apresenta na amostra, mais drogas ligadas a radicais fluorescentes se soltam.

Assim, a droga ligada a fluoresceína fica livre e seu movimento de rotação é maior, diminuindo a polarização, a comparação dos valores do soro humano com valores de curvas padrão, mostram a concentração deste na amostra.

## **7.3. Aplicação e interpretação clínica**

O ensaio do Fenobarbital é um sistema reagente para a determinação quantitativa do Fenobarbital, uma droga anticonvulsivante e sedativa -hipnótica, em soro ou plasma. As determinações obtidas são usadas no diagnóstico e tratamento de dose excessiva de Fenobarbital e na monitorização dos níveis de Fenobarbital para assegurar terapia adequada.

O teste utiliza a tecnologia de imunoensaio por fluorescência polarizada (FPIA). O Fenobarbital foi introduzido em 1912 para o tratamento da epilepsia, particularmente para controlar ataques motores ou sensoriais focais e ataques de grande mal. O fenobarbital está ligado tanto a proteínas do plasma como as do tecido.

A vigilância das concentrações de fenobarbital do soro tem demonstrado melhorar a terapia do paciente, fornecendo aos médicos uma ferramenta para o ajuste da dosagem. Além disso, por causa do estreito índice terapêutico e da vasta variabilidade inter-individual na taxa de metabolismo e depuração do fenobarbital, é essencial a determinação dos níveis de fenobarbital no sangue de pacientes que recebem terapia.

## **7.4. Princípios biológicos**

Os reagentes AxSYM Fenobarbital e a amostra são pipetados na seguinte seqüência:

No centro de Amostragem a amostra e todos reagentes necessários para um teste são pipetados pela probe de amostragem dentro de vários poços de uma célula de reação. A amostra e o diluente de linha são pipetados dentro de um poço da célula de reação. Uma alíquota da mistura de pré-diluição, da solução pré-tratamento e do diluente de linha são transferidas para a cuveta da célula de reação. A célula de reação é imediatamente transferida para o centro de processamento. Pipetagens adicionais são feitas no centro de processamento com a probe do processamento.

No Centro de processamento uma segunda alíquota da mistura de pré-diluição é transferida para a cuveta juntamente com o antisoro de Fenobarbital (Anticorpo) e Fenobarbital marcado com Fluoresceína. O Fenobarbital proveniente da amostra e o Fenobarbital marcado com Fluoresceína competem pelos sítios de ligação na molécula do anticorpo. A intensidade da luz fluorescente polarizada é medida pelo sistema óptico FPIA.

Os reagentes contidos no kit são: 14,5 ml de antisoro de Fenobarbital < 25% (policlonal de ovelha), em tampão, com estabilizadores de proteínas. 8,6 ml de solução de Pré-tratamento, surfactante em tampão. 15,1 ml de Fenobarbital marcado com fluoresceína <0,01% em tampão, contendo

surfactante. Conservantes: Azida sódica

## 7.5. Calibradores

Os seis frascos de calibradores contém quantidades de Fenobarbital precisamente determinadas, preparadas em soro humano, para resultar as seguintes concentrações;

Frasco	Concentração
A	0,0 µg/ml
B	5,0 µg/ml
C	10,0 µg/ml
D	20,0 µg/ml
E	40,0 µg/ml
F	80,0 µg/ml

Conservante: Azida sódica

Soro humano não reagente para HbsAg, HIV- 1 Ag, anti-HCV e anti-HIV1/HIV2

## 7.6. Controles

Três frascos de 8ml com Fenobarbital preparado em soro humano, para resultar nas seguintes faixas de concentração:

Frasco	Concentração	Intervalo
L	15,0 µg/ml	11,55 – 18,45 µg/ml
M	30,0 µg/ml	23,10- 36,90 µg/ml
H	50,0 µg/ml	38,50 – 61,50 µg/ml

Conservante: Azida Sódica 0,1%

Soro humano não reagente para HbsAg, HIV- 1 Ag, anti-HCV e anti-

## **7.7. Precauções de manuseio e armazenamento**

Não usar embalagem de reagentes após a data de vencimento ou um Máximo de 336 horas acumulativas a bordo do aparelho, não misturar reagentes de diferentes embalagens, os reagentes são suscetíveis á formação de bolhas/espuma e requerem inspeção, bem como a remoção das bolhas antes do uso.

Os reagentes são sensíveis a luz, quando a embalagem não estiver no analisador, deve ser armazenada protegida da luz, o kit de reagentes, os calibradores e os controles devem ser armazenados a 2-8°C, a embalagem de reagentes, o calibrador e os controles devem ser usados imediatamente após retirados do refrigerador. Os calibradores e os controles devem ser recolocados ao armazenamento de 2-8°C imediatamente após o uso, não congelar os reagentes.

O kit pode permanecer a bordo do sistema por um Máximo de 336 horas acumulativas, por exemplo, 42 turnos de 8 horas. Após 336 horas, a embalagem de reagentes deve ser descartada. A solução para limpeza da probe e a solução de diluente de linha devem ser armazenados de 15-30°C.

Para a coleta e preparação da amostra para análise podem ser usados soro (incluindo soro coletado em tubos separadores) ou plasma (coletado em heparina, citrato, EDTA ou tubos de coleta com oxalato), seguir as instruções de processamento do fabricante para tubos de coleta de soro ou de plasma.

Amostras contendo partículas em suspensão ou glóbulos vermelhos podem fornecer resultados inconsistentes e devem ser centrifugadas antes da análise (recomenda-se 8.000-10.000 RCF x 10 minutos).

Assegurar-se que houve completa formação de coágulo antes da centrifugação. Algumas amostras, especialmente aquelas provenientes de pacientes que receberam terapia anticoagulante ou trombolítica, podem apresentar um tempo de coagulação alto. Se uma amostra de soro for centrifugada antes da completa coagulação, a fibrina pode causar resultados errôneos. As amostras podem ser armazenadas por até 24 horas a 2-8°C antes de serem testadas.

Amostras a serem transportadas devem ser embaladas e rotuladas de acordo com a legislação federal e internacional sobre transporte de amostras clínicas e agentes etiológicos, para minimizar os efeitos de evaporação da amostra, todas as amostras (de pacientes, controles e calibradores) devem ser testados dentro de 3 horas após serem colocadas a bordo do sistema, deve-se



inspecionar as amostras para detectar a presença de bolhas. Remover as bolhas antes da análise.

## **7.8. Volume da amostra**

O volume da amostra necessário para executar um único ensaio de Fenobarbital não diluído varia de acordo com os diferentes recipientes de amostras usados. Para cálices de amostra, um teste ROUTINE necessita de 150 µL e um teste STAT necessita de 94 µg/mL, para todos os testes adicionais, executados a partir do mesmo recipiente da amostra, será necessário um volume adicional de 44 µL. O volume mínimo do cálice de amostra para ambos os testes será calculado pelo sistema, ele será exibido na tela no momento em que os testes forem solicitados.

Se o ensaio for configurado para auto reteste/auto diluição, o volume adicional de amostra necessário para o reteste não aparecerá na tela de solicitação na hora em que os testes forem solicitados, por tanto o volume total deve incluir um volume adicional de 44 µL de amostra.

Para requerimentos de volume de amostra em tubos Primários ou de alíquotas, bem como para os requerimentos de volume de calibrador e controle, para múltiplos lotes de reagentes consultar manual, para obter os requisitos de volume recomendados para os calibradores e controles, segurar os frascos verticalmente e dispensar 4 gotas de cada dentro do respectivo cálice de amostra.

## **7.9. Controle de qualidade**

Para executar uma calibração padrão, testar os padrões calibradores A,B,C,D,E e F em duplicata. Uma única amostra de todos os níveis de controles deve ser testada como um meio de avaliar a calibração do ensaio. Uma vez aceita e armazenada a calibração, todas as amostras posteriores podem ser testadas sem outra calibração exceto: Nova embalagem de reagentes com novo n° de lote, valores de controle estejam fora do intervalo especificado.

O sistema verifica se os resultados de uma calibração do ensaio atendem as especificações assinaladas aos parâmetros de validade selecionados. Quando a calibração não atende a uma especificação, ocorre uma mensagem de erro.

Os requerimentos de controle recomendados é uma única amostra de pelo menos dois controles de níveis diferentes, testados 1 vez a cada 24 horas, a

cada dia de uso. Os controles devem ser colocados em qualquer posição do carrossel de amostras. Para realizar o Máximo de estabilidade do reagente a bordo, o uso mais freqüente dos controles pode ser necessário para o desempenho do controle do reagente dentro do mesmo lote. Assegurar-se de que os valores dos controles estejam dentro das faixas de concentração especificados nas instruções de uso.

O software calcula uma equação de melhor curva que é usada para gerar uma curva de calibração. Essa curva é armazenada na memória e as concentrações da droga nos controles e nas amostras desconhecidas são calculadas a partir dessa curva, usando valores de polarização gerados.

## **7.10. Limitações e valores esperados**

Como todas as determinações de analíticos, o valor de Fenobarbital deve ser usado em conjunto com as informações disponíveis da avaliação clínica, e outros procedimentos diagnósticos.

No protocolo de diluição manual as amostras de pacientes com concentrações de Fenobarbital, reportadas como superiores a 320,00 µg/mL por um protocolo de diluição automática, devem ser diluídas usando uma diluição manual de 1:10. Adicionar uma parte da amostra do paciente a nove partes do calibrador A, repetir o teste usando esta amostra diluída manualmente. A concentração reportada pelo sistema deve ser multiplicada pelo fator de diluição manual para obter a concentração final da amostra.

Concentração final da amostra = concentração reportada X fator de diluição manual

Fator de diluição manual = (Vol. De amostra + Vol. Do reagente de diluição) / Vol. Da amostra

Foram demonstradas correlações fortes entre os níveis de Fenobarbital no soro e o efeito terapêutico e a toxicidade. As observações clínicas indicam que a toxicidade do Fenobarbital aumenta em pacientes com doença renal. A toxicidade do Fenobarbital afeta primariamente o sistema nervoso central. Níveis tóxicos podem levar a nistagmo, vertigem e ataxia. Um pequeno número de pacientes desenvolve hipersensibilidade ao fármaco. Alguns pacientes sob tratamento crônico desenvolvem macrocitose e anemia megaloblástica, bem como osteomalacia. A maioria dos pacientes recebera controle Máximo dos ataques quando os níveis de fenobarbital no soro estiverem na faixa de 15 a 40 µg/ml.

## 7.11. Precisão, sensibilidade e especificidade

Um painel controle de três membros, usando um único lote de reagentes e uma calibração única, em duplicatas e dois momentos separados do dia por 20 dias. Os dados não excederam 7% dos CV's.

A sensibilidade do ensaio foi calculada como sendo 1,10 µg/mL. Essa sensibilidade é definida como a mais baixa concentração mensurável que pode ser distinta de zero com 95% de confiança.

A reação cruzada foi testada para p-hidroxi fenobarbital, um metabólito maior do Fenobarbital. A reatividade cruzada foi determinada como a diferença da concentração entre amostras contendo Fenobarbital e p-hidroxifenobarbital versus amostras contendo somente Fenobarbital. A uma concentração de metabólito de 22 µg/mL e concentrações de Fenobarbital de 15 a 40 µg/mL, o percentual de reatividade cruzada, ou mudança na concentração de Fenobarbital foi 20% (3,0 µg/mL) e 12% (4,8 µg/mL), respectivamente.

Amobarbital, butobarbital, pentobarbital e secobarbital, enquanto estruturalmente similares ao fenobarbital, produzem mudanças na concentração de fenobarbital menores que a sensibilidade do ensaio em níveis extremamente altos dos reativos cruzados.

## 7.12. Interferência

Os componentes listados na tabela abaixo, adicionados ao soro humano, resultam em uma % erro na detecção da droga adicionada.

Componente	Concentração testada	Resultados
Bilirrubina	15 µg/dL	<10% de erro
Hemoglobina	1,0 g/dL	<10% de erro
Triglicerídeos	2500 µg/dL	<10% de erro
Proteína total	3,0 – 10,0 g/dL	<10% de erro

## 8.Fenitoína

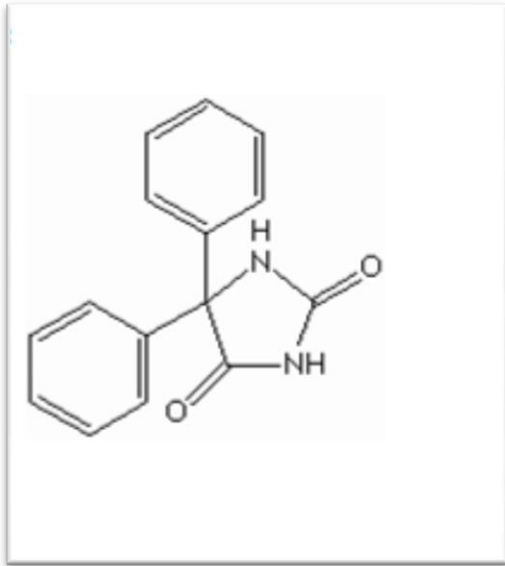


Fig4. Estrutura química da Fenitoína

## 8.1. Definição

A fenitoína, mais comumente disponível como Dilantin ou Epelin, é usada no tratamento das convulsões tônico-clônicas, parciais elementares ou parciais complexas, e do estado epilético. O medicamento não é eficaz nas crises de ausência. Seu efeito fisiológico é a redução da transmissão sináptica, auxiliando no controle da excitabilidade anormal dos neurônios.

A fenitoína não é prontamente solúvel em água, sua absorção é lenta. A baixa biodisponibilidade tem sido atribuída a variações na preparação do medicamento. O medicamento é muito ligado a proteínas (90% a 95%). O efeito farmacológico é diretamente proporcional à quantidade presente no estado livre (não-ligado). Apenas a fenitoína livre tem condições de atravessar as membranas biológicas e interagir nos locais biologicamente importantes de ligação. O grau de ligação às proteínas pode ser reduzido pela presença de outros medicamentos, bem como por anemia e hipoalbuminemia. Nestas condições, é observado um efeito aumentado no mesmo nível da concentração total do medicamento no plasma, em pacientes normais.

O intervalo terapêutico ótimo da concentração, quando administrada para o controle de convulsões sem efeitos colaterais, é de 10 a 20 µg/ml. As concentrações de fenitoína livre de 1 a 2 µg/ml são as ótimas. As concentrações totais acima de 20 µg/ml geralmente não melhoram o controle das convulsões e são, com frequência, associadas ao nistagmo e à ataxia. Foi demonstrado que as concentrações totais no plasma acima de 35 µg/ml realmente precipitam a atividade convulsiva. Um efeito colateral da fenitoína é o desenvolvimento da hiperplasia gengival.

A fenitoína é metabolizada pelas enzimas microssômicas hepáticas de hidroxilação. Seu metabolismo hepático pode ser saturado dentro do intervalo terapêutico. Uma vez saturado o metabolismo, pequenos incrementos de dose resultam em grandes alterações da concentração no sangue. Devido a este fenômeno de saturação, a cinética de primeiro grau não se aplica à fenitoína em concentrações no sangue acima de 5 µg/ml.

O horário de colheita da amostra é determinado pela lógica da monitoração. Se um paciente apresentar qualquer sintoma de intoxicação, o interesse será no pico de concentração no sangue. Esta amostra é colhida 4 a 5 horas após a dose, embora o nível de pico possa ser retardado em até oito horas, se o medicamento for dado junto com substâncias que aumentem a acidez do estômago. Se a principal questão presente for o tratamento adequado, então o mínimo de concentração será mais útil, e a amostra será colhida logo antes de ser dada a dose seguinte.

Numerosas interações medicamentosas resultam em alteração da disposição da fenitoína. O álcool, barbituratos e carbamazepina induzem às enzimas oxidativas; esta indução resulta em um aumento do seu metabolismo, concentração reduzida de fenitoína livre e total no soro, bem como efeito farmacológico reduzido. Medicamentos, como cloranfenicol, dissulfiram, isoniazida e dicumarol, competem com o metabolismo da fenitoína, resultando em um aumento da sua concentração total e livre, bem como acentuação do efeito farmacológico. O salicilato, ácido valpróico, fenilbutazona e sulfonilurías competem com a fenitoína pelos locais de ligação das proteínas. O resultado final é uma concentração total diminuída no soro, enquanto sua concentração livre e os efeitos farmacológicos permanecem aproximadamente os mesmos. O interesse da monitorização da fenitoína livre é em sua resposta a tais estados alterados de disposição.

## **8.2. Método**

Através do imunoensaio de fluorescência polarizada, que envolve anticorpos e antígenos, um radical fluoresceína é ligado ao antígeno, que é a droga a ser monitorizada no soro e se nos temos anticorpos contra o antígeno, nos temos um complexo Ag-Ac e radical fluorescente.

Como este complexo é muito grande, o movimento de rotação dele é muito baixo, conduzindo para uma alta polarização. Se nos adicionarmos este complexo em um soro contendo a droga em investigação, alguns dos radicais fluorescentes ligados é liberado. Quanto mais droga se apresenta na amostra, mais drogas ligadas a radicais fluorescentes se soltam.

Assim, a droga ligada a fluoresceína fica livre e seu movimento de rotação é maior, diminuindo a polarização, a comparação dos valores do soro humano com valores de curvas padrão, mostram a concentração deste na amostra.

### **8.3. Aplicação e interpretação clínica**

O ensaio da Fenitoína é um sistema reagente para a determinação quantitativa Fenitoína, uma droga anticonvulsivante, em soro ou plasma. As determinações obtidas são usadas no monitoramento dos níveis de Fenitoína, para assegurar terapia adequada.

O teste utiliza a tecnologia de imunoensaio por fluorescência polarizada (FPIA). O ensaio Fenitoína é um dos anticonvulsivantes mais freqüentemente prescritos é ocasionalmente utilizado como um antiarrítmico do miocárdio. No tratamento de epilepsia, a fenitoína é indicada nos casos de grande mal (principalmente motores), nas convulsões corticais focais e epilepsia do lóbulo temporal.

A principal via de eliminação da Fenitoína (cerca de 90%) é por meio da excreção do glicuronídeo do para-hidroxifenilfenil-hidantoína (HPPH) na urina. É hidroxilada no fígado e eliminada. A conversão metabólica em HPPH é um processo saturável e, em muitos casos, pequenos aumentos na dose podem provocar um aumento significativo nos níveis plasmáticos de fenitoína. Devido a sua estreita margem terapêutica e a grande variabilidade interindividual na taxa de metabolismo e depuração da fenitoína, a determinação dos níveis de fenitoína no sangue é fundamental para pacientes submetidos a esta terapia.

### **8.4. Princípios biológicos**

Os reagentes do kit de Fenitoína e a amostra são pipetados na seguinte seqüência:

No centro de amostragem a amostra e todos reagentes necessários para um teste são pipetados pela probe de amostragem dentro de vários poços de uma célula de reação. A amostra e o diluente de linha são pipetados dentro de um poço da célula de reação. Uma alíquota da mistura de pré-diluição, da solução pré-tratamento e do diluente de linha são transferidas para a cuveta da célula de reação. A célula de reação é imediatamente transferida para o centro de processamento, pipetagens adicionais são feitas no centro de processamento com a probe do processamento.

No Centro de processamento uma segunda alíquota da mistura de pré-diluição é transferida para a cuveta juntamente com o antisoro de Fenitoína

(Anticorpo) e Fenitoína marcado com Fluoresceína. A Fenitoína proveniente da amostra e a Fenitoína marcada com Fluoresceína competem pelos sítios de ligação na molécula do anticorpo. A intensidade da luz fluorescente polarizada é medida pelo sistema óptico FPIA.

Os reagentes contidos no kit são: 14,5 ml de antisoro de Fenitoína < 25% (policlonal de ovelha), em tampão, com estabilizadores de proteínas. 8,6 ml de solução de Pré-tratamento, surfactante em tampão. 15,1 ml de Fenitoína marcada com fluoresceína <0,01% em tampão, contendo surfactante. Conservantes: Azida sódica

## 8.5. Calibradores

Os seis frascos de calibradores contém quantidades de Fenitoína precisamente determinadas, preparadas em soro humano, para resultar as seguintes concentrações;

Frasco	Concentração
A	0,0 µg/ml
B	2,5 µg/ml
C	5,0 µg/ml
D	10,0 µg/ml
E	20,0 µg/ml
F	40,0 µg/ml

Conservante: Azida sódica

Soro humano não reagente para HbsAg, HIV- 1 Ag, anti-HCV e anti-HIV1/HIV2

## 8.6. Controles

Três frascos de 8ml com Fenitoína preparado em soro humano, para resultar nas seguintes faixas de concentração:

Frasco	Concentração	Intervalo
L	7,5 µg/ml	6,75 – 8,25 µg/ml
M	15,0 µg/ml	13,50 – 16,50 µg/ml
H	30,0 µg/ml	27,00 – 33,00 µg/ml

Conservante: Azida Sódica 0,1%

Soro humano não reagente para HbsAg, HIV- 1 Ag, anti-HCV e anti-HIV1/HIV2

## 8.7. Precauções de manuseio e armazenamento

Não usar embalagem de reagentes após a data de vencimento ou um Máximo de 336 horas acumulativas a bordo do aparelho, não misturar reagentes de diferentes embalagens, os reagentes são suscetíveis à formação de bolhas/espuma e requerem inspeção, bem como a remoção das bolhas antes do uso.

Os reagentes são sensíveis a luz, quando a embalagem não estiver no analisador, deve ser armazenada protegida da luz, o kit de reagentes, os calibradores e os controles devem ser armazenados a 2-8°C, a embalagem de reagentes, o calibrador e os controles devem ser usados imediatamente após retirados do refrigerador. Os calibradores e os controles devem ser recolocados ao armazenamento de 2-8°C imediatamente após o uso, não congelar os reagentes.

O kit pode permanecer a bordo do sistema por um Máximo de 336 horas acumulativas, por exemplo, 42 turnos de 8 horas, após 336 horas, a embalagem de reagentes deve ser descartada. A solução para limpeza da probe e a solução de diluente de linha devem ser armazenados de 15-30°C.

Para a coleta e preparação da amostra para análise podem ser usados soro (incluindo soro coletado em tubos separadores) ou plasma (coletado em heparina, citrato, EDTA ou tubos de coleta com oxalato), seguir as instruções de processamento do fabricante para tubos de coleta de soro ou de plasma.

Amostras contendo partículas em suspensão ou glóbulos vermelhos podem fornecer resultados inconsistentes e devem ser centrifugadas antes da análise (recomenda-se 8.000-10.000 RCF x 10 minutos).



Assegurar-se que houve completa formação de coágulo antes da centrifugação. Algumas amostras, especialmente aquelas provenientes de pacientes que receberam terapia anticoagulante ou trombolítica, podem apresentar um tempo de coagulação alto. Se uma amostra de soro for centrifugada antes da completa coagulação, a fibrina pode causar resultados errôneos. As amostras podem ser armazenadas por até 24 horas a 2-8°C antes de serem testadas.

Amostras a serem transportadas devem ser embaladas e rotuladas de acordo com a legislação federal e internacional sobre transporte de amostras clínicas e agentes etiológicos, para minimizar os efeitos de evaporação da amostra, todas as amostras (de pacientes, controles e calibradores) devem ser testados dentro de 3 horas após serem colocadas a bordo do sistema, deve-se inspecionar as amostras para detectar a presença de bolhas. Remover as bolhas antes da análise.

## **8.8. Volume da amostra**

O volume da amostra necessário para executar um único ensaio de Fenitoína não diluído varia de acordo com os diferentes recipientes de amostras usados. Para cálices de amostra, um teste ROUTINE necessita de 180 µL e um teste STAT necessita de 130 µL para todos os testes adicionais, executados a partir do mesmo recipiente da amostra, será necessário um volume adicional de 44 µL. O volume mínimo do cálice de amostra para ambos os testes será calculado pelo sistema, ele será exibido na tela no momento em que os testes forem solicitados.

Se o ensaio for configurado para auto reteste/auto diluição, o volume adicional de amostra necessário para o reteste não aparecerá na tela de solicitação na hora em que os testes forem solicitados, por tanto o volume total deve incluir um volume adicional de 44 µL de amostra.

Para requerimentos de volume de amostra em tubos Primários ou de alíquotas, bem como para os requerimentos de volume de calibrador e controle, para múltiplos lotes de reagentes consultar manual, para obter os requisitos de volume recomendados para os calibradores e controles, segurar os frascos verticalmente e dispensar 4 gotas de cada dentro do respectivo cálice de amostra.

## **8.9. Controle de qualidade**

Para executar uma calibração padrão, testar os padrões calibradores

A,B,C,D,E e F em duplicata. Uma única amostra de todos os níveis de controles deve ser testada como um meio de avaliar a calibração do ensaio. Uma vez aceita e armazenada a calibração, todas as amostras posteriores podem ser testadas sem outra calibração exceto: Nova embalagem de reagentes com novo nº de lote, valores de controle estejam fora do intervalo especificado.

O sistema verifica se os resultados de uma calibração do ensaio atendem as especificações assinaladas aos parâmetros de validade selecionados. Quando a calibração não atende a uma especificação, ocorre uma mensagem de erro.

Os requerimentos de controle recomendados é uma única amostra de pelo menos dois controles de níveis diferentes, testados 1 vez a cada 24 horas, a cada dia de uso. Os controles devem ser colocados em qualquer posição do carrossel de amostras. Para realizar o Máximo de estabilidade do reagente a bordo, o uso mais freqüente dos controles pode ser necessário para o desempenho do controle do reagente dentro do mesmo lote. Assegurar-se de que os valores dos controles estejam dentro das faixas de concentração especificados nas instruções de uso.

O software calcula uma equação de melhor curva que é usada para gerar uma curva de calibração. Essa curva é armazenada na memória e as concentrações da droga nos controles e nas amostras desconhecidas são calculadas a partir dessa curva, usando valores de polarização gerados.

## **8.10. Limitações e valores esperados**

As amostras urêmicas podem apresentar uma tendência positiva com o ensaio fenitoína.

As amostras de pacientes recebendo fosfenitoína devem ser coletadas pelo menos 2 horas após a administração intravenosa e 4 horas após a administração intramuscular, de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações de fenitoína determinadas antes da conversão completa da fosfenitoína não irão refletir as concentrações de fenitoína mais recentes.

Como todas as determinações de analíticos, o valor de Fenitoína deve ser usado em conjunto com as informações disponíveis da avaliação clínica, e outros procedimentos diagnósticos.

No protocolo de diluição manual as amostras de pacientes com concentrações de Fenitoína, reportadas como superiores a 160,00 µg/mL por um protocolo de diluição automática, devem ser diluídas usando uma diluição manual de 1:10. Adicionar uma parte da amostra do paciente a nove partes do

calibrador A. Repetir o teste usando esta amostra diluída manualmente. A concentração reportada pelo sistema deve ser multiplicada pelo fator de diluição manual para obter a concentração final da amostra.

Concentração final da amostra = concentração reportada X fator de diluição manual

Fator de diluição manual = (Vol. De amostra + Vol. Do reagente de diluição) / Vol. Da amostra

Fortes correlações foram apresentadas entre os níveis séricos e tanto com o efeito terapêutico e a toxicidade. Observações clínicas indicam que toxicidade da fenitoína é aumentada em pacientes com doença renal. A toxicidade da fenitoína afeta principalmente o sistema nervoso central. Os níveis tóxicos podem provocar nistagmo, vertigens, ataxia, psicose e até convulsões. O tratamento crônico provoca hiperplasia das gengivas, anemia e osteomalácia. A frequência e a gravidade dos efeitos tóxicos dependentes da dose aumenta quando o nível sérico sobe acima de 20 µg/mL. A maioria dos pacientes recebera Máximo controle das convulsões quando os níveis séricos de fenitoína estiverem no intervalo de 10 a 20 µg/mL.

## **8.11. Precisão, sensibilidade e especificidade**

Usando o soro humano com 7,5, 15,0 e 30,0 µg/mL de Fenitoína adicionado os resultados desses estudos apresentaram CV's tipicamente menores que 5%.

A sensibilidade do ensaio foi calculada como sendo 0,50 µg/mL. Essa sensibilidade é definida como a mais baixa concentração mensurável que pode ser distinta de zero com 95% de confiança.

Enquanto a especificidade da reação cruzada foi testada para compostos cuja estrutura química ou uso simultâneo poderiam provocar possíveis interferências com o ensaio Fenitoína. A reatividade cruzada foi testada na presença de Fenitoína em relação aos seus principais metabólitos: 5-(4-hidroxifenil)-5-fenilidantoína (p-HPPH) e p-HPPH glicuronídeo. O p-HPPH (5 µg/mL) apresentou uma alteração inferior a 3 µg/mL na concentração do fármaco quando testada nos extremos baixos e alto do intervalo terapêutico da Fenitoína (10 a 20 µg/mL).

A mefenitoína e o seu metabólito principal, 5-etil-5-fenil-hidantoína, testados em concentrações que correspondem a níveis elevados no plasma em pacientes epiléticos, apresentaram concentrações de fenitoína inferiores a sensibilidade do ensaio. A oxaprozina apresentou uma reação cruzada inferior a 1%, quando testada com o ensaio fenitoína.

A fosfenitoína, um éster de fosfato da Fenitoína anticonvulsivante, apresenta reatividade cruzada com os ensaios Fenitoína devido a semelhança com nas suas estruturas. No entanto, não será registrada reatividade cruzada com os ensaios Fenitoína se as amostras de pacientes forem coletadas pelo menos 2 horas após a administração intramuscular.

## 8.12. Interferência

Os componentes listados na tabela abaixo, adicionados ao soro humano, resultam em uma % erro na detecção da droga adicionada.

Componente	Concentração testada	Resultados
Bilirrubina	15 µg/dL	<5% de erro
Hemoglobina	1,0 g/dL	<5% de erro
Triglicerídeos	900 µg/dL	<5% de erro
Proteína total	10,0 g/dL	<10% de erro

## 9. Carbamazepina

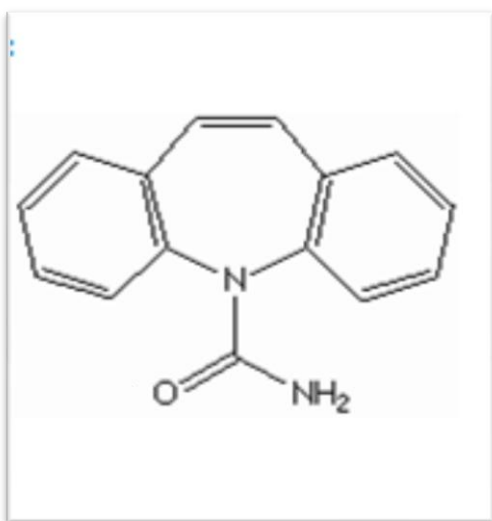


Fig5. Estrutura química da Carbamazepina

### 9.1. Definição

A carbamazepina é utilizada no tratamento das convulsões tônico-clônicas, parciais e parciais complexas. É também usada para o tratamento da dor decorrente da nevralgia do trigêmeo. As ações anticolinérgica, relaxante muscular, antiarrítmica, antidiurética e inibidora da transmissão neuro muscular podem ser explicadas pelo bloqueio da recaptação dos neurotransmissores.

Após a administração oral, a carbamazepina é rapidamente absorvida, mas

com ampla variação individual. Ela é, em grande parte, ligada a proteínas (80%). A meia-vida de eliminação, no início do tratamento, é de aproximadamente um dia. No tratamento crônico, as enzimas responsáveis pelo seu metabolismo são induzidas, e a meia vida de eliminação é reduzida para 15 a 20 horas. Como o metabolismo hepático é o principal meio pelo qual são reduzidos os níveis no plasma, qualquer redução da função hepática resulta em acúmulo deste medicamento.

O intervalo terapêutico de concentração, para efeito farmacológico ótimo da carbamazepina, é de 4 a 12 µg/ml. A intoxicação decorrente da ingestão excessiva ocorre em concentrações no plasma acima de 15 µg/ml, sendo caracterizada por sintomas de visão turva, parestesia, nistagmo, ataxia, sonolência e diplopia. Os efeitos colaterais não relacionados com a concentração no plasma incluem o desenvolvimento de uma erupção de urticária, que geralmente desaparece com a suspensão do medicamento, e depressão hematológica (leucopenia, trombocitopenia e anemia aplástica).

O metabólito ativo de carbamazepina é o 10,11-epóxido, que se acumula, podendo contribuir para os sintomas de intoxicação. Como a carbamazepina é metabolizada pelo sistema enzimático hepático, os medicamentos que induzem a este sistema (fenitoína, fenobarbital) aumentam a taxa de depuração da carbamazepina.

Devido a meia-vida relativamente longa da carbamazepina, a amostra que gera informação mais útil é a que representa a concentração no mínimo, apesar de, no caso de suspeita de intoxicação branda, o valor de concentração plasmática no pico correlacionar-se mais diretamente com a intoxicação. A amostra no pico deve ser colhida 2 a 4 horas após ser dada a dose oral.

## **9.2. Método**

Através do imunoensaio de fluorescência polarizada, que envolve anticorpos e antígenos, um radical fluoresceína é ligado ao antígeno, que é a droga a ser monitorizada no soro e se nos temos anticorpos contra o antígeno, nos temos um complexo Ag-Ac e radical fluorescente.

Como este complexo é muito grande, o movimento de rotação dele é muito baixo, conduzindo para uma alta polarização. Se nos adicionarmos este complexo em um soro contendo a droga em investigação, alguns dos radicais fluorescentes ligados é liberado. Quanto mais droga se apresenta na amostra, mais drogas ligadas a radicais fluorescentes se soltam.

Assim, a droga ligada a fluoresceína fica livre e seu movimento de rotação é maior, diminuindo a polarização, a comparação dos valores do soro humano

com valores de curvas padrão, mostram a concentração deste na amostra.

### **9.3. Aplicação e interpretação clínica**

O ensaio da Carbamazepina é um sistema reagente para a determinação quantitativa da Carbamazepina, uma droga anticonvulsivante, em soro ou plasma. As determinações obtidas são usadas na monitorização dos níveis de Carbamazepina para assegurar terapia adequada.

O teste utiliza a tecnologia de imunoensaio por fluorescência polarizada (FPIA). A Carbamazepina é utilizada no tratamento de convulsões tanto generalizadas como parciais, devido ao rápido controle das descargas elétricas cerebrais excessivas, bem como a baixa incidência de toxicidade aguda e crônica.

A Carbamazepina é um derivado da iminoestilbina e está, portanto, estruturalmente relacionada aos antidepressivos tricíclicos. Contudo, as concentrações encontradas no soro com Carbamazepina são aproximadamente duas vezes superiores aquelas encontradas clinicamente com antidepressivos tricíclicos.

Cerca de 75% da Carbamazepina no soro está ligada a proteínas. A Carbamazepina é metabolizada em grande parte pelo sistema oxidase de função hepática mista, resultando primariamente no 10,11-epóxido, o qual é muito estável, farmacologicamente ativo, e encontrado no plasma e nos tecidos. O 10,11-epóxido é então metabolizado mais uma vez para 10,11-dióxido e eliminado na urina sob esta forma e também sob a forma de conjugados de ácido glicurônico.

### **9.4. Princípios biológicos**

Os reagentes do kit da Carbamazepina e a amostra são pipetados na seguinte seqüência:

No centro de Amostragem a amostra e todos reagentes necessários para um teste são pipetados pela probe de amostragem dentro de vários poços de uma célula de reação. A amostra e o diluente de linha são pipetados dentro de um poço da célula de reação. Uma alíquota da mistura de pré-diluição, da solução pré-tratamento e do diluente de linha são transferidas para a cuveta da célula de reação. A célula de reação é imediatamente transferida para o centro de processamento. Pipetagens adicionais são feitas no centro de processamento com a probe do processamento.

No Centro de processamento uma segunda alíquota da mistura de pré-diluição é transferida para a cuveta juntamente com o antisoro de Carbamazepina (Anticorpo) e Carbamazepina marcada com Fluoresceína. A Carbamazepina proveniente da amostra e a Carbamazepina marcada com Fluoresceína competem pelos sítios de ligação na molécula do anticorpo. A intensidade da luz fluorescente polarizada é medida pelo sistema óptico FPIA.

Os reagentes contidos no kit são: 15 ml de antisoro de Carbamazepina < 10% (policlonal de ovelha), em tampão, com estabilizadores de proteínas. 8,6 ml de solução de Pré-tratamento, surfactante em tampão. 15,1 ml de Carbamazepina marcada com fluoresceína <0,01% em tampão, contendo surfactante. Conservantes: Azida sódica

## 9.5. Calibradores

Os seis frascos de calibradores contem quantidades de Carbamazepina precisamente determinadas, preparadas em soro humano, para resultar as seguintes concentrações;

Frasco	Concentração
A	0,0 µg/ml
B	2,0 µg/ml
C	4,0 µg/ml
D	8,0 µg/ml
E	12,0 µg/ml
F	20,0 µg/ml

Conservante: Azida sódica

Soro humano não reagente para HbsAg, HIV- 1 Ag, anti-HCV e anti-HIV1/HIV2

## 9.6. Controles

Três frascos de 8ml com Carbamazepina preparado em soro humano, para resultar nas seguintes faixas de concentração:

Frasco	Concentração	Intervalo
L	3,0 µg/ml	2,55 – 3,45 µg/ml
M	6,0 µg/ml	5,10- 6,90 µg/ml
H	16,0 µg/ml	13,90 – 18,10 µg/ml

Conservante: Azida Sódica 0,1%

Soro humano não reagente para HbsAg, HIV- 1 Ag, anti-HCV e anti-HIV1/HIV2

## 9.7. Precauções de manuseio e armazenamento

Não usar embalagem de reagentes após a data de vencimento ou um Máximo de 336 horas acumulativas a bordo do aparelho, não misturar reagentes de diferentes embalagens, os reagentes são suscetíveis á formação de bolhas/espuma e requerem inspeção, bem como a remoção das bolhas antes do uso.

Os reagentes são sensíveis a luz, quando a embalagem não estiver no analisador, deve ser armazenada protegida da luz, o kit de reagentes, os calibradores e os controles devem ser armazenados a 2-8°C, a embalagem de reagentes, o calibrador e os controles devem ser usados imediatamente após retirados do refrigerador. Os calibradores e os controles devem ser recolocados ao armazenamento de 2-8°C imediatamente após o uso, não congelar os reagentes.

O kit pode permanecer a bordo do sistema por um Máximo de 336 horas acumulativas, por exemplo, 42 turnos de 8 horas, após 336 horas, a embalagem de reagentes deve ser descartada. A solução para limpeza da probe e a solução de diluente de linha devem ser armazenados de 15-30°C.

Para a coleta e preparação da amostra para análise podem ser usados soro (incluindo soro coletado em tubos separadores) ou plasma (coletado em heparina, citrato, EDTA ou tubos de coleta com oxalato), seguir as instruções de processamento do fabricante para tubos de coleta de soro ou de plasma.

Amostras contendo partículas em suspensão ou glóbulos vermelhos podem fornecer resultados inconsistentes e devem ser centrifugadas antes da análise (recomenda-se 8.000-10.000 RCF x 10 minutos)

Assegurar-se que houve completa formação de coágulo antes da centrifugação. Algumas amostras, especialmente aquelas provenientes de



pacientes que receberam terapia anticoagulante ou trombolítica, podem apresentar um tempo de coagulação alto. Se uma amostra de soro for centrifugada antes da completa coagulação, a fibrina pode causar resultados errôneos. As amostras podem ser armazenadas por até 24 horas a 2-8°C antes de serem testadas.

Amostras a serem transportadas devem ser embaladas e rotuladas de acordo com a legislação federal e internacional sobre transporte de amostras clínicas e agentes etiológicos, para minimizar os efeitos de evaporação da amostra, todas as amostras (de pacientes, controles e calibradores) devem ser testados dentro de 3 horas após serem colocadas a bordo do sistema, deve-se inspecionar as amostras para detectar a presença de bolhas. Remover as bolhas antes da análise.

## **9.8. Volume da amostra**

O volume da amostra necessário para executar um único ensaio de Carbamazepina não diluído varia de acordo com os diferentes recipientes de amostras usados. Para cálices de amostra, um teste ROUTINE necessita de 150 µL e um teste STAT necessita de 94 µL. Para todos os testes adicionais, executados a partir do mesmo recipiente da amostra, será necessário um volume adicional de 44 µL. O volume mínimo do cálice de amostra para ambos os testes será calculado pelo sistema, ele será exibido na tela no momento em que os testes forem solicitados.

Se o ensaio for configurado para auto reteste/auto diluição, o volume adicional de amostra necessário para o reteste não aparecerá na tela de solicitação na hora em que os testes forem solicitados, por tanto o volume total deve incluir um volume adicional de 44 µL de amostra.

Para requerimentos de volume de amostra em tubos Primários ou de alíquotas, bem como para os requerimentos de volume de calibrador e controle, para múltiplos lotes de reagentes consultar manual, para obter os requisitos de volume recomendados para os calibradores e controles, segurar os frascos verticalmente e dispensar 4 gotas de cada dentro do respectivo cálice de amostra.

## **9.9. Controle de qualidade**

Para executar uma calibração padrão, testar os padrões calibradores A,B,C,D,E e F em duplicata. Uma única amostra de todos os níveis de controles deve ser testada como um meio de avaliar a calibração do ensaio.

Uma vez aceita e armazenada a calibração, todas as amostras posteriores podem ser testadas sem outra calibração exceto: Nova embalagem de reagentes com novo nº de lote, valores de controle estejam fora do intervalo especificado.

O sistema verifica se os resultados de uma calibração do ensaio atendem as especificações assinaladas aos parâmetros de validade selecionados. Quando a calibração não atende a uma especificação, ocorre uma mensagem de erro.

Os requerimentos de controle recomendados é uma única amostra de pelo menos dois controles de níveis diferentes, testados 1 vez a cada 24 horas, a cada dia de uso. Os controles devem ser colocados em qualquer posição do carrossel de amostras. Para realizar o Máximo de estabilidade do reagente a bordo, o uso mais freqüente dos controles pode ser necessário para o desempenho do controle do reagente dentro do mesmo lote. Assegurar-se de que os valores dos controles estejam dentro das faixas de concentração especificados nas instruções de uso.

O software calcula uma equação de melhor curva que é usada para gerar uma curva de calibração. Essa curva é armazenada na memória e as concentrações da droga nos controles e nas amostras desconhecidas são calculadas a partir dessa curva, usando valores de polarização gerados.

## **9.10. Limitações e valores esperados**

Como todas as determinações de analíticos, o valor de Carbamazepina deve ser usado em conjunto com as informações disponíveis da avaliação clínica, e outros procedimentos diagnósticos.

No protocolo de diluição manual as amostras de pacientes com concentrações de Fenobarbital, reportadas como superiores a 80,00 µg/mL por um protocolo de diluição automática, devem ser diluídas usando uma diluição manual de 1:10. Adicionar uma parte da amostra do paciente a nove partes do calibrador A. Repetir o teste usando esta amostra diluída manualmente. A concentração reportada pelo sistema deve ser multiplicada pelo fator de diluição manual para obter a concentração final da amostra.

Concentração final da amostra = concentração reportada X fator de diluição manual

Fator de diluição manual = (Vol. De amostra + Vol. Do reagente de diluição) / Vol. Da amostra

Concentrações no plasma entre 4 e 12 µg/ml de carbamazepina tem sido

associadas a um controle ótimo de ataque convulsivo em adultos. A toxicidade associada á terapia de carbamazepina é, de uma maneira geral, relativamente menor. O problema mais grave está relacionado á capacidade da Carbamazepina de suprimir a função da medula óssea. Esse efeito tóxico grave, que leva potencialmente á anemia aplasia, é raro. Efeitos colaterais mais freqüentemente encontrados como sonolência, distúrbios da visão, náusea e dor de cabeça estão relacionados com a dosagem e não com um risco de vida inerente ao fármaco.

### **9.11. Precisão, sensibilidade e especificidade**

Um painel controle de 3 membros, usando um único lote de reagentes e uma calibração única, em duplicatas e dois momentos separados do dia por 20 dias. Os dados não excederam 7% dos CV's.

A sensibilidade do ensaio foi calculada como sendo 0,50 µg/mL. Essa sensibilidade é definida como a mais baixa concentração mensurável que pode ser distinta de zero com 95% de confiança.

Enquanto a especificidade da reação cruzada foi testada para 10,11-epóxido Carbamazepina, um metabólito maior da Carbamazepina, e Desipramine, um antidepressivo que é estruturalmente semelhante a Carbamazepina . A reatividade cruzada foi determinada como a diferença da concentração entre amostras contendo tanto o fármaco original como o reativo cruzado e amostras contendo o fármaco original. Quando testadas, o extremo inferior e superior do intervalo terapêutico da Carbamazepina, o 10,11-epóxi Carbamazepina apresentou mudanças menores que ou iguais a 2,5 µg/ml na concentração do fármaco, enquanto a desipramina apresentou mudança menor que ou igual a 2,7 µg/ml na concentração do fármaco. Os valores relatados foram determinados com amostras sem fármaco.

### **9.12. Interferência**

Os componentes listados na tabela abaixo, adicionados ao soro humano, resultam em uma % erro na detecção da droga adicionada.

Componente	Concentração testada	Resultados
Bilirrubina	15 µg/dL	<10% de erro
Hemoglobina	1,0 g/dL	<10% de erro
Triglicerídeos	806 µg/dL	<10% de erro
Proteína total	3,0 – 10,0 g/dL	<10% de erro

## 10. Vancomicina

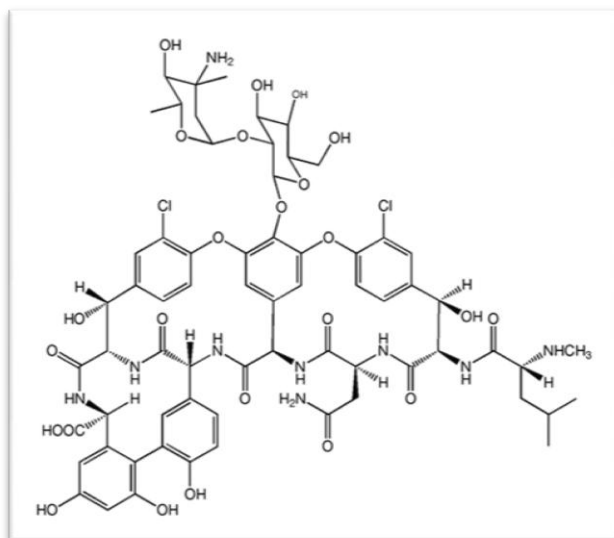


Fig6. Estrutura química da Vancomicina

### 10.1. Definição

A Vancomicina é um antibiótico glicopéptido usado no tratamento das infecções bacterianas. É um péptido tricíclico glicosilado não produzido em ribossoma, mas sim por enzimas específicas. Não é absorvida no intestino e é administrada via intravenosa, exceto no tratamento de infecções do próprio intestino.

Inibe a síntese da parede celular da bactéria. Ela bloqueia a incorporação no peptidoglicano das subunidades N-ácido acetilmurâmico e N-acetilglucosamina, ao se ligar reversivelmente a estas moléculas. Com parede celular deficiente as bactérias não resistem às pressões osmóticas e morrem.

Até recentemente, a vancomicina era dos poucos antibióticos sem casos descritos de resistência. No entanto, em 2002 uma mulher foi internada em Detroit com infecção por *Staphylococcus* resistente à vancomicina. Foi isolada da fermentação por bactérias de um membro da família dos Actinomicetes, ou bactérias semelhantes a fungos, *Amycolatopsis orientalis* (relacionado às *Nocardia*), pela farmacêutica Eli Lilly. A patente expirou em 1980.

Após 24 horas, faz-se análise de vale e de pico de vancomicina, a colheita de sangue para vale será feita imediatamente antes da administração seguinte, a colheita de sangue para pico é feita 2 horas após o final da perfusão.

## **10.2. Método**

Através do imunoensaio de fluorescência polarizada, que envolve anticorpos e antígenos, um radical fluoresceína é ligado ao antígeno, que é a droga a ser monitorizada no soro e se nos temos anticorpos contra o antígeno, nos temos um complexo Ag-Ac e radical fluorescente.

Como este complexo é muito grande, o movimento de rotação dele é muito baixo, conduzindo para uma alta polarização. Se adicionarmos este complexo em um soro contendo a droga em investigação, alguns dos radicais fluorescentes ligados são liberados. Quanto mais droga se apresenta na amostra, mais drogas ligadas a radicais fluorescentes se soltam.

Assim, a droga ligada a fluoresceína fica livre e seu movimento de rotação é maior, diminuindo a polarização, a comparação dos valores do soro humano com valores de curvas padrão, mostram a concentração deste na amostra.

## **10.3. Aplicação e interpretação clínica**

O ensaio da Vancomicina é um sistema reagente para a determinação quantitativa da Vancomicina, um fármaco antibiótico, em soro ou plasma. As determinações obtidas são usadas no diagnóstico no tratamento da superdosagem de Vancomicina no monitoramento de níveis de Vancomicina, para assegurar terapia adequada.

O teste utiliza a tecnologia de imunoensaio por fluorescência polarizada (FPIA). A Vancomicina é um antibiótico glicopeptídico, de ação bactericida face a diversos cocos gram-positivos e alguns cocos gram-negativos. É útil na terapêutica de infecções graves provocadas por estafilococos (incluindo estafilococos resistentes à metaciclina) em pacientes que não possam receber ou que não obtiveram resultados com penicilinas e cefalosporinas. Cloridrato de Vancomicina tem sido utilizada com sucesso no tratamento da endocardite provocada por estafilococos. Devido a sua ototoxicidade, a Vancomicina deve ser administrada com precaução em pacientes com insuficiência renal. A utilização simultânea e seqüencial de outros antibióticos neurotóxicos e/ou nefrotóxicos, principalmente estreptomina, neomicina, canamicina. Gentamicina, cefaloridina, viomicina, polimixina B, colistina, tobramicina e amicacina, requer um monitoramento cuidadoso da vancomicina.

## 10.4. Princípios biológicos

Os reagentes do kit da Vancomicina e a amostra são pipetados na seguinte seqüência:

No centro de Amostragem a amostra e todos reagentes necessários para um teste são pipetados pela probe de amostragem dentro de vários poços de uma célula de reação. A amostra e o diluente de linha são pipetados dentro de um poço da célula de reação. Uma alíquota da mistura de pré-diluição, da solução pré-tratamento e do diluente de linha são transferidas para a cuveta da célula de reação. A célula de reação é imediatamente transferida para o centro de processamento. Pipetagens adicionais são feitas no centro de processamento com a probe do processamento.

No Centro de processamento uma segunda alíquota da mistura de pré-diluição é transferida para a cuveta juntamente com o antisoro de Vancomicina (Anticorpo) e Vancomicina marcada com Fluoresceína. A Vancomicina proveniente da amostra e o Vancomicina marcada com Fluoresceína competem pelos sítios de ligação na molécula do anticorpo. A intensidade da luz fluorescente polarizada é medida pelo sistema óptico FPIA.

Os reagentes contidos no kit são: 15 ml de antisoro de Vancomicina < 25% (policlonal de ovelha), em tampão, com estabilizadores de proteínas. 8,6 ml de solução de Pré-tratamento, surfactante em tampão. 15,1 ml de Vancomicina marcada com fluoresceína <0,01% em tampão, contendo surfactante. Conservantes: Azida sódica

## 10.5. Calibradores

Os seis frascos de calibradores contem quantidades de Vancomicina precisamente determinadas, preparadas em soro humano, para resultar as seguintes concentrações;

Frasco	Concentração
A	0,0 µg/ml
B	5,0 µg/ml
C	10,0 µg/ml
D	25,0 µg/ml
E	100,0 µg/ml

Conservante: Azida sódica

Soro humano não reagente para HbsAg, HIV- 1 Ag, anti-HCV e anti-HIV1/HIV2

## 10.6. Controles

Três frascos de 8 ml com Vancomicina preparado em soro humano, para resultar nas seguintes faixas de concentração:

Frasco	Concentração	Intervalo
L	7,0 µg/ml	5,20 – 8,80 µg/ml
M	35,0 µg/ml	30,00 – 40,00 µg/ml
H	75,0 µg/ml	62,00 – 88,00 µg/ml

Conservante: Azida Sódica 0,1%

Soro humano não reagente para HbsAg, HIV- 1 Ag, anti-HCV e anti-HIV1/HIV2

## 10.7. Precauções de manuseio e armazenamento

Não usar embalagem de reagentes após a data de vencimento ou um Máximo de 336 horas acumulativas a bordo do aparelho, não misturar reagentes de diferentes embalagens, os reagentes são suscetíveis á formação de bolhas/espuma e requerem inspeção, bem como a remoção das bolhas antes do uso.

Os reagentes são sensíveis a luz, quando a embalagem não estiver no analisador, deve ser armazenada protegida da luz, o kit de reagentes, os calibradores e os controles devem ser armazenados a 2-8°C, a embalagem de reagentes, o calibrador e os controles devem ser usados imediatamente após retirados do refrigerador. Os calibradores e os controles devem ser recolocados ao armazenamento de 2-8°C imediatamente após o uso, não congelar os reagentes.

O kit pode permanecer a bordo do sistema por um Máximo de 336 horas acumulativas, por exemplo, 42 turnos de 8 horas, após 336 horas, a embalagem de reagentes deve ser descartada. A solução para limpeza da probe e a solução de diluente de linha devem ser armazenados de 15-30°C.

Para a coleta e preparação da amostra para análise podem ser usados soro

(incluindo soro coletado em tubos separadores) ou plasma (coletado em heparina, citrato, EDTA ou tubos de coleta com oxalato). Seguir as instruções de processamento do fabricante para tubos de coleta de soro ou de plasma.

Amostras contendo partículas em suspensão ou glóbulos vermelhos podem fornecer resultados inconsistentes e devem ser centrifugadas antes da análise (recomenda-se 8.000-10.000 RCF x 10 minutos)

Assegurar-se que houve completa formação de coagulo antes da centrifugação. Algumas amostras, especialmente aquelas provenientes de pacientes que receberam terapia anticoagulante ou trombolítica, podem apresentar um tempo de coagulação alto. Se uma amostra de soro for centrifugada antes da completa coagulação, a fibrina pode causar resultados errôneos. As amostras podem ser armazenadas por até 24 horas a 2-8°C antes de serem testadas.

Amostras a serem transportadas devem ser embaladas e rotuladas de acordo com a legislação federal e internacional sobre transporte de amostras clínicas e agentes etiológicos, para minimizar os efeitos de evaporação da amostra, todas as amostras (de pacientes, controles e calibradores) devem ser testados dentro de 3 horas após serem colocadas a bordo do sistema, deve-se inspecionar as amostras para detectar a presença de bolhas. Remover as bolhas antes da análise.

## **10.8. Volume da amostra**

O volume da amostra necessário para executar um único ensaio de Vancomicina não diluído varia de acordo com os diferentes recipientes de amostras usados. Para cálices de amostra, um teste ROUTINE necessita de 150 µL e um test STAT necessita de 94 µL. Para todos os testes adicionais, executados a partir do mesmo recipiente da amostra, será necessário um volume adicional de 44 µL. O volume mínimo do cálice de amostra para ambos os testes será calculado pelo sistema, ele será exibido na tela no momento em que os testes forem solicitados.

Se o ensaio for configurado para auto reteste/auto diluição, o volume adicional de amostra necessário para o reteste não aparecerá na tela de solicitação na hora em que os testes forem solicitados, por tanto o volume total deve incluir um volume adicional de 44 µL de amostra.

Para requerimentos de volume de amostra em tubos Primários ou de alíquotas, bem como para os requerimentos de volume de calibrador e controle, para múltiplos lotes de reagentes consultar manual, para obter os requisitos de volume recomendados para os calibradores e controles, segurar



os frascos verticalmente e dispensar 4 gotas de cada dentro do respectivo cálice de amostra.

## **10.9. Controle de qualidade**

Para executar uma calibração padrão, testar os padrões calibradores A,B,C,D,E e F em duplicata. Uma única amostra de todos os níveis de controles deve ser testada como um meio de avaliar a calibração do ensaio. Uma vez aceita e armazenada a calibração, todas as amostras posteriores podem ser testadas sem outra calibração exceto: Nova embalagem de reagentes com novo nº de lote, valores de controle estejam fora do intervalo especificado.

O sistema verifica se os resultados de uma calibração do ensaio atendem as especificações assinaladas aos parâmetros de validade selecionados. Quando a calibração não atende a uma especificação, ocorre uma mensagem de erro.

Os requerimentos de controle recomendados é uma única amostra de pelo menos dois controles de níveis diferentes, testados 1 vez a cada 24 horas, a cada dia de uso. Os controles devem ser colocados em qualquer posição do carrossel de amostras. Para realizar o Máximo de estabilidade do reagente a bordo, o uso mais freqüente dos controles pode ser necessário para o desempenho do controle do reagente dentro do mesmo lote. Assegurar-se de que os valores dos controles estejam dentro das faixas de concentração especificados nas instruções de uso.

O software calcula uma equação de melhor curva que é usada para gerar uma curva de calibração. Essa curva é armazenada na memória e as concentrações da droga nos controles e nas amostras desconhecidas são calculadas a partir dessa curva, usando valores de polarização gerados.

## **10.10. Limitações e valores esperados**

Como todas as determinações de analíticos, o valor de Vancomicina deve ser usado em conjunto com as informações disponíveis da avaliação clínica, e outros procedimentos diagnósticos.

No protocolo de diluição manual as amostras de pacientes com concentrações de Fenobarbital, reportadas como superiores a 400,00 µg/mL por um protocolo de diluição automática, devem ser diluídas usando uma diluição manual de 1:10. Adicionar uma parte da amostra do paciente a nove partes do calibrador A. Repetir o teste usando esta amostra diluída

manualmente. A concentração reportada pelo sistema deve ser multiplicada pelo fator de diluição manual para obter a concentração final da amostra.

Concentração final da amostra = concentração reportada X fator de diluição manual

Fator de diluição manual = (Vol. De amostra + Vol. Do reagente de diluição) / Vol. Da amostra.

Fortes correlações apresentadas entre os níveis séricos e tanto com o efeito terapêutico e a toxicidade. Níveis de pico no soro da Vancomicina no intervalo entre 20 a 40 µg/ml e níveis de depressão no sangue de 5 a 10 µg/ml são sugeridos para efetividade terapêutica ótima. Na presença de função renal desequilibrada, níveis desnecessariamente elevados de vancomicina no sangue (aproximadamente 90 µg/ml) podem causar danos no oitavo nervo cranial, causando surdez.

### **10.11. Precisão, sensibilidade e especificidade**

Usando o soro humano com 7,0, 35,0 e 75,0 µg/mL de Vancomicina adicionado os resultados desses estudos apresentaram CV's tipicamente menores que 7%.

A sensibilidade do ensaio foi calculada como sendo 2,00 µg/mL. Essa sensibilidade é definida como a mais baixa concentração mensurável que pode ser distinta de zero com 95% de confiança.

Enquanto a especificidade da reação cruzada foi testada para compostos cuja estrutura química ou uso simultâneo poderiam provocar possíveis interferências com o ensaio Vancomicina.

O teste a reação cruzada mostrou que o produto de degradação cristalina 1 da Vancomicina (CDP-1) em concentrações de 10, 20 e 50 µg/ml, apresenta uma reação cruzada inferior a sensibilidade do ensaio na ausência de Vancomicina. Quando o CDP-1 é testado na presença de Vancomicina, nas mesmas concentrações indicadas (10 a 50 µg/ml), a alteração nos níveis de vancomicina é inferior à sensibilidade do ensaio. O CDP-1 pode acumular-se em pacientes com insuficiência renal.

Os compostos seguintes foram testados na ausência de vancomicina ate os 500 µg/ml apos adicionar uma quantidade conhecida de cada um deles ao soro humano. O metotrexato foi testado ate aos 227 µg/ml. Cada composto atingiu resultados inferiores à sensibilidade do ensaio (2,00 µg/ml).

## 10.12. Interferência

Os componentes listados na tabela abaixo, adicionados ao soro humano, resultam em uma % erro na detecção da droga adicionada.

Componente	Concentração testada	Resultados
Bilirrubina	20 µg/dL	<5% de erro
Hemoglobina	1,0 g/dL	<5% de erro
Triglicerídeos	2300 µg/dL	<10% de erro
Proteína total	3,0 - 10,0 g/dL	<10% de erro

## 11. Conclusão

A análise dos níveis séricos dos medicamentos de uso controlado, visam a adequação da terapia buscando a diminuição dos efeitos colaterais e citotóxicos dos medicamentos.

A utilização dos kits auxilia de modo medir a concentração dos níveis da droga no soro do paciente, e assim analisar se a concentração ultrapassa o nível máximo permitido, ou se não chega ao nível mínimo de concentração, sugerindo assim ao médico um abuso no uso do medicamento ou um não seguimento das orientações médicas.

Sendo assim de grande importância na área clínica, a análise por meio dos profissionais de áreas distintas com o mesmo objetivo, de melhorar a qualidade de vida do paciente.

## 12. Referências Bibliográficas

CORDIOLI, Aristides V., Psicofarmacos: consulta rápida, 2º Ed., Editora Artes Medicas Sul, p.23-53, 2000.

FUCHS, F. D., WANNMACHER, L., Farmacologia clinica - fundamentos da terapêutica racional, 2º Ed., Editora Guanabara Koogan, p. 263-311, 1998.

FUCHS, F. D., WANNMACHER, L., Farmacologia clinica - fundamentos da terapêutica racional, 2º Ed., Editora Guanabara Koogan, p. 332-345, 1998.

Bula do Kit Laboratorial Abbott AxSYM. Responsável Técnico: Tsushima, J. H. Abbott lab, 1998.

KATZUNG, B.G., Farmacologia Básica e Clínica, 6º Ed., Editora Guanabara Koogan, 1995.

Adamczyk, M.; Brate, E. M.; Chiappetta, E. G.; Ginsburg S.; Hoffman, E.; Klein, C.;Peerkowitz, M. M.; Rege, S. D.; Chou, P. P.; Costantino, A. G. Development of a quantitative vancomycin immunoassay for the Abbott AxSYM Analyzer . Therapeutic Drug Monitoring, 1998.

*<http://www.netdrugs.info/dci/fenobar.shtml>*

*<http://www.netdrugs.info/dci/diifen.shtml>*

*<http://www.netdrugs.info/dci/vancom.shtml>*

*<http://www.netdrugs.info/dci/acdval.shtml>*

*<http://www.netdrugs.info/dci/carbam.shtml>*