

 IMMULITE[®]
2000

Phenytoin

DPC[®]

IMMULITE[®] 2000 Phenytoin

English

Intended Use: For *in vitro* diagnostic use with the IMMULITE 2000 Analyzer — for the quantitative measurement of phenytoin in serum or heparinized plasma, as an aid in monitoring drug therapy.

Catalog Number: **L2KPN2** (200 tests), **L2KPN6** (600 tests)

Test Code: **PHN** Color: **Dark Gray**

Summary and Explanation

Phenytoin (5,5-diphenylhydantoin; MW: 252.3 Da) is an antiepileptic drug widely used for treating several types of seizure. It is typically administered orally as phenytoin (Dilantin[®]) itself, or else by intravenous infusion (IV) or intramuscular injection (IM) of the prodrug fosphenytoin (Cerebyx[®]), a relatively water-soluble, phosphate ester of phenytoin. Depending on the route of administration, conversion of fosphenytoin to phenytoin is expected to be essentially complete within 2 to 4 hours.¹⁻⁴

Most of the phenytoin in circulation is tightly bound to plasma proteins, chiefly albumin. Normally, only about 10% circulates in the pharmacologically active free form, though in some conditions, such as renal failure, this fraction may increase to 30% or more.⁵ The amount circulating in free form is expected to be increased in hypoalbuminemia and in conditions where other compounds compete with phenytoin for protein binding sites. Examples include valproic acid and other anticonvulsants which may be administered concurrently with phenytoin; salicylates and nonsteroidal anti-inflammatory drugs such as oxaprozin (Daypro[®]); as well as many other drugs which bind strongly to albumin. Likewise, high free fatty acid levels may displace phenytoin from plasma proteins.

Phenytoin is cleared through the liver, where it is converted primarily to 5-(*p*-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin, which is subsequently glucuronidated and excreted in the urine.^{2,5} Though inactive, these metabolites—HPPH and its

glucuronide HPPG — are structurally similar to phenytoin and may compete with phenytoin for protein binding sites. The clearance rate declines somewhat with age, and is reduced in renal insufficiency. Drugs enhancing or inhibiting the liver's ability to metabolize phenytoin can be expected to affect circulating levels. Moreover, metabolic capacity is limited; hence the relationship between dosage and circulating levels is not uniform: at higher levels, even within the therapeutic range, small increases in administered dose may result in large increases in circulating levels.

Phenytoin is commonly monitored by immunoassay because (total) circulating levels of the drug correlate more strongly with therapeutic effect and toxicity than does the administered dose.⁶ The generally accepted therapeutic range for total circulating phenytoin is 10 to 20 µg/mL (40 to 80 µmol/L), but these limits should be considered as guidelines only.^{1,7-9} (There is no established range for free circulating phenytoin.) Dosage optimization must take into account the patient's clinical response to the drug. Low levels may be associated with inadequate control, as manifested in the frequency and/or severity of the seizures. High levels may be associated with symptoms of neurotoxicity — including involuntary rhythmic eye movements (nystagmus), nausea, vomiting, impaired coordination (ataxia), speech interference (dysarthria), severe lethargy, and so on — or even with a worsening of the seizures.

Principle of the Procedure

IMMULITE 2000 Phenytoin is a solid-phase, competitive chemiluminescent enzyme immunoassay.

Incubation Cycles: 1 × 30 minutes.

Specimen Collection

The patient need not be fasting, and no special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture, avoiding hemolysis, into plain (without anticoagulant) or heparinized tubes and separate the serum or plasma from the cells. Do not use gel barrier tubes.^{1,10-11}

For patients being treated with fosphenytoin (Cerebyx[®]), it is important not to collect samples for phenytoin analysis until at least 2 hours after the completion of intravenous infusion, or 4 hours after intramuscular injection, when conversion of the prodrug to phenytoin can be expected to be essentially complete.¹⁻³

The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Hemolyzed samples may indicate mistreatment of a specimen before receipt by the laboratory; hence the results should be interpreted with caution.

Centrifuging serum samples before a complete clot forms may result in the presence of fibrin. To prevent erroneous results due to the presence of fibrin, ensure that complete clot formation has taken place prior to centrifugation of samples. Some samples, particularly those from patients receiving anticoagulant therapy, may require increased clotting time.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. IMMULITE 2000 Phenytoin has not been tested with all possible variations of tube types. Consult the section on Alternate Sample Types for details on tubes that have been tested.

Volume Required: 10 μ L serum or heparinized plasma.

Storage: 7 days at 2–8°C, or 1 month at –20°C.¹²

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C. Dispose of in accordance with applicable laws.

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a

preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

Chemiluminescent Substrate: Avoid contamination and exposure to direct sunlight. (See insert.)

Water: Use distilled or deionized water.

Materials Supplied

Components are a matched set. Labels on the inside box are needed for the assay.

Phenytoin Bead Pack (L2PN12)

With barcode. 200 beads, coated with polyclonal rabbit anti-phenytoin antibody. Stable at 2–8°C until expiration date.

L2KPN2: 1 pack. **L2KPN6:** 3 packs.

Phenytoin Reagent Wedge (L2PNA2)

With barcode. 21 mL alkaline phosphatase (bovine calf intestine) conjugated to phenytoin in buffer, with preservative, dispensed equally into chambers A and B. Stable at 2–8°C until expiration date.

L2KPN2: 1 wedge. **L2KPN6:** 3 wedges.

Before use, tear off the top of the label at the perforations, without damaging the barcode. Remove the foil seal from the top of wedge; snap the sliding cover down into the ramps on the reagent lid.

Phenytoin Adjustors (LPNL, LPNH)

Two vials (Low and High), 2.0 mL each, of phenytoin in processed human serum, with preservative. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or for 6 months (aliquotted) at –20°C.

L2KPN2: 1 set. **L2KPN6:** 2 sets.

Before making an adjustment, place the appropriate Aliquot Labels (supplied with the kit) on test tubes so that the barcodes can be read by the on-board reader.

Kit Components Supplied Separately

L2SUBM: Chemiluminescent Substrate

L2PWSM: Probe Wash

L2KPM: Probe Cleaning Kit

LRXT: Reaction Tubes (disposable)

SDCM: Bi-level, human serum-based multi-constituent control module

Also Required
Distilled or deionized water; test tubes;
controls.

Assay Procedure

Note that for optimal performance, it is important to perform all routine maintenance procedures as defined in the IMMULITE 2000 Operator's Manual.

See the IMMULITE 2000 Operator's Manual for: preparation, setup, dilutions, adjustment, assay and quality control procedures.

Recommended Adjustment Interval:
2 weeks.

Quality Control Samples: Use controls or serum pools with at least two levels (low and high) of phenytoin.

Therapeutic Range

The commonly accepted therapeutic range for phenytoin is 10 to 20 µg/mL (40 to 80 µmol/L).^{1,7-9} Toxicity has been reported at concentrations greater than 20 µg/mL.

Consider these limits as *guidelines* only.

Limitations

The following should be considered in the interpretation of the phenytoin concentration:

- All concurrent medications taken by the patient
- The time of sampling in relation to the dosing history
- Existing diseases or conditions

Heterophilic antibodies in human serum can react with the immunoglobulins included in the assay components causing interference with *in vitro* immunoassays. [See Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Samples from patients routinely exposed to animals or animal serum products can demonstrate this type of interference potentially causing an anomalous result. These reagents have been formulated to minimize the risk of interference; however, potential interactions between rare sera and test components can occur. For diagnostic purposes, the results obtained from this

assay should always be used in combination with the clinical examination, patient medical history, and other findings.

Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the assay's performance. Results are expressed in µg/mL. (Unless otherwise noted, all were generated on serum samples collected in tubes without gel barriers or clot-promoting additives.)

Conversion Factor:
µg/mL × 3.96 → µmol/L

Calibration Range: 2.5 – 40 µg/mL
(9.9 – 158 µmol/L).

Analytical Sensitivity: 0.5 µg/mL
(2.0 µmol/L).

Precision: Samples were assayed in duplicate over the course of 20 days, two runs per day, for a total of 40 runs and 80 replicates. (See "Precision" table.)

Linearity: Samples were assayed under various dilutions. (See "Linearity" table for representative data.)

Recovery: Samples spiked 1 to 19 with three phenytoin solutions (80, 160 and 320 µg/mL) were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

Specificity: The antibody is highly specific for phenytoin. There is an approximately 12% crossreactivity with the principal metabolite, HPPH, but no significant crossreactivity with the glucuronide ester secreted form, HPPG. (See "Specificity" table.)

Bilirubin: Presence of conjugated and unconjugated bilirubin in concentrations up to 200 mg/L has no effect on results, within the precision of the assay.

Hemolysis: Presence of hemoglobin in concentrations up to 512 mg/dL has no effect on results, within the precision of the assay.

Lipemia: Presence of triglycerides in concentrations up to 3,000 mg/dL has no effect on results, within the precision of the assay.

Alternate Sample Type: Samples (*n* = 20) were collected into plain and heparinized vacutainer tubes. All samples were spiked with phenytoin and assayed by the IMMULITE 2000 Phenytoin procedure.

(Heparin) = 1.02 (Serum) – 0.51 µg/mL
r = 0.988

Means:
8.34 µg/mL (Serum)
7.98 µg/mL (Heparin)

Method Comparison 1: The assay was compared to a commercially available phenytoin assay (Kit A) on 51 samples. (Concentration range: approximately 3.3 to 30 µg/mL. See graph 1.) By linear regression:

(IML 2000) = 0.95 (Kit A) – 0.22 µg/mL
r = 0.982

Means:
10.9 µg/mL (IMMULITE 2000)
11.7 µg/mL (Kit A)

Method Comparison 2: The assay was compared to DPC's IMMULITE Phenytoin on 117 samples. (Concentration range: approximately 2.8 to 40 µg/mL. See graph 2.) By linear regression:

(IML 2000) = 1.03 (IML) + 0.55 µg/mL
r = 0.976

Means:
15.2 µg/mL (IMMULITE 2000)
14.2 µg/mL (IMMULITE)

References

1) Warner A, Privitera M, Bates D. Standards of laboratory practice: antiepileptic drug monitoring. National Academy of Clinical Biochemistry. Clin Chem 1998;44:1085-95. 2) Roberts WL, De BK, Coleman JP, Annesley TM. Falsely increased immunoassay measurements of total and unbound phenytoin in critically ill uremic patients receiving fosphenytoin. Clin Chem 1999;45:829-37. 3) Kugler AR, Annesley TM, Nordblom GD, et al. Cross-reactivity of fosphenytoin in two human plasma phenytoin immunoassays. Clin Chem 1998;44:1474-80. 4) Aweeka FT, Gottwald MD, Gambertoglio JG, et al. Pharmacokinetics of fosphenytoin in patients with hepatic or renal disease. Epilepsia 1999;40:777-82. 5) Rainey PM, Rogers KE, Roberts WL. Metabolite and matrix interference in phenytoin immunoassays. Clin Chem 1996;42:1645-53. 6) Yukawa E. Optimisation of antiepileptic drug therapy. The importance of serum drug concentration monitoring. Clin Pharmacokinet 1996;31:120-30. 7) Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999: 874-5. 8) Hayes G, Kootsikas ME. Reassessing the lower end of the phenytoin therapeutic range: a review of the literature. Ann Pharmacother 1993;27:1389-92. 9) Schumacher GE, Barr JT, Browne TR, Collins JF. Test performance characteristics of the serum phenytoin concentration (SPC): the relationship between SPC and patient response. The

Veterans Administration Epilepsy Cooperative Study Group. Ther Drug Monit 1991;13:318-24. 10) Cai WM, Leader WG, Porter WH, Chandler MH. Influence of serum separator tubes on total and free phenytoin concentrations and dosages. Ther Drug Monit 1993;15:427-30. 11) Mauro LS, Mauro VF. Effect of serum separator tubes on free and total phenytoin and carbamazepine serum concentrations. Ther Drug Monit 1991;13:240-3. 12) Quest Diagnostics. The 1997/1998 Quest Diagnostics Nichols Institute reference manual. San Juan Capistrano: Quest Diagnostics, 1997: 228.

Technical Assistance

In the United States, contact DPC's Technical Services department.
Tel: 800.372.1782 or 973.927.2828
Fax: 973.927.4101. Outside the United States, contact your National Distributor.

The Quality System of Diagnostic Products Corporation is registered to ISO 13485:2003.

Tables and Graphs

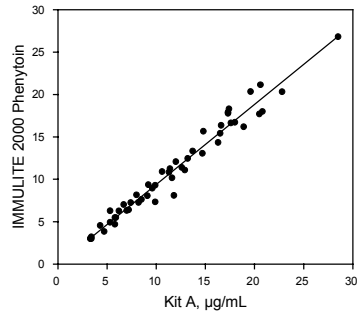
Precision (µg/mL)

	Within-Run ¹			Total ²	
	Mean ³	SD ⁴	CV% ⁵	SD	CV
1	3.5	0.31	8.9%	0.43	12%
2	7.1	0.44	6.2%	0.86	12%
3	8.5	0.71	8.4%	0.80	9.4%
4	18	1.2	6.7%	1.6	8.9%
5	35	1.9	5.6%	3.1	8.9%

Linearity (µg/mL)

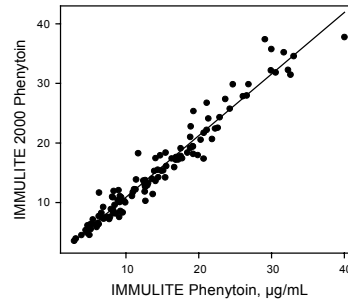
	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	8 in 8	17.9	—	—
	4 in 8	8.7	9.0	97%
	2 in 8	4.9	4.5	109%
	1 in 8	<2.5	2.2	—
2	8 in 8	23.6	—	—
	4 in 8	11.0	11.8	93%
	2 in 8	5.5	5.9	93%
	1 in 8	2.8	3.0	93%
3	8 in 8	27.3	—	—
	4 in 8	13.6	13.7	99%
	2 in 8	7.0	6.8	103%
	1 in 8	3.5	3.4	103%
4	8 in 8	29.8	—	—
	4 in 8	15.9	14.9	107%
	2 in 8	8.3	7.5	111%
	1 in 8	3.5	3.7	95%
5	8 in 8	33.3	—	—
	4 in 8	16.1	16.7	96%
	2 in 8	7.8	8.3	94%
	1 in 8	3.9	4.2	93%

Method Comparison 1



(IML 2000) = 0.95 (Kit A) - 0.22 µg/mL
r = 0.982

Method Comparison 2



(IML 2000) = 1.03 (IML) + 0.55 µg/mL
r = 0.976

Recovery (µg/mL)

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	—	2.7	—	—
	A	6.8	6.6	103%
	B	11.4	10.6	108%
	C	20.2	18.6	109%
2	—	6.2	—	—
	A	9.6	9.9	97%
	B	13.8	13.9	99%
	C	22.7	21.9	104%
3	—	8.2	—	—
	A	11.1	11.8	94%
	B	15.6	15.8	99%
	C	24.3	23.8	102%
4	—	9.2	—	—
	A	12.7	12.7	100%
	B	17.1	16.7	102%
	C	25.8	24.7	104%
5	—	12.5	—	—
	A	14.7	15.9	92%
	B	20.1	19.9	101%
	C	31.3	27.9	112%

Specificity (µg/mL)

Compound ¹	Amount Added ²	Apparent Conc. ³	% Cross-reactivity ⁴
Clonazepam	40	ND	ND
Diazepam	2.5	ND	ND
Ethosuximide	100	ND	ND
Imipramine	1.0	ND	ND
Phenylbutazone	45	ND	ND
Primidone	12	ND	ND
Secobarbital	15	ND	ND
Carbamazepine	20	ND	ND
Phenobarbital	40	ND	ND
Theophylline	20	ND	ND
Valproic acid	100	ND	ND
HPPH	20	2.43	12.2%
HPPG	100	0.21	0.3%

ND: Not detectable.⁵

Deutsch. Precision: ¹Intra-Assay, ²Gesamt, ³Mittelwert, ⁴SD (Standardabweichung), ⁵CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Probe, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E. **Specificity:** ¹Verbindung, ²zugesezte Menge, ³Gemessene Konzentration, ⁴% Kreuzreaktivität, ⁵NN: Nicht nachweisbar. **Method Comparison:** Phenytoin: Phenytoin.

Español. Precision: ¹Intraensayo, ²Total, ³Media, ⁴DS, ⁵CV. **Linearity:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴% O/E, ⁵8 en 8. **Recovery:** ¹Solución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴% O/E. **Specificity:** ¹Compuesto, ²Cantidad añadida, ³Concentración aparente, ⁴% Reacción cruzada, ⁵ND: no detectable. **Method Comparison:** Phenytoin: Fenitoína.

Français. Precision: ¹Intraessai, ²Total, ³Moyenne, ⁴SD, ⁵CV. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴% O/A, ⁵8 dans 8. **Recovery:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴% O/A. **Specificity:** ¹Composé, ²ajouté, ³Concentration apparente, ⁴Réaction croisée%. ⁵ND: non détectable. **Method Comparison:** Phenytoin: Phénytoïne.

Italiano. Precision: ¹Intra-serie, ²Totale, ³Media, ⁴SD (Deviazione Standard), ⁵CV (Coefficiente di Variazione). **Linearity:** ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴% O/A, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴% O/A. **Specificity:** ¹Composto, ²quantità aggiunta, ³Concentrazione apparente, ⁴Percentuale di Crossreattività, ⁵ND: non determinabile. **Method Comparison:** Phenytoin: Fenitoina.

Português. Precision: ¹Entre-ensaios, ²Total, ³Média, ⁴Desvio padrão, ⁵Coefficiente de variação. **Linearity:** ¹Diluição, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴% O/E, ⁵8 em 8. **Recovery:** ¹Solução, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴% O/E. **Specificity:** ¹Composto, ²Quantidade adicionada, ³Apparent Concentration, ⁴Percentagem de reacção cruzada, ⁵ND: não detectável. **Method Comparison:** Phenytoin: Fenitoina.

Deutsch

Phenytoin

Anwendung: Zur *in vitro*-Diagnostik unter Verwendung der IMMULITE 2000 Systeme – zur quantitativen Messung von Phenytoin in Serum oder Heparin-Plasma, als Hilfe für die Überwachung der medikamentösen Therapie.

Artikelnummern:

L2KPN2 (200 Tests), **L2KPN6** (600 Tests)

Testcode: **PHN** Farbe: **dunkelgrau**

Klinische Relevanz

Phenytoin (5,5-Diphenylhydantoin, Molekulargewicht 252,3 Da) ist ein Antiepileptikum, mit dem verschiedene Arten von Anfällen behandelt werden. Verabreicht wird Phenytoin entweder oral (Dilantin®) oder aber mittels intravenöser (i.v.) Infusion oder intramuskulärer (i.m.) Injektion der Prodrug Fosphenytoin (Cerebix®) – ein relativ wasserlöslicher Phosphatester von Phenytoin. Je nach Verabreichungsform kann davon ausgegangen werden, dass die Umwandlung von Fosphenytoin zu Phenytoin innerhalb von 2–4 Stunden im wesentlichen abgeschlossen ist.¹⁻⁴

Der Großteil des im Blutkreislauf befindlichen Phenytoin ist an Plasmaproteine – hauptsächlich Albumin – gebunden. Normalerweise befinden sich lediglich etwa 10% in der pharmakologisch aktiven freien Form im Blutkreislauf, auch wenn diese Fraktion unter bestimmten Begleitumständen wie etwa Nierenversagen bis auf 30% oder darüber ansteigen kann.⁵ Bei Vorliegen einer Hypoalbuminämie und in Situationen, in denen die Bindungsstellen von anderen Verbindungen kompetitiv besetzt werden, ist von erhöhten zirkulierenden Mengen

der freien Form auszugehen. Beispiele hierfür sind gleichzeitig mit dem Phenytoin verabreichte Valproinsäure und andere Antikonvulsiva, Salicylate und nichtsteroidale entzündungshemmende Substanzen wie Oxaprozin (Daypro®) und viele andere Medikamente, die eine große Affinität zu Albumin haben. Ebenso können freie Fettsäuren in großen Mengen zu einer Verdrängung des Phenytoin von den Plasmaproteinen führen.

Phenytoin wird in der Leber abgebaut, primär durch Umwandlung in 5-(*p*-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin, das in der Folge glucuronidiert und im Harn ausgeschieden wird.^{2,5} Diese Metaboliten – HPPH und sein Glucuronid HPPG – sind zwar inaktiv, können aber aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Phenytoin die gleichen Proteinbindungsstellen besetzen. Die Abaurate lässt mit zunehmendem Alter etwas nach und ist bei Nierenversagen reduziert. Medikamente, welche die Metabolisierung des Phenytoin in der Leber verstärken oder herabsetzen, können die Konzentrationen im Blutkreislauf beeinflussen. Da die Stoffwechselleistung überdies begrenzt ist, ist das Verhältnis zwischen Dosierung und Blutkonzentrationen nicht einheitlich. Dies bedeutet, dass selbst bei höheren Konzentrationen, die noch im therapeutischen Bereich liegen, kleine Erhöhungen der verabreichten Dosis große Erhöhungen der Blutkonzentrationen bewirken.

Es ist übliche Praxis, die Phenytoin-Werte mit Immunassays zu überwachen, da die (gesamten) Blutkonzentrationen des Medikaments enger mit der therapeutischen Wirkung und Toxizität zusammenhängen als die verabreichte Dosis.⁶ Der allgemein anerkannte therapeutische Bereich für das gesamte zirkulierende Phenytoin beträgt 10–20 µg/ml (40–80 µmol/l). Diese Grenzen sollten jedoch lediglich als Richtlinien betrachtet werden.^{1,7-9} (Einen etablierten Bereich für freies zirkulierendes Phenytoin gibt es nicht). Bei der Dosisanpassung ist zu berücksichtigen, wie der Patient auf das Medikament anspricht. Niedrige Werte können mit einer ungenügenden Kontrolle der Krankheit verbunden sein, wie sie sich in der Häufigkeit und/oder im Schweregrad der Anfälle äußert. Hohe

Werte können mit neurotoxischen Symptomen – darunter unwillkürliche rhythmische Augenbewegungen (Nystagmus), Übelkeit, Erbrechen, Koordinationsstörungen (Ataxie), Sprachstörungen (Dysarthrie), schwere Lethargie usw. – oder sogar mit noch schlimmeren epileptischen Anfällen verbunden sein.

Methodik

Der Phenytoin IMMULITE 2000 ist ein kompetitiver Festphasen-, Chemilumineszenz-Immunoassay.

Inkubationszyklen: 1 × 30 Minuten.

Probengewinnung

Es ist keine besondere Vorbereitung der Patienten nötig. Die Blutentnahme erfolgt in normale Gefäße (ohne Antigeringungsmittel) oder in Heparin-Röhrchen unter Vermeidung von Hämolyse. Den Entnahmekzeitpunkt notieren und das Serum oder Plasma von den Zellen trennen. Keine Gelbarriere-Röhrchen verwenden.^{1,10-11}

Bei Behandlungen mit Fosphenytoin (Cerebyx®) ist zu beachten, dass die Proben zur Phenytoin-Bestimmung keinesfalls vor Ablauf von 2 Stunden nach (Abschluss) der intravenösen Infusion bzw. 4 Stunden nach der intramuskulären Injektion genommen werden. Erst dann kann davon ausgegangen werden, dass die Umwandlung der Prodrug in Phenytoin im wesentlichen abgeschlossen ist.¹⁻³

Der Einsatz einer Ultrazentrifuge wird zur Klärung von lipämischen Proben empfohlen.

Bei hämolysierten Proben besteht die Möglichkeit einer unsachgemäßen Handhabung vor Eintreffen im Labor, daher sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren

Die Zentrifugation der Serumproben vor dem völligen Abschluss der Gerinnung kann zu Fibringerinnungen führen. Um fehlerhaften Analyseergebnissen infolge von Gerinnungen vorzubeugen, ist sicherzustellen, dass die Gerinnung vor der Zentrifugation der Proben vollständig abgeschlossen ist. Insbesondere Proben von Patienten unter Antikoagulantien-therapie können eine verlängerte Gerinnungszeit aufweisen.

Blutentnahmeröhrchen von verschiedenen Herstellern können differierende Werte verursachen. Dies hängt von den verwendeten Materialien und Additiven (Gel oder physische Trennbarrieren, Gerinnungsaktivatoren und /oder Antikoagulantien) ab. IMMULITE 2000 Phenytoin ist nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden. Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

Erforderliche Menge: 10 µl Serum oder Heparin-Plasma.

Lagerung: 7 Tage bei 2–8°C oder 1 Monat bei –20°C.¹²

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Bei 2–8°C lagern. Unter Einhaltung der geltenden gesetzlichen Vorschriften entsorgen.

Die generell geltenden Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten und alle Komponenten als potenziell infektiös zu behandeln. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wurden auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper untersucht und negativ befundet.

Bestimmten Komponenten wurde Natriumazid (<0,1 g/dl) hinzugefügt. Um die Bildung von explosiven Metallaziden in Blei- und Kupferrohren zu vermeiden, sollten die Reagenzien nur zusammen mit großen Wassermengen in die Kanalisation gespült werden.

Chemilumineszenz–Substratmodul: Kontaminationen sowie direkte Sonnenlichteinwirkungen müssen vermieden werden. (Siehe Packungsbeilage.)

Wasser: Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser benutzen.

Im Lieferumfang enthalten

Die Bestandteile der Testpackung sind aufeinander abgestimmt. Die Barcode-Aufkleber auf der Innenverpackung werden zur Testdurchführung gebraucht.

Phenytoin Kugel-Container (L2PN12)

Der barcodierte Kugel-Container enthält 200 Kugeln, beschichtet mit Phenytoin-Antikörpern (polyklonal, Kaninchen). Bei 2–8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.

L2KPN2: 1 Container

L2KPN6: 3 Container

Phenytoin Reagenzbehälter (L2PNA2)

Mit Barcode. 21 ml mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Phenytoin in Pufferlösung (mit Konservierungsmittel), zu gleichen Mengen in den Kammern A und B. Bei 2–8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.

L2KPN2: 1 Behälter. **L2KPN6:** 3 Behälter.

Vor Gebrauch den Aufkleber an der Perforation abreißen, ohne dabei die Barcodierung zu beschädigen. Die Folie von der Oberseite des Containers entfernen. Den Schiebedeckel nach unten in die Führung des Reagenziendeckels einrasten lassen.

Phenytoin Kalibratoren (LPNL, LPNH)

Jeweils zwei Fläschchen (niedrig und hoch) mit 2 ml Phenytoin in prozessiertem Humanserum (mit Konservierungsmittel). 30 Tage nach dem Öffnen bei 2–8°C haltbar oder 6 Monate bei –20°C (aliquotiert).

L2KPN2: 1 Set.

L2KPN6: 2 Sets.

Vor der Kalibrierung die entsprechenden Aufkleber (dem Kit beiliegend) auf Röhrchen kleben, so daß die Barcodes vom Barcodereader des Systems gelesen werden können.

Separat erhältliche Testsystem-Komponenten

L2SUBM: Chemilumineszenz-Substratmodul

L2PWSM: Waschmodul

L2KPM: Reinigungsmodul

LRXT: (Einmal-) Reaktionsgefäße

SDCM: Multikomponentenkontrollmodul in zwei Konzentrationen.

Ebenfalls benötigt:
Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser;
Röhrchen; Kontrollen

Testdurchführung

Für eine optimale Funktion des Gerätes ist unbedingt zu beachten, dass die Wartungen, wie im IMMULITE 2000-Handbuch beschrieben, regelmäßig durchgeführt werden.

Hinweise zur Vorbereitung, täglichen Inbetriebnahme des Systems, der Kalibrierung sowie Verfahren zur Test- und Qualitätskontrolle entnehmen Sie bitte dem IMMULITE 2000-Handbuch.

Empfohlenes Kalibrationsintervall:
2 Wochen.

Qualitätskontrollseren: Kontrollen oder Seren mit Phenytoin in zumindest zwei Konzentrationen (niedrige und hohe) verwenden.

Therapeutischer Bereich

Der allgemein anerkannte therapeutische Bereich für Phenytoin ist 10–20 µg/ml (40–80 µmol/l).^{1,7,9} Berichte über Toxizität existieren für Konzentrationen jenseits von 20 µg/ml.

Diese Grenzwerte sind lediglich als *Richtlinien* aufzufassen.

Grenzen der Methode

Bei der Interpretation der Phenytoin-Werte sind folgende Aspekte mit in Betracht zu ziehen:

- Alle sonstigen Medikamente, die der Patient erhält.
- Zeitpunkt der Blutentnahme in Relation zum Dosierungsschema
- Bestehende Erkrankungen oder besondere Zustände des Patienten.

Heterophile Antikörper in Humansenen können mit Immunglobulinen aus den Assaykomponenten reagieren und Interferenzerscheinungen innerhalb des in vitro Immunoassays verursachen. (Clin. Chem. 1988;34:27-33) Proben von Patienten, die häufig mit Tier- bzw. Tierserumprodukten zu tun haben, können die erwähnten Interferenzen verursachen und zu anomalen Resultaten führen. Die verwendeten Reagenzien sind so konzipiert, dass das Risiko einer Interferenz mit den zu messenden Proben minimiert ist. Dennoch können potentiell Interaktionen zwischen seltenen Seren und den Testkomponenten auftreten. Zu

diagnostischen Zwecken sollten die mit dem Assay erhaltenen Ergebnisse immer in Kombination mit der klinischen Untersuchung, der Patientenanamnese und anderen Befunden gesehen werden.

Leistungsdaten

Siehe Tabellen und Grafiken mit *repräsentativen* Daten für den Assay. Die Ergebnisse sind als µg/ml ausgedrückt. (Alle Daten wurden – sofern nicht anders angegeben – aus Serumproben in Röhrchen ohne Gelbarrieren oder gerinnungsfördernde Zusätze gewonnen.)

Umrechnungsfaktor:
µg/ml × 3,96 → µmol/l

Meßbereich: 2,5 – 40 µg/ml
(9,9 – 158 µmol/l).

Analytische Sensitivität: 0,5 µg/ml
(2,0 µmol/l).

Präzision: Proben wurden innerhalb von 20 Tagen mit jeweils zwei Testansätzen in Doppelbestimmung gemessen (insgesamt 40 Bestimmungen und 80 Einzelmessungen). (Siehe Tabelle "Precision".)

Linearität: Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Linearität“.)

Wiederfindung: Proben wurden mit drei Phenytoin Lösungen (80, 160 und 320 µg/ml) im Verhältnis von 1:19 versetzt. (Siehe Tabelle "Recovery").

Spezifität: Hochspezifischer Anti-Phenytoin-Antikörper. Es besteht eine Kreuzreaktivität von etwa 12% mit dem Hauptmetaboliten HPPH, aber keine erhebliche Kreuzreaktivität mit dem sezernierten Glucuronidester HPPG. (siehe Tabelle „Spezifität“).

Bilirubin: Konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin hat in Konzentrationen bis zu 200 mg/l keinen Einfluss auf die Messung, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Hämolyse: Hämoglobin hat in Konzentrationen bis zu 512 mg/dl keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Lipämie: Triglyceride hat in Konzentrationen bis zu 3 000 mg/dl keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der

größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Alternative Probenarten: Die Proben ($n = 20$) wurden in unbehandelte und heparinisierte Vacutainer-Röhrchen gefüllt. Alle Proben wurden mit Phenytoin versetzt und dann mit dem Phenytoin - Verfahren für den IMMULITE 2000 getestet.

(Heparin) = 1,02 (Serum) – 0,51 µg/ml
 $r = 0,988$

Mittelwert:
8,34 µg/ml (Serum)
7,98 µg/ml (Heparin)

Methodenvergleich 1: Dieses Testsystem wurde unter Verwendung von 51 Patientenproben mit einem im Handel erhältlichen Phenytoin-Assay (Kit A) verglichen. (Konzentrationsbereich: ca. 3,3 bis 30 µg/ml. Siehe Grafik 1.) Durch lineare Regression:

(IML 2000) = 0,95 (Kit A) – 0,22 µg/ml
 $r = 0,982$

Mittelwert:
10,9 µg/ml (IMMULITE 2000)
11,7 µg/ml (Kit A)

Methodenvergleich 2: Der Assay wurde unter Verwendung von 117 Patientenproben mit DPC's IMMULITE Phenytoin verglichen. Konzentrationsbereich ca. 2,8–40 µg/ml. Siehe Grafik 2.) Durch lineare Regression:

(IML 2000) = 1,03 (IML) + 0,55 µg/ml
 $r = 0,976$

Mittelwert:
15,2 µg/ml (IMMULITE 2000)
14,2 µg/ml (IMMULITE)

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

Das Qualitätssystem der Diagnostic Products Corporation ist nach ISO 13485:2003 registriert.

Español

Fenitoína

Utilidad del análisis: Para el diagnóstico *in vitro* con el Analizador IMMULITE 2000 para la medición cuantitativa de fenitoína en suero o plasma heparinizado, como

una ayuda en el control de la terapia de drogas.

Números de Catálogo:

L2KPN2 (200 tests)

L2KPN6 (600 tests)

Código del Test: **PHN** Color: **Gris oscuro**

Resumen y Explicación del Test

La fenitoína (5,5-difenilhidantoína; PM: 252,3 Da) es una droga antiepiléptica ampliamente utilizada para el tratamiento de varios tipos de epilepsia. Se suele administrar de forma oral como fenitoína (Dilantin[®]), o también como inyección intravenosa (IV) o inyección intramuscular (IM) del precursor fosfenitoína (Cerebyx[®]), un éster fosfato de fenitoína relativamente soluble en agua. Dependiendo de la ruta de administración, se espera que la conversión de fosfenitoína en fenitoína se complete antes de 2 a 4 horas.¹⁻⁴

La mayor parte de la fenitoína en circulación se encuentra unida a proteínas del plasma, principalmente a albúmina. Normalmente, sólo alrededor del 10% circula en la forma libre farmacológicamente activa, aunque en algunas condiciones, tales como la insuficiencia renal, esta fracción puede aumentar hasta el 30% o más.⁵ Se espera que la cantidad de forma libre circulante aumente en casos de hipoalbuminemia y en aquellas condiciones en las que otros compuestos compitan con la fenitoína por los sitios de unión de las proteínas. Algunos ejemplos son el ácido valproico y otros anticonvulsivos, que pueden administrarse de forma concurrente con la fenitoína, los salicilatos y otras drogas antiinflamatorias no esteroideas, como la oxaprozina (Daypro[®]), así como muchas otras drogas que se unen fuertemente a la albúmina. Como es de esperar, niveles muy altos de ácidos grasos pueden desplazar la fenitoína de las proteínas del plasma.

La fenitoína se elimina a través del hígado, donde se convierte principalmente en 5-(*p*-hidroxifenil)-5-fenilhidantoína, que se convierte a continuación en glucurónido y se excreta en la orina.^{2,5} Aunque inactivos, estos metabolitos, HPPH y su glucurónido HPPG, son estructuralmente similares a la fenitoína y pueden competir con ella por los sitios de

unión de las proteínas. La tasa de eliminación declina levemente con la edad, y se reduce con la insuficiencia renal. Es de esperar que las drogas que estimulen o inhiban la capacidad hepática de metabolización de fenitoína afecten a los niveles circulantes. Además, la capacidad metabólica es limitada, de ahí que la relación entre dosis y niveles circulantes no sea uniforme: a niveles más altos, incluso dentro del intervalo terapéutico, pequeños aumentos de la dosis administrada pueden producir grandes aumentos de los niveles circulantes.

La fenitoína suele controlarse por inmunoensayo, porque los niveles circulantes (totales) de la droga se correlacionan más claramente con su efecto terapéutico y toxicidad que la dosis administrada.⁶ El intervalo terapéutico generalmente aceptado para la fenitoína circulante total es de 10 a 20 µg/ml (de 40 a 80 µmol/l), pero estos límites sólo deben considerarse como indicativos.^{1,7-9} (No existe un intervalo establecido de fenitoína circulante libre.) La optimización de la dosificación debe tener en cuenta la respuesta clínica del paciente a la droga. Los niveles bajos pueden asociarse a un control inadecuado, como se manifiesta en la frecuencia y gravedad de los ataques. Los niveles altos pueden asociarse con síntomas de neurotoxicidad, entre los que se incluyen movimientos rítmicos involuntarios del ojo (nistagmus), náuseas, vómitos, dificultades de coordinación (ataxia), interferencias en el habla (disartria), letargo grave, etc., e incluso un agravamiento de los ataques.

Principio del análisis

El IMMULITE 2000 Fenitoína es un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida.

Ciclos de incubación: 1 × 30 minutos.

Recogida de la muestra

El paciente no necesita estar en ayunas, y no son necesarios ningún tipo de preparativos especiales. Recoger la sangre por venopunción, evitando la hemólisis, en tubos sin anticoagulante o con heparina, anotando la hora de

recogida y proceder a la separación del suero de las células. No utilice tubos con gel.^{1,10-11}

Para los pacientes en tratamiento con fosfenitoína (Cerebyx[®]), es importante no recoger muestras para análisis de fenitoína hasta al menos 2 horas después de (el final de) la inyección intravenosa, o bien 4 horas después de la inyección intramuscular, cuando puede esperarse que la conversión del precursor en fenitoína se haya completado.¹⁻³

Se recomienda el uso de una ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas.

Las muestras hemolizadas podrían indicar una mala manipulación de la muestra antes de ser recibida por el laboratorio; en este caso, los resultados deben interpretarse con precaución.

La centrifugación de las muestras de suero antes de que se forme el coágulo puede ocasionar la presencia de fibrina. Para evitar resultados erróneos debidos a la presencia de fibrina, asegurarse que se ha formado el coágulo completamente antes de centrifugar las muestras. Algunas muestras, particularmente aquellas de pacientes sometidos a terapia anticoagulante, pueden requerir mayor tiempo de coagulación.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel o barreras físicas, activadores de la coagulación y/o anticoagulantes. El ensayo Fenitoína IMMULITE 2000 no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos. Para obtener detalles sobre los tipos de tubos que se han analizado, consulte la sección de Tipos de Muestras Alternativos.

Volumen requerido: 10 µl Suero o plasma heparinizado.

Conservación: 7 días a 2–8°C, o 1 mes a –20°C.¹²

Advertencias y Precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Mantener a 2–8°C. Desechar de acuerdo con las normas aplicables.

Siga las precauciones universales y manipule todos los componentes como si

fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Los materiales derivados de sangre humana han sido analizados y son negativos para sífilis; para anticuerpos frente al HIV 1 y 2; para el antígeno de superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

Se ha usado Azida sodica, en concentraciones menores de 0.1 g/dL, como conservante. Para su eliminación, lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitución de residuos de azidas metálicas, potencialmente explosivas, en las cañerías de cobre y plomo.

Substrato quimioluminiscente: Evitar la contaminación y exposición a la luz directa del sol. (Ver el prospecto).

Agua: Usar agua destilada o desionizada.

Materiales Suministrados

Los componentes representan un juego completo. Las etiquetas incluidas en la caja son necesarias para el ensayo.

Cartucho de bolas de Fenitoína (L2PN12)

Con códigos de barras. 200 bolas, recubiertas con anticuerpos policlonales de conejo anti-fenitoína. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad.

L2KPN2: 1 cartucho.

L2KPN6: 3 cartuchos.

Vial de reactivo de Fenitoína (L2PNA2)

Con códigos de barras. 21 ml Fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada con fenitoína, en solución tampón (con conservante), repartido a partes iguales en las cámaras A y B. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad.

L2KPN2: 1 vial. **L2KPN6:** 3 viales.

Antes de usar, cortar la parte superior de la etiqueta en la perforación, sin dañar el código de barras. Quitar el precinto del orificio del vial; encajar la cubierta deslizante en las rampas de la tapa del reactivo.

Ajustadores de Fenitoína (LPNL, LPNH)

Dos viales (bajo y alto) de cada uno con 2 ml de fenitoína en suero humano procesado, con conservante. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrirse, o

hasta 6 meses (alícuotados) a –20°C.

L2KPN2: 1 juego. **L2KPN6:** 2 juegos.

Antes de hacer un ajuste, colocar las etiquetas a las alícuotas apropiadas (suministradas con el kit) sobre tubos de ensayo, de forma tal que los códigos de barras puedan ser leídos por el lector.

Componentes del kit que se suministran por separado

L2SUBM: Substrato quimioluminiscente

L2PWSM: Lavado de sonda

L2KPM: Kit de limpieza de sonda

LRXT: Tubos de reacción (desechables)

SDCM: Un módulo control de suero humano, de dos niveles.

También necesario

Agua destilada o desionizada; tubos de ensayo; controles.

Ensayo

Aviso: para obtener el funcionamiento óptimo, es importante realizar todos los procedimientos del mantenimiento general según lo definido en el manual del operador de IMMULITE 2000.

Consulte el Manual del operador de IMMULITE 2000 para: la preparación, instalación, ajuste, ensayo y procedimientos de control de calidad.

Intervalo de ajuste recomendado:

2 semanas.

Muestras de Control de Calidad: Utilizar controles o pools de sueros con al menos dos niveles diferentes de fenitoína (bajo y alto).

Intervalo terapéutico

El intervalo terapéutico comúnmente aceptado para la fenitoína es de 10 a 20 µg/ml (de 40 a 80 µmol/l).^{1,7-9} Se ha observado toxicidad a concentraciones superiores a 20 µg/ml.

Sólo deberán considerarse como *guía*.

Limitaciones

Debe considerarse lo siguiente en la interpretación de la concentración de fenitoína:

- Todas las medicaciones concurrentes que tome el paciente.

- El momento de recogida de la muestra en relación con el historial de dosificación.
- Las enfermedades y condiciones existentes.

Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas de los componentes del ensayo provocando interferencias con los inmunoanálisis in vitro. [Ver Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Las muestras de los pacientes que frecuentemente están expuestos a animales o a productos séricos animales pueden presentar este tipo de interferencia que potencialmente ocasiona un resultado anómalo. Estos reactivos han sido formulados para minimizar el riesgo de interferencia, no obstante, pueden darse interacciones anómalas entre sueros conflictivos y los componentes del ensayo. Con fines de diagnóstico, los resultados obtenidos con este ensayo siempre deben ser usados en combinación con el examen clínico, la historia médica del paciente y cualquier otro dato clínico relevante.

Características Analíticas

Para ver resultados *representativos* de las cualidades del ensayo ver las tablas y los gráficos. Los resultados se expresan en µg/ml. (A no ser que se indique lo contrario, todos los resultados fueron generados en muestras de suero recogidas en tubos sin geles o activadores de la coagulación).

Factor de Conversión:

µg/ml × 3,96 → µmol/l

Rango de Calibración: 2,5 – 40 µg/ml (9,9 – 158 µmol/l).

Sensibilidad: 0,5 µg/ml (2,0 µmol/l).

Precisión: Las muestras fueron analizadas por duplicado durante 20 días, en dos tandas de trabajo por día, para un total de 40 tandas y 80 replicados. (Ver la tabla de "Precision".)

Linealidad: Las muestras fueron analizadas en varias diluciones. (Ver la tabla de "Linearity" para resultados representativos.)

Recuperación: Se analizaron muestras sobrecargadas 1 en 19 con tres

soluciones fenitoína (80, 160 y 320 µg/ml). (Ver la tabla de "Recovery" para resultados representativos.)

Especificidad: El ensayo es altamente específico para fenitoína. Existe una reactividad cruzada de aproximadamente el 12% con el metabolito principal, HPPH, pero ninguna reactividad significativa con la forma secretada éster de glucurónido, HPPG. (Consulte la tabla "Especificidad").

Bilirrubina: La presencia de bilirrubina conjugada y libre en concentraciones hasta 200 mg/l no tiene efecto en el ensayo, en lo concerniente a la precisión del ensayo.

Hemolisis: La presencia de hemoglobina, en concentraciones hasta 512 mg/dl, no tienen ningún efecto sobre los resultados en términos de precisión.

Lipemia: La presencia de triglicéridos en concentraciones hasta 3 000 mg/dl no tiene efecto alguno en los resultados, en lo correspondiente a la precisión del ensayo.

Tipo alternativo de muestra: Se han recogido muestras ($n = 20$) en tubos Vacutainers sin anticoagulante y en tubos Vacutainers heparinizados. Todas las muestras se cargaron con fenitoína y luego examinadas mediante el ensayo de Fenitoína de IMMULITE 2000.

(Heparina) = 1,02 (Suero) – 0,51 µg/ml
r = 0,988

Medias:
8,34 µg/ml (Suero)
7,98 µg/ml (Heparina)

Comparación de métodos 1: El ensayo se comparó con un ensayo de fenitoína disponible en el mercado (Kit A) en 51 muestras. (Rango de Concentración: aproximadamente 3,3 a 30 µg/ml. Véase el gráfico 2".) Por regresión lineal:

(IML 2000) = 0,95 (Kit A) – 0,22 µg/ml
r = 0,982

Medias:
10,9 µg/ml (IMMULITE 2000)
11,7 µg/ml (Kit A)

Comparación de métodos 2: El ensayo se ha comparado con el fenitoína IMMULITE de DPC en 117 muestras de pacientes. (Intervalo de concentración: aproximadamente 2,8 a 40 µg/ml. Véase el gráfico 2). Por regresión lineal:

(IML 2000) = 1,03 (IML) + 0,55 µg/ml
r = 0,976

Medias:
15,2 µg/ml (IMMULITE 2000)
14,2 µg/ml (IMMULITE)

Asistencia técnica

Contactese con su Distribuidor Nacional.

El Sistema de Calidad de Diagnostic Products Corporation está registrado para la ISO 13485:2003.

Français

Phénytoïne

Domaine d'utilisation: dosage quantitatif de la phénytoïne dans le sérum ou de plasma hépariné. Réservé à un usage diagnostique *in vitro* avec l'analyseur IMMULITE 2000, ce test constitue une aide au suivi d'un traitement médicamenteux.

Ce réactif est enregistré auprès de l'Agence du Médicament.

Référence catalogue: **L2KPN2** (200 tests), **L2KPN6** (600 tests)

Code produit : **PHN**.

Code couleur : **gris foncé**.

Introduction

La phénytoïne (5,5-diphénylhydantoïne ; MM : 252,3 Da) est un anti-épileptique largement utilisé pour le traitement de nombreux types de crise. Elle est habituellement administrée oralement sous forme de phénytoïne (Dilantin[®]) elle-même, ou par injection intraveineuse (IV) ou intramusculaire (IM), sous forme du médicament fosphénytoïne (Cerebyx[®]), un ester de phosphate de phénytoïne relativement soluble dans l'eau. Suivant la voie d'administration, la conversion de la fosphénytoïne en phénytoïne devrait être à peu près totale en 2 à 4 heures.¹⁻⁴

La plus grande partie de la phénytoïne circulante est fortement liée à des protéines plasmatiques, principalement l'albumine. Habituellement, seul 10% environ circule sous forme libre, biologiquement active, même si dans certains états cliniques, comme l'insuffisance rénale, cette fraction peut

aller jusqu'à 30% ou plus.⁵ On peut s'attendre à voir augmenter la quantité de forme libre circulante en cas d'hypoalbuminémie et dans certaines affections où d'autres composés entrent en compétition avec la phénytoïne pour les sites de liaison des protéines. On peut citer par exemple l'acide valproïque et d'autres anti-convulsivants pouvant être administrés de concert avec la phénytoïne, les salicylates et des anti-inflammatoires non-stéroïdiens comme l'oxaprozine (Daypro[®]), ainsi que d'autres médicaments qui se lient fortement à l'albumine. De la même façon, des taux très élevés d'acides gras libres peuvent déplacer la phénytoïne liée aux protéines plasmatiques.

La phénytoïne est éliminée dans le foie où elle est essentiellement convertie en 5-(*p*-hydroxyphényl)-5-phénylhydantoïne, qui est ensuite glycosylée et excrétée dans l'urine.^{2,5} Bien qu'inactifs, ces métabolites — HPPH et sa forme glycosylée HPPG — présentent une similarité structurale avec la phénytoïne et peuvent entrer en compétition avec la phénytoïne pour les sites de liaison des protéines. La vitesse d'élimination diminue légèrement avec l'âge et se trouve réduite dans l'insuffisance rénale. Les médicaments qui favorisent ou inhibent la capacité du foie à métaboliser la phénytoïne sont susceptibles d'influer sur les concentrations circulantes. De plus, la capacité métabolique est limitée ; la relation entre posologie et concentration circulante n'est donc pas linéaire : à concentration plus élevée, et y compris pour des concentrations thérapeutiques, une légère augmentation de la posologie pourra se traduire par une élévation importante de la concentration circulante.

La phénytoïne est habituellement mesurée par immunodosage puisque la concentration de phénytoïne (totale) présente une corrélation plus étroite avec l'effet thérapeutique et la toxicité que la dose administrée.⁶ Les concentrations thérapeutiques généralement admises pour la phénytoïne vont de 10 à 20 µg/ml (40 à 80 µmol/l), mais ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif.^{1,7-9} (Aucun intervalle n'a été établi pour la phénytoïne libre circulante.) L'optimisation de la posologie devra impérativement prendre en compte la réponse clinique au

médicament. Une faible concentration peut résulter d'un suivi insuffisant, comme cela se manifeste par la fréquence et/ou la gravité des crises. Une concentration élevée peut s'accompagner de manifestations de neurotoxicité — comme par exemple des mouvements involontaires des yeux (nystagmus), des nausées, des vomissements, une incoordination motrice (ataxie), des troubles de l'élocution (dysarthrie), une léthargie prononcée, etc. — voire d'une aggravation des crises.

Principe du test

IMMULITE 2000 Phénytoïne est un immunodosage enzymatique chimiluminescent par compétition en phase solide.

Cycles d'incubation : 1 × 30 minutes.

Recueil des échantillons

Le patient n'a pas besoin d'être à jeun et aucune préparation particulière n'est nécessaire. Prélever par ponction veineuse, en évitant l'hémolyse, sur tubes secs (sans anticoagulant) ou sur tubes héparinés. Noter l'heure du prélèvement et séparer le sérum ou le plasma des cellules. Ne pas utiliser de tubes à gel barrière.^{1,10-11}

Pour les patients traités par fosphénytoïne (Cerebyx[®]), il est important de ne pas recueillir d'échantillons destinés au dosage de la phénytoïne, avant 2 heures au moins après administration IV ou avant 4 heures au moins après administration IM, lorsque la conversion du promédicament fosphénytoïne en phénytoïne devrait être presque totale.¹⁻³

Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Des échantillons hémolysés peuvent être révélateurs d'une préparation inadéquate du prélèvement avant son envoi au laboratoire ; il faudra donc interpréter les résultats avec prudence.

La centrifugation des échantillons sériques avant la formation complète du caillot peut entraîner la présence de fibrine. Pour éviter les résultats erronés dus à la présence de fibrine, s'assurer de la formation complète du caillot avant de centrifuger les échantillons. Certains

échantillons, en particulier ceux provenant de patients sous anti-coagulants, peuvent nécessiter un temps plus long pour la formation du caillot.

Des tubes pour prélèvements sanguins provenant de fabricants différents peuvent donner des résultats différents, selon les matériaux et additifs utilisés, y compris gels ou barrières physiques, activateurs de la coagulation et/ou anticoagulants. Le coffret IMMULITE 2000 Phénytoïne n'a pas été testé sur tous les types de tubes possibles. Veuillez consulter le chapitre intitulé Autres Types d'Échantillons pour plus de renseignements sur les tubes qui ont été évalués.

Volume nécessaire: 10 µl sérum ou plasma hépariné.

Conditions de conservation: 7 jours à +2°C/+8°C ou 1 mois à -20°C.¹²

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Réactifs : conserver les réactifs à +2/+8 °C. Eliminer les déchets conformément à la réglementation en vigueur.

Respecter les précautions d'emploi et manipuler tous les composants du coffret comme des produits potentiellement infectieux. Les réactifs dérivés de produits humains et utilisés dans ce coffret ont subi un test sérologique pour la Syphilis et des tests de dépistage pour les anticorps anti-VIH1 et 2, anti-HCV et pour l'antigène de surface de l'hépatite B, qui se sont tous avérés négatifs.

De l'azide de sodium à des concentrations inférieures à 0,1 g/dl a été ajouté comme conservateur ; lors de l'élimination, l'évacuer avec de grandes quantités d'eau pour éviter une accumulation d'azides métalliques explosifs dans les canalisations.

Substrat chimiluminescent: éviter la contamination et l'exposition directe au soleil. (Voir notice).

Eau : utiliser de l'eau distillée ou désionisée.

Matériel fourni

Les composants de la trousse ne peuvent être utilisés que conjointement. Les étiquettes à l'intérieur du coffret sont nécessaires au dosage.

Cartouche de billes Phénytoïne (L2PN12)

Avec code-barres. 200 billes revêtues d'un anticorps polyclonal de lapin anti-phénytoïne. Stable à +2C/+8°C jusqu'à la date de péremption.

L2KPN2: 1 cartouche.

L2KPN6: 3 cartouches.

Cartouche réactif Phénytoïne (L2PNA2)

Avec code-barres. 21 ml de phénytoïne conjuguée à de la phosphatase alcaline (intestins de veau) dans un tampon (avec conservateur), distribué à volume égal dans les compartiments A et B. Stable à +2/ +8°C jusqu'à la date de péremption.

L2KPN2: 1 cartouche.

L2KPN6: 3 cartouches.

Avant l'emploi, retirer la partie supérieure de l'étiquette au niveau des perforations en ayant soin de ne pas endommager le code-barres. Retirer le film protecteur situé sur la partie supérieure de la cartouche-réactif ; insérer le couvercle coulissant entre les glissières sur le dessus de la cartouche-réactif.

Ajusteurs Phénytoïne (LPNL, LPNH)

Deux flacons d'ajusteurs (haut et bas) de 2 ml chacun contenant, de phénytoïne dans du sérum humain traité, avec conservateur. Stable à +2/ +8°C pendant 30 jours après ouverture, ou 6 mois (aliquoté) à -20°C.

L2KPN2: 1 jeu. **L2KPN6:** 2 jeux.

Avant de procéder à un ajustement, placer les étiquettes correspondant à l'aliquot (fournies avec le coffret) sur des tubes en verre de sorte que les code-barres soient lisibles par le lecteur.

Composants du coffret fournis séparément

L2SUBM: Substrat chimiluminescent

L2PWSM: Solution de lavage

L2KPM: Coffret de décontamination de l'aiguille de prélèvement

LRXT: Godets réactionnels (jetables)

SDCM: Un module contrôle à deux niveaux à base de sérum humain.

Egalement requis

Eau distillée ou désionisée ; tubes en verre ; contrôles.

Protocole de dosage

Noter que pour des performances optimales, il est important de réaliser toutes les procédures de maintenance de routine selon les instructions du Manuel d'Utilisation IMMULITE 2000.

Se reporter au manuel d'utilisation de l'IMMULITE 2000 pour : la préparation, le démarrage du système, les ajustements, le dosage et les procédures de contrôle de qualité.

Intervalle d'ajustement recommandé :
2 semaines.

Echantillons pour le contrôle de qualité:

Utiliser des contrôles ou des pools de sérums avec au moins deux niveaux de concentration (faible ou élevé) d'phénytoïne.

Concentrations thérapeutiques

Les concentrations thérapeutiques communément admises pour la phénytoïne vont de 10 à 20 µg/ml (40 à 80 µmol/l).^{1,7-9} Une toxicité a été décrite pour des concentrations supérieures à 20 µg/ml.

Utiliser ces valeurs à titre indicatif uniquement.

Limites

Les éléments suivants devront être pris en compte pour l'interprétation des taux de phénytoïne :

- Chacun des traitements pris de concert par le patient
- L'heure du prélèvement en relation avec l'histoire de la posologie
- Maladies ou états cliniques établis

Les anticorps hétérophiles du sérum humain peuvent réagir avec les immunoglobulines faisant partie des composants du coffret et interférer avec les immunodosages in vitro. [Voir Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Les échantillons provenant de patients fréquemment exposés aux animaux ou aux produits sériques d'origine animale peuvent présenter ce type d'interférence pouvant potentiellement donner un résultat anormal. Ces réactifs ont été mis au point afin de minimiser le risque d'interférence,

cependant des interactions potentielles entre des sérums rares et les composants du test peuvent se produire. Dans un but diagnostique, les résultats obtenus avec ce dosage doivent toujours être utilisés en association avec un examen clinique, l'histoire médicale du patient et d'autres résultats.

Performances du test

Consulter les tableaux et graphiques pour obtenir les données *représentatives* des performances du test. Les résultats sont donnés en µg/ml. (En l'absence d'indication contraire, tous les résultats ont été obtenus sur des échantillons sériques recueillis en tubes, sans gel ni activateur de la coagulation).

Facteur de conversion:

µg/ml × 3,96 → µmol/l

Domaine de mesure: 2,5 – 40 µg/ml
(9,9 – 158 µmol/l).

Sensibilité analytique: 0,5 µg/ml
(2,0 µmol/l).

Précision : les valeurs ont été établies à partir de doublets dosés dans deux séries différentes chaque jour pendant 20 jours soit au total 40 séries et 80 doublets. (Voir le tableau " Precision ".)

Test de dilution: les échantillons ont été testés avec des taux de dilution variés. (Voir le tableau " Linearity " pour des données représentatives.)

Test de récupération: les échantillons testés ont été chargés dans un rapport de 1 à 19 avec trois solutions phénytoïne (80, 160 et 320 µg/ml). (Voir le tableau " Recovery " pour des données représentatives.)

Spécificité: l'anticorps est hautement spécifique de la phénytoïne. La réactivité croisée avec le métabolite principal HPPH est de 12% environ, mais aucune réactivité croisée significative n'est notable avec la forme glycoconjuguée estérifiée HPPG, qui est sécrétée. (Voir le tableau « Spécificité ».)

Bilirubine : La présence de bilirubine, conjuguée ou non, n'a aucun effet sur le dosage ni sur sa précision si la concentration ne dépasse pas 200 mg/l.

Hémolyse : La présence d'hémoglobine ne présente aucun effet sur les résultats ni

sur la précision du dosage si la concentration ne dépasse pas 512 mg/dl.

Lipémie : La présence de triglycérides jusqu'à une concentration de 3 000 mg/dl n'interfère ni sur la précision du dosage, ni sur les résultats.

Utilisation de différents types

d'échantillons : les échantillons ($n = 20$) ont été recueillis dans des tubes vacutainer nus ou héparinés. Tous les échantillons ont été chargés phénytoïne, puis dosés selon le protocole phénytoïne IMMULITE 2000.

(Héparine) = 1,02 (Sérum) – 0,51 µg/ml
 $r = 0,988$

Moyennes:
8,34 µg/ml (Sérum)
7,98 µg/ml (Héparine)

Comparaison de méthodes 1: le test a été comparé à la version commerciale d'un dosage de la phénytoïne (coffret A), sur 51 échantillons. (dont les concentrations allaient d'environ 3,3 à 30 µg/ml. Voir graphique 1.) Par régression linéaire :

(IML 2000) = 0,95 (Coffret A) – 0,22 µg/ml
 $r = 0,982$

Moyennes :
10,9 µg/ml (IMMULITE 2000)
11,7 µg/ml (Coffret A)

Comparaison de méthodes 2: le test a été comparé à l'IMMULITE phénytoïne de DPC sur 117 échantillons (intervalle de concentrations : 2,8 à 40 µg/ml environ. Voir graphique 2.). Par régression linéaire :

(IML 2000) = 1,03 (IML) + 0,55 µg/ml
 $r = 0,976$

Moyennes :
15,2 µg/ml (IMMULITE 2000)
14,2 µg/ml (IMMULITE)

Assistance technique

En France distribué par DPC France 90
bd National 92257 La garenne-Colombes.

Le système d'assurance qualité de DPC est certifié ISO 13485 (2003).

Italiano

Fenitoina

Uso: Ad uso diagnostico *in vitro* con l'analizzatore IMMULITE 2000— per la misurazione quantitativa della fenitoina nel siero o nel plasma eparinizzato, quale ausilio nel monitoraggio della terapia farmacologica.

Codice: **L2KPN2** (200 test)

L2KPN6 (600 test)

Codice del Test: **PHN**

Colore: **grigio scuro**

Riassunto e spiegazione del Test

La fenitoina (5,5-difenilidantoina; peso molecolare: 252,3 Da) è un farmaco antiepilettico ampiamente utilizzato nel trattamento di vari tipi di crisi. Viene generalmente somministrata per via orale sotto forma di fenitoina (Dilantin[®]), oppure mediante infusione endovenosa (IV) o iniezione intramuscolo (IM) del profarmaco fosfenitoina (Cerebyx[®]), un estere fosfato di fenitoina relativamente solubile in acqua. A seconda del tipo di somministrazione, la conversione della fosfenitoina in fenitoina verrà essenzialmente completata entro 2 – 4 ore.¹⁻⁴

La maggior parte della fenitoina in circolo è strettamente legata alle proteine del plasma, principalmente all'albumina. Generalmente, soltanto il 10% circola nella forma libera farmacologicamente attiva, benchè in alcune condizioni, come il blocco renale, questa frazione possa raggiungere il 30% o più.⁵ Ci si attende che la quantità circolante nella forma libera aumenti nell'ipoalbuminemia ed in condizioni nelle quali altri composti competono con la fenitoina per i siti di legame delle proteine. Esempi di questi composti comprendono l'acido valproico ed altri anticonvulsivi che possono essere somministrati unitamente alla fenitoina; i salicilati ed i farmaci anti-infiammatori nonsteroidi come l'osaprozina (Daypro[®]); come anche altri farmaci che si legano con l'albumina. In maniera analoga, livelli elevati di acidi grassi liberi possono

soppiantare la fenitoina nelle proteine plasmatiche.

La fenitoina viene eliminata attraverso il fegato, dove viene convertita principalmente in 5-(*p*-idrossifenile)-5-fenilidantoina, che poi viene successivamente glucuronidata ed eliminata nell'urina.^{2,5} Benchè siano inattivi, questi metaboliti — HPPH ed il suo glucuronide HPPG — sono strutturalmente simili alla fenitoina e potrebbero competere con la fenitoina per i siti di legame delle proteine. Il tasso d'eliminazione diminuisce alquanto con l'età, e viene ridotto nell'insufficienza renale. I farmaci che migliorano o che inibiscono la capacità del fegato di metabolizzare la fenitoina possono influenzare i livelli circolanti. Inoltre, la capacità metabolica è limitata; per questo motivo, la correlazione tra la dose ed i livelli circolanti non è uniforme; a livelli più elevati, anche entro il range terapeutico, lievi aumenti nella dose somministrata possono causare aumenti consistenti nei livelli circolanti.

La fenitoina è generalmente monitorata con un immunodosaggio perchè i livelli circolanti (totali) del farmaco hanno maggiori correlazioni con l'effetto terapeutico e la tossicità della dose somministrata.⁶ Il range terapeutico generalmente accettato per la fenitoina circolante totale è 10 – 20 µg/mL (40 – 80 µmol/L), ma questi limiti devono essere considerati soltanto come linee guida.^{1,7-9} (Non è stato ancora stabilito un range standard per la fenitoina circolante libera). L'ottimizzazione della dose deve considerare la risposta clinica al farmaco da parte del paziente. Livelli bassi possono essere associati ad un controllo non idoneo, come è evidente nella frequenza e/o nella gravità delle crisi. Livelli elevati possono essere associati a sintomi di neurotossicità – inclusi movimenti ritmici involontari degli occhi (il nistagmus), nausea, vomito, coordinazione ostacolata (atassia), interferenze nel linguaggio (disartia), letargia grave, ecc. – o anche con un peggioramento delle crisi.

Principio del procedimento

IMMULITE 2000 Fenitoina è un dosaggio immunoenzimatico competitivo in chemiluminescenza in fase solida.

Cicli d'incubazione: 1 × 30 minuti.

Raccolta del Campione

Il paziente non deve essere a digiuno e non sono necessarie preparazioni particolari. Prelevare i campioni evitando l'emolisi in provette semplici o eparinizzate (senza anticoagulanti) e dividere il siero o plasma dalle cellule. Non utilizzare provette con barriere di gel.^{1,10-11}

Per pazienti trattati con fosfenitoina (Cerebyx[®]), è importante non prelevare campioni per l'analisi della fenitoina fino ad almeno 2 ore dopo il termine dell'infusione endovenosa, o 4 ore dopo l'iniezione intramuscolo, quando la conversione del profarmaco in fenitoina sarà essenzialmente completata.¹⁻³

Si consiglia l'utilizzo di un'ultracentrifuga per schiarire i campioni lipemici.

I campioni emolizzati possono indicare il trattamento non idoneo del campione prima dell'arrivo al laboratorio; per questo motivo, i risultati devono essere interpretati con prudenza.

La centrifugazione dei campioni del siero prima che la coagulazione sia completa può produrre fibrina. Per evitare risultati errati dovuti alla presenza di fibrina, assicurarsi che il processo di coagulazione sia completo prima di centrifugare i campioni. Alcuni campioni, in modo particolare quelli di pazienti sottoposti a terapia con anticoagulanti, possono richiedere tempi di coagulazione più lunghi.

Provette per il prelievo di sangue di produttori diversi possono dare valori differenti, a seconda dei materiali e degli additivi usati, incluso gel o barriere fisiche, attivatori di coaguli e/o anticoagulanti. L'IMMULITE 2000 Fenitoina non è stato testato con tutte le possibili variazioni di tipi di provette. Per dettagli sulle provette testate consultare la sezione sulla Tipologia di Campioni Alternativi.

Volume richiesto: 10 µL di siero o plasma eparinizzato.

Conservazione: 7 giorni a 2–8°C o 1 mese a –20°C.¹²

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare i reagenti a 2–8°C. Eliminare in conformità alle leggi vigenti.

Seguire le precauzioni generali e manipolare tutti i componenti come se fossero potenzialmente infetti. I materiali derivati dal sangue umano sono stati testati con esito negativo per la sifilide, gli anticorpi anti-HIV 1 e 2, l'Antigene di Superficie dell'Epatite B e gli anticorpi Anti-Epatite C.

E' stata aggiunta Sodio Azide a concentrazioni inferiori a 0,1 g/dL come conservante. Al momento dell'eliminazione, irrorare con molta acqua per evitare la formazione di azidi metalliche potenzialmente esplosive nelle tubature di piombo e di rame.

Substrato Chemiluminescente: Evitare la contaminazione e l'esposizione alla luce solare diretta. (Vedi metodica.)

Acqua: Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata.

Materiali Forniti

I componenti costituiscono un unico set. Le etichette all'interno della confezione sono necessarie per eseguire i dosaggi.

Contenitore di Sferette Fenitoina (L2PN12)

Con codice a barre. 200 sfere coattate con un anticorpo policlonale di coniglio anti-fenitoina. Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza.

L2KPN2: 1 confezione.

L2KPN6: 3 confezioni

Porta Reagente Fenitoina (L2PNA2)

Con codice a barre. 21 mL di fosfatasi alcalina (intestino di vitello) coniugata con fenitoina in un tampone (**con conservanti**), dispensata in maniera eguale nella camera A e B. Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza.

L2KPN2: 1 Porta Reagente

L2KPN6: 3 Porta Reagenti

Prima dell'utilizzo rimuovere la parte superiore dell'etichetta lungo la perforazione senza danneggiare il codice a barre. Togliere il foglio protettivo dalla parte superiore del flacone. Far scattare nella corretta posizione il coperchio scorrevole lungo le guide del coperchio del reagente.

Calibratori Fenitoina (LPNL, LPNH)

Due flaconi (Basso ed Alto), ciascuno con 2 mL di fenitoina in siero umano processato, con conservanti. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura, o per 6 mesi (aliquotato) a –20°C.

L2KPN2: 1 set. **L2KPN6:** 2 set.

Prima di ricalibrare collocare le etichette giuste sulle provette delle aliquote (fornite col kit) cosicché i codici a barre possano essere registrati dal lettore.

Componenti del kit forniti separatamente

L2SUBM: Substrato Chemiluminescente

L2PWSM: Tampone di lavaggio dell'Ago

L2KPM: Kit di Pulizia dell'Ago

LRXT: Tubi di Reazione (monouso)

SDCM: Un modulo di controllo a due livelli basato su siero.

Materiali richiesti

Acqua distillata o deionizzata; provette di vetro; controlli.

Procedura del Dosaggio

Attenzione: per avere prestazioni ottimali, è importante effettuare le procedure di manutenzione di routine cosiccome definito nel Manuale dell'Operatore dell'IMMULITE 2000.

Vedere il manuale dell'operatore IMMULITE 2000 per: la preparazione, la messa a punto, la regolazione, la prova ed i procedimenti per il controllo della qualità.

Intervallo di Calibrazione Consigliato: 2 settimane

Controllo di Qualità: Utilizzare controlli o pool di sieri con almeno due livelli (alto e basso) di fenitoina.

Range terapeutico

Il range terapeutico generalmente accettato per la fenitoina è 10 – 20 µg/mL (40 – 80 µmol/L).^{1,7-9} Si è riscontrata tossicità a concentrazioni superiori a 20 µg/mL.

I valori devono essere utilizzati soltanto come *linee guida*.

Limiti

E' consigliabile considerare quanto segue nell'interpretazione della concentrazione di fenitoina:

- Tutti i farmaci somministrati al paziente in maniera concomitante.
- Il tempo del prelievo del campione in relazione alle dosi somministrate
- Malattie o condizioni esistenti

Gli anticorpi eterofili presenti nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline presenti nelle componenti del dosaggio provocando un'interferenza con i dosaggi in vitro. [Vedi Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Campioni di pazienti routinariamente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero di animali possono presentare questo tipo di interferenza causa potenziale di risultati anomali. Questi reagenti sono stati formulati per minimizzare il rischio di interferenze, tuttavia, possono verificarsi interazioni potenziali tra sieri rari e componenti del test. A scopo diagnostico, i risultati ottenuti da questo dosaggio devono sempre essere utilizzati unitamente all'esame clinico, all'anamnesi del paziente e ad altre indagini di laboratorio.

Prestazioni del Dosaggio

(Vedi tavole e grafici per dati *rappresentativi*. I risultati sono indicati in µg/mL. (Se non diversamente previsto, tutti i risultati sono stati generati con campioni di siero raccolti in tubi senza barriere di gel o additivi che favoriscano la formazione di coaguli.)

Fattore di Conversione:

µg/mL × 3,96 → µmol/L

Range di calibrazione: 2,5 – 40 µg/mL (9,9 – 158 µmol/L).

Sensibilità analitica: 0,5 µg/mL (2,0 µmol/L).

Precisione: Sono stati dosati campioni in doppio in 20 giorni, due sedute al giorno, per un totale di 40 sedute ed 80 replicati. (Vedi la Tabella "Precision".)

Linearità: Sono stati dosati campioni in varie forme diluite. (Vedi la Tabella "Linearity" per dati rappresentativi.)

Recupero: Sono stati dosati campioni 1:19 ai quali sono state aggiunte tre soluzioni fenitoina (80, 160 e 320 µg/mL). (Vedi la Tabella "Recovery" per dati rappresentativi.)

Specificità: L'anticorpo è molto specifico per la fenitoina. La crossreattività con il metabolita principale, l'HPPH, è del 12%, ma non si è riscontrata crossreattività significativa con la forma dell'estere glucuronide, l'HPPG. (Vedere la tabella "Specificity").

Bilirubina: La presenza di bilirubina coniugata e non coniugata in concentrazioni fino a 200 mg/L non ha nessun effetto entro il range di precisione del dosaggio.

Emolisi: La presenza di emoglobina in concentrazioni fino a 512 mg/dL non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Lipemia: La presenza di trigliceridi in concentrazioni fino a 3 000 mg/dL non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Tipo di Campione Alternativo: I campioni ($n = 20$) sono stati prelevati in provette semplici, eparinizzate o vacutainer. A tutti i campioni è stata aggiunta fenitoina; poi i campioni sono stati analizzati mediante dosaggio della Fenitoina IMMULITE 2000.

(Eparina) = 1,02 (Siero) – 0,51 µg/mL
 $r = 0,988$

Valore medio:
8,34 µg/mL (Siero)
7,98 µg/mL (Eparina)

Comparazione di Metodi 1: Il dosaggio è stato comparato ad un altro dosaggio della fenitoina disponibile sul mercato (Kit A) in 51 campioni (Range di concentrazione: da 3,3 fino a 30 µg/mL. Vedere il grafico 1.) Con regressione lineare:

(IML 2000) = 0,95 (Kit A) – 0,22 µg/mL
 $r = 0,982$

Valore medio:
10,9 µg/mL (IMMULITE 2000)
11,7 µg/mL (Kit A)

Comparazione di Metodi 2: Il dosaggio è stato comparato al dosaggio IMMULITE fenitoina della DPC in 117 campioni di pazienti. (Range di concentrazione: da 2,8 a 40 µg/mL circa. Vedere il grafico 2.) Mediante regressione lineare:

(IML 2000) = 1,03 (IML) + 0,55 µg/mL
 $r = 0,976$

Valore medio:
15,2 µg/mL (IMMULITE 2000)
14,2 µg/mL (IMMULITE)

Assistenza Tecnica

All'estero: Si prega di contattare il proprio Distributore DPC Nazionale.

Il Sistema Qualità della Diagnostic Products Corporation è certificato secondo le norme ISO 13485:2003.

Português

Fenitoína

Utilização: Para a medição quantitativa de fenitoína no soro ou plasma heparinizado, em diagnósticos *in vitro* com o Analisador IMMULITE 2000, como auxiliar na monitorização da terapia da droga.

Números de catálogo:
L2KPN2 (200 testes)
L2KPN6 (600 testes)

Código do teste: **PHN**
Cor: **Cinzentos escuros**

Sumário e explicação do teste

Fenitoína (5,5-difenilfenitoína; MW: 252,3 Da) é uma droga anti-epiléptica usada amplamente para tratar vários tipos de convulsão. É administrada tipicamente por via oral como fenitoína (Dilantin®) sózinha, ou com infusão intravenosa (IV) ou injeção intramuscular (IM) do fosfenitoína de prodroga (Cerebyx®, um fosfato éster de fenitoína relativamente solúvel em água). Dependendo da via de administração, a conversão de fosfenitoína para fenitoína espera-se que esteja essencialmente completa dentro de 2 a 4 horas.¹⁻⁴

A maioria da fenitoína na circulação é ligada intimamente às proteínas do plasma, principalmente a albumina. Normalmente, apenas cerca de 10% circula de forma livre activa farmacologicamente, embora em algumas condições, como na insuficiência renal, esta fracção possa aumentar para 30% ou mais.⁵ A quantia que circula na forma livre prevê-se que aumente em hipoalbuminémia e em condições onde outros compostos competem com a fenitoína por locais de ligação de proteína. Exemplos incluem ácido valpróico e outros anti-convulsivos que podem

ser administrados concomitantemente com a fenitoína; salicilatos e drogas anti-inflamatórias não-esteroides como a oxaprozín (Daypro®); assim como muitas outras drogas que se ligam fortemente à albumina. Da mesma forma, níveis elevados de ácidos gordos livres podem desalojar a fenitoína das proteínas plasmáticas.

A fenitoína é eliminada pelo fígado onde é convertida principalmente em 5-(*p*-hidroxifenil)-5-fenilhidantoína, que é subsequentemente glucoronizada e excretada na urina.^{2,5} Embora inactivos, esses metabolitos – HPPH e seus HPPG de glucoronidos – são estruturalmente semelhantes à fenitoína e podem competir com a fenitoína por locais de ligação de proteínas. A taxa de excreção declina um pouco com a idade, e é reduzida com a insuficiência renal. As drogas que aumentam ou inibem a capacidade do fígado de metabolizar fenitoína podem ser susceptíveis de afectar os níveis circulatórios. Além disso, a capacidade metabólica é limitada; uma vez que o relacionamento entre a dosagem e os níveis de circulação não são uniformes, mesmo dentro da faixa terapêutica, pequenos aumentos na dose administrada podem resultar em grandes aumentos nos níveis circulatórios.

A fenitoína é geralmente monitorizada por imuno-ensaio devido aos níveis de circulação (totais) da droga se correlacionarem mais fortemente com o efeito terapêutico e a toxicidade do que a dose administrada.⁶ A faixa terapêutica em geral aceita para a fenitoína de circulação total é 10 a 20 µg/mL (40 a 80 µmol/L), mas esses limites devem ser considerados apenas como directrizes.^{1,7-9} (Não existem valores estabelecidos para a fenitoína em circulação livre.) A optimização da dosagem deve levar em consideração a resposta clínica do doente à droga. Níveis reduzidos podem estar associados com o controle inadequado, conforme manifestado na frequência e/ou gravidade das convulsões. Altos níveis podem estar associados com sintomas de neurotoxicidade – incluindo movimentos oculares rítmicos involuntários (nistagmos), náusea, vômito, coordenação prejudicada (ataxia), interferência da fala (desartria), letargia severa e assim por

diante – ou mesmo com uma pioria das convulsões.

Princípio do procedimento

O IMMULITE 2000 Fenitoína é um imuno-ensaio competitivo de fase sólida, de enzimas quimioluminescentes.

Ciclos de incubação: 1 × 30 minutos.

Colheita

O doente não necessita de estar em jejum, nem de qualquer preparação especial. Tirar sangue da veia, evitando hemólise, em tubos simples (sem anticoagulante) ou tubos heparinizados, anotando a hora, e separando o soro ou plasma das células. Não use tubos de barreira de gel.^{1,10-11}

Para doentes a ser tratados com fosfenitoína (Cerebyx®), é importante não colher amostras para o doseamento de fenitoína até pelo menos 2 horas após (a conclusão de) infusão intravenosa, ou quatro horas após a injeção intramuscular, quando se calcula que a conversão da prodroga com a fenitoína esteja essencialmente completa.¹⁻³

O uso de um ultracentrifugação é recomendado.

Amostras hemolisadas podem indicar tratamento incorrecto de uma amostra antes do envio para o laboratório; portanto os resultados devem ser interpretados com cuidado.

A centrifugação de amostras de soro antes da formação completa do coágulo pode resultar na presença de fibrina. Para prevenir resultados errados devido à presença de fibrina, certifique-se que a formação do coágulo foi completa antes da centrifugação das amostras. Algumas amostras, em especial as de doentes que recebem terapia anticoagulante podem requerer um maior tempo de formação do coágulo.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes. IMMULITE 2000 Fenitoína não foram ainda testados com todas as possíveis variações originadas pelos tipos de tubos. Consultar a secção

Tipos de Amostras Alternativas para obter detalhes sobre os tubos que foram testados.

Volume de amostra: 10 µL soro ou plasma heparinizado.

Estabilidade: 7 dias a 2–8°C, ou 1 mês a –20°C.¹²

Precauções

Para uso de diagnóstico in vitro.

Reagentes: Manter a 2–8°C. Elimine de acordo com as normas aplicadas.

Manipule com as devidas precauções todos os materiais capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias primas obtidas de soro humano foram testadas, dando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2; para o antigénio de superfície da hepatite B (HBsAg) e para os anticorpos do vírus da hepatite C.

Azida de sódio foi adicionada como conservante; para evitar acumulações de azidas metálicas explosivas em canalizações de cobre e alumínio, os reagentes devem ser rejeitados no esgoto apenas se estiverem diluídos e forem lavados com grandes volumes de água.

Substrato quimioluminescente: Evite contaminação e exposição à luz directa (ver bula).

Água: Utilize água destilada ou desionizada.

Materiais fornecidos

Os componentes formam um conjunto uno e indivisível. Os códigos de barras no interior das caixas são necessários para o ensaio.

Embalagem de pérolas de Fenitoína (L2PN12)

Com código de barras. 200 pérolas revestidas com anticorpo policlonal de coelho anti-fenitoína. Estável até a data de validade a 2–8°C.

L2KPN2: 1 embalagem.

L2KPN6: 3 embalagens.

Embalagem de reagentes de Fenitoína (L2PNA2)

Com código de barras. 21 mL de fosfatase alcalina (de intestino de bovino)

conjugada com a fenitoína, tamponizada (com conservante), divididos de igual modo pelas câmaras A e B. Estável até à data de validade a 2–8°C.

L2KPN2: 1 embalagem.

L2KPN6: 3 embalagens.

Antes de utilizar, retire a etiqueta de protecção da tampa deslizante; levante a tampa, remova o remanescente da etiqueta com o cuidado de não danificar o código de barras. Remova o selo de alumínio do topo da embalagem, encaixe a tampa deslizante nas ranhuras e verifique se a tampa desliza.

Ajustes Fenitoína (LPNL, LPNH)

Contém dois frascos (nível alto e baixo) cada um contendo 2 mL de fenitoína em soro humano processado, com conservante. Estável, após a abertura, durante 30 dias a 2–8°C, ou por 6 meses (aliquotado) a –20°C.

L2KPN2: 1 conjunto.

L2KPN6: 2 conjuntos.

Antes de realizar qualquer ajuste, coloque as etiquetas da alíquota apropriadas (fornecidas com o "kit") em tubos de amostra de forma que os códigos de barras possam ser lidos pelo dispositivo de leitura do aparelho.

Componentes do kit fornecidos separadamente

L2SUBM: Substrato quimioluminescente

L2PWSM: Solução de lavagem

L2KPM: Kit de limpeza do pipetador

LRXT: Tubos de reacção (descartáveis)

SDCM: Um módulo de controlo baseado em soro humano de dois níveis.

Também necessário :

Água destilada ou desionizada; tubos de amostra; controlos.

Procedimento de doseamento

Têr em atenção que para obter um desempenho óptimo, é importante efectuar todos os procedimentos de manutenção de rotina conforme definido no Manual de Operador do IMMULITE 2000.

Consulte o Manual do Operador de IMMULITE 2000 para para instruções sobre preparação, ajuste, doseamento e procedimentos de controlo de qualidade.

Intervalo entre ajustes aconselhável:
2 semanas.

Amostras de controlo de qualidade:
utilize controlos ou "pools" com, pelo menos, dois níveis (alto e baixo) de fenitoína.

Faixa terapêutica

A faixa terapêutica normalmente aceite para fenitoína é 10 a 20 µg/mL (40 a 80 µmol/L).^{1, 7-9} A toxicidade tem sido reportada em concentrações maiores que 20 µg/mL.

Estes valores devem ser considerados apenas como directrizes.

Limitações

Deve ser considerado na interpretação da concentração de fenitoína:

- Todas as medicações concorrentes tomadas pelo doente
- Tempo de amostragem relativamente à história da dosagem
- Doenças ou condições existentes

Os anticorpos heterófilos no soro humano podem reagir com as imunoglobulinas presentes no ensaio, causando interferência com os imunoensaios in vitro. [Ver Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Amostras de doentes expostas em rotina a produtos ou soros de animais podem demonstrar este tipo de interferência, potencial causador de resultados anómalos. Estes reagentes foram formulados para minimizar o risco de interferência, contudo podem ocorrer potenciais interacções entre soros (raros) e componentes do teste. Para fins de diagnóstico, os resultados obtidos neste ensaio devem ser sempre analisados em combinação com o exame clínico, história de medicação do doente e outros achados que possam correlacionar.

Características do ensaio

Ver tabelas e gráficos para dados representativos da performance do doseamento. Os resultados são apresentados em µg/mL. (Salvo referência em contrário, todos os dados provêm de amostras de soro colhidas em tubos sem anticoagulantes, barreiras de

gel ou aditivos promotores da coagulação.)

Factor de conversão:
µg/mL × 3,96 → µmol/L

Calibração: 2,5 – 40 µg/mL
(9,9 – 158 µmol/L).

Sensibilidade Analítica: 0,5 µg/mL
(2,0 µmol/L).

Precisão: As amostras foram doseadas em duplicado durante 20 dias, 2 ensaios por dia, perfazendo um total de 40 ensaios e 80 réplicas. (Ver a tabela de "Precisão".)

Linearidade: As amostras foram doseadas sob vários níveis de diluição. (Ver a tabela de "Linearidade" para dados representativos.)

Recuperação: As amostras foram adicionadas na relação de 1 para 19 com três soluções Fenitoína (80, 160 e 320 µg/mL) antes do doseamento. (Ver tabela de "Recuperação" para dados representativos.)

Especificidade: O anticorpo é altamente específico para fenitoína. Existe uma reactividade cruzada aproximada de 12% com o metabolito principal, HPPH, mas nenhuma reactividade cruzada com a forma segregada do éster de glucoronido, HPPG. (Veja a tabela "Especificidade")

Bilirrubina: A presença de bilirrubina conjugada e não conjugada em concentrações até 200 mg/L não tem efeito no procedimento dentro da precisão do ensaio.

Hemolise: A presença de hemoglobina em concentrações até 512 mg/dL não tem efeito em resultados, dentro da precisão do ensaio.

Lipemia: A presença de trigliceridos em concentrações até 3 000 mg/dL não tem efeito nos resultados, dentro da precisão do ensaio.

Tipo de amostras alternativas: As amostras ($n = 20$) foram extraídas para tubos de vacutainer heparinizados e simples. Todas as amostras foram adicionadas com fenitoína e depois doseadas pelo Procedimento de Fenitoína IMMULITE 2000.

(Heparina) = 1,02 (Soro) – 0,51 µg/mL
 $r = 0,988$

Médias:
8,34 µg/mL (Soro)
7,98 µg/mL (Heparina)

Comparação de métodos 1: O doseamento foi comparado com um doseamento de fenitoína disponível comercialmente (Kit A) em 51 amostras. (Zona de trabalho: aproximadamente 3,3 a 30 µg/mL. Veja o gráfico 1.) Regressão linear:

$(IML\ 2000) = 0,95\ (Kit\ A) - 0,22\ \mu g/mL$
 $r = 0,982$

Médias:
10,9 µg/mL (IMMULITE 2000)
11,7 µg/mL (Kit A)

Comparação de métodos 2: O doseamento foi comparado ao Fenitoína IMMULITE da DPC em 117 amostras de doentes. (Zona de trabalho: aproximadamente 2,8 a 40 µg/mL. Consulte o gráfico 2.) Regressão linear:

$(IML\ 2000) = 1,03\ (IML) + 0,55\ \mu g/mL$
 $r = 0,976$

Médias:
15,2 µg/mL (IMMULITE 2000)
14,2 µg/mL (IMMULITE)

Assistência Técnica:

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

O Sistema de Qualidade da Diagnostic Products Corporation está registado sob ISO 13485:2003.

DPC[®]

Diagnostic Products Corporation
Corporate Offices
5210 Pacific Concourse Drive
Los Angeles, CA 90045-6900
USA

2005-04-05

PIL2KPN – 11



EC REP DPC Biermann GmbH
61231 Bad Nauheim
Germany
+49 -6032-994-00