

# CEDIA™ Opiate Assay

**IVD** Per uso diagnostico in vitro

## Rx Only

**REF** 10016429 (3 x 17 ml Indiko Kit)  
100089 (Kit da 3 x 17 ml)  
100098 (Kit da 65 ml)  
1661248 (Kit da 495 ml)

## Uso previsto

Il dosaggio CEDIA™ Opiate Assay è uno strumento diagnostico previsto per la determinazione qualitativa e semiquantitativa di oppiati nell'urina umana.

**Questo dosaggio fornisce unicamente un risultato analitico preliminare. Per ottenere un risultato analitico di conferma, è necessario utilizzare un metodo chimico alternativo a specificità più elevata. Il metodo di conferma più idoneo è la gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS).<sup>1</sup> Qualsiasi risultato di analisi riguardante sostanze stupefacenti, soprattutto nel caso di un risultato preliminare positivo, va trattato con la considerazione clinica e la discrezione professionale opportune.**

## Sommario e spiegazione del metodo

L'oppio si ottiene dalla capsula immatura del papavero officinale *Papaver somniferum*.<sup>2,3</sup> La morfina e la codeina sono alcaloidi naturali dell'oppio.<sup>2,4</sup> Entrambi hanno riscontrato un'accoglienza favorevole nel campo medico, soprattutto come analgesici; tuttavia, entrambi vengono spesso usati abusivamente.<sup>2,5</sup> L'eroina è un composto sintetizzato dalla morfina ed è l'oppiato più comunemente usato in modo abusivo.<sup>7</sup>

Gli oppiati (morfina, codeina ed eroina) vengono rapidamente metabolizzati dal corpo, e la sede principale del metabolismo è il fegato.<sup>4,8</sup> La morfina viene escreta nell'urina come morfina coniugata, morfina libera e altri metaboliti in tracce.<sup>3,4,8</sup> La codeina viene escreta nell'urina come codeina libera e coniugata e come morfina libera e coniugata.<sup>2,5</sup> Dopo la somministrazione di codeina, la codeina totale può essere eliminata più rapidamente della morfina totale, per cui alcuni campioni di urina di individui che fanno uso di codeina possono evidenziare soltanto la presenza di morfina totale o un rapporto di morfina totale rispetto a codeina totale maggiore di uno.<sup>3,5,7</sup> L'eroina viene rapidamente metabolizzata nel sangue intero in 6-monoacetilmorfina, che poi viene idrolizzata in morfina coniugata nel fegato.<sup>3,6</sup> Viene escreta nell'urina principalmente come morfina coniugata, ma anche in quantità ridotte come morfina libera e 6-monoacetilmorfina.<sup>3,6</sup> A seconda della dose assunta e della sensibilità del metodo di analisi, la morfina totale può essere rilevata nell'urina fino a 72 ore dopo l'ultima somministrazione di morfina, codeina o eroina.<sup>3,5,7,8</sup>

Il dosaggio CEDIA Opiate Assay è un immunodosaggio enzimatico omogeneo che si avvale della tecnologia del DNA ricombinante (brevetto USA n. 4708929).<sup>9</sup> Questo dosaggio è basato sull'enzima batterico  $\beta$ -galattosidasi, geneticamente suddiviso in due frammenti inattivi. Questi frammenti si riassociano spontaneamente per formare un enzima pienamente attivo in grado di legarsi, nel formato del dosaggio, ad un substrato, dando luogo ad una variazione cromatica misurabile spettrofotometricamente.

Nel dosaggio, il farmaco nel campione compete con il farmaco coniugato con un frammento inattivo di  $\beta$ -galattosidasi per i siti di legame degli anticorpi. Se la droga è presente nel campione, si legherà all'anticorpo, lasciando i frammenti enzimatici inattivi liberi di formare enzimi attivi. Se il farmaco non è presente nel campione, l'anticorpo si legherà al farmaco coniugato con il frammento enzimatico inattivo, inibendo stericamente la riassociazione dei frammenti inattivi di  $\beta$ -galattosidasi, e non si verificherà la formazione di alcun enzima attivo. La quantità di enzima attivo formata ed il risultante cambiamento dell'estinzione sono proporzionali alla concentrazione del farmaco presente nel campione.

## Reagenti

- Tampone di ricostituzione per EA:** contiene tampone citrato, 3  $\mu$ g/ml di anticorpi murini monoclonali per oppioidi, sali tampone, stabilizzatore e conservante.
- 1a Reagente EA:** contiene 0,171 g/l di accettore enzimatico, sali tampone, detergente e conservante.
- 2 Tampone di ricostituzione ED:** contiene tampone fosfato, sali tampone e conservante.
- 2a Reattivo donatore di enzima:** contiene 23,3  $\mu$ g/l di donatore enzimatico coniugato con morfina, 1,67 g/l di rosso di clorofenolo- $\beta$ -D-galattopiranoside, stabilizzante e conservante.

**Ulteriori materiali:** etichette alternative con codici a barre (solo per n. di cat. 100089 e 100098). Flaconi vuoti per analizzatore per il travaso delle soluzioni EA/ED (n. di cat. 100098). Flacone vuoto per analizzatore per il travaso delle soluzioni ED (solo per n. di cat. 1661248).

## Ulteriori materiali necessari (venduti separatamente):

CEDIA Negative Calibrator  
CEDIA Multi-Drug Calibrator, Primary Clinical Cutoffs,  
Secondary Cutoffs, or Optional Cutoffs, (300 ng/ml)  
CEDIA Multi-Drug Intermediate Calibrator  
CEDIA Multi-Drug High Calibrator  
CEDIA Multi-Drug Clinical Control Set, Speciality Control Set or Optional Control Set

## ⚠ Avvertenze e precauzioni

**PERICOLO:** il reagente in polvere contiene  $\leq 56\%$  p/p di albumina sierica bovina (BSA) e  $\leq 2\%$  p/p di sodio azide. I reagenti liquidi contengono  $\leq 1,0\%$  di siero bovino,  $\leq 0,3\%$  di sodio azide e  $\leq 0,1\%$  di anticorpo specifico del farmaco (topo).

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

H334 - Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.

EUH032 - A contatto con acidi libera gas molto tossici.

Non respirare polveri, nubi, vapori e spray. Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro. Indossare guanti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. In caso di ventilazione insufficiente utilizzare un apparecchio respiratorio. In caso di contatto con la pelle: lavare abbondantemente con acqua e sapone. IN CASO DI INALAZIONE: se la respirazione è difficile, trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente. Smaltire il prodotto/recipiente nelle apposite aree in conformità alla regolamentazione locale/regionale/nazionale/internazionale.

## Preparazione e conservazione dei reagenti

Estrarre il kit dal frigorifero appena prima della preparazione delle soluzioni. Preparare le soluzioni nel seguente ordine per ridurre al minimo la possibilità di contaminazione:

**Soluzione R2 di donatore enzimatico:** collegare il flacone 2a (reagente per ED) al flacone 2 (tampone di ricostituzione per ED) usando uno degli adattatori forniti. Mescolare capovolgendo delicatamente, assicurandosi che tutto il materiale liofilizzato del flacone 2a si trasferisca nel flacone 2. Evitare la formazione di schiuma. Staccare il flacone 2a e l'adattatore dal flacone 2 e gettarli. Tappare il flacone 2 e lasciarlo riposare per circa 5 minuti a temperatura ambiente (15-25 °C). Mescolare nuovamente. Annotare la data di ricostituzione sull'etichetta del flacone.

**Soluzione R1 di accettore enzimatico:** collegare il flacone 1a (reagente per EA) al flacone 1 (tampone di ricostituzione per EA) usando uno degli adattatori forniti. Mescolare capovolgendo delicatamente, assicurandosi che tutto il materiale liofilizzato del flacone 1a si trasferisca nel flacone 1. Evitare la formazione di schiuma. Staccare il flacone 1a e l'adattatore dal flacone 1 e gettarli. Tappare il flacone 1 e lasciarlo riposare per circa 5 minuti a temperatura ambiente (15-25 °C). Mescolare nuovamente. Annotare la data di ricostituzione sull'etichetta del flacone.

**NOTA 1:** i componenti forniti in questo kit sono previsti per l'uso concomitante. Non mescolare tra loro componenti di lotti diversi.

**NOTA 2:** per evitare la contaminazione crociata dei reagenti, non scambiare tra loro i tappi dei diversi flaconi. La soluzione R2 deve essere di colore giallo arancio. La comparsa di un colore rosso scuro o rosso porpora indica la contaminazione del reagente, che va quindi eliminato.

**NOTA 3:** prima dell'esecuzione del dosaggio, le soluzioni R1 e R2 vanno portate alla temperatura dello scomparto dei reagenti dell'analizzatore. Per ulteriori informazioni, consultare il foglio delle applicazioni relativo all'analizzatore in dotazione.

**NOTA 4:** per garantire la stabilità della soluzione EA ricostituita, non esporla per un periodo prolungato all'azione diretta di forti sorgenti luminose.

Conservare i reagenti a 2-8 °C. **NON CONGELARLI.** Per il periodo di stabilità dei componenti non aperti, vedere la data di scadenza sulla confezione o sulle etichette dei flaconi.

**Soluzione R1:** 60 giorni nello scomparto refrigerato dell'analizzatore oppure in frigorifero a 2-8 °C.  
**Soluzione R2:** 60 giorni nello scomparto refrigerato dell'analizzatore oppure in frigorifero a 2-8 °C.

## Prelievo e trattamento dei campioni

Prelevare i campioni di urina in contenitori di plastica o vetro.

I campioni mantenuti a temperatura ambiente che non vengono inizialmente analizzati entro 7 giorni<sup>10</sup> dall'arrivo in laboratorio devono essere riposti in un'unità di refrigerazione sicura a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C fino a un massimo di due mesi.<sup>11</sup> La conservazione dei campioni di urina per periodi più lunghi prima o dopo l'analisi deve essere effettuata a una temperatura di -20 °C.<sup>11,12</sup>

I laboratori che seguono le linee guida obbligatorie SAMHSA devono fare riferimento ai requisiti SAMHSA "Short-Term Refrigerated Storage" (Conservazione refrigerata a breve termine) e "Long-Term Storage" (Conservazione a lungo termine).<sup>13</sup>

Per proteggere l'integrità del campione, non indurre la formazione di schiuma ed evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti. Cercare di ottenere campioni pipettati senza detriti di grandi dimensioni. Si raccomanda di centrifugare i campioni notevolmente torbidi prima dell'analisi. I campioni congelati devono essere scongelati e miscelati prima dell'analisi. L'adulterazione del campione di urina può portare a risultati errati. Se si sospetta un'adulterazione del campione, prelevare un altro e inoltrare entrambi i campioni al laboratorio per l'analisi.

## Maneggiare tutti i campioni di urina come materiale potenzialmente infettivo.

## Procedura di analisi

Ai fini del presente dosaggio è possibile utilizzare gli analizzatori chimici in grado di mantenere una temperatura costante, pipettare i campioni, miscelare i reagenti, misurare i tassi enzimatici e regolare con precisione i tempi di reazione. Fogli delle applicazioni riportanti i parametri specifici per ciascun analizzatore sono disponibili presso la Microgenics, che fa parte della Thermo Fisher Scientific.

Solo con i kit da 17 ml e da 65 ml vengono fornite etichette con codice a barre supplementari per la determinazione semiquantitativa. A tal fine, apporre l'etichetta corretta sopra l'etichetta già presente sul flacone.

## Controllo di qualità e calibrazione<sup>14</sup>

### Analisi qualitativa

Per esaminare i risultati dell'analisi qualitativa dei campioni, usare il calibratore multi-farmaco, il valore limite principale, i valori limite opzionali o i valori limite secondari. Consultare il foglio delle applicazioni specifico per l'analizzatore in dotazione.

### Analisi semiquantitativa

Per esaminare i risultati dell'analisi semiquantitativa dei campioni, usare il calibratore multi-farmaco, i valori limite clinici primari, i valori limite opzionali o i valori limite secondari insieme al calibratore negativo e ai calibratori multi-farmaco intermedio e alto.

Una buona prassi di laboratorio prevede l'analisi dei controlli parallelamente all'analisi dei campioni dei pazienti e ad ogni calibrazione. Si raccomandano due livelli di controllo: uno 25% al di sopra del limite selezionato e l'altro 25% al di sotto del limite selezionato. Per il controllo di qualità, usare il set di controlli clinici multi-farmaco CEDIA, il set di controlli speciali o il set di controlli opzionali. I calibratori dovrebbero essere rianalizzati se ci fosse un cambiamento nei reattivi oppure se i risultati di controllo si trovassero al di fuori dei limiti stabiliti. Ogni laboratorio deve determinare indipendentemente la frequenza dei suoi controlli. Basare la valutazione del controllo di qualità sui valori ottenuti dai controlli, che devono rientrare entro limiti specifici. Se si riscontrano tendenze marcate o deviazioni improvvise nei valori, riesaminare tutti i parametri operativi. Per ulteriore assistenza, rivolgersi al servizio di assistenza tecnica. Tutti i requisiti di controllo della qualità vanno soddisfatti in conformità alle normative vigenti o ai requisiti per l'accreditamento.

## Risultati e valori attesi

### Risultati qualitativi

Il calibratore multi-farmaco, i valori limite clinici primari, i valori limite opzionali o i valori limite secondari (ciascuno contenente 300 ng/ml di morfina) vengono usati come riferimento per distinguere i campioni positivi da quelli negativi. I campioni che generano un valore di risposta uguale o maggiore rispetto al valore di risposta del calibratore per il valore limite sono considerati positivi. I campioni che generano un valore di risposta inferiore rispetto a quello del calibratore per il valore limite sono considerati negativi. Per ulteriori informazioni, consultare il foglio delle applicazioni relativo all'analizzatore in dotazione.

### Risultati semiquantitativi

Il calibratore multi-farmaco, i valori limite clinici primari, i valori limite opzionali o i valori limite secondari, usati insieme al calibratore negativo e ai calibratori multi-farmaco intermedio e alto, possono essere utilizzati per stimare le concentrazioni relative di oppiati.

Si dovrebbe aver cura quando si annotano i risultati delle concentrazioni in quanto esistono molti altri fattori che possono alterare il risultato del test dell'urina, come l'assorbimento di liquidi e altri fattori biologici.

## Limitazioni

- Un risultato di analisi positivo indica la presenza di oppiati; non indica o misura il livello di intossicazione.
- I semi di papavero possono contenere oppiati. Perciò il consumo di alimentari contenenti semi di papavero può portare ad un risultato positivo.<sup>15,16</sup>
- Esiste la possibilità che altre sostanze e/o fattori non elencati (come ad esempio gli errori tecnici o procedurali) possano interferire con l'analisi e dar luogo a risultati falsi.
- Quando si esegue l'analisi semiquantitativa, i risultati del dosaggio CEDIA Opiate Assay indicano solo in via approssimativa le concentrazioni cumulative del farmaco analizzato.

## Caratteristiche specifiche del rendimento del test

Le caratteristiche di rendimento del test tipiche ottenibili mediante l'analizzatore Hitachi 717 sono riportate qui di seguito.<sup>17</sup> I valori ottenuti nei diversi laboratori possono essere differenti da quelli riportati in questa sede. Per tutti gli altri analizzatori, consultare il foglio delle applicazioni specifico per l'analizzatore in dotazione.

### Precisione

Studi sulla precisione misurata, condotti usando reagenti e calibratori confezionati, hanno dato i seguenti risultati in mA/min con un analizzatore Hitachi 717 mediante la metodica di replicazione NCCLS modificata.

| ng/ml     | Precisione intra-serie |       |       | Precisione totale |       |       |
|-----------|------------------------|-------|-------|-------------------|-------|-------|
|           | 225                    | 300   | 375   | 225               | 300   | 375   |
| n         | 120                    | 120   | 120   | 120               | 120   | 120   |
| $\bar{x}$ | 269,8                  | 316,8 | 361,4 | 269,8             | 316,8 | 361,4 |
| SD        | 4,23                   | 4,54  | 4,84  | 11,38             | 15,04 | 15,27 |
| %CV       | 1,6                    | 1,4   | 1,3   | 4,2               | 4,8   | 4,2   |

## Accuratezza

Seicento campioni di urina sono stati analizzati con il dosaggio CEDIA Opiate Assay sull'analizzatore Hitachi 717 e mediante il dosaggio Syva Emit® II Opiate Assay (metodo di riferimento). Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

|          |   | CEDIA |     |
|----------|---|-------|-----|
|          |   | +     | -   |
| Emit® II | + | 100   | 0   |
|          | - | 3*    | 497 |

Sensibilità 100%  
Specificità 99,4%

\*2 dei 3 campioni sono stati analizzati mediante GC/MS e hanno dato come risultato un contenuto di 227 e 241 ng/ml di morfina totale, rispettivamente. Il terzo campione è stato analizzato seguendo il protocollo semiquantitativo Emit® II e ha dato come risultato una concentrazione di 196 ng/ml. Il campione è stato analizzato mediante GC/MS e ha dato come risultato elevate concentrazioni di imipramina e relativi metaboliti.

## Specificità

I seguenti composti progenitori e metaboliti, quando sono stati analizzati con il dosaggio CEDIA Opiate Assay, hanno dato i seguenti risultati percentuali di reattività crociata:

| Composto              | Reattività crociata (%) |
|-----------------------|-------------------------|
| Morfina               | 100                     |
| Codeina               | 125                     |
| Diacetilmorfina       | 67                      |
| Diidrocodeina         | 62                      |
| Idrocodone            | 59                      |
| Idromorfone           | 66                      |
| Imipramina            | 1,6                     |
| Morfina-3-glucuronide | 94                      |
| Morfina-6-glucuronide | 57                      |
| 6-Monoacetilmorfina   | 81                      |
| Meperidina            | 0,2                     |
| Ossimorfone           | 1,9                     |
| Ossicodone            | 3,1                     |

Le concentrazioni elevate di rifampicina possono portare a falsi risultati positivi. Una concentrazione di 100.000 µg/ml di floxina può portare a un risultato positivo.

Si sono analizzati con il dosaggio CEDIA Opiate Assay anche composti non strutturalmente correlati che, alle concentrazioni qui di seguito elencate, hanno dato risultati negativi.

| Composto               | ng/ml   | Composto                     | ng/ml   |
|------------------------|---------|------------------------------|---------|
| Acetaminofene          | 500.000 | Fenobarbitale                | 500.000 |
| Acido acetilsalicilico | 500.000 | Fluossetina                  | 500.000 |
| Acido salicilurico     | 500.000 | Ibuprofene                   | 500.000 |
| Amoxicillina           | 100.000 | Levotiroxina                 | 50.000  |
| Amfetamina             | 500.000 | Metadone                     | 500.000 |
| Benzoilecgonina        | 500.000 | Metanfetamina                | 500.000 |
| Captoprile             | 500.000 | Nifedipina                   | 500.000 |
| Cimetidina             | 500.000 | Propossifene                 | 100.000 |
| Clordiazepossido       | 100.000 | Ranitidina                   | 500.000 |
| Diazepam               | 100.000 | Secobarbitale                | 500.000 |
| Digossina              | 100.000 | 11-nor- $\Delta^9$ -THC-COOH | 10.000  |
| Enalaprile             | 500.000 | Verapamil                    | 500.000 |
| Fenciclidina           | 500.000 |                              |         |

Non è stata osservata alcuna interferenza dovuta all'aggiunta delle seguenti sostanze alle normali concentrazioni endogene ritrovate nelle urine con il dosaggio CEDIA Opiate Assay.

| Sostanza               | Concentrazione | Sostanza       | Concentrazione |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Acetone                | ≤ 1,0 g/dl     | Etanolo        | ≤ 1,0 g/dl     |
| Acido ascorbico        | ≤ 1,5 g/dl     | Galattosi      | ≤ 10 mg/dl     |
| Acido ossalico         | ≤ 0,1 g/dl     | Gammaglobulina | ≤ 0,5 g/dl     |
| Albumina sierica umana | ≤ 0,5 g/dl     | Glucosio       | ≤ 3,0 g/dl     |
| Cloruro di sodio       | ≤ 6,0 g/dl     | Riboflavina    | ≤ 7,5 mg/dl    |
| Creatinina             | ≤ 0,5 g/dl     | Urea           | ≤ 6,0 g/dl     |
| Emoglobina             | ≤ 0,3 g/dl     |                |                |

#### Sensibilità

Per l'applicazione qualitativa, il limite di rilevamento (LOD) è stato di 21,6 ng/ml.

#### Bibliografia

- Hawks RL. Analytical methodology. In: Hawks RL, Chiang CN, eds. Urine Testing for Drugs of Abuse. NIDA Research Monograph. 1986;73:30-41.
- Balant LP, Balant-Gorgia AE. Opium and its derivatives. Clin Ther. 1992;14:846-848.
- Baselt RC, Cravey RH. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 4th ed. Foster City, Calif: Chemical Toxicology Institute; 1995.
- Glare PA, Walsh TD. Clinical pharmacokinetics of morphine. Ther Drug Monit. 1991;13:1-23.
- Cone EJ, Welch P, Paul BD, Mitchell JM. Forensic drug testing for opiates, III. Urinary excretion rates of morphine and codeine following codeine administration. J Anal Toxicol. 1991; 15 :161-166.
- Cone EJ, Welch P, Mitchell JM, Paul BD. Forensic drug testing for opiates, I. Detection of 6-acetylmorphine in urine as an indicator of recent heroin exposure; drug and assay considerations and detection times. J Anal Toxicol. 1991;15:17.
- Mitchell JM, Paul BD, Welch P, Cone EJ. Forensic drug testing for opiates, II. Metabolism and excretion rate of morphine in humans after morphine administration. J Anal Toxicol. 1991;15:49-53.
- Hasselström J, Säwe J. Morphine Pharmacokinetics and Metabolism in Humans: Enterohepatic cycling and relative contribution of metabolites to active opioid concentrations. Clin Pharmacokinet. 1993;24:344-354.
- Henderson DR, Friedman SB, Harris JD, et al. CEDIA, a new homogeneous immunoassay system. Clin Chem. 1986; 32:1637-1641.
- Ciuti R, Quercioli M, Borsotti M. Stabilità delle principali droghe d'abuso in campioni di urine non trattate rispetto a campioni di urine stabilizzate. *Biochimica Clinica* 2014, vol. 38, n. 2.
- Gonzales E, Ng G, Pesce A, West C, West R, Mikel C, Llaatyshev, S, Almazan P. Stability of pain-related medications, metabolites and illicit substances in urine. *Clinica Chimica Acta* 416: (2013) 30-35.
- C52-A2, Toxicology and Drug Testing in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Second Edition, *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* (April 2007).
- Notice of Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Program: Final Guidelines; Federal Register*, Substance Abuse and Mental Health Administration (SAMHSA), (1994) 110 (June 9):11983.
- Dati sulla tracciabilità sono disponibili presso la Microgenics Corporation, che fa parte della Thermo Fisher Scientific.
- Hayes LW, Krasselt WG, Mueggler PA. Concentrations of morphine and codeine in serum and urine after ingestion of poppy seeds. Clin Chem. 1987; 33:806-808.
- Struempfer RE. Excretion of codeine and morphine following ingestion of poppy seeds. J Anal Toxicol. 1987;11:97-99.
- Dati disponibili presso la Microgenics Corporation, che fa parte della Thermo Fisher Scientific.

#### Glossario:

<http://www.thermofisher.com/symbols-glossary>



Microgenics Corporation  
46500 Kato Road  
Fremont, CA 94538 USA  
Assistenza tecnica e assistenza  
alla clientela negli USA:  
1-800-232-3342



B-R-A-H-M-S GmbH  
Neuendorfstrasse 25  
16761 Hennigsdorf, Germany



Per gli aggiornamenti del foglietto illustrativo, visitare:  
[www.thermofisher.com/diagnostics](http://www.thermofisher.com/diagnostics)

#### Altri paesi:

consultare il rappresentante Thermo Fisher Scientific di zona.