ARK Diagnostics, Inc.

ARK *Methotrexate II Assay*

Il est impératif de lire attentivement la présente notice ARK Diagnostics, Inc. relative au produit ARK Methotrexate II Assay avant toute utilisation. Les instructions de cette notice doivent être suivies scrupuleusement. La fiabilité des résultats du dosage ne peut pas être garantie en cas de non-respect de ces instructions.

Tout incident grave lié à l'utilisation de ce dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente, le cas échéant. Un résumé des données de sécurité et de performance est disponible via Eudamed (base de données européenne sur les dispositifs médicaux), réf. : US-MF-000023925.

Service clientèle

ARK Diagnostics, Inc.

48089 Fremont Blvd

Fremont, CA 94538 États-Unis
Tél. : 1-877-869-2320
Fax : 1-510-270-6298
customersupport@ark-tdm.com

www.ark-tdm.com

CE
2797

EC REP
Emergo Europe
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
Pays-Bas

CH REP
MedEnvoy Switzerland
Gotthardstrasse 28
6302 Zug
Switzerland

Légende des symboles utilisés

LOT	Code de lot	JJ/MM/AAAA	Utiliser avant le/Date d'expiration
REF	Référence catalogue		Fabricant
EC REP	Représentant autorisé	CE 2797	Marquage CE avec numéro de l'organisme notifié
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Limite de température
	Consulter les instructions d'utilisation	R1 R2	Réactif 1/Réactif 2
Rx Only	Pour utilisation sur prescription uniquement		

© 2025, ARK Diagnostics, Inc. **Kit de réactif h 5071-0001-00, 5071-0001-01**

1 Dénomination

ARK ***Methotrexate II Assay***

2 Utilisation prévue

ARK Methotrexate II Assay est un essai immunologique enzymatique homogène destiné à la détermination quantitative de méthotrexate dans le sérum ou le plasma humain sur les analyseurs de biochimie clinique automatisés. Les mesures obtenues permettent de surveiller les niveaux de méthotrexate afin de vérifier que le traitement est approprié.

Les prélèvements effectués sur des patients ayant reçu de la glucarpidase (carboxypeptidase G2) comme antidote électif dans le cadre d'une thérapie au méthotrexate à haute dose ne doivent pas être testés à l'aide du produit ARK Methotrexate II Assay.

3 Résumé et explication du test

Le méthotrexate (acide [N-[4-[[(2,4-diamino-6-pteridinyl) méthyl]méthylamino] benzoyl]-L-glutamique]), anciennement améthoptérine, est un antimétabolite utilisé dans le traitement de certaines maladies néoplasiques, de certains cas de psoriasis sévère, et de la polyarthrite rhumatoïde chez l'adulte.[1-3] Le méthotrexate présente un degré de toxicité élevé. Les patients sous traitement par méthotrexate doivent faire l'objet d'une surveillance étroite afin de détecter rapidement les effets toxiques.

La surveillance du méthotrexate est couramment utilisée chez les patients recevant un traitement à forte dose de méthotrexate pour le cancer ; les résultats sont utilisés pour guider le traitement de soutien pendant que le méthotrexate est éliminé par les reins. Il est primordial de consulter les directives relatives à l'application d'une thérapie au méthotrexate en employant la leucovorine comme antidote électif.[1,4] La pratique consistant à alterner l'administration de doses importantes de méthotrexate (environ 35 mg/m^2 - 12 g/m^2) et de leucovorine (facteur citrovorum) comme antidote électif a permis d'obtenir de bons résultats dans le cas des traitements contre les ostéosarcomes, la leucémie, les lymphomes malins non hodgkiniens et les cancers des poumons et du sein.[5-9]

4 Principes de la procédure

ARK Methotrexate Assay II est un essai immunologique enzymatique homogène. Le système de dosage utilise des anticorps spécifiques qui peuvent se lier au méthotrexate. Il est basé sur la concurrence entre un médicament marqué au recombinant glucose-6-phosphate déshydrogénase (rG6PDH) et un médicament libre dans l'échantillon qui vont saturer les sites de fixation des

anticorps spécifiques. En l'absence de médicament libre dans l'échantillon, l'anticorps anti-méthotrexate monoclonal du lapin se lie au médicament marqué au rG6PDH et provoque une diminution de l'activité enzymatique.
En présence de médicament dans l'échantillon, l'activité enzymatique augmente et est directement liée à la concentration médicamenteuse. L'enzyme active convertit la coenzyme nicotamide-adénine-dinucléotide (NAD) en NADH qui est mesurée par spectrophotométrie en tant que taux de variation d'absorption. Le sérum endogène G6PDH n'interfère pas avec les résultats car la coenzyme NAD réagit uniquement avec l'enzyme bactérienne utilisée pour l'essai.

5 Réactifs

RÉF.	Description du produit	Quantité/Volume
5071-0001-00	**ARK Methotrexate II Assay** **Réactif R1– Anticorps/substrat** Anticorps monoclonal du lapin au méthotrexate, glucose-6-phosphate, nicotamide-adénine-dinucléotide, albumine de sérum bovin, azoture de sodium et stabilisateurs	1 x 16 ml
	Réactif R2– Enzyme Méthotrexate marqué à l'enzyme rG6PDH bactérienne, tampon, albumine de sérum bovin, azoture de sodium et stabilisateurs	1 x 8 ml
5071-0001-01	**ARK Methotrexate II Assay** **Réactif R1 – Anticorps/substrat** Anticorps monoclonal du lapin au méthotrexate, glucose-6-phosphate, nicotamide-adénine-dinucléotide, albumine de sérum bovin, azoture de sodium et stabilisateurs	1 X 28 mL
	Réactif R2 – Enzyme Méthotrexate marqué à l'enzyme rG6PDH bactérienne, tampon, albumine de sérum bovin, azoture de sodium et stabilisateurs	1 X 14 mL

Manipulation et stockage des réactifs

Les réactifs ARK Methotrexate II Assay sont fournis sous forme liquide, prêts à l'emploi, et peuvent être utilisés dès la sortie du réfrigérateur. Lorsqu'ils ne sont pas utilisés, les réactifs doivent être stockés à une température comprise entre 2 et 8 °C (36 et 46 °F), en position verticale et avec les bouchons à vis correctement fermés. S'ils sont stockés dans les conditions indiquées, les réactifs restent stables jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette. Ne pas congeler les réactifs. Éviter toute exposition prolongée à des températures supérieures à 32 °C (90 °F). **Le stockage incorrect des réactifs peut affecter les performances du système de dosage.**

Les produits ARK Methotrexate II ont une teneur en azoture de sodium ≤0,09 %. Par mesure de précaution, la tuyauterie et l'instrumentation doivent être correctement rincées à l'eau afin de limiter l'accumulation éventuelle d'azotures

métalliques explosifs. Aucune manipulation spéciale n'est requise concernant les autres composants du système de dosage.

6 Avertissements et précautions

- Pour un usage professionnel en laboratoire « **diagnostic in vitro** ».
- Pour utilisation sur prescription uniquement. *Attention : Selon la loi fédérale américaine, ce dispositif ne peut être utilisé que par un médecin ou sur demande d'un médecin.*
- Les réactifs R1 et R2 sont fournis ensemble et ne doivent pas être interchangés avec des réactifs provenant de numéros de lot différents.
- Les réactifs ont une teneur en azoture de sodium ≤0,09 %.
- Le dosage doit uniquement être utilisé sur la base des informations obtenues suite aux évaluations cliniques et autres procédures de diagnostic.

7 Prélèvement et préparation des échantillons pour analyse

- Il incombe à chaque laboratoire de fournir un échantillon valide pour analyse conformément à ses procédures qualité.
- Il est nécessaire de disposer de sérum ou de plasma. Par souci de cohérence, il est recommandé d'utiliser la même matrice d'échantillon pour chaque patient.
- L'heure du prélèvement du méthotrexate dépend de la dose administrée, de la durée de la perfusion et de l'état clinique du patient. Consulter les protocoles de traitement spécifiques pour déterminer l'heure de prélèvement.
- Il n'est pas possible d'utiliser du sang total. Les anticoagulants suivants peuvent être utilisés avec ce système de dosage.
    - Héparine de sodium
    - Héparine de lithium
    - EDTA de potassium
- Le prélèvement sanguin doit être effectué à l'aide de tubes compatibles avec le suivi thérapeutique pharmacologique (STP).
- Suivre les recommandations du fabricant du tube de prélèvement pour le prélèvement, le traitement et la centrifugation.
- Le document GP44-A4 du CLSI décrit les procédures à suivre pour réduire les artefacts dus au prélèvement et à la manipulation des échantillons pour les tests de laboratoire courants.[10]
- Éviter la formation de mousse et les cycles de congélation/décongélation répétés afin de préserver l'intégrité de l'échantillon entre son prélèvement et son analyse.
- La fibrine, les globules rouges et autres particules peuvent entraîner un résultat erroné. Assurer une centrifugation adéquate.
- La présence de bulles ou de mousse sur les échantillons peut entraîner un prélèvement insuffisant d'échantillon et des résultats erronés.

- Chaque laboratoire doit consulter la documentation disponible et les données internes concernant la stabilité de l'échantillon.
- D'après les études réalisées par ARK Diagnostics, les échantillons clarifiés peuvent être stockés jusqu'à une semaine à une température comprise entre 2 et 8 °C selon les données de référence. Si les tests sont différés à plus d'une semaine, les échantillons doivent être stockés congelés (≤ 10 °C) jusqu'à quatre semaines avant d'être testés. Des précautions doivent être prises afin de limiter le nombre de cycles de congélation/décongélation ; les données de référence ne montrent aucun impact négatif sur trois cycles de congélation/décongélation.
- **Manipuler tous les échantillons de patient comme s'ils étaient potentiellement infectieux.**

8 Procédure

Matériel fourni
ARK Methotrexate II Assay – **RÉF.** 5071-0001-00, 5071-0001-01

Matériel requis – Fourni séparément
ARK Methotrexate II Calibrator – **RÉF.** 5071-0002-00
Contrôles qualité – ARK Methotrexate II Control – **RÉF.** 5071-0003-00
Contrôles qualité – ARK Methotrexate II Control – **RÉF.** 5071-0003-01
Contrôles qualité – ARK Methotrexate II Control – **RÉF.** 5071-0003-02
ARK Methotrexate II Dilution Buffer – **RÉF.** 5071-0004-00

Instruments
Il peut s'avérer nécessaire de transférer les réactifs R1 et R2 dans les flacons de réactif spécifiques à l'analyseur avant utilisation. Éviter toute contamination croisée de R1 et R2.

De nombreux analyseurs de biochimie clinique automatisés avec détermination du taux photométrique à 340 nm conviennent. Consulter la fiche de l'application spécifique à l'analyseur pour la programmation du système de dosage ARK Methotrexate II Assay, disponible auprès du distributeur ou du service clientèle ARK. Les fiches de protocole d'application qui ont été classées CLIA (essai immunologique par chimiluminescence) ou qui ou portent le marquage CE ont été vérifiées par le fabricant. Il incombe au laboratoire d'effectuer toutes les validations appropriées pour l'utilisation du dosage avec d'autres paramètres ou analyseurs

Consulter le manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument pour son entretien quotidien.

Séquence de dosage
Pour effectuer ou étalonner le dosage, consulter le manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument.

Étalonnage
Effectuer une procédure d'étalonnage complète (6 points) en utilisant ARK Methotrexate II Calibrator A, B, C, D, E et F ; calibrateurs en double. Un étalonnage est nécessaire pour chaque nouveau numéro de lot de kit de réactifs. Vérifier la courbe d'étalonnage sur au moins deux niveaux de contrôle qualité conformément au plan d'assurance qualité de laboratoire établi.

Quand procéder au réétalonnage
- Chaque fois qu'un nouveau numéro de lot de réactifs est utilisé
- Chaque fois que les résultats de contrôle qualité l'exigent
- Chaque fois que les protocoles de laboratoire standard l'exigent

Contrôle qualité
Les laboratoires doivent établir les procédures de contrôle qualité pour le produit ARK Methotrexate II Assay. Tous les contrôles qualité requis et les tests doivent être réalisés conformément aux réglementations locales, nationales et/ou fédérales ou aux conditions d'accréditation.

Les bonnes pratiques de laboratoire suggèrent qu'au moins deux niveaux (critères de décision médicale supérieur et inférieur) de contrôle qualité soient testés chaque jour où des prélèvements patient sont analysés et chaque fois qu'un étalonnage est effectué. Surveiller les valeurs de contrôle afin d'identifier les tendances ou variations éventuelles. Si des tendances ou variations sont identifiées, ou si les valeurs ne se situent pas dans la plage spécifiée, examiner tous les paramètres de fonctionnement conformément aux procédures qualité clinique du laboratoire. Contacter le service clientèle pour obtenir de l'aide.

Protocole de dilution manuelle
Pour estimer les niveaux de médicament dans les échantillons dépassant la limite de quantification supérieure, diluer manuellement l'échantillon avec le produit ARK Methotrexate II Dilution Buffer. Multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.

$$\text{Facteur de dilution manuelle} = \frac{\text{(Volume d'échantillon + Volume de tampon de dilution)}}{\text{Volume d'échantillon}}$$

Une plage de dosage étendue a été validée jusqu'à 1200 µmol/l par des dilutions d'échantillons en série 1:10 de 1:10, 1:100 ou 1:1000 selon les besoins.

9 Résultats

Consigner les résultats en µmol/l ou µg/ml. Pour convertir les résultats exprimés en µmol/l en unités µg/ml, diviser la valeur obtenue par le facteur de conversion 2,2005. La valeur de méthotrexate obtenue doit être utilisée en complément des autres informations cliniques. Consulter le manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument pour les codes d'erreur de résultat éventuels.

10 Limites de la procédure

Cet essai est conçu pour être utilisé avec du sérum ou du plasma uniquement ; consulter la section **Prélèvement et préparation des échantillons pour analyse**. Il est généralement recommandé d'utiliser systématiquement la même méthode (et la même matrice) pour les soins individuels apportés aux patients en raison des risques de variabilité d'une méthode à une autre. Consulter la section **Valeurs attendues** ci-après.

IMPORTANT : Les prélèvements effectués sur des patients ayant reçu de la glucarpidase (carboxypeptidase G2) comme antidote électif dans le cadre d'une thérapie au méthotrexate à haute dose ne doivent pas être testés à l'aide du produit ARK Methotrexate II Assay. Ces prélèvements présentent des niveaux de sérum plus élevés d'acide 4-[[2,4-diamino-6-(ptéridinyl)méthyl]-méthylamino]-benzoïque (DAMPA)[11-13] résultant du métabolisme du méthotrexate par la glucarpidase. Le DAMPA interagit avec l'anticorps de méthotrexate utilisé pour le test, et peut continuer à circuler pendant au moins cinq à sept jours avant que des mesures précises de méthotrexate puissent être obtenues.[14] Les oncologues de l'équipe clinique doivent signaler l'administration de glucarpidase au laboratoire afin que des concentrations de méthotrexate anormalement élevées ne soient pas relevées, concentrations qui seraient le résultat d'une interférence avec le DAMPA et qui amoindriraient les effets d'une thérapie à la glucarpidase.[14] Bien que la glucarpidase soit bien tolérée et réduise rapidement le MTX circulant, le retardement de l'élimination du MTX par voie rénale peut être un problème chez les adultes et les patients plus âgés.[15]

11 Valeurs attendues

Les taux sériques de méthotrexate dépendent des indications d'utilisation, de la posologie, du mode d'administration, du schéma thérapeutique, de la pharmacocinétique individuelle, du métabolisme et d'autres facteurs cliniques.[1,3] Alors que le taux sérique peut généralement atteindre environ 10 à 100 µmol/l dans le traitement du cancer du sein (par exemple),[16] les concentrations peuvent dépasser 1000 µmol/l[17] dans le cas d'une thérapie à haute dose contre l'ostéosarcome, et des niveaux jusqu'à 3100 µmol/l de méthotrexate ont été atteints après une perfusion de 4 heures chez des patients pédiatriques atteints d'ostéosarcome.[18] Pour le traitement de l'ostéosarcome,[17] la courbe de décroissance du méthotrexate présente d'importantes variations : 24 heures, 30

à 300 µmol/l ; 48 heures, 3 à 30 µmol/l ; et 72 heures, moins de 0,3 µmol/l. Une dose de 10 mg de leucovorine est généralement administrée par voie intraveineuse 24 heures après le début de la perfusion de MTX. Les doses suivantes sont ajustées et administrées en fonction des taux de MTX obtenus après 24, 48 et 72 heures. Des taux de méthotrexate supérieurs à 50 µmol/l après 24 heures, 10 µmol/l après 48 heures et 0,5 µmol/ après 72 heures indiquent une toxicité potentielle et sont généralement corrigés par une augmentation de la dose de leucovorine conformément aux algorithmes jusqu'à ce que le taux de MTX soit inférieur à 0,1 µmol/l. Les directives relatives à l'application d'une thérapie au méthotrexate en employant la leucovorine comme antidote électif recommandent généralement l'utilisation continue de la leucovorine jusqu'à ce que le taux de méthotrexate soit inférieur à 0,05 µmol/.[1, 4] Certains centres vont jusqu'à un taux ≤ 0,10 µmol/l.[17, 19]

À partir de la prescription ou toute autre information : Indicateurs de toxicité suivant les programmes d'utilisation de leucovorine comme antidote électif avec des doses élevées de méthotrexate.[1, 4, 20]

Situation clinique	**Résultats de laboratoire**	
	Taux de méthotrexate (µmol/l)	**Nombre d'heures après l'administration**
Élimination normale de méthotrexate	~10 ~1 <0,2	24 48 72
Élimination lente de méthotrexate différée	>0,2 >0,05	72 96
Élimination rapide de méthotrexate différée et/ou Signe de problème rénal aigu	≥50 ≥5 OU Hausse d'au moins 100 % de la créatinine dans le sérum	24 48 24

La toxicité rénale est un risque important qui peut être exacerbé par l'administration concomitante d'autres médicaments,[15, 20] comme la vancomycine par exemple.[21] D'autres formes de toxicité peuvent apparaître, notamment des troubles digestifs (nausées, vomissements, douleurs abdominales), des affections cutanées des muqueuses (et particulièrement la mucosite), des anomalies hématologiques (neutropénie et thrombocytopénie), des troubles des fonctions du foie et une certaine neurotoxicité.[22-29]

Compte tenu du profil de l'aspect du métabolite 7-hydroxyméthotrexate,[16, 28] son rapport molaire au méthotrexate pouvant atteindre jusqu'à 100 fois,[30] et une insolubilité relative en comparaison au médicament mère,[15, 20] une possible néphrotoxicité causée par la précipitation du métabolite dans les tubules rénaux[30] peut retarder l'élimination du méthotrexate lui-même.

Un traitement à la glucarpidase réduit rapidement le niveau de circulation du méthotrexate, et non celui du médicament intracellulaire. Un effet rebond sur le taux sérique de méthotrexate après un traitement par glucarpidase a été observé.[15] L'élimination du DAMPA peut durer plusieurs jours avant que ce dernier ne cesse d'interférer avec la surveillance du méthotrexate par essai immunologique.[14]

12 Caractéristiques de performance spécifiques

Il incombe à chaque laboratoire de vérifier les performances à l'aide des paramètres d'instrument établis pour son analyseur. Les caractéristiques de performance figurant dans cette section ont été obtenues sur l'analyseur de biochimie clinique automatisé Beckman Coulter AU680®.

Sensibilité

Limite de quantification (LDQ)

La LDQ du produit ARK Methotrexate II Assay a été déterminée conformément au protocole EP17-A2 du CLSI et définie comme la concentration la plus faible pour laquelle une précision (≤0,010 d'écart-type) et une récupération (±0,010 µmol/l de la valeur nominale) acceptables entre les dosages sont observées. La LDQ a été fixée à 0,030 µmol/l et peut dépendre des performances spécifiques de l'analyseur.

Concentration nominale (µmol/l)	Moyenne générale (µmol/l)	Écart-type	CV (%)
0,030	0,034	0,002	4,87
0,040	0,043	0,002	4,01
0,050	0,052	0,003	4,00

Plage de mesure

La plage de mesure analytique du système de dosage ARK Methotrexate II Assay s'étend de 0,030 à 1,300 µmol/l. Les échantillons contenant du méthotrexate à des concentrations plus élevées (>1,300 µmol/l) peuvent être analysés par dilution dans la plage de mesure pour un résultat quantitatif ou être consignés en cas de valeur supérieure à la plage de mesure. Multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution pour obtenir la concentration de méthotrexate dans l'échantillon non dilué. Consigner les résultats inférieurs à cette plage comme étant <0,030 µmol/l ou inférieurs à une LDQ supérieure spécifique à l'analyseur établie dans le laboratoire. Consigner les résultats supérieurs à cette plage comme étant >1,300 µmol/l ou supérieurs à la LDQ supérieure spécifique à l'analyseur établie dans le laboratoire.

Récupération

La précision (récupération analytique) a été vérifiée en ajoutant du méthotrexate concentré dans du sérum humain négatif pour le méthotrexate. Un concentré de méthotrexate haute pureté certifié a été ajouté volumétriquement à du sérum humain négatif pour le méthotrexate, représentant ainsi les concentrations médicamenteuses sur l'ensemble de la plage. Six réplicats de chaque prélèvement ont été testés sur un analyseur de biochimie clinique automatisé. Les résultats ont été moyennés et comparés à la concentration cible, et le pourcentage de récupération a été calculé. Les résultats sont présentés ci-après.

$$\% \text{ de récupération} = 100 \times \frac{\text{Concentration récupérée moyenne}}{\text{Concentration théorique}}$$

Concentration théorique (µmol/l)	**Concentration récupérée moyenne (µmol/l)**	**Pourcentage de récupération**
0,060	0,063	104,4
0,100	0,105	105,2
0,300	0,322	107,2
0,600	0,628	104,7
1,000	1,079	107,9
1,200	1,293	107,8

Linéarité

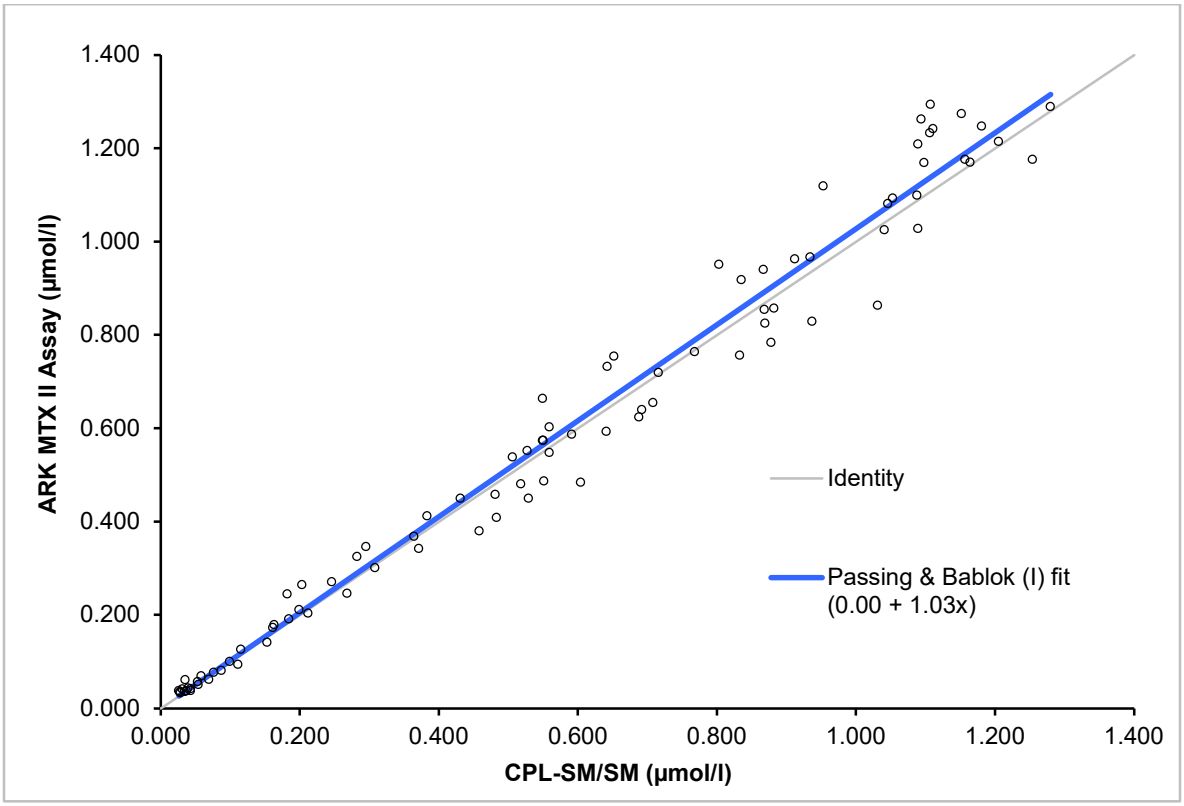
Des études de linéarité ont été réalisées selon le protocole EP06-Ed2 du CLSI. Un prélèvement sérique de 1,600 µmol/l a été préparé et des dilutions ont été effectuées proportionnellement au sérum humain négatif pour le méthotrexate. Les concentrations en méthotrexate s'étendaient de 0,030 à 1,300 µmol/l. Une relation linéaire a été démontrée entre 0,030 et 1,300 µmol/l. Les résultats sont présentés ci-après.

Concentration nominale (µmol/l)	Résultats observés (µmol/l)	Résultats prévus (µmol/l)	Différence (%)
0,000	0,000	S.O.	S.O.
0,030	0,035	0,033	5,78
0,060	0,062	0,065	-4,96
0,130	0,129	0,141	-8,73
0,260	0,296	0,283	4,66
0,390	0,399	0,424	-5,98
0,520	0,549	0,565	-2,89
0,650	0,721	0,707	2,07
0,780	0,877	0,848	3,36
0,910	1,012	0,989	2,32
1,040	1,157	1,131	2,34
1,170	1,261	1,272	-0,87
1,300	1,380	1,413	-2,40

Comparaison des méthodes

Des études de corrélation ont été réalisées selon le protocole EP9-A3 du CLSI. Les mesures de méthotrexate dans du sérum humain (chez des patients traités par méthotrexate à haute dose) à l'aide du produit ARK Methotrexate II Assay ont été comparées à celles obtenues par chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse en tandem (CPL-SM/SM). Les concentrations en méthotrexate obtenues par les méthodes CPL-SM/SM variaient de 0,026 à 1,280 µmol/l. Les résultats de l'analyse de régression Passing-Bablok[31] pour l'étude sont présentés ci-dessous (avec une limite de confiance de 95 %).

Pente	1,03	(1,00 à 1,06)
Ordonnée	0,00	(-0,01 à 0,01)
Coefficient de corrélation (r^2)	0,98	(0,96 à 0,98)
Nombre d'échantillons	90	



La comparaison des méthodes a été également effectuée par rapport au système de dosage ARK Methotrexate Assay d'origine pour 123 échantillons de patients avec des valeurs de méthotrexate comprises entre 0,054 et 1,168. Les statistiques de l'analyse de régression Passing-Bablok avec des intervalles de confiance sont les suivantes : pente = 0,98 (0,95 à 1,01) ; ordonnée = -0,02 (-0,03 à -0,01) ; et coefficient de corrélation (r^2) = 0,97 (0,96 à 0,98).

Précision

La précision a été déterminée tel que décrit dans le protocole EP5-A3 du CLSI. Tous les six niveaux de contrôle du produit ARK Methotrexate II Control (Faible, Moyen, Élevé, 5, 50 et 500) et les six équivalents d'échantillons de sérum humain mélangé correspondants ont été utilisés dans l'étude. Chaque niveau a été analysé à quatre reprises deux fois par jour pendant 20 jours. Chacun des cycles effectués chaque jour était séparé d'au moins deux heures. Les valeurs en cours

de cycle, d'un jour à l'autre, l'écart-type total et le pourcentage de CV ont été calculés. Les résultats sont présentés ci-après. Critères d'acceptation : ≤10 % CV total

Échantillon	N	Moyenne (µmol/l)	En cours de cycle		D'un jour à l'autre		Total	
			Écart-type	CV (%)	Écart-type	CV (%)	Écart-type	CV (%)
ARK Methotrexate II Control								
FAIBLE	160	0,069	0,002	2,84	0,001	1,23	0,002	3,00
MOYEN	160	0,411	0,006	1,40	0,002	0,43	0,006	1,40
ÉLEVÉ	160	0,811	0,014	1,79	0,008	0,97	0,017	2,05
5	160	4,868	0,070	1,44	0,036	0,74	0,077	1,58
50	160	49,660	1,108	2,23	0,397	0,80	1,141	2,30
500	160	493,769	8,012	1,62	2,483	0,50	8,012	1,62
Sérum humain								
FAIBLE	160	0,070	0,002	2,50	0,001	1,49	0,002	2,88
MOYEN	160	0,404	0,008	1,86	0,003	0,65	0,008	1,92
ÉLEVÉ	160	0,846	0,016	1,93	0,008	0,95	0,017	2,06
5	160	5,247	0,076	1,45	0,028	0,54	0,078	1,49
50	160	51,614	0,723	1,40	0,285	0,55	0,777	1,51
500	160	507,988	7,632	1,50	4,240	0,83	8,538	1,68

Substances interférentes

Des études d'interférence ont été menées selon le protocole EP07-A3 du CLSI. Les concentrations cliniquement élevées des substances potentiellement interférentes suivantes dans le sérum avec niveaux de méthotrexate connus (environ 0,050 et 0,500 µmol/l) ont été évaluées. Chaque prélèvement a été analysé à l'aide de l'essai ARK Methotrexate II Assay, avec un contrôle sérique du méthotrexate. Les mesures de méthotrexate se situaient à ±10 % d'interférence ou ±0,010 µmol/l du contrôle sérique lorsque les concentrations de méthotrexate étaient ≤0,100 µmol/l.

		Résultats	
Substance interférente	**Concentration interférente**	**± µmol/l du contrôle sérique (0,050 µmol/l de méthotrexate)**	**% d'interférence (0,500 µmol/l de méthotrexate)**
Albumine humaine	12 g/dl	0,002	-1,04
Bilirubine - conjuguée	72 mg/dl	0,001	1,96
Bilirubine - non conjuguée	72 mg/dl	0,003	0,23
Cholestérol	500 mg/dl	0,005	3,49
Gammaglobuline humaine	12 g/dl	0,003	2,42
Hémoglobine	1000 mg/dl	-0,006	-2,72
Facteur rhumatoïde	1080 UI/ml	0,001	3,52
Triglycérides	1000 mg/dl	-0,007	7,48
Acide urique	30 mg/dl	0,000	1,60

Spécificité

Les métabolites de méthotrexate, les analogues de folate ainsi que d'autres composés disposant d'une structure similaire ont été testés afin de déterminer si ces composés affectent la quantification des concentrations de méthotrexate lors de l'utilisation du produit ARK Methotrexate II Assay. Des niveaux élevés de ces composés ont été introduits dans les groupes de sérum ne contenant pas de méthotrexate, ou contenant 0,050 µmol/l ou 0,500 µmol/l de méthotrexate. Les échantillons ont été analysés et les concentrations de méthotrexate des échantillons contenant des composés interférents ont été comparées à un contrôle sérique.

Interférence avec le 7-Hydroxyméthotrexate, le principal métabolite

Après l'administration de méthotrexate à forte dose (HDMTX), la concentration en 7-hydroxyméthotrexate du sérum/plasma dépasse généralement celle obtenue quelques heures plus tard. 12 à 48 heures après l'administration de HDMTX, il a été constaté que les niveaux de 7-hydroxyméthotrexate étaient 100 fois supérieurs à ceux de méthotrexate.[16, 28, 30, 32, 34-35]

La réactivité croisée avec le 7-hydroxyméthotrexate a été déterminée pour le produit ARK Methotrexate II Assay en testant à la fois 0,050 et 0,500 µmol/l de méthotrexate dans du sérum humain, mélangé avec 50 µmol/l de 7-hydroxyméthotrexate (facteur 1 000 et 100). La réactivité croisée à ce métabolite était négligeable (moins de 0,01 %). Un ajout important de métabolite 7-hydroxyméthotrexate (facteur 1 000) provoque moins de 10 % d'interférence dans la mesure du méthotrexate dans le test ARK Methotrexate II Assay.

Activité hétérospécifique de l'acide 2,4-diamino-N ^{10}-méthylptéroïque (DAMPA)

En tant que métabolite mineur du méthotrexate, le DAMPA n'est pas censé se trouver à des niveaux de concentrations qui pourraient interférer avec la mesure du méthotrexate.[32] Cependant, en cas d'utilisation de la glucarpidase comme antidote électif lors d'un traitement, la concentration sérique de DAMPA peut être très élevée.[13, 14] Le produit ARK Methotrexate II Assay présente une forte activité hétérospécifique avec le métabolite mineur, le DAMPA. Les tests ont été effectués sans molécule mère de méthotrexate. L'activité hétérospécifique avec le DAMPA variait de 19 % à 58 % sur la base des données observées. Le test ne doit pas être utilisé dans le cadre de traitements à la glucarpidase (carboxypeptidase G2) qui peuvent rapidement transformer le méthotrexate en DAMPA.

Interférence avec les analogues de folate et d'autres composés

Les composés mentionnés ci-après n'ont pas interféré avec l'essai ARK Methotrexate II Assay lors des tests en présence de méthotrexate (±10 % d'interférence à une concentration en méthotrexate de 0,500 µmol/l et ±0,010 µmol/l du contrôle sérique à une concentration en méthotrexate de 0,050 µmol/l). Les concentrations de composés ont été testées selon le protocole EP37 du CLSI.

Composé	**Conc. testée (µmol/l)**
Adriamycine	1000
Cyclophosphamide	2200
Cytosine	1000
Acide dihydrofolique	1000
Acide tétrahydrofolique	1000
DL-6-Méthyl-5,6,7,8-Tétrahydroptérine	1000
Acide folique	1000
Acide folinique	1000
5-Fluorouracile	3000
6-Mercaptopurine	1000
Acide 5-méthyltétrahydrofolique	1000
Prednisolone	1000
Pyriméthamine	1000

Sulfaméthoxazole	1600
Vinblastine	1000
Vincristine	1000
Triméthoprime	150
Triamtérène	25

13 Références

1. Prescribing information. 2011. Methotrexate Injection, USP. Hospira, Inc. Lake Forest, IL.

2. Jonsson, O. G. and Kamen, B. A. 1991. Methotrexate and childhood leukemia. *Cancer Investigation* **9**:53 – 60.

3. Bleyer, W. A. 1978. The clinical pharmacology of methotrexate: New applications of an old drug. *Cancer* **41**:36 – 51.

4. Leucovorin (Fusilev) Prescribing Information. 2020. Acrotech Biopharma LLC, East Windsor, NJ.

5. Saeter, G. et al. 1991. Treatment of osteosarcoma of the extremities with the T-10 protocol, with emphasis on the effects of preoperative chemotherapy with single-agent high-dose methotrexate: A scandinavian sarcoma group study. *Journal of Clinical Oncology* **9**:1766 – 1775.

6. Abromowitch, M. et al. 1988. High-dose methotrexate improves clinical outcome in children with acute lymphoblastic leukemia: St. Jude total therapy study X. *Medical and Pediatric Oncology* **16**:297 – 303.

7. Hann, I. M. et al. 1990. 'MACHO' chemotherapy for stage IV B cell lymphoma and B cell acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *British Journal of Haematology* **76**:359 – 364.

8. Wheeler, C. A. et al. 1991. Cisplatin, continuous infusion 5-fluorouracil, and intermediate dose methotrexate in the treatment of unresectable non-small cell carcinoma of the lung. *Cancer* **67**:892 – 895.

9. Powles, T. J. et al. 1991. A randomized trial comparing combination chemotherapy using mitomycin C, mitozantrone and methotrexate (3M) with vincristine, anthracycline and cyclophosphamide (VAC) in advanced breast cancer. *Br J Cancer* **64**:406 – 410.

10. CLSI. *Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline—Fourth Edition*. CLSI document GP44-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.

11. Chabner, B. A. et al. 1972. Enzymatic cleavage of methotrexate provides a method for prevention of drug toxicity. *Nature* **239**:395 – 397.

12. Widemann, B. C. et al. 1995. Carboxypeptidase-G2 rescue in a patient with high dose methotrexate-induced nephrotoxicity. *Cancer* **76**:521 – 526.

13. Buchen, S. et al. 2005. Carboxypeptidase G2 rescue in patients with methotrexate intoxication and renal failure. *British Journal of Cancer* **92**:480 – 487.

14. Al-Turkmani, M. R. et al., 2010. Difficulty Measuring Methotrexate in a Patient with High-Dose Methotrexate–Induced Nephrotoxicity. *Clin Chem* **56**:1792 – 1796.

15. Prescribing information. 2012. VORAXAZE® (glucarpidase) For Injection, for intravenous use, BTG International Inc. West Conshohocken, PA.

16. Bore, P. et al. 1987. Pharmacokinetics of Methotrexate and 7-Hydroxy-Methotrexate After Methotrexate Infusions. *Cancer Drug Delivery* **4**:177 – 183.

17. Jaffe, N. and Gorlick, R. 2008. High-Dose Methotrexate in Osteosarcoma: Let the Questions Surcease—Time for Final Acceptance. *J Clin Oncol* **26**:4365 – 4366.

18. Colom, H. et al. 2009. Population Pharmacokinetics of High-Dose Methotrexate After Intravenous Administration in Pediatric Patients With Osteosarcoma. *Ther Drug Monit* **31**:76 – 85.

19. Dombrowsky, E. et al. 2011. Evaluating performance of a decision support system to improve methotrexate pharmacotherapy in children and young adults with cancer. *Ther Drug Monit* **33**:99 – 107.

20. Widemann, B. C. and Adamson, P. C. 2006. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* **11**:694 – 703.

21. Blum, R. et al. 2002. Significant impairment of high-dose methotrexate clearance following vancomycin administration in the absence of overt renal impairment. *Annals of Oncology* **13**:327 – 330.

22. Martelli, N. et al. 2011. Methotrexate pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prognostic value? *J Clin Pharm Ther* **36**:237 – 245.

23. Mazanec, D. J. and Grisanti, J. M. 1989. Drug-induced osteoporosis. *Cleve Clin J of Med* **56**:297 – 303.

24. Chessells, J. M. et al. 1990. Neurotoxicity in lymphoblastic leukaemia: Comparison of oral and intramuscular methotrexate and two doses of radiation. *Archives of Disease in Childhood* **65**:416 – 422.

25. Allen, J. C. et al. 1980. Leukoencephalopathy following high-dose IV methotrexate chemotherapy with leucovorin rescue. *Cancer Treat Rep* **64**:1261 – 1273.

26. Jacobs, P. et al. 1991. Methotrexate encephalopathy. *Eur J Cancer* **27**:1061 – 1062.

27. Flombaum, C. D. and Meyers, P. A. 1999. High-Dose Leucovorin as Sole Therapy for Methotrexate Toxicity. *J Clin Oncol* **17**:1589 – 1594.

28. Collier, C. P. et al. 1982. Analysis of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate by high-performance liquid chromatography and preliminary clinical studies. *Ther Drug Monit* **4**:371 – 380.

29. Widemann, B. C. et al. 2010. Glucarpidase, leucovorin, and thymidine for high-dose methotrexate-induced renal dysfunction: clinical and pharmacologic factors affecting outcome. *J Clin Oncol* **28**:3979 – 3986.

30. Erttmann, R. et al. 1985. 7-Hydroxy-Methotrexate and Clinical Toxicity Following High-Dose Methotrexate Therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* **109**:86 – 88.

31. Bablok, W. et al. 1988. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part III. *J. Clin Chem Clin Biochem* **26**:783 – 790.

32. Jacobs, S. A. et al. 1976. 7-Hydroxymethotrexate as a urinary metabolite in human subjects and rhesus monkeys receiving high dose methotrexate. *J Clin Invest* **57**:534 – 538.

33. Wolfrom, C. et al. 1990. Pharmacokinetic study of methotrexate, folinic acid and their serum metabolites in children treated with high-dose methotrexate and leucovorin rescue. *Eur J Clin Pharmacol* **39**:377 – 383.

34. Belz, S. et al. 1994. High-performance liquid chromatographic determination of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, 5-methyltetrahydrofolic acid and folinic acid in serum and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B Biomed Appl* **661**:109 – 118.

35. Breithaupt, H. and Kuenzlen, E. 1982. Pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate following infusions of high dose methotrexate. *Cancer Treat Rep* **66**:1733 – 1741.

14 Marques commerciales

ARK™ est une marque commerciale de ARK Diagnostics, Inc.
Tous les autres noms de marque ou de produit sont des marques commerciales de leurs propriétaires respectifs.

ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 États-Unis

Révisé en mai 2025
1600-1222-00FR Rév. 05