

ARKTM *Levetiracetam Assay*

Lire attentivement avant toute utilisation la présente notice d'emploi du test ARK Diagnostics, Inc. de détection de Levetiracetam et suivre les instructions qui y sont formulées. En cas de non-respect des instructions figurant dans la présente notice d'emploi, la fiabilité des résultats des tests ne peut être garantie.

Service clientèle














ARK Diagnostics, Inc.
 48089 Fremont Blvd
 Fremont, CA 94538 USA
 Tél. : 1-877-869-2320
 Fax : 1-510-270-6298
 customersupport@ark-tdm.com
 www.ark-tdm.com



Emergo Europe
 Prinsessegracht 20
 2514 AP La Haye
 Pays-Bas

Légende des symboles utilisés

	Code de lot	 YYYY-MM-DD	Utiliser avant/ date de péremption
	Numéro de catalogue		Fabricant
	Représentant autorisé		Sigle CE
	Procédé médical pour diagnostic in vitro		Limite de température
	Consulter la notice d'emploi	 	Réactif 1/Réactif 2
Rx Only	Usage réservé à la prescription		

1 Dénomination

ARKTM Levetiracetam Assay

2 Utilisation visée

Le test ARK de détection de Levetiracetam est une analyse immuno-enzymatique en phase homogène destinée à la détermination quantitative de Levetiracetam dans le sérum humain sur des analyseurs automatisés de chimie clinique. Les concentrations de Levetiracetam peuvent être utilisées comme auxiliaire pour la gestion de patients traités au Levetiracetam.

3 Résumé et explication du test

Levetiracetam (KEPPRA[®], (S)- α -éthyl-2-oxo-1-pyrrolidine acétamide) est un anti-convulsivant homologué comme médicament d'appoint dans le traitement de l'épilepsie.¹

4 Principes du procédé

Le test ARK de détection de Levetiracetam repose sur une technique immuno-enzymatique homogène basée sur la compétition entre le médicament contenu dans l'échantillon et le Levetiracetam marqué avec l'enzyme glucose-6-phosphate déhydrogénase (G6PDH) pour liaison sur le réactif anticorps. Lorsque le réactif lie les anticorps, l'activité enzymatique diminue. En présence de médicament provenant de l'échantillon, l'activité enzymatique augmente et se trouve directement proportionnelle à la concentration de médicament. L'enzyme actif convertit la coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) en NADH qui est mesurée par spectrophotométrie comme un taux de modification de l'absorbance. Le sérum endogène G6PDH n'interfère pas avec les résultats, car la coenzyme NAD ne réagit qu'avec l'enzyme bactérienne utilisée dans le test.

5 Réactifs

REF	Description du produit	Quantité/Volume
5024-0001-00	ARK™ Levetiracetam Assay Réactif R1 – Anticorps/substrat Anticorps polyclonaux de lapin au Levetiracetam, glucose-6-phosphate, nicotinamide adénine dinucléotide, albumine de sérum bovin, conservateurs et stabilisateurs	1 X 28 ml
	Réactif R2 – Enzyme Levetiracetam marqué avec du G6PDH bactérien, tampon, albumine de sérum bovin, conservateurs et stabilisateurs	1 X 14 ml

Manipulation des réactifs et conservation

Les réactifs utilisés dans le test ARK de Levetiracetam sont fournis sous forme liquide, prêts à l'emploi et peuvent être utilisés directement à la sortie du réfrigérateur. Lorsqu'ils ne sont pas utilisés, les réactifs doivent être conservés à une température entre 2°C et 8°C (36-46°F), en position verticale avec les capuchons fermement vissés. S'ils sont conservés conformément aux instructions, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Ne pas congeler les réactifs. Éviter toute exposition prolongée à des températures supérieures à 32°C (90°F). **Toute conservation inappropriée des réactifs peut affecter la performance de l'analyse.**

6 Avertissements et précautions

- Pour usage de **diagnostic in vitro**. À utiliser uniquement sur ordonnance.
- Les réactifs **R1** et **R2** sont fournis comme un ensemble assorti et ne doivent pas être interchangeables avec d'autres réactifs provenant de lots différents.

7 Prélèvement des échantillons et préparation pour l'analyse

- Il est nécessaire de disposer de sérum ou de plasma. À des fins de cohérence, il s'est avéré une bonne pratique d'utiliser la même matrice d'échantillonnage pour chaque patient. Un échantillon avec une concentration minimale à l'état d'équilibre (avant dose) est généralement accepté comme tout à fait cohérent pour le contrôle de substances thérapeutiques (TDM). L'heure de la prise de sang depuis la dernière administration de dose doit être notée.

- Le sang entier ne peut être utilisé. Les anticoagulants suivants peuvent être utilisés avec le présent test :
 - Héparine de sodium
 - Héparine de lithium
 - EDTA de potassium
- **Traiter le sang le plus rapidement possible après prélèvement pour préparer le sérum ou le plasma. En effet, le Levetiracetam peut être hydrolysé en présence prolongée de sang entier.**²⁻³
- NE PAS UTILISER DE GEL SÉPARATEUR.
- Afin de préserver l'intégrité de l'échantillon à partir du prélèvement jusqu'à l'analyse, ne pas provoquer la formation de mousse et éviter les congélations et décongélations répétées
- La fibrine, les globules rouges et autres particules de matière peuvent fausser les résultats. Assurer une centrifugation adéquate.
- Les échantillons clarifiés peuvent être conservés jusqu'à une semaine à une température de 2°C à 8°C. Si les tests sont ajournés pendant plus d'une semaine, les échantillons doivent être conservés congelés ($\leq -10^{\circ}\text{C}$) jusqu'à quatre semaines avant d'être testés. Veiller à limiter le nombre de cycles de congélation et décongélation
- **Traiter tous les échantillons provenant de patients comme potentiellement infectieux.**

8 Procédé

Matériel fourni

Test ARK de détection de Levetiracetam – REF 5024-0001-00

Matériel nécessaire – fourni séparément

Calibrateur ARK du test de Levetiracetam – REF 5024-0002-00

Contrôles de qualité – Contrôle ARK du test de Levetiracetam – REF 5024-0003-00

Instruments

Les réactifs R1 et R2 peuvent, avant l'emploi, devoir être transférés dans des conteneurs de réactif adaptés aux analyseurs. Éviter toute contamination croisée de R1 et R2.

Séquence du test

Pour effectuer le test ou bien l'étalonner, se conférer au manuel de l'opérateur spécifique aux instruments.

Étalonnage

Effectuer un étalonnage complet (6-points) en utilisant les calibrateurs ARK du test de Lamotrigine A, B, C, D, E, et F; tester les calibrateurs en double. L'étalonnage est nécessaire pour chaque nouveau numéro de lot de kit de réactifs. Vérifier la courbe d'étalonnage avec au moins deux niveaux de contrôle de qualité, conformément au plan de contrôle de qualité établi du laboratoire. CAL A représente le blanc d'étalonnage.

Quand un nouvel étalonnage est-il nécessaire ?

- Lorsqu'un nouveau numéro de lot de réactifs est en usage,
- Lorsque les résultats de contrôle de qualité le demandent,
- Lorsque les protocoles standards de laboratoire l'exigent.

Contrôle de qualité (CQ)

Les laboratoires doivent fixer des procédures de CQ pour le test ARK de Levetiracetam. Toutes les opérations de contrôle de qualité et de tests doivent être conduites conformément à la réglementation locale, de l'État et/ou fédérale ou aux procédures d'accréditation.

Le code des Bonnes Pratiques de Laboratoire stipule que deux niveaux au moins de contrôle de qualité (points haut et bas de décision médicale) doivent être testés chaque jour où des échantillons de patients sont analysés et chaque fois qu'un étalonnage est effectué. Vérifier les valeurs de contrôle pour détecter des tendances ou des altérations. En cas de détection de tendances ou d'altérations, ou bien si le contrôle ne récupère pas dans la plage de valeurs spécifiée, réviser tous les paramètres opératoires conformément à vos procédures de qualité de laboratoire clinique. Contacter le service clientèle pour une plus ample assistance.

Protocole de dilution manuelle

Afin d'estimer les niveaux de concentration du médicament dans les échantillons dépassant la limite supérieure de quantification, diluer manuellement l'échantillon avec un calibrateur zéro (CAL A). Multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.

$$\text{Facteur de dilution manuelle} = \frac{(\text{Vol. de l'échantillon} + \text{Volume du CAL A})}{\text{Volume de l'échantillon}}$$

9 Résultats

Consigner les unités des résultats en µg/ml ou µmol/l. Pour convertir les résultats de µg/ml en µmol/l de Levetiracetam, multiplier la valeur en µg/ml par 5,88. La valeur de Levetiracetam fournie par ce test doit être utilisée conjointement avec d'autres données cliniques. Pour les codes d'erreur

de résultats, se référer au manuel de l'opérateur spécifique aux instruments.

10 Limitations du procédé

La présente analyse est conçue pour être utilisée uniquement avec du sérum ou du plasma. Se reporter au chapitre **Prélèvement des échantillons et préparation pour le test**. En général, il est de bonne pratique d'utiliser avec cohérence la même méthode (ainsi que la même matrice) pour chaque patient, vu le potentiel de variance d'une méthode à une autre. Se reporter au Chapitre **Valeurs attendues** ci-dessous

11 Valeurs attendues

Une plage de valeurs de référence pour Levetiracetam n'a pas été clairement établie. Des plages de référence provisoires pour le contrôle des crises ont été identifiées. Elles contiennent des concentrations s'étalant de 6 à 46 µg/ml (35 à 270 µmol/l ; échantillons avec les concentrations les plus faibles). Cependant, ces plages de valeurs n'ont pas été validées par des essais appropriés et bien contrôlés, et en général les relations entre ces concentrations sériques et les effets cliniques n'ont pas été clairement définies.⁴⁻⁸ Les concentrations de Levetiracetam doivent toujours être utilisées dans le contexte d'évaluations cliniques et d'autres procédés de diagnostic. Les niveaux de circulation de Levetiracetam (concentrations dans le sérum sanguin) peuvent être affectés par la conformité, la fonction rénale, la grossesse, les interactions médicamenteuses et le moment de la prise d'échantillons. En outre, l'effet clinique de ces concentrations dans le sérum sanguin peut également être altéré par des changements dans l'aggravation de la maladie et par l'addition ou le retrait de médicaments concomitants susceptibles d'exercer une interaction pharmacodynamique avec des niveaux de circulation de Levetiracetam.

La plage de référence des concentrations de médicament citée doit uniquement fixer une limite inférieure en dessous de laquelle une réponse thérapeutique est peu susceptible de se produire, et une limite supérieure au-dessus de laquelle une toxicité est relativement susceptible de se manifester dans la population spécifique de patients étudiée. En général, les cliniciens qui utilisent des plages de référence comme celles-ci doivent savoir que vu la variation individuelle, certains patients peuvent obtenir un bénéfice thérapeutique avec des concentrations sériques de médicament hors de ces plages, et peuvent éprouver une toxicité en présence de niveaux de concentration plus faibles que la limite inférieure de la plage de référence. Il est recommandé de procéder à l'échantillonnage selon un horaire standardisé, de sorte que les concentrations minimum soient

mesurées juste avant l'administration de la prochaine dose, de préférence le matin.

12 Caractéristiques spécifiques de performance

Chaque laboratoire est responsable de la vérification des performances sur la base des paramètres établis pour son propre analyseur. Les caractéristiques de performance suivantes ont été obtenues sur le système Roche/Hitachi 917

Sensitivité

Limite de quantification (LDQ)

La LDQ du test ARK de Levetiracetam a été déterminée conformément à la directive CLSI EP17-A et définie comme la plus basse concentration pour laquelle on observe une précision inter-analyse et une récupération acceptables ($\leq 20\%$ CV avec une récupération de $\pm 15\%$). La LDQ a été fixée à 2,0 µg/ml, et peut dépendre de la performance spécifique de l'analyseur.

Plage de mesures

La plage de mesure du test s'étend de 2,0 à 100,0 µg/ml. Consigner les résultats inférieurs à cette plage ou inférieurs à la LDQ de l'analyseur fixée dans votre laboratoire comme $< 2,0$ µg/ml. Consigner les résultats supérieurs à cette plage comme $> 100,0$ µg/ml ou supérieurs à la LDQ de l'analyseur fixée dans votre laboratoire.

Récupération

La fidélité (récupération analytique) a été vérifiée en ajoutant du Levetiracetam concentré à du sérum humain testé négativement pour le Levetiracetam. Un stock de concentré de Levetiracetam hautement purifié a été ajouté en proportion volumétrique à du sérum humain testé négativement pour le Levetiracetam, et représentant des concentrations de médicament englobant toute la fourchette du test. Six réplicats de chaque échantillon ont été testés sur un analyseur automatique de chimie clinique. Une moyenne des résultats a été établie, comparée à la concentration cible et le pourcentage de récupération calculé. Voir les résultats ci-dessous

$$\% \text{ Récupération} = 100 \times \frac{\text{concentration moyenne récupérée}}{\text{concentration théorique}}$$

Concentration théorique (µg/ml)	Concentration moyenne récupérée (µg/ml)	Pourcentage de récupération
2,0	1,9	95,8
4,0	3,8	94,6
10,0	10,0	100,0
20,0	19,2	95,9
45,0	44,1	98,0
80,0	79,3	99,1
100,0	105,3	105,3

Linéarité

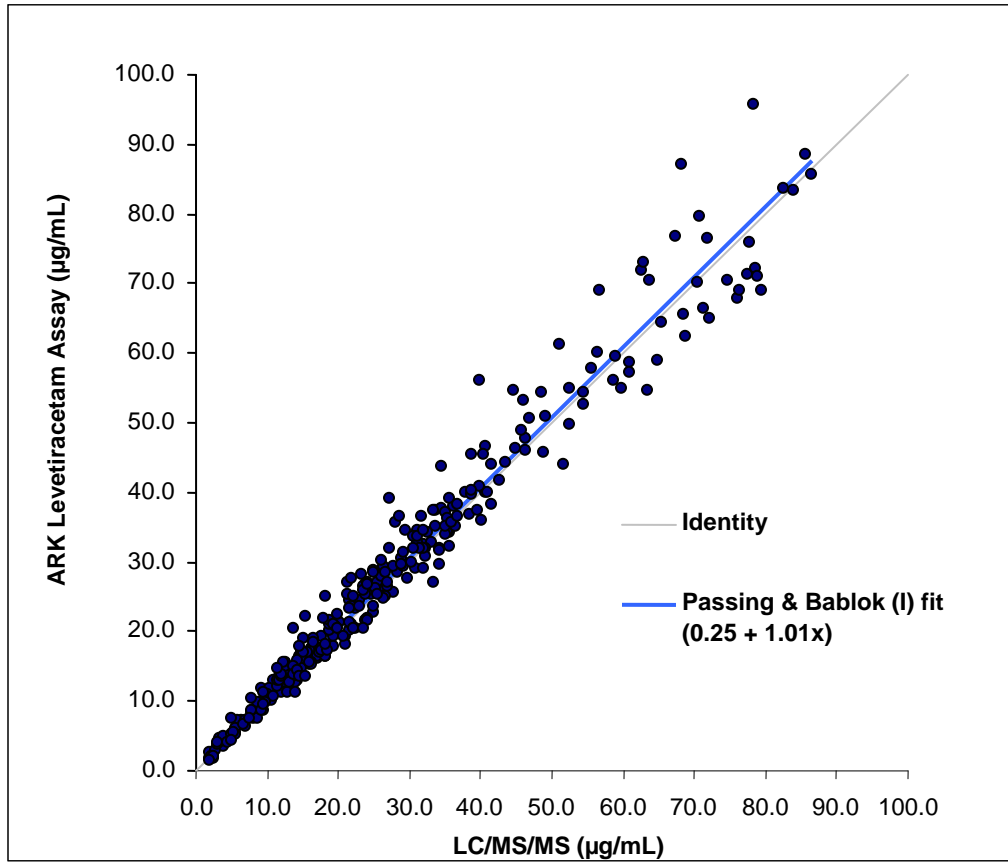
Les études de linéarité ont été effectuées conformément aux suggestions de la directive CLSI/NCCLS protocole EP6-A. Sur un échantillon de sérum préparé de 100,0 µg/ml on a effectué proportionnellement des dilutions avec du sérum humain négatif au Levetiracetam. Les concentrations de Levetiracetam étaient comprises entre 1,0 et 100,0 µg/ml. À des dilutions spécifiques, la linéarité a été considérée comme acceptable si la différence de pourcentage entre les valeurs par régression de 1^{er} et de 2^e ordre prédites était de ±10 % ou ±15 % inférieures à 3,0 µg/ml. Voir les résultats ci-dessous :

Valeur estimée (µg/ml)	Résultats (µg/ml)	Résultats prédits de 1 ^{er} ordre	Résultats prédits de 2 ^e ordre	% Différence
2,0	1,9	2,1	2,4	13,2
3,0	3,2	3,1	3,4	7,6
4,0	4,1	4,2	4,3	4,8
5,0	5,3	5,2	5,3	3,1
6,0	6,4	6,2	6,3	2,0
7,0	7,6	7,2	7,3	1,3
8,0	8,4	8,3	8,3	0,7
9,0	9,5	9,3	9,3	0,3
10,0	10,7	10,3	10,3	-0,1
20,0	20,7	20,6	20,4	-1,3
30,0	31,0	31,0	30,5	-1,4
40,0	41,3	41,3	40,8	-1,2
50,0	51,9	51,6	51,1	-0,9
60,0	60,3	61,9	61,6	-0,5
70,0	71,2	72,2	72,1	-0,1
80,0	81,4	82,5	82,8	0,3
90,0	93,7	92,8	93,5	0,7
100,0	104,6	103,1	104,3	1,2

Comparaison des méthodes

Des études de corrélation ont été effectuées sur la base de la directive CLSI/NCCLS, protocole EP9-A2. Les résultats du test ARK de Levetiracetam ont été comparés aux résultats obtenus avec des méthodes de CL/MS/MS. Les concentrations de Levetiracetam s'étendaient de 2,0 µg/ml à 86,4 µg/ml. Les résultats de l'analyse de régression Passing-Bablok⁹ pour l'étude sont reproduits ci-dessous (avec une limite de confiance de 95 %).

Pente	1,01	(de 0,99 à 1,03)
Ordonnée	0,25	(de - 0,24 à 0,63)
Coefficient de corrélation (r^2)	0,97	(de 0,96 à 0,97)
Nombre d'échantillons	305	



Précision

La précision a été déterminée comme décrit dans la directive CLSI/NCCLS protocole EP5-A2 en utilisant des contrôles à trois niveaux et un pool de trois échantillons de sérum humain contenant du Levetiracetam. Chaque niveau a été évalué en quadruple, deux fois par jour pendant 20 jours. Chacun des cycles journaliers a été effectué à deux heures d'intervalle au moins. L'écart type (SD) et le coefficient de variation (CV) en pourcent ont été calculés pendant le cycle, d'un jour à l'autre et en valeur totale. Critère d'acceptance: $\leq 10\%$ CV.

Échantillon	N	Moyenne ($\mu\text{g/ml}$)	Pendant le cycle		D'un jour à l'autre		Valeurs totales	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Contrôle ARK de Levetiracetam								
BAS	160	7,5	0,25	3,4	0,23	3,2	0,34	4,5
MOYEN	160	29,4	0,85	2,9	0,83	2,8	1,08	3,7
ÉLEVÉ	160	73,4	2,14	2,9	2,03	2,8	3,08	4,2
Sérum humain								
BAS	160	6,9	0,26	3,8	0,22	3,1	0,33	4,8
MOYEN	160	30,2	0,87	2,9	1,10	3,7	1,23	4,1
ÉLEVÉ	160	75,5	2,19	2,9	2,35	3,1	3,31	4,4

Substances interférentes

Des études d'interférence ont été effectuées sur la base de la directive CLSI/NCCLS protocole EP7-A2. Les concentrations élevées d'un point de vue clinique de substances potentiellement interférentes contenues dans le sérum à des taux connus de Levetiracetam (approximativement 3 et 15 $\mu\text{g/ml}$) ont été évaluées. Chaque échantillon a été analysé à l'aide du test ARK de Levetiracetam, étayé par un contrôle de Levetiracetam dans le sérum. L'évaluation du Levetiracetam a donné une erreur de $\leq 10\%$ sur la présence de substances interférentes aux taux testés

Substance interférente	Concentration interférente	Pourcentage de récupération	
		15 µg/ml Levetiracetam	50 µg/ml Levetiracetam
Albumine	12 g/dl	99,8	102,6
Bilirubine - conjuguée	70 mg/dl	100,4	102,1
Bilirubine – non conjuguée	70 mg/dl	99,3	107,9
Cholestérol	535 mg/dl	105,3	94,0
Gammaglobuline	12 g/dl	99,8	109,5
Hémoglobine	1000 mg/dl	98,6	100,9
Intralipid®	1500 mg/dl	97,1	99,8
Facteur rhumatoïde	1100 IU/ml	98,1	106,4
Triglycérides	1033 mg/dl	96,8	100,2
Acide urique	30 mg/dl	99,6	102,5

Spécificité

Le Levetiracetam est hydrolysé dans son métabolite majeur 2-pyrrolidone-*N*-acide butyrique (ucb L057) et dans deux métabolites mineurs.³ D'autres médicaments habituellement administrés avec le Levetiracetam ainsi que d'autres anti-épileptiques ont également été testés, afin de déterminer si ces composés pouvaient influencer la quantification de la concentration de Levetiracetam à l'aide du test ARK. De fortes concentrations de ces composés ont été ajoutées dans des pools de sérum contenant des concentrations thérapeutiques de Levetiracetam faibles (15 µg/ml) et élevées (50 µg/ml). Les échantillons ont été testés et les concentrations de Levetiracetam des échantillons contenant des composés interférents ont été comparées au contrôle sérique

Métabolites

Le métabolite ucb L057 a été testé en vue de sa réactivité croisée.

Métabolite	ucb L057 (µg/ml)	Pourcentage de réact. croisée		Pourcentage d'interférence	
		Levetiracetam 15 µg/ml	Levetiracetam 50 µg/ml	Levetiracetam 15 µg/ml	Levetiracetam 50 µg/ml
ucb L057 :					
2-pyrrolidone- <i>N</i> -acide butyrique	250,0	-0,2	1,3	-3,0	6,6

Interférences médicamenteuses

L'anticorps sélectif du Levetiracetam n'a pas présenté de réaction croisée avec la plupart des anticonvulsivants et autres médicaments testés, administrés en concomitance. Une concentration élevée de chaque composé a été ajoutée à du sérum humain normal présentant des taux connus de Levetiracetam (approximativement 15 et 50 µg/ml) et analysée avec un contrôle sérique de Levetiracetam. L'évaluation du Levetiracetam a donné une erreur ≤10 % quant à la présence de composés du médicament aux taux testés

Composé	Conc. testée (µg/ml)	Pourcent. de récupération	
		15 µg/ml Levetiracetam	50 µg/ml Levetiracetam
Acétaminophène	200	99,3	97,5
Acide acétylsalicylique	1000	103,2	98,9
Amitriptyline	20	98,4	100,7
Caféine	100	95,4	97,7
Carbamazépine	120	101,1	99,7
Clonazépan	50	100,2	100,4
Cyclosporine A	40	99,9	98,4
Diazépan	50	100,3	98,6
Digoxine	40	92,9	100,2
Érythromycine	200	99,0	97,9
Ethosuximide	250	98,1	101,1
Felbamate	250	100,8	97,9
Gabapentine	100	101,3	96,3
Héparine	200 unités/ml	97,0	97,2
Hydrochlorothiazide	20	98,2	98,9
Ibuprofène	500	98,5	99,2
Lamotrigine	250	94,3	102,4
Naproxène	500	99,0	101,3
Nortriptyline	20	99,3	97,8
Oxcarbazépine	50	95,5	100,4
Phénobarbital	200	98,8	99,4

Composé	Conc. testée (µg/ml)	Pourcent. de récupération	
		15 µg/ml Levetiracetam	50 µg/ml Levetiracetam
Phénytoïne	200	97,8	96,8
Primidone	100	97,7	97,3
Probénécide	600	100,5	101,5
Acide salicylique	500	95,1	98,4
Sulfaméthoxazole	400	97,9	96,3
Sulfisoxazole	400	100,6	100,4
Théophylline	250	96,6	101,1
Tiagabine	200	99,0	97,5
Topiramate	250	94,7	99,2
Triméthoprime	40	102,0	99,3
Acide valproïque	500	98,7	96,2
Vérapamil	100	100,3	96,4
Vigabatrine	150	94,0	97,1
Warfarine	250	96,6	102,3
Zonisamide	250	100,3	101,7

13 Références bibliographiques

1. KEPPRA[®] prescribing information (KEPPRA Tablets, KEPPRA XR[™], KEPPRA Oral Solution and KEPPRA Injection), UCB, Inc., Smyrna, GA (www.keppra.com).
2. Patsalos, P. N. et al. 2006. In situ metabolism of levetiracetam in blood of patients with epilepsy. *Epilepsia* **47** :1818-1821.
3. Benedetti, M. S. et al. 2003. Pharmacokinetics and metabolism of ¹⁴C-levetiracetam, a new antiepileptic agent, in health volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* **59** :621-630.
4. Leppik, I. E. et al. 2002. Effective levetiracetam doses and serum concentrations : Age effects. *Epilepsia* **43** (Suppl 7) :240.
5. Johannessen, S. I. et al. 2003. Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit.* **25** :347-363.
6. Splinter, M. Y. 2005. Pharmacokinetic properties of new antiepileptic drugs. *Journal Of Pharmacy Practice* **18** :444-460.

7. Lancelin, F. et al. 2007. Therapeutic drug monitoring of levetiracetam by high-performance liquid chromatography with photodiode array ultraviolet detection : Preliminary observations on correlation between plasma concentration and clinical response in patients with refractory epilepsy. *Ther Drug Monit.* **29** :576-583.
8. Patsalos, P. N. et al. 2008. Antiepileptic drugs – best practice guidelines for therapeutic drug monitoring : A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* **49** :1239-1276.
9. Bablok W, Passing H, Bender R, Schneider B. 1988. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part III. *J. Clin Chem Clin Biochem.* **26**(11) :783-790.

14 Marques déposées

ARKTM est une marque déposée de **ARK** Diagnostics, Inc.

Toutes les autres marques et produits sont des marques commerciales appartenant à leurs compagnies respectives.

Brevet U.S. n°. 8, 168, 756



ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 USA

Imprimé aux USA
Révisé en Février 2017
1600-0169-00FR Rév. 03