


ARK™ Methotrexate Assay












Cette notice d'emploi diffusée par ARK Diagnostics, Inc. et relative au test Méthotrexate, doit être lue attentivement avant toute utilisation. Les instructions détaillées par la notice d'emploi doivent être rigoureusement respectées. La fiabilité des résultats du test ne peut être garantie si les instructions détaillées par cette notice d'emploi ne sont pas respectées.

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


 Emergo Europe
 Prinsessegracht 20
 2514 AP La Haye
 Pays-Bas

Définition des symboles utilisés

	Code de lot	 AAAA-MM- JJ	À utiliser avant le/Date de péremption
	Référence catalogue		Fabricant
	Représentant agréé		Marquage CE
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Limite de température
	Consulter les instructions avant utilisation	 	Réactif 1 Réactif 2
Rx Only	Usage réservé à la prescription		

© 2020, ARK Diagnostics, Inc. Coffret de réactif  5026-0001-00; 5026-0001-02;
5026-0001-03

1 NOM

ARKTM Methotrexate Assay

2 Utilisation prévue

Le test Méthotrexate ARK est un dosage immuno-enzymatique en phase homogène pour la détermination quantitative du méthotrexate dans le plasma ou le sérum humain à l'aide d'analyseurs automatiques de chimie clinique. Les mesures obtenues sont utilisées pour surveiller les niveaux de méthotrexate afin d'assurer une thérapie appropriée.

Les prélèvements effectués sur des patients ayant reçu du 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 test Méthotrexate ARK.

3 Résumé et explications relatifs au test

Le méthotrexate (acide (N-[4-[[[(2,4-diamino-6-pteridiny] 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 l'arthrite rhumatoïde chez l'adulte.¹⁻³ Le méthotrexate présente un degré de toxicité élevé. Les patients qui suivent une thérapie au méthotrexate doivent être étroitement surveillés de façon à détecter rapidement les effets toxiques. Il est primordial de consulter les directives relatives à l'application d'une thérapie au méthotrexate en employant la leucovorine comme antidote électif. Le fait d'alterner l'administration de doses importantes de méthotrexate (approximativement 35 mg/m² – 12 g/m²) et de leucovorine (facteur citrovorum) comme antidote électif a permis d'obtenir de bons résultats dans le cas des traitements contre les sarcomes ostéogènes, la leucémie, les lymphomes malins non hodgkiniens et les cancers des poumons et du sein.⁴⁻⁸

4 Principes de la procédure

Le test Méthotrexate ARK est un dosage immuno-enzymatique en phase homogène basé sur la compétition entre le produit présent dans le prélèvement et le méthotrexate marqué avec l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) pour la fixation au réactif anticorps. L'activité enzymatique décroît à mesure que ce dernier se fixe aux anticorps. En présence du produit contenu dans le prélèvement, l'activité enzymatique, qui est directement proportionnelle au niveau de concentration du médicament, décroît. L'enzyme active transforme la coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) en NADH, qui est

mesurée par spectrophotométrie en tant que taux de variation d'absorbance. Le sérum endogène G6PDH n'a pas d'influence sur les résultats étant donné que la coenzyme NAD interfère uniquement avec l'enzyme bactérienne utilisée pour le test.

5 Réactifs

Référence	Description du produit	Quantité / Volume
5026-0001-00	ARK™ Methotrexate Assay	1 X 16 mL
5026-0001-02	Réactif R1 - Anticorps / Substrat Anticorps polyclonaux de lapin vers méthotrexate, glucose-6-phosphate, nicotinamide adénine dinucléotide, sérum-albumine bovin, agents de conservation et stabilisants	
5026-0001-03	Réactif R2 - Enzyme Méthotrexate marqué au G6PDH bactérien, tampon, sérum-albumine bovin, agents de conservation et stabilisants	

Manipulation et stockage du réactif

Les réactifs du test Méthotrexate ARK sont fournis sous forme liquide, prêts à l'emploi, et peuvent être utilisés directement dès la sortie du réfrigérateur. Lorsqu'ils ne sont pas utilisés, les réactifs doivent être conservés à une température comprise entre 2 et 8°C (36 à 46°F), en position verticale et en prenant soin de fermer correctement les bouchons à vis. S'ils sont stockés conformément aux instructions fournies, les réactifs restent stables jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Ne pas congeler les réactifs. Évitez toute exposition prolongée à des températures supérieures à 32°C (90°F). **Les performances du test peuvent être compromises si les conditions de conservation des réactifs ne sont pas appropriées.**

6 Avertissements et précautions

- Utilisation dans le cadre de **diagnostic in vitro**. Usage réservé à la prescription.
- Les réactifs **R1** et **R2** sont fournis comme un ensemble assorti et ne doivent pas être remplacés par des réactifs appartenant à des lots différents.

7 Préparation et prélèvement des échantillons pour l'analyse

- Du sérum ou du plasma doit être utilisé. Pour une meilleure fiabilité, il est recommandé d'utiliser la même matrice de prélèvement pour chaque patient.
- Le temps d'échantillonnage du méthotrexate dépend de la dose administrée, de la durée de la perfusion et de l'état clinique du patient. Consultez les protocoles de traitement spécifiques pour déterminer le temps de prélèvement.

- Le sang total ne peut être utilisé. Les anticoagulants suivants peuvent être utilisés pour ce test.
 - Héparine sodique
 - Héparine de lithium
 - EDTA de potassium
- Le prélèvement sanguin doit être réalisé à l'aide de tubes de prélèvement compatibles avec les applications de pharmacovigilance thérapeutique.
- Évitez la formation de mousse ainsi que la congélation et décongélation répétée afin de préserver l'intégrité de l'échantillon, depuis son prélèvement jusqu'à son utilisation pour le test.
- La fibrine, les globules rouges et d'autres matières particulières peuvent entraîner des résultats erronés. S'assurer que la centrifugation est correctement réalisée.
- Les prélèvements limpides peuvent être stockés jusqu'à deux semaines à une température comprise entre 2 et 8°C. Si la date du test est repoussée, les prélèvements doivent être congelés pour le stockage ($\leq -10^{\circ}\text{C}$) avant d'être utilisés pour le test. Une attention toute particulière doit être portée afin de limiter le nombre de cycles de congélation et décongélation. Les prélèvements peuvent supporter 3 cycles de congélation et décongélation s'ils sont stockés à une température de -20°C .
- **Manipuler l'ensemble des prélèvements des patients comme s'ils présentaient un risque potentiel de contamination.**

8 Procédure

Équipement fourni

Réactif Méthotrexate ARK - REF 5026-0001-00

Réactif Méthotrexate ARK, Roche® cobas c pack - REF 5026-0001-02

Réactif Méthotrexate ARK, Roche® cobas c pack vert - REF 5026-0001-03

Équipement nécessaire - Fourni séparément

Calibrateur Méthotrexate ARK - REF 5026-0002-00

Contrôles qualité, Contrôle Méthotrexate ARK - REF 5026-0003-00

Tampon de dilution Méthotrexate ARK - REF 5026-0004-00

Instruments

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

Séquence de test

Pour réaliser ou étalonner le test, consulter le manuel de l'opérateur spécifique à chaque instrument.

Étalonnage

Réaliser une procédure d'étalonnage complète (6 points) à l'aide des Calibrateurs méthotrexate ARK A, B, C, D, E, et F ; tester en double les Calibrateurs. Une calibration doit être réalisée pour chaque nouveau numéro de lot de coffret de réactif. Vérifier la courbe d'étalonnage avec au moins deux niveaux de contrôle qualité, conformément au plan d'assurance qualité mis en place au sein du laboratoire.

Quand procéder à un ré-étalonnage ?

- Dès lors qu'un nouveau numéro de lot de réactif est utilisé.
- Dès lors que les résultats du contrôle qualité l'imposent.
- Dès lors que les protocoles standard du laboratoire l'imposent.

Contrôle qualité (CQ)

Les laboratoires doivent établir des procédures CQ pour le test Méthotrexate ARK. L'ensemble des tests et des exigences relatifs au contrôle qualité doit être conforme aux conditions d'agrément et autres réglementations locales, régionales et/ou nationales.

De bonnes pratiques de laboratoire reposent sur le fait qu'au moins deux niveaux de contrôle qualité (points de décision médicale bas et élevé) soient testés chaque fois que des échantillons de patient sont soumis à des tests et chaque fois qu'un étalonnage est réalisé. Surveiller les tendances et les décalages apparaissant sur les valeurs de contrôle. Si des décalages ou des tendances apparaissent, ou si le témoin ne revient pas à la normale dans la plage spécifiée, réviser tous les paramètres de fonctionnement conformément aux procédures de qualité en vigueur au sein du laboratoire. Contacter le service clientèle pour toute assistance supplémentaire.

Protocole de dilution manuelle

La plage de mesure du test Méthotrexate est comprise entre 0,04 et 1,20 $\mu\text{mol/L}$. Les prélèvements et les témoins contenant des niveaux de concentration plus importants ($>1,20 \mu\text{mol/L}$) sont testés après dilution dans la plage de mesure.

Diluer manuellement les prélèvements et les témoins présentant des concentrations élevées à l'aide du tampon de dilution Méthotrexate ARK en préparant l'une des dilutions présentées ci-dessous par facteur de 10.

Volume de l'échantillon		Volume du tampon de dilution	Dilution	Facteur de dilution
50 μL	Échantillon non dilué	450 μL	1:10	10
50 μL	Échantillon 1:10	450 μL	1:100	100
50 μL	Échantillon 1:100	450 μL	1:1000	1000

50 µL	Échantillon 1:1000	450 µL	1:10000	10000
Facteur de dilution manuelle =				
$\frac{(\text{Volume de prélèvement} + \text{Volume de tampon de dilution})}{\text{Volume de prélèvement}}$				

Multiplier les résultats testés par le facteur de dilution.

9 Résultats

Pour convertir les valeurs exprimées en µmol/L en valeurs exprimées en µg/mL, diviser la valeur obtenue par un facteur de conversion de 2,2005.

10 Limites de la procédure

Ce test est conçu pour être utilisé avec du sérum ou du plasma uniquement ; consulter la section Préparation et prélèvement des échantillons pour l'analyse. Il est généralement conseillé d'utiliser systématiquement la même méthode (ainsi que la même matrice) pour chaque patient en raison des variations qui peuvent exister entre chaque méthode. Consulter la section Valeurs prévues ci-dessous.

Comme pour toute détermination à partir de substance à analyser, la valeur de méthotrexate doit être utilisée en combinaison avec les informations disponibles à partir des évaluations cliniques et d'autres procédures de diagnostic.

IMPORTANT : Les prélèvements effectués sur des patients ayant reçu du 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 test Méthotrexate ARK. Ces prélèvements présentent des niveaux de sérum plus élevés d'acide 4-[[2,4-diamino-6-(ptéridinyl)méthyl]-méthylamino]-benzoïque (DAMPA)¹⁰⁻¹² résultant du métabolisme du méthotrexate par le 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.¹³ 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 amoindrieraient les effets d'une thérapie au glucarpidase.¹³ Bien que le glucarpidase soit bien toléré et qu'il réduise rapidement la circulation de MTX, le retardement de l'élimination du MTX par voie rénale peut être un problème chez les adultes et les patients plus âgés.¹⁴

11 Valeurs prévues

Les niveaux de sérum de méthotrexate dépendent des indications d'utilisation, du dosage, du mode d'administration, du schéma thérapeutique, de la

pharmacocinétique de chaque individu, du métabolisme et d'autres facteurs cliniques.^{1,3} Bien que le niveau de sérum puisse généralement atteindre une valeur approximative comprise entre 10 et 100 µmol/L dans le traitement du cancer du sein (par exemple),¹⁵ les concentrations peuvent dépasser 1000 µmol/L¹⁶ dans le cas d'une thérapie à haute dose contre l'ostéosarcome, et des niveaux pouvant atteindre jusqu'à 3100 µmol/L de méthotrexate furent recensés suite à une perfusion de 4 heures sur des enfants atteints d'ostéosarcome.¹⁷ Pour le traitement de l'ostéosarcome,¹⁶ 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 intraveineuse 24 heures après le début de la perfusion de MTX. Les doses suivantes sont ajustées et administrées en fonction de niveaux de MTX obtenus après 24, 48, et 72 heures. Des niveaux de méthotrexate supérieurs à 50 µmol/L après 24 heures, 10 µmol/L après 48 heures, et 0,5 µmol/L 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 niveau 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 niveau de méthotrexate soit inférieur à 0,05 µmol/L.^{1,9} Dans certains cas, le niveau chute en dessous de 0,10 µmol/L.^{16, 18}

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, 9, 19}

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

La toxicité rénale est un risque important qui peut être exacerbé par l'administration concomitante d'autres médicaments,^{14, 19} comme la vancomycine par exemple.²⁰ D'autres formes de toxicité peuvent apparaître, incluant des troubles digestifs (nausées, vomissements, douleurs abdominales), des affections cutanées des muqueuses (et particulièrement la mucosite), des anomalies hématologiques (neutropénie et thrombocytopénie), des perturbations des fonctions du foie et une certaine neurotoxicité.²¹⁻²⁸

Étant donné le profil d'apparence du métabolite 7-hydroxyméthotrexate,^{15, 27} son rapport molaire au méthotrexate pouvant approximativement atteindre jusqu'à 100 fois,²⁹ et une insolubilité relative en comparaison au médicament apparenté,^{14, 19} une possible néphrotoxicité causée par la précipitation du métabolite dans les tubules rénaux²⁹ peut retarder l'élimination du méthotrexate.

Un traitement au glucarpidase (disponible pour usage compassionnel) réduit rapidement le niveau de circulation du méthotrexate, et non celui du médicament intracellulaire. Il a été constaté un effet rebond dans le niveau de sérum du méthotrexate suite à un traitement au glucarpidase.¹⁴ L'élimination du DAMPA peut durer plusieurs jours avant que ce dernier ne cesse d'interférer avec la surveillance du méthotrexate par essai immunologique.¹³

12 Caractéristiques spécifiques de performance

Chaque laboratoire a la responsabilité de vérifier les performances en appliquant les paramètres d'instrument définis pour l'analyseur utilisé. Les caractéristiques de performance présentées ci-dessous ont été obtenues sur le système Beckman Coulter AU680.

Limite de quantification (LoQ)

Les caractéristiques suivantes ont été déterminées conformément à la directive CLSI EP17-A2 pour le test au méthotrexate ARK. Les performances spécifiques à chaque analyseur peuvent varier.

Critère	Concentration MTX (µmol/L)
Limite du blanc (LoB) ; N = 60 µB + 1,645 SD, où SD = 0,002	0,00
Limite de détection (LoD) ; N = 60 LoB + 1,652 SD, où SD = 0,012	0,02
Limite de quantification (LoQ) ; N = 40 LoQ – 2 SD > LoD	0,04

Chaque laboratoire a la responsabilité de déterminer les critères de rapport des concentrations de méthotrexate. Les suggestions suivantes, issues de la directive CLSI EP17-A2, peuvent être appliquées :

Résultat \leq LoB indiquer « pas de détection ; concentration $<$ LoD »

LoB $<$ Résultat $<$ LoQ indiquer « substance à analyser détectée ; concentration $<$ LoD »

Résultat \geq LoQ indiquer le résultat tel que mesuré

Plage de mesure

La plage de mesure du test méthotrexate est comprise entre 0,04 et 1,20 $\mu\text{mol/L}$. Les prélèvements présentant des concentrations de méthotrexate plus importantes doivent être dilués avant d'être testés. Rapporter toute valeur de test dépassant LoD conformément aux informations fournies pour LoQ. Multiplier le résultat du test par le facteur de dilution pour les prélèvements contenant un niveau de méthotrexate dépassant la plage de mesure.

Récupération

Des valeurs précises (récupération analytique) ont été obtenues en ajoutant du méthotrexate concentré dans du sérum humain négatif au méthotrexate. Un concentré courant certifié à forte teneur en méthotrexate a été ajouté à un sérum humain négatif au méthotrexate, représentant les concentrations de médicament sur l'ensemble de la plage d'étalonnage du test. Six mesures de chaque échantillon ont été testées sur un analyseur automatique de chimie clinique. Les résultats ont été pondérés et comparés à la concentration cible, et le pourcentage de récupération a été calculé. Les résultats sont illustrés ci-dessous.

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

Concentration théorique ($\mu\text{mol/L}$)	Concentration récupérée moyenne ($\mu\text{mol/L}$)	Pourcentage de récupération (%)
0,06	0,06	102,8
0,10	0,11	108,3
0,30	0,30	101,1
0,60	0,62	103,3
1,00	1,06	105,7

Pourcentage moyen de récupération : 104,2

Linéarité

Conformément au protocole CLSI EP6-A, des études de linéarité ont été menées. Un échantillon de sérum de 1,40 µmol/L a été préparé et dilué proportionnellement avec du sérum humain négatif au méthotrexate. Les résultats du test ARK Méthotrexate étaient linéaires entre 0,03 et 1,20 µmol/l. Les résultats sont indiqués ci-dessous.

Valeur théorique (µmol/L)	Résultats observés (µmol/L)	Résultats prévus de 1er ordre	Résultats prévus de 2ème ordre	Différence (µmol/L ou %)
0,00	0,01	-0,002	0,010	S/O
0,03	0,04	0,029	0,038	0,009 µmol/l
0,05	0,06	0,050	0,057	0,007 µmol/l
0,12	0,13	0,124	0,125	1,1 %
0,24	0,24	0,250	0,243	-2,7 %
0,36	0,36	0,375	0,363	-3,2 %
0,48	0,49	0,501	0,486	-3,0 %
0,72	0,72	0,753	0,740	-1,8 %
0,96	1,02	1,005	1,003	-0,2 %
1,20	1,27	1,257	1,277	1,6 %

Les échantillons contenant des niveaux de méthotrexate compris entre 2 et 1200 µmol/L ont été préparés proportionnellement dans du sérum humain mélangé, puis dilués sur la plage d'étalonnage à l'aide du tampon de dilution Méthotrexate ARK. La baisse des niveaux de concentration de méthotrexate testés a été linéaire sur l'ensemble de la plage.

Comparaison des méthodes

Des études de corrélation ont été réalisées à partir du protocole CLSI EP9-A3. Les résultats du test ARK Méthotrexate sur l'analyseur Beckman Coulter AU680 ont été comparés aux résultats obtenus sur l'analyseur Roche/Hitachi 917.

Les concentrations de méthotrexate obtenues par l'analyseur Roche/Hitachi 917 se situaient entre 0,04 et 1050 $\mu\text{mol/l}$ (μM). Les valeurs obtenues par le test ARK Méthotrexate sur l'analyseur Beckman Coulter AU680 se situaient entre 0,04 et 1070 $\mu\text{mol/l}$. Les résultats de l'analyse de régression Passing-Bablok³⁰ pour cette étude sont illustrés ci-dessous (avec des limites de confiance de 95 %) pour 112 prélèvements compris dans la plage de mesure, ainsi que pour l'ensemble des 142 prélèvements, y compris ceux qui sont exclus de la plage de mesure et qui nécessitent une dilution.

Paramètre	Plage comprise entre 0,04 et 1,11 μM		Plage comprise entre 0,04 et 1050 μM	
Coefficient angulaire	0,99	(0,96 à 1,00)	1,00	(1,00 à 1,02)
Segment sur l'axe y	0,00	(0,00 à 0,01)	0,00	(0,00 à 0,00)
Coefficient de corrélation (r^2)	0,98	(0,97 à 0,98)	1,00	(1,00 à 1,00)
Nombre d'échantillons	112	S/O	142	S/O

Précision

La précision a été déterminée conformément aux indications du protocole CLSI EP5-A3. Les six niveaux de contrôle Méthotrexate ARK ainsi que des sérum humain mélangé ont été utilisés pour cette étude. Chaque niveau a été testé deux fois par jour, en quatre exemplaires, pendant 20 jours. Les séries de tests quotidiens ont été réalisées à un intervalle minimum de deux heures. Entre chaque série, d'un jour sur l'autre, le total de SD et le pourcentage de CV ont été calculés. Les résultats sont illustrés ci-dessous. Critère d'acceptation : $\leq 10\%$ du total de CV à $> 0,1 \mu\text{mol/L}$, SD $\leq 0,01$ à $\leq 0,1 \mu\text{mol/L}$.

Échantillon	N	Moyenne ($\mu\text{mol/L}$)	Inter séries		Entre chaque jour		Total	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Contrôles Méthotrexate ARK								
FAIBLE	160	0,08	0,006	7,8	0,004	5,5	0,008	9,6
INTERMÉDIAIRE	160	0,39	0,009	2,2	0,007	1,7	0,012	3,1
ÉLEVÉ	160	0,78	0,026	3,3	0,027	3,5	0,038	4,9
5	160	5,2	0,186	3,6	0,247	4,8	0,309	6,0
50	160	48,7	3,674	7,6	2,264	4,6	4,439	9,2
500	160	516,8	13,284	2,6	35,641	6,9	38,813	7,5
Sérum humain								
FAIBLE	160	0,08	0,007	8,9	0,006	7,2	0,009	11,2
INTERMÉDIAIRE	160	0,41	0,011	2,6	0,008	2,1	0,015	3,7
ÉLEVÉ	160	0,82	0,038	4,6	0,031	3,8	0,050	6,1
5	160	5,2	0,278	5,3	0,381	7,3	0,464	8,9
50	160	53,0	1,624	3,1	3,319	6,3	3,705	7,0
500	160	507,9	12,222	2,4	22,957	4,5	26,177	5,2

Substances interférentielles

Des études d'interférence ont été menées à partir du protocole CLSI EP7-A2. Une évaluation clinique a été réalisée sur des concentrations élevées des substances endogènes suivantes, substances pouvant provoquer des interférences avec le sérum pour des niveaux de méthotrexate connus (environ 0,05 et 0,50 $\mu\text{mol/L}$). Chaque échantillon a été testé à l'aide du test Méthotrexate ARK, combiné à un contrôle sérique du méthotrexate. Les mesures de méthotrexate n'ont pas été affectées aux niveaux de substances endogènes testés.

Substance interférentielle	Concentration interférentielle	Méthotrexate (~ 0,05 $\mu\text{mol/L}$)		Méthotrexate (~ 0,50 $\mu\text{mol/L}$)	
		Contrôle sérique	Test	Contrôle sérique	Test (% contrôle)
Albumine	12 g/dL	0,05	0,05	0,48	0,50 (103,5)
Bilirubine conjuguée	70 mg/dL	0,05	0,06	0,48	0,49 (101,4)
Bilirubine non conjuguée	70 mg/dL	0,05	0,05	0,48	0,48 (101,4)
Cholestérol	620 mg/dL	0,05	0,04	0,47	0,48 (103,2)
Gammaglobuline	12 g/dL	0,05	0,06	0,48	0,49 (100,7)
Hémoglobine	1000 mg/dL	0,06	0,06	0,48	0,49 (101,4)
Facteur rhumatoïde	1080 IU/mL	0,06	0,07	0,46	0,45 (96,7)
Triglycérides	835 mg/dL	0,05	0,04	0,48	0,48 (98,6)
Acide urique	30 mg/dL	0,05	0,06	0,48	0,49 (100,7)

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 test Méthotrexate ARK. D'importants niveaux de ces composés ont été introduits dans les groupes de sérum ne contenant pas de méthotrexate, ou contenant 0,05 $\mu\text{mol/L}$ voire 0,50 $\mu\text{mol/L}$ de méthotrexate. Les échantillons ont été analysés et les concentrations de méthotrexate des échantillons contenant des substances interférentielles ont été comparées au contrôle sérique

Activité hétérosécificique du 7-Hydroxyméthotrexate, le principal métabolite

Après l'administration d'une importante dose de méthotrexate (HDMTX), la concentration en 7-hydroxyméthotrexate du sérum/plasma dépasse généralement celle obtenue quelques heures plus tard. 12 à 48 après l'administration de HDMTX, il a été constaté que les niveaux de 17-hydroxyméthotrexate étaient 100 fois supérieurs à ceux de méthotrexate.^{15, 27, 29, 31, 33-34}

L'activité hétérosécificique du 7-hydroxyméthotrexate dans la mesure de méthotrexate a été déterminée pour le test Méthotrexate ARK en testant des paires d'échantillons contenant (1) 0,05 µmol/L de méthotrexate et 5 µmol/L de 7-hydroxyméthotrexate et (2) 0,50 µmol/L de méthotrexate et 50 µmol/L de 7-hydroxyméthotrexate dans du sérum humain.

Le test Méthotrexate ARK ne subit pas l'activité hétérosécificique ($\leq 0,1$ %) du principal métabolite, le 7-hydroxyméthotrexate.

Activité hétérosécificique de l'acide 2,4-Diamino-N¹⁰-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 du glucarpidase comme antidote électif lors d'un traitement, la concentration sérique de DAMPA peut être substantielle.^{13, 14} Le test de méthotrexate ARK subit considérablement l'activité hétérosécificique du métabolite mineur DAMPA. Les tests ont été réalisés sans molécule mère de méthotrexate. Sur la base des données observées, la réactivité croisée avec DAMPA se situait entre 76,3 % et 100 %. Le test ne doit pas être utilisé dans le cadre de traitements compassionnels au glucarpidase (carboxypeptidase G2) qui peuvent rapidement transformer le méthotrexate en DAMPA.

Médicaments présentant une activité hétérosécificique

Le test Méthotrexate ARK subit légèrement l'activité hétérosécificique du triamtérène et du triméthoprime ; ces médicaments peuvent cependant être contre indiqués lors d'un traitement du cancer au MTX en raison des effets néfastes que peuvent avoir leur administration. Les structures de ces composés correspondent parfaitement à la fraction annulaire de ptéridine du méthotrexate. En l'absence de méthotrexate, une réactivité croisée au triamtérène (1,15 %) et au triméthoprime (0,01 %) a été observée. En présence de méthotrexate, une réactivité croisée au triamtérène ($\leq 3,3$ %) et au triméthoprime ($\leq 0,5$ %) a été démontrée sur la base des données observées.

Activité hétérosécificique des analogues de folate et d'autres composés

Le test Méthotrexate ARK ne subit pas l'activité hétérosécificique ($\leq 0,01\%$) des analogues de folate et d'autres composés à une valeur $\geq 1000\ \mu\text{mol/L}$.

Composé	Testé ($\mu\text{mol/L}$)
Adriamycine	1000
Cyclophosphamide	1500
Cytosine	1000
Acide dihydrofolique	1000
DL-6-Méthyl-5,6,7,8-Tétrahydroptérine	1000
Acide folique	1000
Acide folinique (leucovorine)	1000
5-Fluorouracile	3000
6-Mercaptopurine	1000
Acide 5-Méthyltétrahydrofolique	1000
Prednisolone	1000
Pyriméthamine	1000
Sulfaméthoxazole	1600
Acide tétrahydrofolique	1000
Vinblastine	1000
Vincristine	1000

13 Références

1. Prescribing information. 2008. Methotrexate Injection, USP. Hospira, Inc. Lake Forest, IL.
2. Jonsson, O. G. et 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. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Leucovorin (Fusilev) Prescribing Information. 2008. Spectrum Pharmaceuticals, Inc. Irvine, CA.
10. Chabner, B. A. *et al.* 1972. Enzymatic cleavage of methotrexate provides a method for prevention of drug toxicity. *Nature* **239**:395 – 397.
11. Widemann, B. C. *et al.* 1995. Carboxypeptidase-G2 rescue in a patient with high dose methotrexate-induced nephrotoxicity. *Cancer* **76**:521 – 526.
12. Buchen, S. *et al.* 2005. Carboxypeptidase G2 rescue in patients with methotrexate intoxication and renal failure. *British Journal of Cancer* **92**:480 – 487.

13. Al-Turkmani, M. R. et al., 2010. Difficulty Measuring Methotrexate in a Patient with High-Dose Methotrexate–Induced Nephrotoxicity. *Clin Chem* **56**:1792 – 1796.
14. Schwarz, S. et al. 2007. Glucarpidase (Carboxypeptidase G2) intervention in adult and elderly cancer patients with renal dysfunction and delayed methotrexate elimination after high-dose methotrexate therapy. *The Oncologist* **12**:1299 – 1308.
15. Bore, P. et al. 1987. Pharmacokinetics of Methotrexate and 7-Hydroxy-Methotrexate After Methotrexate Infusions. *Cancer Drug Delivery* **4**:177 – 183.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Widemann, B. C. and Adamson, P. C. 2006. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* **11**:694 – 703.
20. 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.
21. Martelli, N. et al. 2011. Methotrexate pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prognostic value? *J Clin Pharm Ther* **36**:237 – 245.
22. Mazanec, D. J. and Grisanti, J. M. 1989. Drug-induced osteoporosis. *Cleve Clin J of Med* **56**:297 – 303.
23. 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.
24. Allen, J. C. et al. 1980. Leukoencephalopathy following high-dose IV methotrexate chemotherapy with leucovorin rescue. *Cancer Treat Rep* **64**:1261 – 1273.
25. Jacobs, P. et al. 1991. Methotrexate encephalopathy. *Eur J Cancer* **27**:1061 – 1062.

26. Flombaum, C. D. and Meyers, P. A. 1999. High-Dose Leucovorin as Sole Therapy for Methotrexate Toxicity. *J Clin Oncol* **17**:1589 – 1594.
27. 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.
28. 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.
29. Erttmann, R. et al. 1985. 7-Hydroxy-Methotrexate and Clinical Toxicity Following High-Dose Methotrexate Therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* **109**:86 – 88.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Breithaupt, H. et 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.

Les autres marques et noms de produits sont des marques commerciales appartenant à leurs détenteurs respectifs.



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

Révision, Août 2020
1600-0213-00FR Rév 08