ARK Diagnostics, Inc.

Ensayo de metotrexato II de ARK

Lea atentamente el presente folleto ilustrativo de ARK Diagnostics, Inc. antes de usar el Ensayo de metrotexato II de ARK. Aténgase a las instrucciones que figuran en este folleto. No se garantizará la fiabilidad de los resultados del ensayo en caso de que no se observen las instrucciones de este folleto ilustrativo.

Notificar cualquier incidente grave que se haya producido en relación con el producto al fabricante y a la autoridad competente correspondiente, según proceda. Existe un resumen de seguridad y rendimiento disponible a través de EUDAMED (base de datos europea sobre productos sanitarios), SRN: US-MF-000023925.

Atención al cliente

ARK Diagnostics, Inc.

48089 Fremont Blvd

Fremont, CA 94538 EE. UU.
Tel.: 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
Países Bajos

CH REP

MedEnvoy Switzerland
Gotthardstrasse 28
6302 Zug
Switzerland

Leyenda de los símbolos empleados

LOT	Código del lote	AAAA-MM-DD	Fecha de caducidad
REF	N° de catálogo		Fabricante
EC REP	Representante autorizado	CE 2797	Marca CE con número del organismo notificado
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*		Límite de temperatura
	Consultar las instrucciones de uso	R1 R2	Reactivo 1/ Reactivo 2
Rx Only	Para uso exclusivo bajo prescripción médica		

© 2025, ARK Diagnostics, Inc. **Kit de reactivo REF 5071-0001-00, 5071-0001-01**

1 Nombre

Ensayo de metotrexato II de ARK

2 Uso previsto

El Ensayo de metotrexato II de ARK es un inmunoensayo enzimático homogéneo concebido para la determinación cuantitativa del metotrexato en suero o plasma humanos en analizadores químicos clínicos automatizados. Los resultados obtenidos se emplean para la monitorización de los niveles de metotrexato con el fin de optimizar la terapia administrada.

Las muestras obtenidas de pacientes que han recibido glucarpidasa (carboxipeptidasa G2) como terapia de rescate con dosis altas de metotrexato no deben analizarse con el Ensayo de metotrexato II de ARK.

3 Resumen y explicación de la prueba

El metotrexato [N-[4[[(2,4-diamino-6-pteridinil) metil] metilamino]benzoil]-Ácido L-glutámico], antes llamado ametopterina, es un antimetabolito utilizado en el tratamiento de ciertas enfermedades neoplásicas, la psoriasis grave y la artritis reumatoide del adulto.[1-3] El metotrexato tiene un potencial de toxicidad grave. Los pacientes sometidos a tratamiento con metotrexato deben ser monitorizados estrechamente para que eventuales efectos tóxicos sean detectados con prontitud.

La monitorización del metotrexato se utiliza habitualmente en pacientes sometidos a un tratamiento con dosis altas de metotrexato para el cáncer; los resultados se utilizan para guiar la terapia de apoyo mientras el metotrexato es eliminado por los riñones by the kidneys. Deben consultarse las directrices para el tratamiento con metotrexato con rescate de leucovorina.[1,4] Se han utilizado dosis de intermedias a altas de metotrexato (aproximadamente 35 mg/m^2 - 12 g/m^2) con rescate de leucovorina (factor citrovorum) con resultados favorables en el tratamiento del sarcoma osteogénico, la leucemia, el linfoma no Hodgkin, el cáncer de pulmón y de mama.[5-9]

4 Principios del procedimiento

El Ensayo de metotrexato de ARK es un inmunoensayo enzimático homogéneo. El ensayo utiliza anticuerpos específicos que pueden unirse al metotrexato. El ensayo se basa en la competencia entre un fármaco marcado con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa recombinante (rG6PDH) y el fármaco libre de la muestra, por una cantidad fija de sitios de unión de anticuerpos específicos. En ausencia de fármaco libre
procedente de la muestra, el anticuerpo monoclonal de conejo anti-metotrexato se une al fármaco marcado con rG6PDH, provocando una disminución de la actividad

enzimática. En presencia de fármaco de la muestra, la actividad enzimática aumenta y está directamente relacionada con la concentración del fármaco. La enzima activa convierte la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) en NADH cuyo nivel se mide mediante espectrofotometría al estar en relación con la variación de absorbancia. La G6PDH sérica endógena no interfiere en los resultados porque la coenzima NAD funciona sólo con la enzima bacteriana usada en el ensayo.

5 Reactivos

REF	Descripción del producto	Cantidad/Volumen
5071-0001-00	**Ensayo de metotrexato II de ARK** **Reactivo R1 – Anticuerpo/Sustrato** Anticuerpo policlonal de conejo contra el metotrexato, glucosa-6-fosfato, dinucleótido de nicotinamida y adenina, albumina de suero bovino, azida de sodio y estabilizantes	1 X 16 ml
	Reactivo R2 – Enzima Metotrexato marcado con rG6PDH bacteriana, tampón, albumina de suero bovino, azida de sodio y estabilizantes	1 X 8 ml
5071-0001-01	**Ensayo de metotrexato II de ARK** **Reactivo R1 – Anticuerpo/Sustrato** Anticuerpo policlonal de conejo contra el metotrexato, glucosa-6-fosfato, dinucleótido de nicotinamida y adenina, albumina de suero bovino, azida de sodio y estabilizantes	1 X 28 ml
	Reactivo R2 – Enzima Metotrexato marcado con rG6PDH bacteriana, tampón, albumina de suero bovino, azida de sodio y estabilizantes	1 X 14 ml

Manipulación y almacenamiento de reactivo

Los reactivos del Ensayo de metotrexato II de ARK se suministran en forma líquida, listos para el uso y pueden ser usados justo después de sacarlos del frigorífico. Cuando no se están usando, los reactivos se deben almacenar a una temperatura entre 2°C y 8°C (36-46°F) de pie y con el tapón de rosca bien cerrado. Si se han almacenado correctamente a las condiciones indicadas, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. No congelar los reactivos. Evitar la exposición prolongada a temperaturas superiores a los 32°C (90°F). **Un almacenamiento incorrecto de los reactivos puede comprometer el resultado del ensayo.**

Los productos del Metotrexato II contienen ≤0,09% de azida de sodio. Como medida de precaución, se debería enjuagar la tubería afectada y la instrumentación con agua abundante para prevenir la posible acumulación de azidas metálicas explosivas. No se requieren precauciones especiales a la hora de manejar los demás componentes del ensayo.

6 Advertencias y precauciones

- Para **diagnóstico in vitro,** uso profesional en laboratorio.
- Para uso exclusivo bajo prescripción médica. *Atención: La Ley Federal de EE.UU. autoriza la venta de este sistema solo por parte de un médico autorizado o por orden de él.*
- Los reactivos R1 y R2 se suministran juntos en un kit y no se deberían intercambiar con reactivos que lleven otro número de lote.
- Los reactivos contienen ≤0,09% de azida de sodio.
- Los valores de este ensayo deberían ser usados exclusivamente en relación con la información arrojada por las evaluaciones clínicas y otros procedimientos diagnósticos.

7 Recogida de muestras y preparación para el análisis

- Cada laboratorio es responsable de suministrar una muestra válida para el análisis de acuerdo con sus procedimientos de calidad.
- Se precisa suero o plasma. Es buena práctica usar la misma matriz de muestra para el mismo paciente con el fin de obtener una mayor homogeneidad de los resultados.
- El tiempo de toma de muestras de metotrexato dependerá de la dosis, la duración de la infusión y el estado clínico del paciente. Consultar los protocolos de tratamiento específicos para el tiempo de muestreo.
- No usar sangre entera. Con este ensayo es posible emplear los siguientes anticoagulantes.
    - Heparina de sodio
    - Heparina de litio
    - EDTA potásico
- Recoger la sangre con tubos adecuados para el uso de la monitorización terapéutica del fármaco (TDM).
- Siga las recomendaciones del fabricante del tubo de recogida para la recogida, el procesamiento y la centrifugación.
- El documento GP44-A4 del CLSI describe los procedimientos para minimizar los artefactos debidos a la recogida y manipulación de muestras para pruebas de laboratorio usuales.[10]
- No provocar la formación de espuma y evitar los congelamientos y descongelamientos reiterados con el fin de conservar la integridad de la muestra desde el momento de su recogida hasta el momento en el que se ejecuta el ensayo.
- La presencia de fibrina, de hematíes o de otra materia particulada puede alterar el resultado. Asegurarse de que la centrifugación sea correcta.
- La presencia de burbujas o espuma en las muestras puede originar una entrega incompleta de la muestra o resultados erróneos.
- Cada laboratorio debe consultar la bibliografía disponible y los datos internos relativos a la estabilidad de las muestras.

- Basado en estudios realizados por ARK Diagnostics, una vez eliminada la parte sólida, las muestras se pueden almacenar a 2 - 8°C durante una semana como máximo en base a los datos a disposición. Si va a transcurrir más de una semana antes de ejecutarse la prueba, congelar las muestras (≤- 10°C) durante un máximo de cuatro semanas. Se recomienda limitar el número de congelaciones-descongelaciones; los datos no mostraron impacto adverso alguno sobre la base de tres congelaciones-descongelaciones.
- **Manipular todas las muestras procedentes de pacientes como potencialmente infecciosas.**

8 Procedimiento

Material suministrado
Ensayo de metotrexato II de ARK – REF 5071-0001-00, 5071-0001-01

Material requerido (se suministra por separado)
Calibrador de metotrexato II de ARK – REF 5071-0002-00
Controles de calidad – Control de metotrexato II de ARK – REF 5071-0003-00
Controles de calidad – Control de metotrexato II de ARK – REF 5071-0003-01
Controles de calidad – Control de metotrexato II de ARK – REF 5071-0003-02
Tampón de dilución de metotrexato II de ARK – REF 5071-0004-00

Instrumentación
Antes del uso, puede ser necesario transferir los reactivos R1 y R2 a recipientes específicos para el analizador en cuestión. Evitar la contaminación cruzada de R1 y R2.

Existen numerosos analizadores químico-clínicos automatizados con determinación fotométrica de la tasa a 340 nm que son adecuados. Consultar la hoja de aplicación específica del analizador para programar el Ensayo de metotrexato II de ARK disponible en su distribuidor o en el servicio de atención al cliente de ARK. Para el mantenimiento cotidiano correcto, consultar el manual de instrucciones del instrumento. Las Hojas de Protocolo de Aplicación que han sido categorizadas CLIA o llevan el distintivo CE han sido verificadas por el fabricante. Es responsabilidad del laboratorio realizar toda la validación apropiada para el uso del ensayo con otros ajustes o analizadores.

Secuencia del ensayo
Para ejecutar o calibrar correctamente el ensayo, véase el manual específico de la instrumentación.

Calibración
Ejecutar una calibración completa (de 6 puntos) usando los Calibradores de metotrexato II de ARK A, B, C, D, E, y F; realizar doble ejecución para cada

calibrador. Con cada nuevo número de lote del kit de reactivos es preciso ejecutar una nueva calibración. Verificar la curva de calibración con controles de calidad de al menos dos niveles en conformidad con el plan de aseguramiento de calidad fijado en el laboratorio.

Cuándo repetir la calibración

- Siempre que se vayan a utilizar reactivos de un nuevo lote
- Siempre que resulte necesario en base a los resultados del control de calidad
- Siempre que lo prevean los protocolos estándar de laboratorio

Control de calidad (QC)

Los laboratorios deben establecer procedimientos QC para el Ensayo de metotrexato II de ARK. Todos los controles de calidad y las pruebas se deben ejecutar en cumplimiento de las normativas locales, regionales o nacionales y de los requisitos de acreditación.

La buena práctica de laboratorio prevé que sean testados al menos dos niveles (puntos de decisión médica alto y bajo) del control de calidad todos los días, que se realice el ensayo de las muestras del paciente y que se efectúe cada vez una calibración. Monitorizar constantemente si los valores de control presentan alguna tendencia o desviación. Si se detecta alguna tendencia o desviación o si el control no recupera dentro del margen especificado, verificar todos los parámetros operativos siguiendo los procedimientos de calidad clínicos y de laboratorio. Para más información, contactar a nuestro servicio de atención al cliente.

Protocolo de dilución manual

Para calcular los niveles de fármaco en las muestras que excedan el límite superior del análisis cuantitativo, diluir la muestra a mano con el Tampón de dilución de metotrexato II de ARK. Multiplicar los resultados del ensayo por el factor de dilución.

$$\text{Factor de dilución manual} = \frac{\text{(volumen de la muestra + volumen del tampón de dilución)}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

Ha sido validado un rango de ensayo ampliado hasta 1200 µmol/l mediante diluciones seriadas 1:10 de la muestra de 1:10, 1:100 o 1:1000 según lo necesario.

9 Resultados

Informe sobre las unidades de resultado como µmol/l o µg/ml. Para convertir µmol/l en µg/ml, dividir el valor obtenido por el factor de conversión de 2,2005. El valor de metrotrexato de este ensayo debería ser usado en relación con otras informaciones clínicas. Si el resultado es algún código de error, consultar el manual de instrucciones del instrumento para interpretarlo correctamente.

10 Limitaciones del procedimiento

Este ensayo está concebido exclusivamente para su uso con suero o plasma; véase el Apartado **Recogida de muestras y preparación para el análisis**. En general se considera buena práctica usar siempre el mismo método (y la misma matriz) para cada paciente, debido al potencial de variabilidad entre método y método. Véase el Apartado **Valores previstos** más abajo.

IMPORTANTE: Las muestras obtenidas de pacientes que han recibido glucarpidasa (carboxipeptidasa G2) como terapia de rescate con dosis altas de metotrexato **no** deben analizarse con el Ensayo de metotrexato II de ARK. Estas muestran presentan niveles séricos aumentados de ácido 4-[[2,4-diamino-6-(pteridinil)metil]-metilamino]-benzoico (DAMPA)[11-13] que resultan del metabolismo del metotrexato por efecto de la glucarpidasa. El DAMPA reacciona de forma cruzada con el anticuerpo de metotrexato utilizado en este ensayo, y puede seguir circulando al menos entre cinco y siete días antes de que puedan volver a obtenerse mediciones precisas de metotrexato sérico.[14] Los oncólogos del equipo clínico deben notificar al laboratorio la administración de glucarpidasa para evitar la notificación de concentraciones de metotrexato falsamente elevadas debido a la interferencia del DAMPA que confundiría los esfuerzos del tratamiento con glucarpidasa.[14] Aunque la glucarpidasa se tolera bien y reduce rápidamente el MTX circulante, la eliminación renal retardada del MTX puede seguir siendo un problema para los pacientes adultos y ancianos.[15]

11 Valores previstos

Los niveles séricos de metotrexato dependen de la indicación de uso, la dosis, el modo de administración, el régimen de tratamiento, la farmacocinética individual, el metabolismo y otros factores clínicos.[1,3] Mientras que el nivel sérico puede alcanzar aproximadamente entre 10 y 100 µmol/l en el tratamiento del cáncer de mama (por ejemplo),[,16] las concentraciones pueden superar los 1000µmol/l[17] con la terapia de dosis altas para el osteosarcoma, y se alcanzaron hasta 3100 µmol/l de metotrexato tras una infusión de 4 horas en pacientes pediátricos con osteosarcoma.[18] Para el tratamiento del osteosarcoma,[17] la curva de decaimiento del metotrexato presenta una amplia variabilidad: 24 horas, de 30 a 300 µmol/l; 48 horas, de 3 a 30 µmol/l; y 72 horas, menos de 0,3 µmol/l. Se suele administrar una dosis de 10 mg de leucovorina por vía intravenosa 24 horas después del inicio de la infusión de MTX. Las dosis posteriores se ajustan y administran en función de los niveles de MTX obtenidos a las 24, 48 y 72 horas. Los niveles de metotrexato superiores a 50 µmol/l a las 24 horas, 10 µmol/l a las 48 horas y 0,5 µmol/l a las 72 horas pueden indicar toxicidad y suelen tratarse con un aumento de la dosis de leucovorina de acuerdo con los algoritmos hasta que el nivel de MTX sea <0,1 µmol/l. Las directrices para el tratamiento con metotrexato con rescate de leucovorina suelen recomendar la continuación de leucovorina hasta que el nivel de metotrexato descienda por debajo de 0,05 µmol/l.[1, 4] Algunos centros se atienen a ≤0,10 µmol/l.[17, 19]

De la prescripción y otra información: Indicadores de laboratorio de toxicidad después de programas de rescate de leucovorina con dosis altas de metotrexato.[1,4,20]

Situación clínica	Resultados de laboratorio	
	Nivel de metotrexato (µmol/l)	**Horas después de la administración**
Eliminación normal del metotrexato	~10 ~1 <0,2	24 48 72
Eliminación retrasada (tardía) de metotrexato	>0,2 >0,05	72 96
Eliminación retrasada de metotrexato (inicial) y/o Evidencia de lesión renal aguda	≥50 ≥5 o aumento ≥100% en la creatinina sérica	24 48 24

La toxicidad renal es un riesgo importante y puede verse exacerbada por la coadministración de otros fármacos[15, 20] por ejemplo vancomicina.[21] Pueden aparecer otras formas de toxicidad, como trastornos digestivos (por ejemplo, náuseas, vómitos, dolor abdominal), trastornos cutáneo-mucosos (especialmente mucositis), anomalías hematológicas (por ejemplo, neutropenia y trombocitopenia), alteraciones de las pruebas de función hepática y neurotoxicidad.[22-29]

Dado el perfil de aparición del metabolito 7-hidroximetotrexato[16, 28], su relación molar con el metotrexato de hasta 100 veces[30] y la insolubilidad relativa respecto al fármaco original[15, 20], la posible nefrotoxicidad debida a la precipitación del metabolito en los túbulos renales[30] puede retrasar la eliminación del propio metotrexato.

El tratamiento con glucarpidasa reduce rápidamente el nivel circulante de metotrexato, pero no el fármaco intracelular. Se ha observado un efecto rebote en el nivel sérico de metotrexato tras el tratamiento con glucarpidasa.[15] La eliminación del DAMPA puede tomar varios días antes de que deje de interferir en la monitorización del metotrexato mediante inmunoensayo.[14]

12 Características de rendimiento específicas

Cada laboratorio es responsable de verificar el rendimiento usando los parámetros establecidos para sus analizadores. Los datos de rendimiento que aparecen en esta sección se obtuvieron en un analizador químico clínico automático Beckman Coulter AU680® usando el Ensayo de petidina de ARK.

Sensibilidad

Límite de cuantificación (LoQ)

El LoQ del Ensayo del metotrexato II de ARK se calculó en conformidad con EP17-A2 de CLSI y está definido como la concentración más baja para la que se observa una precisión entre ensayos (≤0,010 DE) y una recuperación aceptables (± 0,010 µmol/l del valor nominal). Se obtuvo un LoQ de 0,030 µmol/l, un valor que está en relación con las características del analizador empleado.

Concentración nominal (µmol/l)	Media general (µmol/l)	DE	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

Rango de medición

El rango de medición analítico del Ensayo de metotrexato II de ARK es de 0,030 a 1,300 µmol/l. Las muestras que contengan metotrexato en concentraciones más elevadas (> 1,300 µmol/l) pueden ser ensayadas diluyendo la muestra hasta entrar dentro del rango de medición para obtener un resultado cuantitativo útil, o bien, pueden ser recogidas en el informe como "detectadas por encima del rango de medición". Multiplicar el resultado del ensayo por el factor de dilución para obtener la concentración de metotrexato en la muestra sin diluir. Anotar los resultados por debajo de este margen como <0,030 µmol/l o por debajo del LoQ inferior establecido en su laboratorio para el analizador en cuestión. Anotar los resultados por encima de este margen como >1,300 µmol/l o como resultados superiores al LoQ superior establecido en su laboratorio para el analizador en cuestión.

Recuperación

La recuperación analítica se calculó añadiendo metotrexato concentrado a suero humano negativo al metotrexato. Fue añadido un volumen determinado de un concentrado procedente de un lote certificado de metotrexado altamente puro al suero humano negativo al metotrexato, representándose así las concentraciones

del fármaco a través del margen del ensayo. Fueron ensayadas seis réplicas de cada muestra en un analizador químico-clínico automatizado. Fue calculado el promedio de los resultados y comparado con la concentración teórica para calcular el valor porcentaje de la recuperación. Los resultados se muestran a continuación.

$$\% \text{ de recuperación} = 100 \times \frac{\text{Concentración media recuperada}}{\text{Concentración teórica}}$$

Concentración teórica (µmol/l)	**Concentración media recuperada (µmol/l)**	**Interferencia porcentual**
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

Linealidad

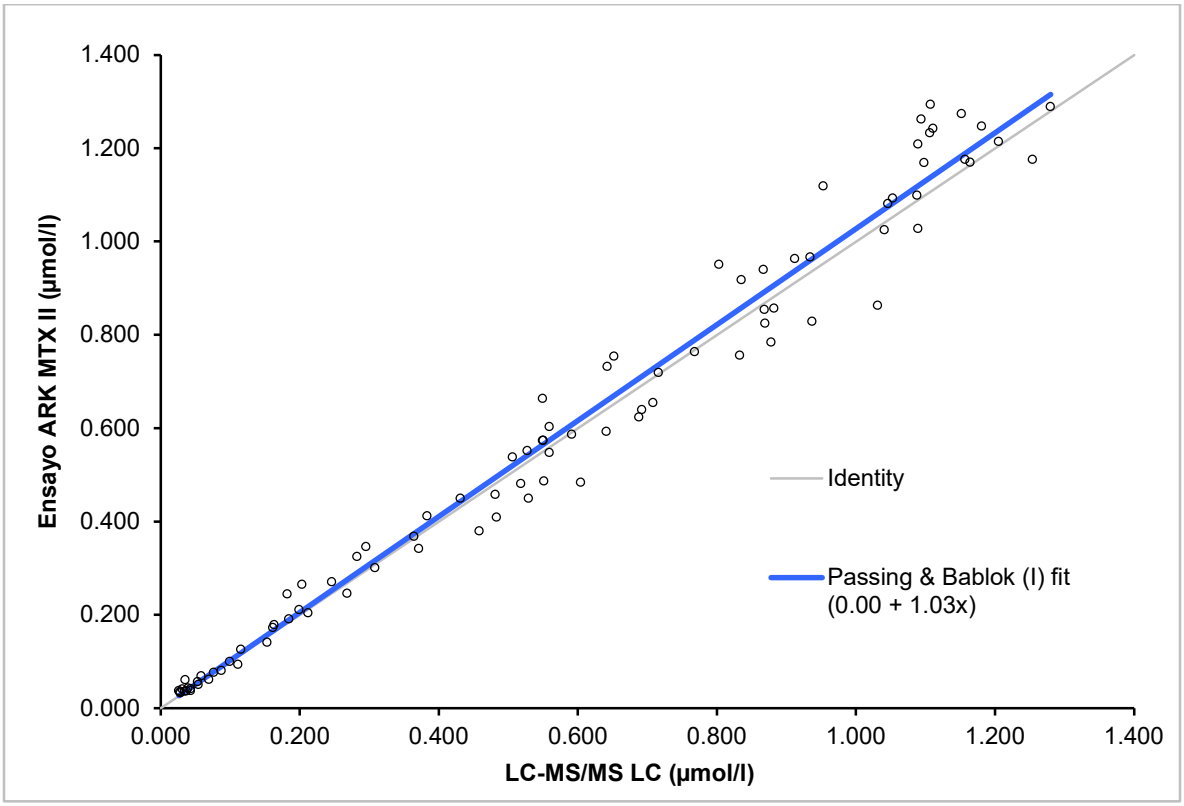
Los estudios de linealidad se realizaron según lo sugerido en el Protocolo EP06-Ed2 del CLSI. Se preparó una muestra de suero de 1,600 µmol/l y se hicieron diluciones proporcionales con suero humano negativo para metotrexato. Las concentraciones de metotrexato oscilaban entre 0,030 y 1,300 µg/l. Se ha constatado una relación lineal entre 0,030 y 1,300 µmol/l. Los resultados se muestran a continuación.

Concentración nominal (µmol/l)	Resultados observados (µmol/l)	Resultados previstos (µmol/l)	Diferencia (en %)
0,000	0,000	NA	NA
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

Comparación de métodos

Fueron investigadas las correlaciones ateniéndose al protocolo EP9-A3 de NCCLS. Las mediciones de metotrexato en suero humano (de pacientes tratados con altas dosis de metotrexato) mediante el ensayo de metotrexato II de ARK se compararon con las obtenidas por cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Las concentraciones de metotrexato oscilaban entre 0,026 y 1,280 µg/l (LC-MS/MS). 9Abajo figuran los resultados de la regresión de Passing-Bablok[31] para este estudio (con el 95% de límites de confianza).

Pendiente	1,03	(1,00 a 1,06)
Intersección en y	0,00	(De -0,01 a 0,01)
Coeficiente de correlación ($r^{2)}$	0,98	(de 0,96 a 0,98)
Número de muestras	90	



También se realizó una comparación del método con el ensayo original de metotrexato ARK para 123 muestras de pacientes con valores de metotrexato que oscilaban entre 0,054 y 1,168. Las estadísticas con intervalos de confianza de la comparación Passing-Bablok son: pendiente = 0,98 (de 0,95 a 1,01); intersección y = -0,02 de (-0,03 a -0,01); y coeficiente de correlación (r^2) = 0,97 (de 0,96 a 0,98).

Precisión

La precisión fue determinada según el procedimiento descrito en el protocolo EP5-A3 de CLSI. En el estudio se utilizaron los seis niveles de control del Control de metotrexato II de ARK (Bajo, Mediano, Alto, 5, 50 y 500) y las seis muestras de suero humano correspondientes. Cada nivel fue ensayado por cuadruplicado dos veces al día durante 20 días. Las series diarias distaban entre sí al menos dos horas. Fue calculada la precisión intraserial y la interdiaria, la DE total y los CVs porcentuales. Los resultados se muestran a continuación. Criterios de aceptación: <10% CV total.

			Intraserial		Interdiario		Total	
Muestra	**N**	**Promedio (µmol/l)**	**DE**	**CV (%)**	**DE**	**CV (%)**	**DE**	**CV (%)**
Control de metotrexato II de ARK								
BAJO	160	0,069	0,002	2,84	0,001	1,23	0,002	3,00
MEDIO	160	0,411	0,006	1,40	0,002	0,43	0,006	1,40
ALTO	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
Suero humano								
BAJO	160	0,070	0,002	2,50	0,001	1,49	0,002	2,88
MEDIO	160	0,404	0,008	1,86	0,003	0,65	0,008	1,92
ALTO	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

Sustancias interferentes

Fueron realizados estudios de interferencias empleando como guía el protocolo EP07-A3 de CLSI. Fueron evaluadas concentraciones clínicamente altas de las siguientes sustancias potencialmente interferentes en suero con niveles conocidos de metotrexato (aprox. 0,050 y 0,500 µmol/l). Fue ensayada cada muestra usando el Ensayo del metotrexato II de ARK junto con un control sérico de metotrexato. Las mediciones de metotrexato estuvieron dentro de ±10% de interferencia o ±0,010 µmol/l del suero control cuando las concentraciones de metotrexato fueron ≤0,100 µmol/l.

		Resultados	
Sustancia Concentración	**Concentración Concentración**	**± µmol/l de Control (0,050 µmol/L de metotrexato)**	**% de interferencia (0,500 µmol/l de metotrexato)**
Albumina humana	12 g/dl	0,002	-1,04
Bilirrubina (conjugada)	72 mg/dl	0,001	1,96
Bilirrubina (no conjugada)	72 mg/dl	0,003	0,23
Colesterol	500 mg/dl	0,005	3,49
Gamaglobulina humana	12 g/dl	0,003	2,42
Hemoglobina	1000 mg/dl	-0,006	-2,72
Factor reumatoide	1080 UI/ml	0,001	3,52
Triglicéridos	1000 mg/dl	-0,007	7,48
Ácido úrico	30 mg/dl	0,000	1,60

Especificidad

Se probaron metabolitos del metotrexato, análogos del folato y otros compuestos con similitud estructural para determinar si estos compuestos afectan a la cuantificación de las concentraciones de metotrexato utilizando el ensayo de metotrexato II de ARK. Se añadieron altos niveles de estos compuestos a grupos de suero que no contenían metotrexato, 0,050 µmol/l o 0,500 µmol/l de metotrexato. Las muestras fueron analizadas y las concentraciones de metotrexato de las muestras que contenían los interferentes se compararon con un control sérico.

Interferencia con 7-hidroximetotrexato, el principal metabolito

Tras la administración de dosis altas de metotrexato (HDMTX), la concentración sérica/plasmática de 7-hidroximetotrexato suele superar la del metotrexato en momentos posteriores. Se ha descrito que los niveles de 7-hidroximetotrexato

superan a los de metotrexato hasta 100 veces entre 12 y 48 horas después de la administración de HDMTX.[16, 28, 30, 32, 34-35]

Se determinó una reactividad cruzada con 7-hidroximetotrexato metotrexato para el Ensayo de metotrexato II de ARK probando tanto 0,050 como 0,500 µmol/l de metotrexato con 50 µmol/l de 7-hidroximetotrexato en suero humano (exceso de 1000 y 100 veces). La reactividad cruzada con este metabolito fue insignificante, inferior al 0,01%. Un exceso extremo de 1000 veces del metabolito 7-hidroximetotrexato causa menos del 10% de interferencia en la medición de metotrexato en el Ensayo de metotrexato II de ARK.

Reactividad cruzada con el ácido 2, 4-diamino-N^{10}-metilpteroico (DAMPA)

Siendo un metabolito menor del metotrexato, no está previsto que el DAMPA circule en concentraciones que interfieran en la medición del metotrexato.[32] Sin embargo, tras la terapia de rescate con glucarpidasa, la concentración sérica de DAMPA puede ser sustancial.[13, 14] El Ensayo de metotrexato II de ARK de hecho presenta una reacción cruzada con el metabolito menor DAMPA. Las pruebas se realizaron en ausencia del fármaco original metotrexato. La reactividad cruzada observada con el DAMPA osciló entre el 19% y el 58% según los datos recogidos. El ensayo no debe utilizarse durante la terapia con glucarpidasa (carboxipeptidasa G2) que convierte rápidamente el metotrexato circulante en DAMPA.

Interferencia con análogos del folato y otros compuestos

Los compuestos relacionados a continuación no interfirieron con el Ensayo de metotrexato II de ARK cuando se probaron en presencia de metotrexato (±10% de interferencia a una concentración de 0,500 µmol/l de metotrexato y ±0,010 µmol/l del control a una concentración de 0,050 µmol/l de metotrexato). Las concentraciones de los compuestos se analizaron de acuerdo con las directrices EP37 del CLSI.

Compuesto	**Conc. analizada (µmol/l)**
Adriamicina	1000
Ciclofosfamida	2200
Citosina	1000
Ácido dihidrofólico	1000
Ácido tetrahidrofólico	1000
DL-6-Metil-5,6,7,8-Tetrahidropterina	1000

Ácido fólico	1000
Ácido folínico	1000
5-Fluorouracilo	3000
6-Mercaptopurina	1000
Ácido 5-metiltetrahidrofólico	1000
Prednisolona	1000
Pirimetamina	1000
Sulfametoxazol	1600
Vinblastina	1000
Vincristina	1000
Trimetoprima	150
Triamtereno	25

13 Bibliografía

1. Información de prescripción. 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. Información de prescripción. 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 Marcas registradas

ARK™ es una marca registrada de ARK Diagnostics, Inc.

Donde aparezcan otros nombres de producto, estos también podrían ser marcas registradas.

ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 EE. UU.

Revisado en Mayo de 2025
1600-1222-00ES Rev 05