ARK Diagnostics, Inc.

ARK *Methotrexate II Assay*

ARK Diagnostics, Inc. tarafından ARK Methotrexate II Assay için hazırlanan bu prospektüs, kullanımdan önce dikkatle okunmalıdır. Prospektüs talimatlarına uygun hareket edilmelidir. Bu prospektüsteki talimatlardan herhangi bir sapma olması durumunda analiz sonuçlarının güvenilirliği garanti edilemez.

Cihazla ilgili olarak meydana gelen her türlü ciddi olayı, üreticiye ve gerekli durumlarda ilgili yetkili kuruma bildirin. Güvenlik ve Performans Özeti'ne, EUDAMED (Avrupa Tıbbi Cihaz Veri Tabanı) üzerinden, SRN: US-MF-000023925 ile erişilebilir.

Müşteri Hizmetleri

ARK Diagnostics, Inc.

48089 Fremont Blvd

Fremont, CA 94538 USA
Tel: 1-877-869-2320
Faks: 1-510-270-6298
customersupport@ark-tdm.com

www.ark-tdm.com

CE
2797

EC REP
Emergo Europe
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

CH REP
MedEnvoy Switzerland
Gotthardstrasse 28
6302 Zug
Switzerland

Kullanılan Sembollerin Açıklaması

LOT	Parti kodu	YYYY-MM-DD	Geçerlilik tarihi/Son Kullanma tarihi
REF	Katalog Numarası:		Üretici
EC REP	Yetkili Temsilci	CE 2797	CE İşareti ve onaylanmış kuruluş numarası
IVD	İn Vitro Tanısal Tıbbi Cihaz		Sıcaklık sınırlaması
	Kullanma Talimatlarına Bakın	R1 R2	Reaktif 1 / Reaktif 2
Rx Only	Yalnızca Reçeteyle Kullanılır		

© 2025, ARK Diagnostics, Inc.

Reaktif kiti REF 5071-0001-00; 5071-0001-01

1 Adı

ARK *Methotrexate II Assay*

2 Kullanım Amacı

ARK Methotrexate II Assay, otomatik klinik kimya analizörlerinde insan serumu veya plazmasında metotreksatın miktar tayini için tasarlanmış homojen bir enzim immünolojik testidir. Elde edilen ölçümler, uygun tedavinin sağlanmasına yardımcı olmak için metotreksat seviyelerinin izlenmesinde kullanılır.

Yüksek doz metotreksat kurtarma tedavisi olarak glukarpidaz (karboksipeptidaz G2) uygulanmış hastalardan alınan numuneler, ARK Methotrexate Assay II ile test edilmemelidir.

3 Testin Özeti ve Açıklaması

Eskiden Ametopterin olarak bilinen metotreksat [N-[4[[(2,4-diamino-6-pteridinil) metil] metilamino]benzoil]-L-glutamik asit], bazı neoplastik hastalıkların, şiddetli sedef hastalığının ve yetişkin romatoid artritinin tedavisinde kullanılan bir antimetabolittir.[1-3] Metotreksat, ciddi toksisite potansiyeline sahiptir. Metotreksat tedavisi gören hastalar, toksik etkilerin derhal tespit edilmesi için yakından izlenmelidir.

Metotreksat monitörizasyonu, kanser için yüksek doz metotreksat tedavisi gören hastalar için yaygın olarak kullanılır; sonuçlar, metotreksat böbrekler tarafından elimine edilirken destekleyici tedaviye rehberlik etmek için kullanılır. Lökovorin kurtarmayı içeren metotreksat tedavisi için ilgili kılavuzlara başvurulmalıdır.[1,4] Osteojenik sarkom, lösemi, non-Hodgkin lenfoma, akciğer kanseri ve meme kanseri tedavisinde, lökovorin (sitrovorum faktörü) kurtarmayla birlikte orta ila yüksek dozlarda metotreksat (yaklaşık 35 mg/m^2 - 12 g/m^2) kullanımıyla olumlu sonuçlar elde edilmiştir.[5-9]

4 Prosedürün İlkeleri

ARK Methotrexate II Assay, homojen bir enzim immünolik testidir. Testte, metotreksata bağlanabilen spesifik antikorlar kullanır. Test, rekombinant glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (rG6PDH) ile etiketlenmiş bir ilaç ile örnekte bulunan serbest ilaç arasındaki, sabit miktardaki spesifik antikor bağlanma bölgeleri için gerçekleşen rekabete dayanır Örnekte serbest ilaç bulunmadığında, tavşan monoklonal anti-metotreksat antikoru, rG6PDH ile etiketlenmiş ilaca bağlanır ve enzim aktivitesinde bir azalmaya neden olur. Numunede ilaç bulunduğunda, enzim aktivitesi artar ve bu artış ilaç konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Aktif

enzim, koenzim nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) NADH'ye dönüştürür. NADH, absorbanstaki değişim hızı spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlenir. Endojen serum G6PDH'si sonuçları etkilemez çünkü koenzim NAD sadece testte kullanılan bakteriyel enzim ile çalışır.

5 Reaktifler

REF	Ürün Açıklaması	Miktar/Hacim
5071-0001-00	**ARK Methotrexate II Assay** **Reaktif R1 – Antikor/Substrat** Metotreksata karşı tavşan monoklonal antikoru, glikoz-6-fosfat, nikotinamid adenin dinükleotit, bovin serum albümini, sodyum azit ve stabilizatörler.	1 X 16 mL
	Reaktif R2 – Enzim Bakteriyel rG6PDH ile etiketlenmiş metotreksat, tampon, bovin serum albümini, sodyum azit ve stabilizatörler.	1 X 8 mL
5071-0001-01	**ARK Methotrexate II Assay** **Reaktif R1 – Antikor/Substrat** Metotreksata karşı tavşan monoklonal antikoru, glikoz-6-fosfat, nikotinamid adenin dinükleotit, bovin serum albümini, sodyum azit ve stabilizatörler.	1 X 28 mL
	Reaktif R2 – Enzim Bakteriyel rG6PDH ile etiketlenmiş metotreksat, tampon, bovin serum albümini, sodyum azit ve stabilizatörler.	1 X 14 mL

Reaktifin Kullanımı ve Saklanması

ARK Methotrexate II Assay reaktifleri sıvı olarak sağlanır, kullanıma hazırdır ve doğrudan buzdolabından alınarak kullanılabilir. Kullanılmadıkları zamanlarda reaktifler, 2-8°C'de (36-46°F), dik konumda ve vida kapakları sıkıca kapalı olarak saklanmalıdır. Belirtilen koşullarda saklandığında reaktifler, etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir. Reaktifleri dondurmayın. 32°C'nin (90°F) üzerindeki sıcaklıklara uzun süre maruz bırakmaktan kaçının. **Reaktiflerin yanlış depolanması test performansını etkileyebilir.**

ARK Methotrexate II ürünleri, ≤%0,09 sodyum azit içerir. Tedbir amaçlı olarak, patlayıcı metal azitlerin potansiyel birikimini azaltmak için aletler de dahil olmak üzere etkilenen sıhhi tesisat yeterli miktarda suyla yıkanmalıdır. Testin diğer bileşenleri için herhangi bir özel kullanım gerekliliği bulunmamaktadır.

6 Uyarılar ve Önlemler

- Yanızca laboratuvar uzmanları tarafından **İn Vitro Tanısal** kullanım içindir.
- Yalnızca reçeteyle kullanılır. *Dikkat: ABD Federal Yasaları, bu cihazın yalnızca lisanslı bir uygulayıcı tarafından veya onun istemi üzerine satılmasına izin vermektedir.*

- R1 ve R2 reaktifleri eşleşen bir set olarak sağlanır ve farklı lot numaralarından reaktiflerle değiştirilmemelidir.
- Reaktifler, ≤%0,09 sodyum azit içerir.
- Bu test yalnızca klinik değerlendirmelerden ve diğer tanısal prosedürlerden elde edilen bilgiler doğrultusunda kullanılmalıdır.

7 Analiz İçin Numune Toplanması ve Hazırlanması

- Her laboratuvar, kalite prosedürlerine göre analiz için geçerli bir numune sağlamaktan sorumludur.
- Serum veya plazma gereklidir. Tutarlılığı sağlamak amacıyla, bireysel hastalar için aynı numune matrisinin kullanılması önerilir.
- Metotreksatın örnekleme zamanı uygulanan doza, infüzyon süresine ve hastanın klinik durumuna bağlıdır. Örnekleme zamanı için ilgili tedavi protokollerine başvurun.
- Tam kan kullanılamaz. Bu testte, aşağıdaki antikoagülanlar kullanılabilir.
    - Sodyum heparin
    - Lityum heparin
    - Potasyum EDTA
- Kan alma işlemi, terapötik ilaç izlemeyle (TDM) uyumlu kan alma tüpleriyle gerçekleştirilmelidir.
- Numunenin toplanması, işlenmesi ve santrifüj edilmesi için kan alma tüpü üreticisinin tavsiyelerine uyun.
- CLSI belgesi GP44-A4, ortak laboratuvar testleri için numune toplama ve işleme sırasında oluşabilecek artefaktları en aza indirmeye yönelik prosedürleri özetlemektedir.[10]
- Numunenin toplandığı andan analiz edildiği ana kadar bütünlüğünü korumak için köpük oluşumu önlenmeli ve tekrarlayan dondurma-çözdürme işlemlerinden kaçınılmalıdır.
- Fibrin, kırmızı kan hücreleri ve diğer partikül maddeler hatalı bir sonuca neden olabilir. Yeterli santrifüjleme sağlandığından emin olun.
- Numuneler üzerinde kabarcık veya köpük bulunması, yetersiz örnek dağıtımına ve hatalı sonuçlara yol açabilir.
- Her laboratuvar, numune stabilitesiyle ilgili mevcut literatüre ve kendi verilerine başvurmalıdır.
- ARK Diagnostics tarafından yapılan çalışmalara ve destekleyici verilere göre, berraklaştırılmış numuneler 2-8°C'de bir haftaya kadar saklanabilir. Test bir haftadan uzun süre ertelenecek ise numuneler test edilmeden önce en fazla dört hafta süreyle donmuş olarak (≤ -10°C) saklanmalıdır. Dondurma-çözme döngülerinin sayısını sınırlı tutmaya özen gösterilmelidir. Destekleyici veriler, üç dondurma - çözme döngüsünün olumsuz bir etkisi olmadığını göstermiştir.
- **Hasta numunelerinin tümü, potansiyel olarak enfeksiyöz kabul edilerek işlem görmelidir.**

8 Prosedür

Sağlanan Malzemeler
ARK Methotrexate II Assay – **REF** 5071-0001-00, 5071-0001-01

Gerekli Malzemeler – Ayrı Sağlanır
ARK Methotrexate II Calibrator – **REF** 5071-0002-00
Kalite Kontrolleri – ARK Methotrexate II Control – **REF** 5071-0003-00
Kalite Kontrolleri – ARK Methotrexate II Control – **REF** 5071-0003-01
Kalite Kontrolleri – ARK Methotrexate II Control – **REF** 5071-0003-02
ARK Methotrexate II Dilution Buffer – **REF** 5071-0004-00

Aletler
R1 ve R2 reaktiflerinin, kullanımdan önce analizöre özgü reaktif kaplarına aktarılması gerekebilir. R1 ve R2 arasında çapraz kontaminasyondan kaçının.

340 nm'de fotometrik hız tespiti yapabilen birçok otomatik klinik kimya analizörü bu test için uygundur. ARK Methotrexate II Assay'i programlamak için distribütörünüzden veya ARK Müşteri Hizmetlerinden sağlayabileceğiniz analizöre özgü uygulama dokümanına bakın. CLIA kapsamında sınıflandırılmış veya CE İşareti taşıyan Uygulama Protokolü Dokümanları, üretici tarafından doğrulanmıştır. Testin farklı ayarlar veya analizörlerle kullanımına yönelik gerekli tüm uygun doğrulama çalışmalarının gerçekleştirilmesi laboratuvarın sorumluluğundadır.

Günlük bakım için cihaza özel kullanım kılavuzuna bakın.

Analiz Sırası
Analizi çalıştırmak veya kalibre etmek için cihaza özel kullanım kılavuzuna bakın.

Kalibrasyon
ARK Methotrexate Calibrators A, B, C, D, E ve F'yi kullanarak tam kalibrasyon (6 noktalı) prosedürü gerçekleştirin ve kalibratörleri çift olarak çalıştırın. Her yeni reaktif kiti lot numarası için kalibrasyon gereklidir. Kalibrasyon eğrisini, laboratuvarın belirlediği kalite güvence planına göre en az iki farklı seviyede kalite kontrolü uygulayarak doğrulayın.

Yeniden Kalibrasyonun Gerektiği Durumlar
- Yeni bir reaktif lot numarası kullanıldığında
- Kalite kontrol sonuçlarının gerekli kıldığı durumlarda
- Standart laboratuvar protokolleri gerektirdiğinde

Kalite Kontrol (KK)

Laboratuvarlar, ARK Methotrexate II Assay için KK prosedürleri oluşturmalıdır. Kalite kontrole ilişkin tüm gereklilikler ve testler, yürürlükteki yerel, bölgesel ve/veya ulusal düzenlemeler ya da akreditasyon gerekliliklerine uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

İyi laboratuvar uygulamaları doğrultusunda, hasta örneklerinin test edildiği günlerde ve her kalibrasyon yapıldığında, en az iki farklı seviyede kalite kontrol (düşük ve yüksek tıbbi karar noktaları) uygulanması gerekir. Kontrol değerleri, eğilim ve kayma açısından izlenmelidir. Herhangi bir eğilim veya kayma tespit edilmesi ya da kontrol sonuçlarının belirtilen aralığa dönmemesi durumunda, klinik laboratuvarın kalite prosedürlerine uygun olarak tüm çalışma parametreleri gözden geçirilmelidir. Daha fazla yardım için Müşteri Hizmetleri ile iletişime geçin.

Manuel Seyreltme Protokolü
Miktar tayininin üst sınırını aşan numunelerdeki ilaç seviyelerini tahmin etmek için numunenin ARK Methotrexate II Dilution Buffer ile manuel olarak seyreltilmesi gerekir. Test edilen sonuç, seyreltme faktörüyle çarpılmalıdır.

$$\text{Manuel Seyreltme Faktörü} = \frac{\text{(Numune Hacmi + Seyreltme Tamponu Hacmi)}}{\text{Numune Hacmi}}$$

Genişletilmiş test aralığı, gerektiğinde 1:10, 1:100 veya 1:1000 oranlarında seri 1:10 örnek seyreltmeleri ile 1200 µmol/L'ye kadar doğrulanmıştır.

9 Sonuçlar

Sonuçlar, µmol/L veya µg/mL cinsinden raporlanmalıdır. µmol/L'yi µg/mL'ye dönüştürmek için elde edilen değer 2,2005 dönüşüm faktörüne bölünmelidir. Bu analizden elde edilen metotreksat değeri, diğer klinik ile birlikte kullanılmalıdır. Sonuç hata kodları için cihaza özel kullanım kılavuzuna bakın.

10 Prosedürün Sınırlamaları

Bu test yalnızca serum veya plazma ile kullanılmak üzere tasarlanmıştır. **Analiz için Numunenin Toplanması ve Hazırlanması** bölümüne bakın. Yöntemler arasında farklılıklar bulunabileceği için bireysel hasta bakımında aynı yöntemin (ve matrisin) tutarlı bir şekilde kullanılması genel olarak iyi bir uygulamadır. Aşağıdaki **Beklenen Değerler** bölümüne bakın.

ÖNEMLİ: Yüksek doz metotreksat kurtarma tedavisi olarak glukarpidaz (karboksipeptidaz G2) alan hastalardan alınan numuneler, ARK Methotrexate II Assay ile test **edilmemelidir**. Bu numunelerde, glukarpidazın metotreksatı metabolize etmesi sonucunda oluşan 4-[[2,4-diamino-6-(pteridinil)metil]-metilamino]-benzoik asit (DAMPA)[11-13] serum seviyeleri artmıştır. DAMPA, bu testte kullanılan metotreksat antikoru ile çapraz reaksiyona girer ve serum

metotreksatın doğru olarak ölçülebilmesi için en az beş ila yedi gün geçmesi gerekebilir.[14] Glukarpidaz uygulandığında, DAMPA girişimi nedeniyle oluşabilecek yalancı yüksek metotreksat konsantrasyonu sonuçlarının raporlanmasını önlemek ve bu sonuçların glukarpidaz tedavisinin yürütülmesini olumsuz etkilemesini engellemek için klinik ekipteki onkologlar laboratuvarı bilgilendirmelidir.[14] Glukarpidazın iyi tolere edilmesine ve dolaşımdaki MTX seviyelerini hızla azaltmasına rağmen, MTX'in gecikmiş renal eliminasyonu erişkin ve yaşlı hastalarda hala bir sorun olabilir.[15]

11 Beklenen Değerler

Metotreksat serum seviyeleri; kullanım endikasyonu, dozaj, uygulama şekli, tedavi rejimi, bireysel farmakokinetik özellikler, metabolizma ve diğer klinik faktörlere bağlıdır.[1,3] Örneğin meme kanseri tedavisinde serum seviyesi tipik olarak yaklaşık 10 ila 100 µmol/L'ye ulaşabilirken,[16] osteosarkom için yüksek doz tedavi ile konsantrasyon 1000 µmol/L'yi aşabilir [17] ve osteosarkomlu pediatrik hastalarda 4 saatlik bir infüzyonun ardından 3100 µmol/L'ye kadar metotreksat seviyelerine ulaşılmıştır.[18] Osteosarkom tedavisinde,[17] metotreksatın bozunma eğrisi geniş değişkenlik göstermektedir: 24. saatte 30 ila 300 µmol/L; 48. saatte 3 ila 30 µmol/L; ve 72. saatte 0,3 µmol/L'den az. 10 mg lökovorin dozu genellikle MTX infüzyonunun başlamasından 24 saat sonra intravenöz olarak uygulanır. Sonraki dozlar 24., 48. ve 72. saatlerde elde edilen MTX seviyelerine göre ayarlanır ve uygulanır. 24. saatte 50 µmol/L'yi, 48. saatte 10 µmol/L'yi ve 72. saatte 0,5 µmol/L'yi aşan metotreksat seviyeleri, potansiyel toksisiteye işaret eder ve genellikle MTX seviyesi <0,1 µmol/L olana kadar algoritmalara uygun olarak lökovorin dozunun artırılmasıyla tedavi edilir. Lökovorin kurtarma ile metotreksat tedavisine yönelik kılavuzlar, genellikle metotreksat seviyesi 0,05 µmol/L'nin altına düşene kadar lökovorin uygulamasının sürdürülmesini önerir.[1, 4] Bazı merkezlerde bu değer ≤0,10 µmol/L değeri esas alınır.[17, 19]

Reçete ve diğer bilgilerden elde edilen: Yüksek Doz Metotreksat ile Lökovorin Kurtarma Programlarını Takip Eden Toksisitenin Laboratuvar Göstergeleri.[1, 4, 20]

Klinik Durum	**Laboratuvar Bulguları**	
	Metotreksat Seviyesi (µmol/L)	**Uygulamadan sonraki saatler**
Normal Metotreksat Eliminasyonu	~10 ~1 <0,2	24 48 72
Gecikmiş Geç Dönem Metotreksat Eliminasyonu	>0,2 >0,05	72 96
Gecikmiş Erken Dönem Metotreksat Eliminasyonu ve/veya Akut Renal Hasar Bulguları	≥50 ≥5 VEYA Serum kreatininde ≥%100 artış	24 48 24

Renal toksisite önemli bir risktir ve örneğin vankomisin[21] gibi diğer ilaçların birlikte uygulanmasıyla şiddetlenebilir.[15, 20] Sindirim bozuklukları (örneğin mide bulantısı, kusma, karın ağrısı), kutanöz-mukoza bozuklukları (özellikle mukozit), hematolojik anormallikler (örneğin, nötropeni ve trombositopeni), karaciğer fonksiyon testi bozuklukları ve nörotoksisite dahil olmak üzere başka toksisite biçimleri ortaya çıkabilir.[22-29]

7-hidroksimetotreksat metabolitinin oluşum profili,[16, 28] metotreksata göre molar oranının yaklaşık 100 kata kadar çıkabilmesi[30] ve ana ilaca kıyasla daha düşük çözünürlüğe sahip olması[15, 20] göz önüne alındığında, metabolitin renal tübüllerde çökelmesine bağlı olası nefrotoksisite,[30] metotreksatın kendisinin eliminasyonunu geciktirebilir.

Glukarpidaz tedavisi, hücre içi ilacı değil, dolaşımdaki metotreksat seviyesini hızla azaltır. Glukarpidaz tedavisini takiben, metotreksat serum seviyesinde bir geri tepme etkisi gözlenmiştir.[15] DAMPA'nın eliminasyonu, metotreksatın immünolojik testle izlenmesini artık etkilemeyecek seviyelere ulaşana kadar birkaç gün sürebilir.[14]

12 Spesifik Performans Özellikleri

Her laboratuvar, analizörleri için belirlenen cihaz parametrelerini kullanarak performansın doğrulanmasından sorumludur. Beckman Coulter AU680® otomatik klinik kimya analizör sistemi üzerinde, aşağıdaki performans özellikleri elde edilmiştir.

Hassasiyet

Miktar Tayini Limiti (LOQ)

ARK Methotrexate II Assay için LOQ, CLSI EP17-A2 standardına uygun olarak belirlenmiştir ve kabul edilebilir testler arası kesinlik (≤0,010 SD) ve geri kazanım (nominal değerin ±0,010 µmol/L'si) elde edilen en düşük konsantrasyon olarak tanımlanmıştır. LOQ 0,030 µg/mL olarak belirlenmiştir ve analizöre özgü performansa bağlı olabilir.

Nominal Konsantrasyon (µmol/L)	Genel Ortalama (µmol/L)	SD	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

Ölçüm Aralığı

ARK Methotrexate II Assay'in analitik ölçüm aralığı 0,030-1,300 µmol/L'dir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (>1,300 µmol/L) metotreksat içeren numuneler, numunenin kantitatif bir sonuç için ölçüm aralığına seyreltilmesiyle test edilebilir veya ölçüm aralığının üzerinde tespit edildiği şekilde rapor edilebilir. Seyreltilmemiş numunede metotreksat konsantrasyonunu elde etmek için test sonucunu seyreltme faktörü ile çarpın. Bu aralığın altındaki sonuçları, <0,030 µg/mL olarak veya laboratuvarınızda belirlenen analizöre özgü daha yüksek LOQ'nun altında olarak rapor edin. Bu aralığın üzerindeki sonuçları ise >1,300 µmol/L olarak veya laboratuvarınızda belirlenen analizöre özgü üst LOQ'nun üzerinde olarak rapor edin.

Geri Kazanım

Doğruluk (analitik geri kazanım), metotreksat içermeyen insan serumuna konsantre metotreksat ilacı eklenerek değerlendirilmiştir. Yüksek saflıkta metotreksat içeren sertifikalı stok konsantre, test aralığını temsil eden ilaç konsantrasyonları oluşturacak şekilde, metotreksat içermeyen insan serumuna hacimsel olarak eklenmiştir. Her örneğin altı kopyası, otomatik bir klinik kimya analizöründe test edilmiştir. Sonuçların ortalaması alınmış ve hesaplanan hedef konsantrasyon ve geri kazanım yüzdesiyle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar aşağıda gösterilmiştir.

$$\% \text{ Geri kazanım} = 100 \times \frac{\text{Ortalama geri kazanılan konsantrasyon}}{\text{Teorik konsantrasyon}}$$

Teorik Konsantrasyon µmol/L	Ortalama Geri Kazanılan Konsantrasyon µmol/L	Yüzde Geri Kazanım
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

Doğrusallık

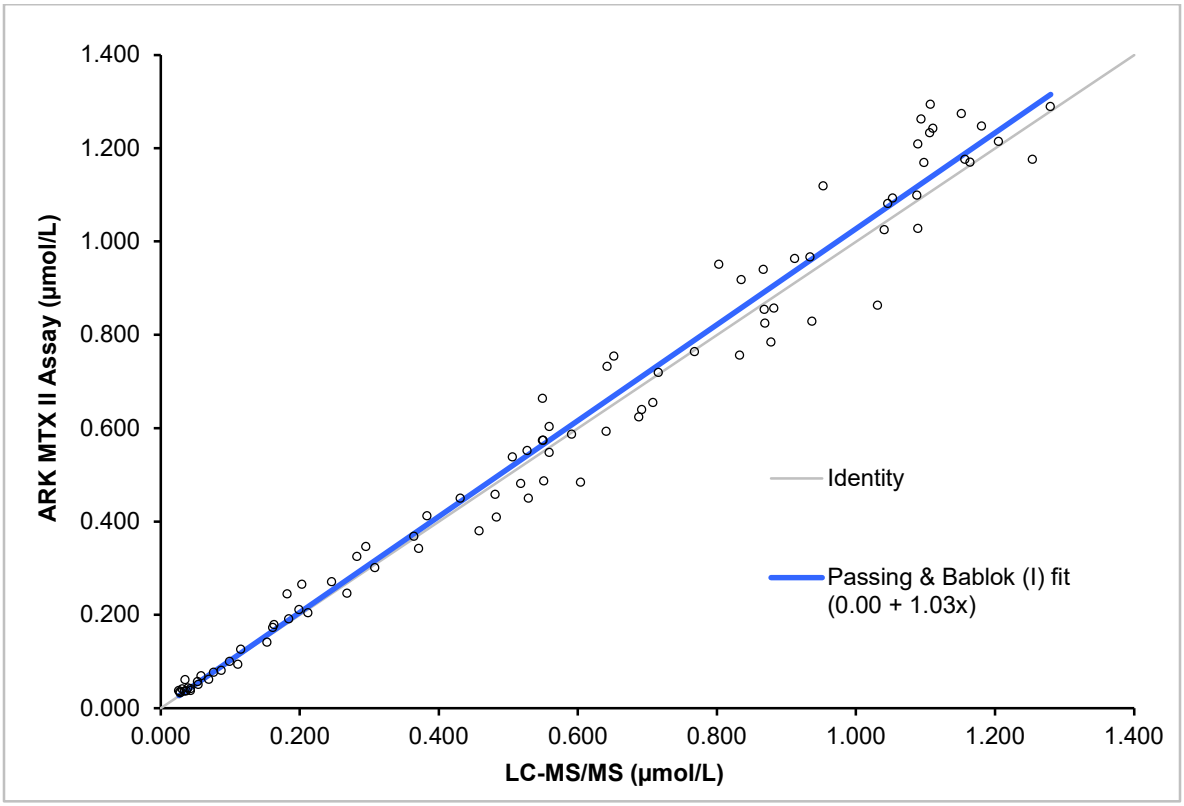
Doğrusallık çalışmaları, CLSI Protokolü EP06-Ed2'de önerildiği gibi yapılmıştır. Bir 1,600 µmol/L serum örneği hazırlanmış ve seyreltmeler, metotreksat içermeyen insan serumu ile orantılı olarak yapılmıştır. Metotreksat konsantrasyonları, 0,030 ila 1,300 µmol/L arasında değişmektedir. 0,030-1,300 µg/mL arasında doğrusal bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar aşağıda gösterilmiştir.

Nonimal Konsantrasyon (µmol/L)	Gözlenen Sonuçlar (µmol/L)	Beklenen Sonuçlar (µmol/L)	% Fark
0,000	0,000	G/D	G/D
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

Yöntem Karşılaştırması

Korelasyon çalışmaları, CLSI EP9-A3 Protokolü kullanılarak yapılmıştır. Yüksek doz metotreksat tedavisi alan hastalardan elde edilen insan serumunda ARK Methotrexate II Assay ile yapılan metotreksat ölçümleri, sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemiyle elde edilen ölçümlerle karşılaştırılmıştır. Metotreksat konsantrasyonları, LC-MS/MS ile 0,026-1,280 µmol/L arasında değişiklik göstermiştir. Çalışma için yapılan Passing-Bablok[31] regresyon analizinin sonuçları aşağıda gösterilmiştir (%95 güven sınırları ile).

Eğim	1,03	(1,00 ila 1,06)
y-kesişim noktası	0,00	(-0,01 ila 0,01)
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,98	(0,96 ila 0,98)
Örnek Sayısı	90	



Metotreksat değerleri 0,054 ila 1,168 arasında değişen 123 hasta örneği için orijinal ARK Methotrexate Assay ile de yöntem karşılaştırması yapılmıştır. Passing-Bablok karşılaştırmasına ait güven aralıklarıyla hesaplanan istatistiklere göre; eğim = 0,98 (0,95 ila 1,01); y-kesişim noktası = -0,02 (-0,03 ila -0,01) ve korelasyon katsayısı (r^2) = 0,97'dir (0,96 ila 0,98).

Kesinlik

Kesinlik, CLSI EP5-A3 Protokolü'nde tarif edildiği gibi belirlenmiştir. ARK Methotrexate II Control'ün altı kontrol seviyesinin tümü (Düşük, Orta, Yüksek, 5, 50 ve 500) ve bunlara karşılık gelen eşdeğer altı havuzlanmış insan serum örneği, çalışmada kullanılmıştır. Her seviye, 20 gün boyunca günde iki kez ve dört tekrarlı olarak test edilmiştir. Gün içinde gerçekleştirilen test çalışmaları arasında en az iki saatlik bir zaman aralığı bırakılmıştır. Çalışma içi, günler arası ve toplam SD (Standart Sapma) ile CV (Varyasyon Katsayısı) yüzdeleri hesaplanmıştır. Sonuçlar aşağıda gösterilmiştir. Kabul kriterleri: ≤%10 toplam CV.

			Çalışma İçi		Günler Arası		Toplam	
Örnek	**N**	**Ortalama µmol/L**	**SD**	**CV (%)**	**SD**	**CV (%)**	**SD**	**CV (%)**
ARK Methotrexate II Control								
DÜŞÜK	160	0,069	0,002	2,84	0,001	1,23	0,002	3,00
ORTA	160	0,411	0,006	1,40	0,002	0,43	0,006	1,40
YÜKSEK	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
İnsan Serumu								
DÜŞÜK	160	0,070	0,002	2,50	0,001	1,49	0,002	2,88
ORTA	160	0,404	0,008	1,86	0,003	0,65	0,008	1,92
YÜKSEK	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

Etkileşen Maddeler

Etkileşim çalışmaları, kılavuz olarak CLSI EP07-A3 Protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Metotreksat seviyesi bilinen (yaklaşık 0,050 ve 0,500 µmol/L) serum örneklerinde, aşağıda belirtilen potansiyel etkileşen maddelerin klinik olarak yüksek konsantrasyonları değerlendirilmiştir. Her örnek, ARK Methotrexate II Assay ve metotreksatın serum kontrolü kullanılarak test edilmiştir. Metotreksat ölçümleri, metotreksat konsantrasyonları ≤0.100 µmol/L olduğunda %±10 girişim ve serum kontrolüne göre ±0.010 µmol/L seviyesinde bulunmuştur.

		Sonuçlar	
Etkileşen Madde	**Etkileşim Konsantrasyon**	**Kontrolden ± µmol/L (0,050 µmol/L Metotreksat)**	**%Etkileşim (0,500 µmol/L Metotreksat)**
İnsan Albümin	12 g/dL	0,002	-1,04
Bilirubin - konjuge	72 mg/dL	0,001	1,96
Bilirubin - konjuge olmayan	72 mg/dL	0,003	0,23
Kolesterol	500 mg/dL	0,005	3,49
İnsan Gama Globulini	12 g/dL	0,003	2,42
Hemoglobin	1000 mg/dL	-0,006	-2,72
Romatoid Faktör	1080 IU/mL	0,001	3,52
Trigliseritler	1000 mg/dL	-0,007	7,48
Ürik Asit	30 mg/dL	0,000	1,60

Özgüllük

Metotreksatın metabolitleri, folat analogları ve yapısal benzerliğe sahip diğer bileşikler, bu bileşiklerin ARK Methotrexate Assay II kullanılarak metotreksat konsantrasyonlarının ölçümünü etkileyip etkilemediğini belirlemek için test edilmiştir. Bu bileşiklerin yüksek seviyeleri, metotreksat içermeyen veya 0,050 µmol/L ya da 0,500 µmol/L metotreksat içeren serum havuzlarına eklenmiştir. Örnekler analiz edilmiş ve etkileşen madde içeren örneklerin metotreksat konsantrasyonları bir serum kontrolüyle karşılaştırılmıştır.

Majör metabolit olan 7-Hidroksimetotreksat ile etkileşim

Yüksek doz metotreksat (HDMTX) uygulanması sonrasında, 7-hidroksimetotreksatın serum/plazma konsantrasyonu genellikle daha sonraki zaman noktalarında metotreksat konsantrasyonunu aşmaktadır. HDMTX uygulamasından 12 ila 48 saat sonra 7-hidroksimetotreksat seviyelerinin metotreksat seviyelerini 100 kata kadar aştığı bildirilmiştir.[16, 28, 30, 32, 34-35]

ARK Methotrexate II Assay'in 7-hidroksimetotreksat ile çapraz reaktivitesi, 50 µmol/L 7-hidroksimetotreksat (0,050 ve 0,500 µmol/L metotreksata göre sırasıyla 1000 ve 100 kat fazla) ilave edilmiş insan serumu örnekleri test edilerek belirlenmiştir. Bu metabolit ile çapraz reaktivite %0,01 'in altında olup ihmal edilebilir seviyededir. 7-hidroksimetotreksat metabolitinin 1000 katlık aşırı fazlalığı, ARK Methotrexate II Assay ile metotreksat ölçümünde %10'dan daha az etkileşime neden olur.

2,4-Diamino-N^{10}-metilpteroik asit (DAMPA) ile çapraz reaktivite

Metotreksatın minör bir metaboliti olan DAMPA'nın metotreksatın ölçümünü etkileyecek konsantrasyonlarda dolaşımda bulunması beklenmez.[32] Bununla birlikte, glukarpidaz kurtarma tedavisini takiben, serumdaki DAMPA konsantrasyonu önemli seviyelere ulaşabilir.[13, 14] ARK Methotrexate II Assay, minör metabolit olan DAMPA ile önemli ölçüde çapraz reaksiyona girer. Testler, ana ilaç olan metotreksatın bulunmadığı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere göre, DAMPA ile çapraz reaktivite %19 ile %58 arasında değişiklik göstermiştir. Bu test, dolaşımdaki metotreksatı hızla DAMPA'ya dönüştüren glukarpidaz (karboksipeptidaz G2) tedavisi sırasında kullanılmamalıdır.

Folat analoglarına ve diğer bileşikler ile etkileşim

Aşağıda listelenen bileşikler, metotreksat varlığında test edildiklerinde ARK Methotrexate II Assay ile etkileşime girmemiştir (0,500 µmol/L metotreksat konsantrasyonunda %±10 etkileşim ve 0,050 µmol/L metotreksat konsantrasyonunda kontrole göre ±0,010 µmol/L). Bileşik konsantrasyonları CLSI EP37 kılavuzlarına göre test edilmiştir.

Bileşik	**Test Kons. (µmol/L)**
Adriamisin	1000
Siklofosfamid	2200
Sitozin	1000
Dihidrofolik Asit	1000
Tetrahidrofolik Asit	1000
DL-6-Metil-5,6,7,8-Tetrahidropterin	1000
Folik Asit	1000
Folinik Asit	1000
5-Florourasil	3000
6-Merkaptopürin	1000
5-Metiltetrahidrofolik asit	1000
Prednizolon	1000
Pirimetamin	1000
Sülfametoksazol	1600
Vinblastin	1000
Vinkristin	1000
Trimetoprim	150
Triamteren	25

13 Referanslar

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. ve ark. 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. ve ark. 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. ve ark. 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. ve ark. 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. ve ark. 1972. Enzymatic cleavage of methotrexate provides a method for prevention of drug toxicity. *Nature* **239**:395 – 397.

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

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

14. Al-Turkmani, M. R. ve ark., 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. ve ark. 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. ve ark. 2009. Population Pharmacokinetics of High-Dose Methotrexate After Intravenous Administration in Pediatric Patients With Osteosarcoma. *Ther Drug Monit* **31**:76 – 85.

19. Dombrowsky, E. ve ark. 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. ve ark. 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. ve ark. 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. ve ark. 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. ve ark. 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. ve ark. 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. ve ark. 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. ve ark. 1985. 7-Hydroxy-Methotrexate and Clinical Toxicity Following High-Dose Methotrexate Therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* **109**:86 – 88.

31. Bablok, W. ve ark. 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. ve ark. 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. ve ark. 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. ve ark. 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 Ticari markalar

ARK™, **ARK** Diagnostics, Inc.'ın ticari markasıdır.
Diğer marka veya ürün adları, ilgili sahiplerinin ticari markalarıdır.

ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 USA

Mayıs 2025'te revize edilmiştir
1600-1222-00TR Rev 05