

**ARK™ Methotrexate Assay**

Bitte lesen Sie diese Packungsbeilage für den ARK Methotrexate Assay von ARK Diagnostics, Inc. vor der Verwendung sorgfältig durch und befolgen Sie die Anweisungen. Die Zuverlässigkeit der Testergebnisse kann nicht gewährleistet werden, wenn die Anweisungen in dieser Packungsbeilage nicht befolgt werden.

Melden Sie alle schwerwiegenden Vorfälle im Zusammenhang mit diesem Produkt dem Hersteller und gegebenenfalls der zuständigen Behörde. Eine Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung ist über die Eudamed (Europäische Datenbank für Medizinprodukte) erhältlich, SRN: US-MF-000023925.

**Kundenservice**


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


**2797**





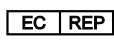





EC	REP
----	-----

Emergo Europe  
 Westervoortsedijk 60  
 6827 AT Arnhem  
 The Netherlands

CH	REP
----	-----

MedEnvoy Switzerland  
 Gotthardstrasse 28  
 6302 Zug  
 Switzerland

**Verwendete Symbole**

	Chargenbezeichnung	 YYYY-MM-DD	Verwendbar bis / Verfallsdatum
	Bestellnummer		Hersteller
	Autorisierte Vertretung	 2797	CE-Zeichen mit Kennnummer der Benannten Stelle
	<i>In-vitro</i> -diagnostisches Medizinprodukt		Temperaturbeschränkung
	Siehe Gebrauchsanweisung		Reagenz 1/ Reagenz 2
<b>Rx Only</b>	Verwendung nur gemäß Vorschrift		

## 1 Name

**ARK<sup>TM</sup> Methotrexate Assay**

## 2 Verwendungszweck

Der ARK Methotrexate Assay ist ein homogener Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Methotrexat in Humanserum oder -plasma auf klinisch-chemischen Analysensystemen. Die ermittelten Werte werden zur Überwachung von Methotrexat-Spiegeln verwendet, um eine angemessene Therapie zu gewährleisten.

Proben von Patienten, die Glucarpidase (Carboxypeptidase G2) im Rahmen einer Hochdosis Methotrexat-Rescue-Therapie erhalten, sollten nicht mit dem ARK Methotrexate Assay getestet werden.

## 3 Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Methotrexat [N-[4[[[(2,4-Diamino-6-Pteridiny] Methyl] Methylamino] Benzoyl]-L-Glutaminsäure], früher Amethopterin, ist ein Antimetabolit, der zur Behandlung bestimmter neoplastischer Erkrankungen, schwerer Psoriasis und rheumatoider Arthritis bei Erwachsenen eingesetzt wird.<sup>1-3</sup> Methotrexat kann potentiell schwere Toxizitäten verursachen. Patienten, die sich einer Methotrexat-Therapie unterziehen, sollten sorgfältig überwacht werden, um toxische Nebenwirkungen schnell erkennen zu können.

Methotrexat-Monitoring wird häufig bei Patienten eingesetzt, die sich einer hochdosierten Methotrexat-Behandlung gegen Krebs unterziehen. Die Ergebnisse dienen als Grundlage für die unterstützende Therapie, während Methotrexat über die Nieren ausgeschieden wird. Die Richtlinien zur Methotrexat-Therapie mit Leucovorin Rescue sollten berücksichtigt werden.<sup>1</sup> Mittlere bis hohe Methotrexat-Dosen (ca. 35 mg/m<sup>2</sup> - 12 g/m<sup>2</sup>) mit Leucovorin (Citrovorum-Faktor) Rescue wurden mit guten Ergebnissen zur Behandlung von osteogenen Sarkomen, Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphomen sowie Lungen- und Brustkrebs eingesetzt.<sup>4-8</sup>

## 4 Grundlagen des Verfahrens

Der ARK Methotrexate Assay ist ein homogener Enzymimmunoassay, bei dem der Wirkstoff in der Probe mit Methotrexat, das an das Enzym Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) gekoppelt wurde, um eine Bindung an das Antikörper-Reagenz konkurriert. Je mehr Antikörper es bindet, desto mehr sinkt die Enzymaktivität. Ist Wirkstoff in der Probe vorhanden, steigt die Enzymaktivität. Sie ist direkt proportional zur Wirkstoffkonzentration. Das aktive

Enzym wandelt das Koenzym Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) zu NADH um. Dieses wird spektralphotometrisch als Änderung der Extinktionsrate gemessen. Das endogene Serum G6PDH hat keinen störenden Einfluss auf die Ergebnisse, da das Koenzym NAD lediglich mit dem bakteriellen Enzym im Assay interagiert.

## 5 Reagenzien

REF	Produktbeschreibung	Menge/Volumen
5026-0001-00	<b>ARK Methotrexate Assay</b>	
5026-0001-02	<b>Reagenz R1 – Antikörper/Substrat</b> Polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen Methotrexat, Glukose-6-Phosphat, Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, bovines Serumalbumin, Konservierungsmittel und Stabilisatoren	1 X 16 mL
5026-0001-03	<b>Reagenz R2 – Enzym</b> Mit bakteriellem G6PDH markiertes Methotrexat, Puffer, bovines Serumalbumin, Konservierungsmittel und Stabilisatoren	1 X 8 mL

REF	Produktbeschreibung	Menge/Volumen
5026-0001-01	<b>ARK Methotrexate Assay</b>	
	<b>Reagenz R1 – Antikörper/Substrat</b> Polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen Methotrexat, Glukose-6-Phosphat, Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, bovines Serumalbumin, Konservierungsmittel und Stabilisatoren	1 X 28 mL
	<b>Reagenz R2 – Enzym</b> Mit bakteriellen G6PDH markiertes Methotrexat, Puffer, bovines Serumalbumin, Konservierungsmittel und Stabilisatoren	1 X 14 mL

### Handhabung und Lagerung der Reagenzien

Die ARK Methotrexate Assay Reagenzien werden flüssig und gebrauchsfertig geliefert und können direkt aus dem Kühlschrank verwendet werden. Wenn die Reagenzien nicht in Gebrauch sind, lagern Sie sie aufrecht und fest verschlossen bei 2-8°C. Die Reagenzien sind bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett stabil, wenn sie gemäß Anweisung gelagert werden. Frieren Sie die Reagenzien nicht ein. Vermeiden Sie eine längere Einwirkung von Temperaturen über 32°C. **Eine unsachgemäße Lagerung der Reagenzien kann die Testleistung beeinträchtigen.**

## 6 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- **In-vitro-Diagnostikum.** Gebrauch nur gemäß Vorschrift.
- Die Reagenzien **R1** und **R2** werden als zusammengehöriges Set geliefert und dürfen nicht mit Reagenzien anderer Chargen ausgetauscht werden.

## 7 Probennahme und Vorbereitung für die Analyse

- Jedes Labor ist selbst dafür verantwortlich, gemäß seinen Qualitätsverfahren eine geeignete Probe für die Analyse bereitzustellen.
- Als Probenmaterial wird Serum oder Plasma benötigt. Aus Gründen der Konsistenz empfiehlt es sich, für jeden Patienten immer die gleiche Probenmatrix zu verwenden.
- Die Abnahmezeit der Methotrexat-Probe hängt ab von der Dosis, der Infusionsdauer und dem klinischen Zustand des Patienten. Beachten Sie die spezifischen Behandlungsprotokolle für die Festlegung der Probennahmezeit.
- Vollblut kann nicht verwendet werden. Bei diesem Test dürfen folgende Antikoagulantien verwendet werden:
  - Natrium-Heparin
  - Lithium-Heparin
  - Kalium-EDTA
- Die Blutabnahme muss mit Entnahmeröhrchen erfolgen, die für das Therapeutische Drug Monitoring (TDM) geeignet sind.
- Befolgen Sie bei der Abnahme, Verarbeitung und Zentrifugierung der Probe die Empfehlungen des Herstellers des Entnahmeröhrchens.
- Das CLSI-Dokument GP44-A4 beschreibt Verfahren zur Minimierung von Artefakten bei der Probenabnahme und -handhabung bei gängigen Labortests.<sup>35</sup>
- Vermeiden Sie Schaumbildung und wiederholtes Einfrieren und Auftauen, um die Probenintegrität von der Abnahme bis zum Zeitpunkt der Analyse zu sicherzustellen.
- Fibrin, rote Blutkörperchen und andere Partikel können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Achten Sie auf eine ausreichende Zentrifugierung.
- Die Bildung von Bläschen oder Schaum in der Probe kann zu falschen Ergebnissen führen und dazu, dass nicht ausreichend Probenmaterial zur Verfügung steht.
- Jedes Labor sollte die verfügbare Literatur sowie interne Daten zur Probenstabilität konsultieren.
- Geklärte Proben können bis zu zwei Wochen bei 2-8°C gelagert werden. Wenn die Messung später erfolgen soll, können die Proben vor der Messung eingefroren werden ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ). Achten Sie darauf, die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen zu begrenzen. Proben, die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden, konnten drei Gefrier-Auftau-Zyklen überstehen.
- **Behandeln Sie alle Patientenproben als potentiell infektiös.**

## 8 Vorgehensweise

### Mitgelieferte Materialien

ARK Methotrexate Assay – REF 5026-0001-00, 5026-0001-01

ARK Methotrexate Assay, Roche® cobas c pack – REF 5026-0001-02

ARK Methotrexate Assay, Roche® cobas c pack green – **REF** 5026-0001-03

### **Benötigte Materialien – nicht im Lieferumfang enthalten**

ARK Methotrexate Calibrator – **REF** 5026-0002-00

Qualitätskontrollen – ARK Methotrexate Control – **REF** 5026-0003-00

ARK Methotrexate Dilution Buffer – **REF** 5026-0004-00

### **Analysensystem**

Die Reagenzien **R1** und **R2** müssen eventuell vor der Verwendung in gerätespezifische Probengefäße umgefüllt werden. Vermeiden Sie eine Kreuzkontamination von **R1** und **R2**.

Viele automatisierte klinisch-chemische Analysensysteme mit photometrischer Bestimmung bei 340 nm sind geeignet. Informationen zur Programmierung des ARK Methotrexate Assays finden Sie im gerätespezifischen Applikationsprotokoll. Dieses erhalten Sie von Ihrem Lieferanten bzw. vom ARK Kundenservice. Die Applikationsprotokolle, die CLIA-kategorisiert wurden oder ein CE-Zeichen tragen, wurden vom Hersteller geprüft. Es liegt in der Verantwortung des Labors, für die Durchführung des Assays mit anderen Einstellungen oder anderen Analysensystemen die erforderlichen Validierungen durchzuführen.

Informationen zur täglichen Wartung finden Sie in der gerätespezifischen Bedienungsanleitung.

### **Testverfahren**

Informationen zur Durchführung bzw. zur Kalibration des Tests finden Sie im Benutzerhandbuch des entsprechenden Gerätes.

### **Kalibration**

Führen Sie mit den ARK Methotrexate Calibrators A, B, C, D, E und F eine vollständige 6-Punkt-Kalibration in Doppelbestimmung durch. Für jede neue Charge des Reagenzkits ist eine Kalibration erforderlich. Überprüfen Sie die Kalibrationskurve mit mindestens zwei Qualitätskontroll-Konzentrationen gemäß dem in Ihrem Labor festgelegten Qualitätssicherungsplan.

### **Gründe für eine Neukalibration**

- Wenn eine neue Reagenz-Charge verwendet wird
- Wenn die Ergebnisse der Qualitätskontrolle es erfordern
- Wenn das Standard-Laborprotokoll es erfordert

### **Qualitätskontrolle (QC)**

Jedes Labor sollte Qualitätskontroll-Verfahren für den ARK Methotrexate Assay festlegen. Alle Vorgaben an die Qualitätskontrolle und alle Messungen sollten unter Berücksichtigung der lokalen, Landes- und Bundesvorschriften oder Akkreditierungsanforderungen befolgt werden.

In der Laborpraxis hat es sich bewährt, mindestens zwei Kontrollkonzentrationen (unterer bzw. oberer medizinischer Entscheidungspunkt) an jedem Tag zu testen, an dem Patientenproben gemessen werden bzw. jedes Mal, wenn eine Kalibration durchgeführt wird. Überwachen Sie die Kontrollwerte auf mögliche Trends und Verschiebungen. Wenn Sie Trends oder Verschiebungen erkennen oder wenn eine Wiederfindung innerhalb des definierten Kontrollbereichs nicht möglich ist, überprüfen Sie alle Funktionsparameter entsprechend den Qualitätskontrollverfahren Ihres Labors. Kontaktieren Sie unseren Kundenservice zur weiteren Unterstützung.

### Protokoll für die manuelle Verdünnung

Der Messbereich des ARK Methotrexate Assays liegt zwischen 0.04 und 1.20 µmol/L. Proben und Kontrollen mit höheren Methotrexat-Konzentrationen (>1.20 µmol/L) können gemessen werden, indem die Proben bzw. Kontrollen durch Verdünnung in den Messbereich gebracht werden.

Verdünnen Sie Proben oder Kontrollen mit hoher Wirkstoffkonzentration manuell mit dem ARK Methotrexate Dilution Buffer, indem Sie, wie unten gezeigt, eine entsprechende 10-fache Serienverdünnung erstellen:

Probenvolumen	Dilution Buffer Volumen	Verdünnung	Verdünnungs-faktor
50 µL Unverdünnte Probe	450 µL	1:10	10
50 µL 1:10 Probe	450 µL	1:100	100
50 µL 1:100 Probe	450 µL	1:1000	1000
50 µL 1:1000 Probe	450 µL	1:10000	10000

$$\text{Manueller Verdünnungsfaktor} = \frac{(\text{Probenvolumen} + \text{Volumen des Verdünnungspuffers})}{\text{Probenvolumen}}$$

Multiplizieren Sie das Testergebnis mit dem Verdünnungsfaktor.

## 9 Ergebnisse

Um µmol/L in µg/mL umzurechnen, dividieren Sie die ermittelten Werte durch den Umrechnungsfaktor 2.2005.

## 10 Grenzen des Verfahrens

Dieser Assay ist lediglich für die Verwendung mit Serum oder Plasma vorgesehen; weitere Informationen dazu finden Sie im Abschnitt **Probenabnahme und Vorbereitung für die Analyse**. In der Praxis hat es sich bewährt, das jeweils gleiche Verfahren (und die gleiche Probenmatrix) für

einzelne Patienten zu verwenden, da möglicherweise Unterschiede zwischen verschiedenen Methoden existieren. Weitere Informationen finden Sie im nachstehenden Abschnitt **Erwartete Werte**.

Wie bei allen Analyt-Bestimmungen sollten auch bei Methotrexat die Messwerte im Zusammenhang mit Informationen aus klinischen Untersuchungen und anderen diagnostischen Verfahren verwendet werden.

**Wichtige Hinweise:** Proben von Patienten, die Glucarpidase (Carboxypeptidase G2) Hochdosis Methotrexat Rescue Therapie erhalten, sollten **nicht** mit dem ARK Methotrexate Assay gemessen werden. Diese Proben enthalten durch den Abbau von Methotrexat durch Glucarpidase eine erhöhte Serum-Konzentration von 4-[[2,4-Diamino-6-(Pteridiny)methyl]-Methylamino]-Benzoessäure (DAMPA).<sup>10-12</sup> DAMPA zeigt eine Kreuzreaktivität mit dem in diesem Test verwendeten Methotrexat-Antikörper. Es kann mindestens fünf bis sieben Tage lang im Blut zirkulieren, bevor wieder präzise Methotrexat-Serumkonzentrationen gemessen werden können.<sup>13</sup> Die Onkologen im klinischen Team sollten das Labor darüber informieren, wenn Glucarpidase eingesetzt wurde, um so die Weitergabe falsch-erhöhter Methotrexat-Werte infolge einer Interferenz mit DAMPA und damit die Störung einer Glucarpidase-Therapie zu vermeiden.<sup>13</sup> Obwohl Glucarpidase meist gut vertragen wird und zirkulierendes Methotrexat schnell abbaut, kann eine verzögerte Eliminierung von MTX über die Niere dennoch Probleme bei erwachsenen und älteren Patienten verursachen.<sup>14</sup>

## 11 Erwartete Werte

Methotrexat-Serumkonzentrationen sind abhängig von der Indikation für den Einsatz, der Dosierung, der Art der Gabe, dem Behandlungsschema, der individuellen Pharmakokinetik, dem Metabolismus sowie anderen klinischen Faktoren.<sup>1,3</sup> Während etwa die Serumkonzentrationen bei der Behandlung von Brustkrebs<sup>15</sup> typischerweise bei ungefähr 10 bis 100 µmol/L liegen, können bei einer Hochdosis-Therapie von Osteosarkomen Konzentrationen von über 1000 µmol/L auftreten.<sup>16</sup> Bis zu 3100 µmol/L Methotrexat wurden gemessen nach einer vierstündigen Infusion bei pädiatrischen Osteosarkom-Patienten.<sup>17</sup> Bei der Behandlung von Osteosarkomen<sup>16</sup> zeigt die Zerfallskurve von Methotrexat eine hohe Variabilität: 24 Stunden: 30 bis 300 µmol/L; 48 Stunden: 3 bis 30 µmol/L; und 72 Stunden: weniger als 0.3 µmol/L. Eine Dosis von 10 mg Leucovorin wird üblicherweise 24 Stunden nach Beginn der MTX-Infusion intravenös gegeben. Die folgenden Dosen werden entsprechend den MTX-Konzentrationen nach 24, 48 und 72 Stunden angepasst und verabreicht. Methotrexat-Konzentrationen höher als 50 µmol/L nach 24 Stunden, 10 µmol/L nach 48 Stunden und 0.5 µmol/L nach 72 Stunden weisen auf eine mögliche Toxizität hin und führen üblicherweise zu einer erhöhten Leucovorin-Dosis entsprechend dem Behandlungsalgorithmus, bis die MTX-Konzentration bei <0.1 µmol/L liegt. In den Leitlinien für die Methotrexat-Therapie mit Leucovorin Rescue wird normalerweise die Fortsetzung der Leucovorin-Gabe empfohlen, bis die

Methotrexat-Konzentration unter 0.05 µmol/L fällt.<sup>1, 9</sup> Einige Zentren verwenden ≤ 0.10 µmol/L als Zielwert.<sup>16, 18</sup>

Aus Gebrauchsinformationen und anderen Quellen: Labor-Indikatoren für Toxizitäten nach Leucovorin Rescue Schemata mit Hoch-Dosis-Methotrexat.<sup>1, 9, 19</sup>

Klinische Situation	Laborbefunde	
	Methotrexat-Level (µmol/L)	Stunden nach Gabe
Normale Methotrexat-Eliminierung	~10	24
	~1	48
	<0.2	72
Verzögerte, späte Methotrexat-Eliminierung	>0.2	72
	>0.05	96
Verzögerte, frühe Methotrexat-Eliminierung	≥50	24
	≥5	48
bzw.	OR	
Hinweise auf akute Nierenschädigung	≥100% Zunahme von Serum-Creatinin	24

Nephrotoxizität stellt ein erhebliches Risiko dar und kann durch die gleichzeitige Gabe anderer Medikamente wie Vancomycin<sup>20</sup> verstärkt werden.<sup>14, 19</sup> Auch andere Formen von Toxizität können auftreten, z. B. Störungen des Verdauungstraktes (z.B. Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen), Haut- bzw. Schleimhautprobleme (hauptsächlich Mukositis), hämatologische Abnormalitäten (z.B. Neutropenie und Thrombozytopenie), Störungen von Leberfunktionstests und Neurotoxizität.<sup>21-28</sup>

Aufgrund des Erscheinungsprofils des Metaboliten 7-Hydroxymethotrexat,<sup>15, 27</sup> seinem bis zu 100-fachen molaren Verhältnis zu Methotrexat<sup>29</sup> und seiner im Vergleich zur Muttersubstanz relativen Unlöslichkeit,<sup>14, 19</sup> sowie der möglichen Nephrotoxizität durch Präzipitation des Metaboliten in den Nierenkanälen<sup>29</sup> kann die Eliminierung von Methotrexat verlangsamt sein.

Die Glucarpidase-Therapie senkt zwar den zirkulierenden Methotrexat-Spiegel schnell, nicht jedoch den intrazellulären Wirkstoffspiegel. Nach einer Glucarpidase-Therapie wurde ein Rebound-Effekt des Methotrexat-Spiegels im Serum beobachtet.<sup>14</sup> Es kann mehrere Tage dauern, bis DAMPA vollständig ausgeschieden ist und das Monitoring von Methotrexat mittels Immunoassay nicht mehr beeinträchtigt wird.<sup>13</sup>

## 12 Spezifische Leistungsparameter

Jedes Labor ist verpflichtet, die Leistung des Assays mit den für das laborspezifische Analystensystem festgelegten Geräteparametern selbst zu verifizieren. Die folgenden Leistungsparameter wurden auf einem Beckman Coulter AU680 System ermittelt.

### Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantitation, LoQ)

Gemäß CLSI Protokoll EP17-A2 wurden die folgenden Parameter für den ARK Methotrexate Assay ermittelt. Gerätespezifische Leistungsmerkmale können variieren.

Kriterium	MTX Konzentration ( $\mu\text{mol/L}$ )
Erfassungsgrenze (Limit of Blank, LoB); N = 60 $\mu\text{B} + 1.645 \text{ SD}$ , bei $\text{SD} = 0.002$	0.00
Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD); N = 60 $\text{LoB} + 1.652 \text{ SD}$ , bei $\text{SD} = 0.012$	0.02
Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantitation, LoQ); N = 40 $\text{LoQ} - 2 \text{ SD} > \text{LoD}$	0.04

Jedes Labor ist selbst dafür verantwortlich, Kriterien zur Herausgabe von Methotrexat-Werten festzulegen. Die folgenden Vorschläge des CLSI EP17-A2 Protokolls sind eventuell hilfreich:

- Ergebnis  $\leq$  LoB            "kein Nachweis; Konzentration  $<$  LoD"
- LoB  $<$  Ergebnis  $<$  LoQ    "Analyt nachgewiesen; Konzentration  $<$  LoQ"
- Ergebnis  $\geq$  LoQ            Weitergabe des Ergebnisses wie gemessen

### Messbereich

Der analytische Messbereich des ARK Methotrexat Assays liegt zwischen 0,04 und 1,20  $\mu\text{mol/L}$ . Proben, die Methotrexat in höheren Konzentrationen enthalten, werden durch die Verdünnung der Proben analysiert. Geben Sie gemessene Werte, die den LOD überschreiten, gemäß den Angaben zur LoQ an.

Multiplizieren Sie das Messergebnis mit dem Verdünnungsfaktor für Proben, die Methotrexat über dem Messbereich enthalten.

### Wiederfindung

Die Genauigkeit (analytische Wiederfindung) wurde durch Zusatz des konzentrierten Methotrexat-Wirkstoffs zu Methotrexat-freiem Humanserum bestimmt. Methotrexat-freies Humanserum wurde mit einer zertifizierten Stocklösung mit konzentriertem hochreinen Methotrexat dotiert, um Wirkstoff-Konzentrationen im gesamten Messbereich zu erhalten. Sechs Replikate jeder Probe wurden auf einem klinisch-chemischen Analysensystem gemessen. Aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert gebildet und die prozentuale Wiederfindung unter Berücksichtigung der Sollkonzentration berechnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

$$\% \text{ Wiederfindung} = 100 \times \frac{\text{Mittlere wiedergefundene Konzentration}}{\text{Theoretische Konzentration}}$$

Theoretische Konzentration (µmol/L)	Wiedergefundene Konzentration Mittelwert µmol/L)	Prozentuale Wiederfindung (%)
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

Mittlere prozentuale Wiederfindung: 104.2

### Linearität

Gemäß CLSI Protokoll EP6-A wurden Linearitätsstudien durchgeführt. Eine Serumprobe von 1.40 µmol/L wurde vorbereitet und proportional mit Methotrexat-freiem Humanserum verdünnt. Der ARK Methotrexate Assay war linear zwischen 0.03 und 1.20 µmol/L Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

Theoretischer Wert (µmol/L)	Gemessener Wert (µmol/L)	Prognostizierte Ergebnisse 1. Ordnung	Prognostizierte Ergebnisse 2. Ordnung	Differenz (µmol/L oder %)
0.00	0.01	-0.002	0.010	NA
0.03	0.04	0.029	0.038	0.009 µmol/L
0.05	0.06	0.050	0.057	0.007

0.12	0.13	0.124	0.125	µmol/L 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 %

Proben mit Methotrexat-Konzentrationen zwischen 2 und 1200 µmol/L wurden proportional in gepooltem Humanserum angesetzt und dann mit dem ARK Methotrexate Dilution Buffer in den Messbereich verdünnt. Die Regression der gemessenen Methotrexat-Konzentrationen war über den gesamten Messbereich linear.

### Methodenvergleich

Gemäß CLSI Protokoll EP9-A3 wurden Korrelationsstudien durchgeführt. Die Ergebnisse für den ARK Methotrexate Assay am Beckman Coulter AU680 Analysensystem wurden mit den Ergebnissen am Roche/Hitachi 917 Analysensystem verglichen.

Die Methotrexat-Konzentrationen am Roche/Hitachi 917 lagen zwischen 0,04 und 1050 µmol/L (µM). Die mit dem Beckman Coulter AU680 ermittelten Werte lagen zwischen 0.04 und 1070 µmol/L. Die Ergebnisse der Passing-Bablok<sup>30</sup> Regressionsanalyse für die Studie finden Sie weiter unten (mit einem Konfidenzintervall von 95%), sowohl für die 112 Proben innerhalb des Messbereichs als auch für die 142 Proben im erweiterten Messbereich, die verdünnt werden mussten.

Parameter	Bereich 0.04 bis 1.11 µM		Bereich 0.04 bis 1050 µM	
<b>Steigung</b>	0.99	(0.96 bis 1.00)	1.00	(1.00 bis 1.02)
<b>y-Schnittpunkt</b>	0.00	(0.00 bis 0.01)	0.00	(0.00 bis 0.00)
<b>Korrelationskoeffizient (r<sup>2</sup>)</b>	0.98	(0.97 bis 0.98)	1.00	(1.00 bis 1.00)
<b>Anzahl der Proben</b>	112	NA	142	NA

### Präzision

Die Präzision wurde gemäß CLSI Protokoll EP5-A3 bestimmt. Für die Studie wurden Methotrexat-Kontrollen mit sechs verschiedenen Konzentrationen sowie gepoolte Humanserumproben verwendet. Jeder Level wurde in

Vierfachbestimmung zweimal pro Tag über 20 Tage gemessen. Zwischen den Messläufen eines Tages lagen mindestens zwei Stunden. Dabei wurden die SD-Werte innerhalb der Messläufe, von Tag zu Tag, der Gesamt-SD-Wert sowie die prozentualen Variationskoeffizienten (VK) berechnet. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst. Akzeptanzkriterien:  $\leq 10\%$  Gesamt-VK bei  $>0.1 \mu\text{mol/L}$ ,  $\text{SD} \leq 0.01$  bei  $\leq 0.1 \mu\text{mol/L}$ .

Probe	N	Mittelwert ( $\mu\text{mol/L}$ )	Within Run		Von Tag zu Tag		Gesamt	
			SD	%VK	SD	%VK	SD	%VK
ARK Methotrexate Control								
LOW	160	0.08	0.006	7.8	0.004	5.5	0.008	9.6
MID	160	0.39	0.009	2.2	0.007	1.7	0.012	3.1
HIG	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
Humanserum								
LOW	160	0.08	0.007	8.9	0.006	7.2	0.009	11.2
MID	160	0.41	0.011	2.6	0.008	2.1	0.015	3.7
HIGH	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

### Störende Substanzen

Gemäß CLSI Protokoll EP7-A2 wurden Interferenzstudien durchgeführt. Dabei wurden klinisch hohe Konzentrationen der nachstehenden potentiell störenden Substanzen in Serum mit bekannten Methotrexat-Konzentrationen (ca. 0.05 und 0.50  $\mu\text{mol/L}$ ) getestet. Jede Probe wurde mit dem ARK Methotrexate Assay gemessen; zusätzlich wurde eine Methotrexat-Serumkontrolle getestet. Die Messung von Methotrexat wurde bei den getesteten Konzentrationen der endogenen Substanzen nicht wesentlich beeinträchtigt.

Störende Substanz	Konzentration	Methotrexat (~ 0.05 $\mu\text{mol/L}$ )		Methotrexat (~ 0.50 $\mu\text{mol/L}$ )	
		Serum-Kontrolle	Test	Serum-kontrolle	Test

					(% Kontrolle)
Albumin	12 g/dL	0.05	0.05	0.48	0.50 (103.5)
Bilirubin - konjugiert	70 mg/dL	0.05	0.06	0.48	0.49 (101.4)
Bilirubin – unkonjugiert	70 mg/dL	0.05	0.05	0.48	0.48 (101.4)
Cholesterin	620 mg/dL	0.05	0.04	0.47	0.48 (103.2)
Gamma-Globulin	12 g/dL	0.05	0.06	0.48	0.49 (100.7)
Hämoglobin	1000 mg/dL	0.06	0.06	0.48	0.49 (101.4)
Rheumafaktor	1080 IU/mL	0.06	0.07	0.46	0.45 (96.7)
Triglyzeride	835 mg/dL	0.05	0.04	0.48	0.48 (98.6)
Harnsäure	30 mg/dL	0.05	0.06	0.48	0.49 (100.7)

### Spezifität

Methotrexat-Metaboliten, Folat-Analoga und andere Komponenten mit struktureller Ähnlichkeit wurden getestet, um zu ermitteln, ob diese Verbindungen die Messung der Methotrexat-Konzentrationen mit dem ARK Methotrexate Assay beeinträchtigen. Serumpools, die kein, 0.05 µmol/l bzw. 0.50 µmol/l Methotrexat enthielten, wurden mit hohen Konzentrationen dieser Verbindungen dotiert. Die Proben wurden analysiert und die Methotrexat-Konzentrationen in den Proben mit der Störsubstanz wurden mit einer Serumkontrolle verglichen.

#### Kreuzreaktivität mit dem Hauptmetaboliten 7-Hydroxymethotrexat

Nach Gabe von Hochdosis-Methotrexat (HDMTX) liegt die Konzentration von 7-Hydroxymethotrexat in Serum bzw. Plasma nach einiger Zeit häufig höher als die von Methotrexat. Es wurde gezeigt, dass 7-Hydroxymethotrexat-Konzentrationen 12 bis 48 Stunden nach der HDMTX-Gabe bis zu 100-fach höher liegen können als die Methotrexat-Konzentration.<sup>15, 27, 29, 31, 33-34</sup>

Die Kreuzreaktivität mit 7-Hydroxymethotrexat bei der Messung von Methotrexat mit dem ARK Methotrexate Assay wurde durch paarweise Messung von Proben bestimmt, die (1) 0.05 µmol/L Methotrexat und 5 µmol/L 7-Hydroxymethotrexat bzw. (2) 0.50 µmol/L Methotrexat und 50 µmol/L 7-Hydroxymethotrexat in Humanserum enthielten.

Der ARK Methotrexate Assay zeigte keine Kreuzreaktivität (≤ 0.1%) mit dem Hauptmetaboliten 7-Hydroxymethotrexat.

#### Kreuzreaktivität mit 2,4-Diamino-N<sup>10</sup>-Methylpteroinsäure (DAMPA)

Da DAMPA ein Nebenmetabolit von Methotrexat ist, ist nicht zu erwarten, dass es in Konzentrationen zirkuliert, die mit der Methotrexat-Bestimmung

interferieren.<sup>32</sup> Nach einer Glucarpidase Rescue Therapie kann die DAMPA-Konzentration im Serum allerdings beträchtlich erhöht sein.<sup>13, 14</sup> Der ARK Methotrexate Assay zeigt eine erhebliche Kreuzreaktivität mit dem Nebenmetaboliten DAMPA. Bei Tests, die in Abwesenheit der Muttersubstanz Methotrexat durchgeführt wurden, lag die Kreuzreaktivität mit DAMPA laut den ermittelten Daten zwischen 76,3% und 100%. Der Test sollte nicht durchgeführt werden, wenn eine Härtefalltherapie mit Glucarpidase (Carboxypeptidase G2) durchgeführt wird, durch die zirkulierendes Methotrexat rasch zu DAMPA konvertiert wird.

#### Kreuzreaktivität mit anderen Medikamenten

Der ARK Methotrexate Assay zeigt eine leichte Kreuzreaktivität mit Triamteren und Trimethoprim; diese Medikamente sind jedoch aufgrund einer Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen für die Verabreichung während einer MTX-Krebstherapie kontraindiziert. Die Strukturen dieser Substanzen zeigen eine große Ähnlichkeit mit der Pteridin-Ringeinheit von Methotrexat. In Abwesenheit von Methotrexat wurde eine Kreuzreaktivität mit Triamteren (1,15%) und Trimethoprim (0,01%) beobachtet. In Gegenwart von Methotrexat ergab sich aus den ermittelten Daten eine Kreuzreaktivität mit Triamteren ( $\leq 3.3\%$ ) und Trimethoprim ( $\leq 0.5\%$ ).

#### Kreuzreaktivität mit Folat-Analoga und anderen Substanzen

Der ARK Methotrexate Assay zeigte bei  $\geq 1000 \mu\text{mol/L}$  keine Kreuzreaktivität ( $\leq 0.01\%$ ) mit den getesteten Folat-Analoga und anderen getesteten Substanzen.

<b>Substanz</b>	<b>Getestet (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>
Adriamycin	1000
Cyclophosphamid	1500
Cytosin	1000
Dihydrofolsäure	1000
DL-6-Methyl-5,6,7,8-Tetrahydropterin	1000
Folsäure	1000
Folinsäure (Leucovorin)	1000
5-Fluorouracil	3000
6-Mercaptopurin	1000
5-Methyltetrahydrofolsäure	1000
Prednisolon	1000
Pyrimethamin	1000
Sulfamethoxazol	1600
Tetrahydrofolsäure	1000
Vinblastin	1000
Vincristin	1000

## 13 Literaturnachweise

1. Prescribing information. 2008. 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. 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. and Kuenzlen, E. 1982. Pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate following infusions of high dose methotrexate. *Cancer Treat Rep* **66**:1733 – 1741.
35. 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.

## 14 Markenzeichen

**ARK<sup>TM</sup>** ist ein Markenzeichen von ARK Diagnostics, Inc.

Alle anderen Marken- oder Produktnamen sind Markenzeichen der entsprechenden Markeninhaber.



**ARK Diagnostics, Inc.**  
**Fremont, CA 94538 USA**

Überarbeitet im Juni 2025  
1600-0213-00DE Rev 11