

ARK™ Methotrexate Assay

Leggere attentamente questo foglietto illustrativo di ARK Diagnostics, Inc. prima di effettuare il dosaggio ARK Methotrexate Assay ed attenersi scrupolosamente alle istruzioni ivi riportate. L'affidabilità dei risultati analitici è garantita soltanto se le istruzioni del foglietto illustrativo vengono seguite attentamente.

Segnalare eventuali incidenti gravi avvenuti con il dispositivo al fabbricante e all'autorità competente appropriata, secondo i casi. Una sintesi relativa alla sicurezza e alle prestazioni è disponibile tramite Eudamed (Banca dati europea dei dispositivi medici), SRN: US-MF-000023925.

Servizio Clienti


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

Legenda dei simboli utilizzati

	Codice del lotto	 YYYY-MM-DD	Utilizzare entro/Data di scadenza
	Numero di catalogo		Fabbricante
	Mandatario	 2797	Marchio CE con il numero di identificazione dell'organismo notificato
	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>		Limiti di temperatura
	Consultare le istruzioni per l'uso		Reagente 1/Reagente 2
Rx Only	Uso consentito esclusivamente su prescrizione		

1 Denominazione

ARKTM Methotrexate Assay

2 Finalità d'uso

ARK Methotrexate Assay è un immunodosaggio enzimatico omogeneo previsto per la determinazione quantitativa di metotressato in campioni di siero o plasma umano con analizzatori di chimica clinica automatizzati. I risultati ottenuti vengono utilizzati per il monitoraggio dei livelli di metotressato onde assicurare una terapia appropriata.

I campioni prelevati da pazienti che hanno ricevuto glucarpidasi (carbossipeptidasi G2) come terapia di salvataggio per il metotressato ad alte dosi non devono essere sottoposti al dosaggio ARK Methotrexate Assay.

3 Riassunto e spiegazione del test

Il metotressato [acido N-[4[[[(2,4-diammino-6-pteridinil) metil] metilammino]benzoil]-L-glutammico], già noto come ametopterina, è un antimetabolita utilizzato nel trattamento di determinate neoplasie, gravi forme di psoriasi e artrite reumatoide negli adulti.¹⁻³ Il metotressato è potenzialmente molto tossico. I pazienti sottoposti a trattamento con metotressato devono essere tenuti sotto stretto controllo in modo da rilevare tempestivamente gli eventuali effetti tossici.

Il monitoraggio del metotressato viene comunemente utilizzato per i pazienti oncologici sottoposti a trattamento con dosi elevate di metotressato; i risultati sono usati per stabilire la terapia di supporto mentre il metotressato viene escreto per via renale. Consultare le linee guida relative alla terapia con metotressato e leucovorina di salvataggio.¹ Dosi da intermedie ad elevate di metotressato (circa 35 mg/m² - 12 g/m²) con leucovorina di salvataggio (fattore citrovorum) sono state impiegate con risultati positivi per il trattamento del sarcoma osteogenico, della leucemia, del linfoma non Hodgkin, del carcinoma polmonare e mammario.⁴⁻⁸

4 Principi del metodo

ARK Methotrexate Assay è un immunodosaggio omogeneo basato sul principio di competizione tra il metotressato presente nel campione e il metotressato marcato con l'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH) per il legame con il reagente anticorpo. Quando quest'ultimo si lega all'anticorpo, l'attività enzimatica diminuisce. In presenza di metotressato nel campione, l'attività enzimatica aumenta ed è direttamente proporzionale alla concentrazione di metotressato. L'enzima attivo converte il coenzima nicotinamide adenina dinucleotide (NAD) in NADH, misurato spettrofotometricamente come velocità di cambiamento dell'assorbanza. La G6PDH nel siero endogeno non interferisce

con i risultati poiché il coenzima NAD agisce unicamente con l'enzima batterico usato nel dosaggio.

5 Reagenti

REF	Descrizione del prodotto	Quantità/Volume
5026-0001-00	ARK Methotrexate Assay	1 x 16 mL
5026-0001-02	Reagente R1 – Anticorpo/Substrato Anticorpi policlonali di coniglio anti-metotressato, glucosio-6-fosfato, nicotinamide adenina dinucleotide, sieroalbumina bovina, conservante e stabilizzanti	
5026-0001-03	Reagente R2 – Enzima Metotressato marcato con G6PDH batterica, tampone, sieroalbumina bovina, conservante e stabilizzanti	

REF	Descrizione del prodotto	Quantità/Volume
5026-0001-01	ARK Methotrexate Assay Reagente R1 – Anticorpo/Substrato Anticorpi policlonali di coniglio anti-metotressato, glucosio-6-fosfato, nicotinamide adenina dinucleotide, sieroalbumina bovina, conservante e stabilizzanti	1 x 28 mL
	Reagente R2 – Enzima Metotressato marcato con G6PDH batterica, tampone, sieroalbumina bovina, conservante e stabilizzanti	1 x 14 mL

Manipolazione e conservazione dei reagenti

I reagenti ARK Methotrexate Assay vengono forniti in stato liquido, pronti per l'uso e possono essere utilizzati immediatamente dopo essere stati tolti dal frigorifero. Prima dell'uso, i reagenti devono essere conservati a 2-8°C, in posizione verticale e chiusi ermeticamente con il tappo. Se conservati secondo le istruzioni, i reagenti si mantengono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Non congelare i reagenti. Evitare l'esposizione prolungata a temperature superiori a 32°C.

Se i reagenti non vengono conservati correttamente, le prestazioni del dosaggio possono risultare compromesse.

6 Avvertenze e precauzioni

- Per uso **diagnostico in vitro**. Solo su prescrizione medica.
- I reagenti **R1** e **R2** sono forniti come kit combinato e non devono essere utilizzati in modo intercambiabile con i reagenti contrassegnati da numeri di lotto differenti.

7 Prelievo e preparazione dei campioni per l'analisi

- Spetta a ciascun laboratorio fornire un campione valido per l'analisi secondo le proprie procedure di qualità.
- Va utilizzato un campione di siero o di plasma. Per garantire la riproducibilità dei risultati, si raccomanda di utilizzare la stessa matrice di campioni per i singoli pazienti.
- Il momento della determinazione del metotressato dipende dalla dose, dalla durata dell'infusione e dalle condizioni cliniche del paziente. Consultare i protocolli specifici del trattamento per stabilire il momento della determinazione.
- Non è possibile usare sangue intero. Con questo dosaggio possono essere utilizzati i seguenti anticoagulanti:
 - eparina di sodio
 - eparina di litio
 - EDTA di potassio
- Il prelievo di sangue deve essere eseguito utilizzando provette dedicate compatibili per l'uso con il monitoraggio terapeutico dei farmaci (TDM).
- Seguire le raccomandazioni del produttore delle provette per la raccolta, il trattamento e la centrifugazione.
- Il documento GP44-A4 del CLSI illustra le procedure volte a ridurre al minimo gli artefatti dovuti alla raccolta e alla manipolazione dei campioni per i comuni test di laboratorio.³⁵
- Evitare la formazione di schiuma e ripetuti cicli di congelamento/scongelo per assicurare l'integrità del campione da quando viene prelevato fino a quando viene sottoposto al test.
- La fibrina, i globuli rossi ed altre sostanze particolate possono dare luogo a risultati errati. Assicurare un'adeguata centrifugazione.
- La presenza di bolle d'aria o schiuma nei campioni può determinare un volume insufficiente di campione dispensato e causare la generazione di risultati errati.
- Ciascun laboratorio deve fare riferimento alla letteratura disponibile e ai dati interni relativi alla stabilità dei campioni.
- I campioni chiarificati possono essere conservati fino a due settimane a 2-8°C. Se il dosaggio viene eseguito oltre questo intervallo di tempo, i campioni possono essere conservati congelati ($\leq -10^{\circ}\text{C}$) prima di essere sottoposti all'analisi. Ridurre al minimo i cicli di congelamento-scongelo. Le prove condotte hanno evidenziato che i campioni resistono a 3 cicli di congelamento-scongelo, se conservati a -20°C .
- **Trattare tutti i campioni dei pazienti come potenzialmente infettivi.**

8 Procedura

Materiali forniti

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

Materiali necessari – forniti a parte

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

Controlli di qualità – ARK Methotrexate Control – **REF** 5026-0003-00

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

Strumenti

È possibile che i reagenti **R1** e **R2** debbano essere trasferiti in un contenitore del reagente specifico per l'analizzatore, prima dell'uso. Evitare la contaminazione crociata tra **R1** e **R2**.

Il dosaggio può essere utilizzato su numerosi analizzatori di chimica clinica automatizzati con determinazione fotometrica a 340 nm. Consultare la scheda tecnica specifica dell'analizzatore per la programmazione del dosaggio ARK Methotrexate Assay, che può essere richiesta al distributore o al Servizio clienti ARK. Le schede dei protocolli di applicazione, suddivise secondo le categorie CLIA o recanti il marchio CE, sono state verificate dal fabbricante. Spetta al laboratorio eseguire tutte le procedure di validazione appropriate per l'utilizzo del dosaggio con altre impostazioni o altri analizzatori.

Per la manutenzione giornaliera fare riferimento al manuale d'impiego specifico dello strumento.

Sequenza analitica

Per l'esecuzione o la calibrazione del dosaggio fare riferimento al manuale d'impiego specifico dello strumento.

Calibrazione

Eseguire la procedura di calibrazione completa (a 6 punti) utilizzando i calibratori ARK Methotrexate Calibrator A, B, C, D, E e F; analizzare i calibratori in duplicato. È necessario eseguire la calibrazione ogni qualvolta venga utilizzato un kit di reagenti con un nuovo numero di lotto. Verificare la curva di calibrazione con almeno due livelli dei controlli di qualità, conformemente al piano per l'assicurazione della qualità stabilito dal proprio laboratorio.

Quando ripetere la calibrazione

- Ogni qualvolta venga utilizzato un nuovo numero di lotto dei reagenti
- Se indicato dai risultati del controllo di qualità
- Se richiesto dai protocolli di laboratorio standard

Controllo di qualità (CQ)

Spetta ai laboratori stabilire le procedure CQ per il dosaggio ARK Methotrexate Assay. Tutti i controlli di qualità e i test devono essere eseguiti in conformità alle disposizioni locali e/o nazionali o ai requisiti per l'accreditamento.

Le buone pratiche di laboratorio prevedono l'analisi di almeno due livelli di controlli di qualità (punti decisionali medici basso ed elevato) ogni qualvolta vengano analizzati i campioni del paziente e quando viene eseguita la calibrazione. Esaminare i valori dei controlli per individuare eventuali tendenze o variazioni. Qualora vengano rilevate tendenze o scostamenti, o se il recupero del controllo non rientra nel range specificato, controllare tutti i parametri operativi conformemente alle procedure di qualità del laboratorio clinico. Contattare il Servizio Clienti per assistenza.

Protocollo di diluizione manuale

Il range di misurazione del dosaggio ARK Methotrexate Assay è compreso tra 0,04 e 1,20 µmol/L. I campioni e i controlli contenenti concentrazioni di metotressato più elevate (>1,20 µmol/L) vengono analizzati dopo essere stati diluiti, in modo che rientrino nel range specificato.

Diluire manualmente i campioni o i controlli contenenti concentrazioni elevate con il tampone ARK Methotrexate Dilution Buffer, preparando le diluizioni seriali di dieci volte, come illustrato nella tabella sottostante.

	Volume di campione	Volume di tampone di diluizione	Diluizione	Fattore di diluizione
50 µL	campione intero (non diluito)	450 µL	1:10	10
50 µL	campione 1:10	450 µL	1:100	100
50 µL	campione 1:100	450 µL	1:1000	1000
50 µL	campione 1:1000	450 µL	1:10000	10000

$$\text{Fattore di diluizione manuale} = \frac{\text{volume di campione} + \text{volume di tampone di diluizione}}{\text{volume di campione}}$$

Moltiplicare il risultato ottenuto dal dosaggio per il fattore di diluizione.

9 Risultati

Per convertire µmol/L in µg/mL, dividere il valore ottenuto per il fattore di conversione di 2,2005.

10 Limiti della procedura

Questo dosaggio è previsto per l'uso unicamente con siero o plasma; fare riferimento alla sezione "Prelievo e preparazione dei campioni per l'analisi". È

generalmente buona norma utilizzare sempre lo stesso metodo (e la stessa matrice) per il singolo paziente a causa della possibile variabilità da metodo a metodo. Consultare la sezione “Valori previsti” sottostante.

Come per tutte le determinazioni di analiti, il valore di metotressato deve essere utilizzato congiuntamente alle informazioni disponibili ottenute dalla valutazione clinica e da altre procedure diagnostiche.

IMPORTANTE: i campioni di pazienti che hanno ricevuto glucarpidase (carbossipeptidasi G2) come terapia di salvataggio per il metotressato ad alte dosi **non** devono essere sottoposti al dosaggio ARK Methotrexate Assay. Questi campioni presentano nel siero livelli elevati di acido benzoico 4-[[2,4-diammino-6-(pteridinil)metil]-metilammino] (DAMPA)¹⁰⁻¹² quale risultato del metabolismo del metotressato ad opera del glucarpidase. Il DAMPA ha una reazione crociata con l'anticorpo del metotressato utilizzato nel dosaggio e può restare in circolo per almeno cinque-sette giorni prima di poter ottenere delle misurazioni accurate del metotressato nel siero.¹³ Gli oncologi dell'equipe medica devono avvertire il laboratorio se viene somministrato glucarpidase, onde evitare che siano riferite concentrazioni falsamente elevate di metotressato a causa dell'interferenza del DAMPA, che potrebbero pregiudicare la terapia con glucarpidase.¹³ Mentre il glucarpidase è ben tollerato e riduce rapidamente il metotressato circolante, il ritardo di eliminazione del metotressato da parte dei reni può essere un problema nei pazienti adulti ed anziani.¹⁴

11 Valori previsti

I livelli di metotressato nel siero dipendono dalle indicazioni d'uso, dal dosaggio, dalla modalità di somministrazione, dal regime terapeutico, dalla farmacocinetica individuale, dal metabolismo e da altri fattori clinici.^{1,3} Mentre il livello nel siero è in genere compreso tra circa 10 e 100 µmol/L nel trattamento del carcinoma mammario (ad esempio),¹⁵ le concentrazioni possono essere superiori a 1000 µmol/L¹⁶ nella terapia dell'osteosarcoma ad alte dosi, e in pazienti pediatriche con osteosarcoma è stato raggiunto un livello fino a 3100 µmol/L di metotressato dopo un'infusione di 4 ore.¹⁷ Per il trattamento dell'osteosarcoma,¹⁶ la curva di decadimento del metotressato varia notevolmente: a 24 ore, da 30 a 300 µmol/L; a 48 ore, da 3 a 30 µmol/L e a 72 ore, meno di 0,3 µmol/L. Viene generalmente somministrata per via endovenosa una dose di 10 mg di leucovorina dopo 24 ore dall'inizio dell'infusione con metotressato. Le dosi successive vengono aggiustate e somministrate in base ai livelli di metotressato ottenuti a 24, 48 e 72 ore. I livelli di metotressato superiori a 50 µmol/L a 24 ore, 10 µmol/L a 48 ore e 0,5 µmol/L a 72 ore prefigurano una potenziale tossicità e richiedono in genere un aumento della dose di leucovorina sulla base degli algoritmi, fino ad ottenere un livello di metotressato <0,1 µmol/L. Le linee guida della terapia con metotressato in combinazione con leucovorina di salvataggio raccomandano generalmente la somministrazione continua di leucovorina fino a quando il livello di metotressato è inferiore a 0,05 µmol/L.^{1,9} Alcuni centri adottano il valore di riferimento ≤ 0,10 µmol/L.^{16,18}

Prescrizione ed altre informazioni: indicatori di laboratorio della tossicità dopo la somministrazione di leucovorina di salvataggio con metotressato ad alte dosi.^{1,9,19}

Situazione clinica	Risultati di laboratorio	
	Livello di metotressato ($\mu\text{mol/L}$)	Ore dalla somministrazione
Eliminazione normale del metotressato	~10	24
	~1	48
	<0,2	72
Ritardo nella fase di eliminazione tardiva del metotressato	>0,2	72
	>0,05	96
Ritardo nella fase di eliminazione precoce del metotressato	≥ 50	24
	≥ 5	48
e/o	OPPURE	
Evidenza di lesione renale acuta	aumento $\geq 100\%$ della creatinina sierica	24

La tossicità renale rappresenta un rischio significativo e può essere esacerbata dalla somministrazione concomitante di altri farmaci,^{14,19} ad esempio la vancomicina.²⁰ Si possono manifestare altre forme di tossicità, inclusi disturbi digestivi (ad es., nausea, vomito, dolore addominale), disturbi cutanei e delle mucose (in particolare, mucosite), anomalie ematologiche (ad es., neutropenia e trombocitopenia), alterazioni della funzione epatica e neurotossicità.²¹⁻²⁸

Considerati il profilo della comparsa del metabolita 7-idrossi-metotressato,^{15,27} il rapporto molare fino a circa 100 volte rispetto al metotressato²⁹ e la relativa insolubilità rispetto al farmaco precursore,^{14,19} la possibile nefrotossicità dovuta alla precipitazione del metabolita nei tubuli renali²⁹ può ritardare l'eliminazione del metotressato stesso.

La terapia con glucarpidasi riduce rapidamente il livello di metotressato in circolo, non del farmaco intracellulare. È stato osservato un peggioramento (effetto rebound) nel livello di metotressato nel siero dopo la terapia con glucarpidasi.¹⁴ Possono trascorrere alcuni giorni prima che il DAMPA sia eliminato e non interferisca più con il monitoraggio del metotressato mediante l'immunodosaggio.¹³

12 Caratteristiche specifiche di prestazione

Ciascun laboratorio è tenuto a verificare le prestazioni usando i parametri stabiliti per il proprio analizzatore. Le caratteristiche di prestazione illustrate nella tabella sottostante sono state ottenute con un sistema Beckman Coulter AU680.

Limite di quantificazione (LoQ)

Le seguenti caratteristiche sono state determinate secondo le linee guida del protocollo CLSI EP17-A2 per il dosaggio ARK Methotrexate Assay. Le prestazioni specifiche dell'analizzatore possono variare.

Criterio	Concentrazione MTX ($\mu\text{mol/L}$)
Limite del bianco (LoB); N = 60 μB + 1,645 DS, laddove DS = 0,002	0,00
Limite di rilevazione (LoD); N = 60 LoB + 1,652 DS, laddove DS = 0,012	0,02
Limite di quantificazione (LoQ); N = 40 LoQ – 2 DS > LoD	0,04

Ciascun laboratorio è tenuto a determinare i criteri di riportabilità delle concentrazioni di metotressato. La seguente indicazione del CLSI EP17-A2 può essere un riferimento appropriato:

Risultato \leq LoB riportare come “non rilevato; concentrazione < LoD”
LoB < Risultato < LoQ riportare come “analita rilevato; concentrazione < LoQ”
Risultato \geq LoQ riportare il risultato come misurato

Range di misurazione

Il range di misurazione analitica del dosaggio ARK Methotrexate Assay è compreso tra 0,04 e 1,20 $\mu\text{mol/L}$. I campioni contenenti il metotressato in concentrazioni maggiori vengono analizzati dopo essere stati diluiti. Riportare i valori del dosaggio superiori al LoD secondo le informazioni fornite per il LoQ. Moltiplicare il risultato ottenuto dal dosaggio per il fattore di diluizione per i campioni contenenti livelli di metotressato superiori all'intervallo di misurazione.

Recupero

L'accuratezza (recupero analitico) è stata verificata aggiungendo il metotressato concentrato al siero umano negativo per il metotressato. Un concentrato certificato di metotressato purissimo è stato aggiunto volumetricamente a siero

umano negativo per il metotressato, per ottenere le concentrazioni di metotressato dell'intervallo di calibrazione del dosaggio. Sei replicati di ciascun campione sono stati analizzati su un analizzatore di chimica clinica automatizzato. È stata calcolata la media dei risultati, che sono stati confrontati con la concentrazione target e con il recupero percentuale calcolato. I risultati sono illustrati nella tabella sottostante.

$$\text{Recupero (\%)} = 100 \times \frac{\text{concentrazione recuperata media}}{\text{concentrazione teorica}}$$

Concentrazione teorica (µmol/L)	Concentrazione recuperata media (µmol/L)	Recupero (%)
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

Recupero medio (%): 104,2

Linearità

Sono stati condotti degli studi di linearità, come raccomandato nel protocollo EP6-A del CLSI. È stato preparato un campione di siero di 1,40 µmol/L e sono state eseguite delle diluizioni proporzionali con siero umano negativo per il metotressato. Il dosaggio ARK Methotrexate Assay è risultato lineare nell'intervallo da 0,03 a 1,20 µmol/L. I risultati sono illustrati nella tabella sottostante.

Teorico (µmol/L)	Risultati osservati (µmol/L)	Risultati previsti 1° ordine	Risultati previsti 2° ordine	Differenza (µmol/L o %)
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 µmol/L
0,12	0,13	0,124	0,125	1,1 %
0,24	0,24	0,250	0,243	-2,7 %
0,36	0,36	0,375	0,363	-3,2 %
0,48	0,49	0,501	0,486	-3,0 %
0,72	0,72	0,753	0,740	-1,8 %
0,96	1,02	1,005	1,003	-0,2 %
1,20	1,27	1,257	1,277	1,6 %

Sono stati preparati in modo proporzionale campioni contenenti metotressato in concentrazioni comprese tra 2 e 1200 $\mu\text{mol/L}$ con pool di sieri umani, successivamente diluiti con il tampone ARK Methotrexate Dilution Buffer secondo l'intervallo di calibrazione. La regressione delle concentrazioni di metotressato analizzate è risultata lineare lungo tutto l'intervallo.

Confronto dei metodi

Sono stati eseguiti degli studi di correlazione usando il protocollo EP9-A3 del CLSI. I risultati ottenuti con il dosaggio ARK Methotrexate Assay sull'analizzatore Beckman Coulter AU680 sono stati confrontati con quelli ottenuti con l'analizzatore Roche/Hitachi 917.

Le concentrazioni di metotressato rilevate con Roche/Hitachi 917 rientravano in un intervallo da 0,04 a 1050 $\mu\text{mol/L}$ (μM). I valori del dosaggio ARK Methotrexate rilevati sull'analizzatore Beckman Coulter AU680 erano compresi tra 0,04 e 1070 $\mu\text{mol/L}$. I risultati dell'analisi di regressione di Passing-Bablok³⁰ dello studio sono illustrati nella tabella sottostante (con intervallo di confidenza al 95%) per i 112 campioni rientranti nell'intervallo di misurazione e per tutti i 142 campioni, inclusi quelli superiori all'intervallo di misurazione che hanno richiesto la diluizione.

Parametro	Range da 0,04 a 1,11 μM		Range da 0,04 a 1050 μM	
Pendenza	0,99	(0,96 – 1,00)	1,00	(1,00 - 1,02)
Intercetta y	0,00	(0,00 – 0,01)	0,00	(0,00 - 0,00)
Coefficiente di correlazione (r^2)	0,98	(0,97 – 0,98)	1,00	(1,00 - 1,00)
Numero di campioni	112	NA	142	NA

Precisione

La precisione è stata determinata in base a quanto descritto nel protocollo EP5-A3 del CLSI. Per lo studio sono stati utilizzati un controllo a sei livelli ARK Methotrexate Control e pool di campioni di siero umani contenenti metotressato. Ciascun livello è stato analizzato in quadruplicato due volte al giorno per 20 giorni. Ciascuna analisi giornaliera è stata eseguita ad almeno due ore di distanza dalla precedente. È stato eseguito il calcolo della DS e del CV percentuale intra-dosaggio, inter-giornaliero e totale. I risultati sono illustrati nella tabella sottostante. Criteri di accettazione: CV totale $\leq 10\%$ a $>0,1 \mu\text{mol/L}$, DS $\leq 0,01$ a $\leq 0,1 \mu\text{mol/L}$.

Campione	N	Media ($\mu\text{mol/L}$)	Intra- dosaggio		Inter- giornaliero		Totale	
			DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%
ARK Methotrexate Control								
BASSO	160	0,08	0,006	7,8	0,004	5,5	0,008	9,6
MEDIO	160	0,39	0,009	2,2	0,007	1,7	0,012	3,1
ALTO	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
Siero umano								
BASSO	160	0,08	0,007	8,9	0,006	7,2	0,009	11,2
MEDIO	160	0,41	0,011	2,6	0,008	2,1	0,015	3,7
ALTO	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

Sostanze interferenti

Sono stati condotti studi sulle sostanze interferenti usando il protocollo EP7-A2 del CLSI come riferimento. Sono state analizzate concentrazioni clinicamente elevate delle seguenti sostanze endogene nel siero potenzialmente interferenti con livelli noti di metotressato (circa 0,05 e 0,50 $\mu\text{mol/L}$). Ciascun campione è stato analizzato usando il dosaggio ARK Methotrexate Assay e un controllo sierico di metotressato. La misurazione del metotressato non ha sostanzialmente subito variazioni con i livelli di sostanze endogene testate.

Sostanza interferente	Concentrazione della sostanza interferente	Metotressato (~ 0,05 $\mu\text{mol/L}$)		Metotressato (~ 0,50 $\mu\text{mol/L}$)	
		Controllo sierico	Test	Controllo sierico	Test (controllo%)
Albumina	12 g/dL	0,05	0,05	0,48	0,50 (103,5)
Bilirubina - coniugata	70 mg/dL	0,05	0,06	0,48	0,49 (101,4)
Bilirubina – non coniugata	70 mg/dL	0,05	0,05	0,48	0,48 (101,4)
Colesterolo	620 mg/dL	0,05	0,04	0,47	0,48 (103,2)
Gammaglobuline	12 g/dL	0,05	0,06	0,48	0,49 (100,7)
Emoglobina	1000 mg/dL	0,06	0,06	0,48	0,49 (101,4)
Fattore reumatoide	1080 UI/mL	0,06	0,07	0,46	0,45 (96,7)

Trigliceridi	835 mg/dL	0,05	0,04	0,48	0,48 (98,6)
Acido urico	30 mg/dL	0,05	0,06	0,48	0,49 (100,7)

Specificità

I metaboliti del metotressato, gli analoghi del folato e altri composti con struttura analoga sono stati analizzati per stabilire se tali composti influiscono sulla determinazione quantitativa delle concentrazioni di metotressato usando il dosaggio ARK Methotrexate Assay. Livelli elevati di tali composti sono stati aggiunti ai pool di sieri che non contenevano metotressato, che contenevano 0,05 µmol/L o 0,50 µmol/L di metotressato. I campioni sono stati analizzati e le concentrazioni di metotressato nei campioni contenenti le sostanze interferenti sono state confrontate con un controllo di siero.

Reattività crociata al 7-idrossi-metotressato, il metabolita principale

Dopo la somministrazione di metotressato ad alte dosi (HDMTX), la concentrazione di 7-idrossi-metotressato nel siero/plasma è in genere superiore a quella del metotressato rilevato successivamente. È stato riferito che i livelli di 7-idrossi-metotressato sono fino a 100 volte superiori rispetto a quelli del metotressato da 12 a 48 ore dopo la somministrazione di HDMTX.^{15, 27, 29, 31, 33-34}

La reattività crociata del 7-idrossi-metotressato nella misurazione del metotressato è stata determinata per il dosaggio ARK Methotrexate Assay analizzando coppie di campioni contenenti (1) 0,05 µmol/L di metotressato e 5 µmol/L di 7-idrossi-metotressato e (2) 0,50 µmol/L di metotressato e 50 µmol/L di 7-idrossi-metotressato nel siero umano.

Il dosaggio ARK Methotrexate Assay non ha evidenziato alcuna reattività crociata ($\leq 0,1\%$) con il metabolita principale 7-idrossi-metotressato.

Reattività crociata all'acido 2,4-diammino-N¹⁰-metilpteroico (DAMPA)

Poiché è un metabolita secondario del metotressato, il DAMPA non dovrebbe essere presente in circolo in concentrazioni tali da interferire con la misurazione del metotressato.³² Tuttavia, dopo la terapia di salvataggio con glucarpidase, la concentrazione di DAMPA nel siero può essere considerevole.^{13,14} Il dosaggio ARK Methotrexate Assay presenta una notevole reattività crociata con il metabolita secondario DAMPA. Sono stati eseguiti esami senza il farmaco principale metotressato. La reattività crociata con il DAMPA è risultata compresa tra il 76,3 e il 100% sulla base dei dati osservati. Il dosaggio non deve essere utilizzato durante le eventuali terapie compassionate con glucarpidase (carbosipeptidasi G2) che converte rapidamente il metotressato in circolo in DAMPA.

Farmaci che presentano reattività crociata

Il dosaggio ARK Methotrexate Assay presenta una leggera reattività crociata con il triamterene e il trimetoprim, ma tali farmaci sono controindicati per il trattamento oncologico con il metotressato a causa degli ulteriori effetti indesiderati che si possono manifestare in caso di somministrazione concomitante. Le strutture di questi composti sono molto simili a quella dell'anello di pteridina del metotressato. In assenza di metotressato, è stata osservata una reattività crociata al triamterene (1,15%) e al trimetoprim (0,01%). In presenza di metotressato, è stata rilevata una reattività crociata al triamterene ($\leq 3,3\%$) e al trimetoprim ($\leq 0,5\%$) sulla base dei dati osservati.

Reattività crociata agli analoghi del folato e ad altre sostanze

Il dosaggio ARK Methotrexate Assay non ha evidenziato reattività crociata ($\leq 0,01\%$) agli analoghi del folato o ad altre sostanze a $\geq 1000 \mu\text{mol/L}$, come risulta dalle analisi condotte.

Sostanza	Analizzati ($\mu\text{mol/L}$)
Adriamicina	1000
Ciclofosfamide	1500
Citosina	1000
Acido diidrofolico	1000
DL-6-metil-5,6,7,8-tetraidropterina	1000
Acido folico	1000
Acido folinico (leucovorina)	1000
5-Fluorouracile	3000
6-Mercaptopurina	1000
Acido 5-metiltetraidrofolico	1000
Prednisolone	1000
Pirimetamina	1000
Sulfametossazolo	1600
Acido tetraidrofolico	1000
Vinblastina	1000
Vincristina	1000

13 Bibliografia

1. Foglietto illustrativo. 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. Istituto per gli standard clinici e di laboratorio (CLSI). *Procedure per la manipolazione e il trattamento di campioni di sangue per comuni esami di laboratorio; Linea guida approvata – Quarta edizione*. Documento CLSI GP44-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.

14 Marchi commerciali

ARKTM è un marchio commerciale di ARK Diagnostics, Inc.

Altri marchi o nomi di prodotti sono marchi commerciali dei rispettivi proprietari.



ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 USA

Revisione giugno 2025
1600-0213-00IT Rev 11