ARK Diagnostics, Inc.

ARK™ *Methotrexate Assay*

Esta bula da ARK Diagnostics, Inc. para o Ensaio de Metotrexato ARK deve ser lida cuidadosamente antes do uso. As instruções desta bula devem ser rigorosamente seguidas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida se houver qualquer desvio das instruções contidas nesta bula.

Comunique qualquer incidente grave ocorrido em relação ao dispositivo ao fabricante e à autoridade competente, conforme aplicável. Um Resumo de Segurança e Desempenho está disponível por meio da Eudamed (base de dados europeia sobre dispositivos médicos), SRN: US-MF-000023925.

Atendimento ao Cliente

ARK Diagnostics, Inc.

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

CE
2797

EC REP
Emergo Europe
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

CH REP
MedEnvoy Switzerland
Gotthardstrasse 28
6302 Zug
Switzerland

Legenda dos símbolos utilizados

LOT	Código do lote	YYYY-MM-DD	Data de validade
REF	Número de catálogo		Fabricante
EC REP	Representante autorizado	CE 2797	Marca CE com número do órgão notificado
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Limite de temperatura
	Consulte as instruções de uso	R1 R2	Reagente 1/Reagente 2
Rx Only	Apenas para uso sob prescrição		

© 2026, ARK Diagnostics, Inc.

Kit de Reagentes REF **5026-0001-00; 5026-0001-02; 5026-0001-03; 5026-0001-01**

1 Nome

ARK™ *Methotrexate Assay*

2 Uso pretendido

O Ensaio de Metotrexato ARK é um imunoensaio enzimático homogêneo destinado à determinação quantitativa de metotrexato em soro ou plasma humano em analisadores automatizados de química clínica. As medições obtidas são utilizadas para monitorar os níveis de metotrexato, contribuindo para assegurar uma terapia adequada.

As amostras de pacientes que receberam glucarpidase (carboxipeptidase G2) como terapia de resgate para metotrexato em altas doses não devem ser analisadas com o Ensaio de Metotrexato ARK.

3 Resumo e explicação do teste

O metotrexato [ácido N-[4[[(2,4-diamino-6-pteridinil) metil] metilamino] benzoil]-L-glutâmico], antes denominado amethopterin, é um antimetabólito utilizado no tratamento de determinadas doenças neoplásicas, psoríase grave e artrite reumatoide em adultos.[1-3] O metotrexato pode causar toxicidade grave. Pacientes submetidos a tratamento com metotrexato devem ser monitorados de perto para que os efeitos tóxicos sejam detectados prontamente.

O monitoramento terapêutico do metotrexato é comumente utilizado em pacientes submetidos ao tratamento do câncer com altas doses de metotrexato; os resultados são utilizados para orientar a terapia de suporte enquanto o metotrexato é eliminado pelos rins. Diretrizes para terapia com metotrexato com resgate de leucovorina devem ser consultadas.[1] Doses intermediárias a altas de metotrexato (aproximadamente 35 mg/m^2 - 12 g/m^2) com resgate de leucovorina (fator citrovorum) têm sido usadas com resultados favoráveis no tratamento de sarcoma osteogênico, leucemia, linfoma não-Hodgkin, câncer de pulmão e mama.[4-8]

4 Princípios do procedimento

O Ensaio de Metotrexato ARK é um imunoensaio homogêneo baseado na competição entre o fármaco presente na amostra e o metotrexato marcado com a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) pela ligação ao reagente de anticorpo. À medida que este último se liga ao anticorpo, a atividade enzimática diminui. Na presença do medicamento na amostra, a atividade enzimática aumenta e é diretamente proporcional à concentração do fármaco. A enzima ativa converte a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) em NADH, que é medido espectrofotometricamente pela taxa de variação da absorbância. O G6PDH sérico endógeno não interfere nos resultados porque a coenzima NAD funciona apenas com a enzima bacteriana usada no ensaio.

5 Reagentes

REF	Descrição do produto	Quantidade/volume
5026-0001-00 **5026-0001-02** **5026-0001-03**	**Ensaio de Metotrexato ARK** **Reagente R1 – Anticorpo/substrato** anticorpos policlonais de coelho contra metotrexato, glicose-6-fosfato, nicotinamida adenina dinucleotídeo, albumina sérica bovina, conservantes e estabilizadores	1 × 16 mL
	Reagente R2 – Enzima metotrexato marcado com G6PDH bacteriana, tampão, albumina sérica bovina, conservantes e estabilizadores	1 × 8 mL

REF	Descrição do produto	Quantidade/volume
5026-0001-01	**Ensaio de Metotrexato ARK** **Reagente R1 – Anticorpo/Substrato** anticorpos policlonais de coelho contra metotrexato, glicose-6-fosfato, nicotinamida adenina dinucleotídeo, albumina sérica bovina, conservantes e estabilizadores	1 × 28 mL
	Reagente R2 – Enzima metotrexato marcado com G6PDH bacteriana, tampão, albumina sérica bovina, conservantes e estabilizadores	1 × 14 mL

Manuseio e armazenamento de reagentes

Os reagentes do Ensaio de Metotrexato ARK são fornecidos na forma líquida, prontos para uso, e podem ser utilizados diretamente do refrigerador. Quando não estiverem em uso, os reagentes devem ser armazenados a 2–8°C (36–46°F), na posição vertical e com as tampas de rosca bem fechadas. Se armazenados conforme as instruções, os reagentes serão estáveis até a data de validade impressa no rótulo. Não congele os reagentes. Evite a exposição prolongada a temperaturas acima de 32°C (90°F). **O armazenamento inadequado de reagentes pode afetar o desempenho do ensaio.**

6 Advertências e precauções

- Para uso **em diagnóstico *in vitro***. Apenas para uso sob prescrição.
- Os reagentes R1 e R2 são fornecidos como um conjunto pareado e não devem ser substituídos por reagentes de números de lote diferentes.

7 Coleta e preparo de amostras para análise

- Cada laboratório é responsável por fornecer uma amostra válida para análise de acordo com seus procedimentos de qualidade.

- É necessário soro ou plasma. Para garantir a consistência, é uma boa prática utilizar a mesma matriz de amostra para cada paciente.
- O momento da coleta da amostra para determinação de metotrexato dependerá da dose, da duração da infusão e do estado clínico do paciente. Consulte protocolos terapêuticos específicos para determinar o momento da coleta da amostra.
- Sangue total não pode ser utilizado. Os seguintes anticoagulantes podem ser utilizados com este ensaio.
    - Heparina sódica
    - Heparina de lítio
    - EDTA de potássio
- A coleta de sangue deve ser realizada com tubos de coleta compatíveis com o monitoramento terapêutico de medicamentos (TDM).
- Siga as recomendações do fabricante do tubo de coleta para coleta, processamento e centrifugação.
- O documento CLSI GP44-A4 descreve procedimentos para minimizar artefatos decorrentes da coleta e do manuseio de amostras em testes laboratoriais de rotina.[35]

- Não provoque a formação de espuma e evite ciclos repetidos de congelamento e descongelamento para preservar a integridade da amostra desde a coleta até a realização do ensaio.
- Fibrina, hemácias e outras partículas podem causar resultados incorretos. Assegure a centrifugação adequada.
- A presença de bolhas ou espuma nas amostras pode resultar em aspiração insuficiente da amostra e resultados errôneos.
- Cada laboratório deve consultar a literatura disponível e dados internos sobre estabilidade da amostra.
- As amostras clarificadas podem ser armazenadas por até duas semanas entre 2°C e 8°C. Se a análise for adiada, as amostras poderão ser armazenadas congeladas (≤ −10°C) até o momento da análise. Deve-se tomar cuidado para limitar o número de ciclos de congelamento e descongelamento. Foi demonstrado que as amostras suportam até 3 ciclos de congelamento-descongelamento quando armazenadas a −20°C.
- **Manuseie todas as amostras de pacientes como se fossem potencialmente infecciosas.**

8 Procedimento

Materiais fornecidos

Ensaio de Metotrexato ARK – REF 5026-0001-00, 5026-0001-01

Ensaio de Metotrexato ARK, Roche® cobas c pack – REF 5026-0001-02

Ensaio de Metotrexato ARK, Roche® cobas c pack green – REF 5026-0001-03

Materiais necessários – Fornecidos separadamente

Calibrador de Metotrexato ARK – REF 5026-0002-00

Controles de Qualidade – Controle de Metotrexato ARK – REF 5026-0003-00

Tampão de Diluição de Metotrexato ARK – REF 5026-0004-00

Instrumentos

Os reagentes R1 e R2 podem precisar ser transferidos para recipientes de reagentes específicos do analisador antes do uso. Evite a contaminação cruzada de R1 e R2.

Muitos analisadores automatizados de química clínica com determinação fotométrica da taxa de reação a 340 nm são adequados. Consulte a ficha de aplicação específica do analisador para programar o Ensaio de Metotrexato ARK, disponível com seu distribuidor ou junto ao Atendimento ao Cliente da ARK. As Folhas de Protocolo de Aplicação categorizadas pela CLIA ou que ostentam a Marca CE foram verificadas pelo fabricante. É responsabilidade do laboratório realizar todas as validações apropriadas para uso do ensaio com outras configurações ou analisadores.

Consulte o manual do operador específico do instrumento para manutenção diária.

Sequência do ensaio

Para executar ou calibrar o ensaio, consulte o manual do operador específico do instrumento.

Calibração

Execute um procedimento de calibração completo (6 pontos) utilizando os Calibradores de Metotrexato ARK A, B, C, D, E e F; analise os calibradores em duplicata. Uma calibração é necessária para cada novo número de lote do kit de reagentes. Verifique a curva de calibração utilizando pelo menos dois níveis de controles de qualidade, de acordo com o plano de garantia da qualidade do laboratório.

Quando recalibrar

- Sempre que um novo número de lote de reagentes for utilizado
- Sempre que indicado pelos resultados do controle de qualidade
- Sempre que exigido pelos protocolos laboratoriais padronizados

Controle de qualidade (CQ)

Os laboratórios devem estabelecer procedimentos de CQ para o Ensaio de Metotrexato ARK. Todos os requisitos e testes de controle de qualidade devem ser realizados em conformidade com os regulamentos locais, estaduais e/ou federais ou requisitos de acreditação.

As boas práticas laboratoriais recomendam que pelo menos dois níveis de controle de qualidade (níveis baixo e alto de decisão médica) sejam analisados em cada dia de análise de amostras de pacientes e sempre que uma calibração for realizada. Monitore os valores de controle em busca de tendências ou desvios. Se forem detectadas tendências ou desvios, ou se o controle não retornar à faixa especificada, revise todos os parâmetros operacionais de acordo com os procedimentos de qualidade do laboratório clínico. Entre em contato com o Atendimento ao Cliente para obter mais assistência.

Protocolo de diluição manual
A faixa de medição do Ensaio de Metotrexato ARK é de 0,04 a 1,20 µmol/L. As amostras e os controles contendo metotrexato em concentrações mais elevadas (>1,20 µmol/L) são analisados após diluição das amostras e dos controles, de modo que suas concentrações fiquem dentro da faixa de medição.

Dilua manualmente a amostra ou o controle de alta concentração utilizando o Tampão de Diluição de Metotrexato ARK, preparando a diluição seriada apropriada de dez vezes, conforme mostrado abaixo.

	Amostra Volume	**Tampão de Diluição Volume**	**Diluição**	**Fator de diluição**
50 µL	Amostra não diluída	450 µL	1:10	10
50 µL	Amostra diluída 1:10	450 µL	1:100	100
50 µL	Amostra diluída 1:100	450 µL	1:1000	1000
50 µL	Amostra diluída 1:1000	450 µL	1:10000	10000

$$\text{Fator de diluição manual} = \frac{\text{volume da amostra + volume do tampão de diluição}}{\text{Volume da amostra}}$$

Multiplique o resultado do ensaio pelo fator de diluição.

9 Resultados

Para converter de µmol/L para µg/mL, divida o valor obtido pelo fator de conversão de 2,2005.

10 Limitações do procedimento

Este ensaio foi desenvolvido para uso apenas com soro ou plasma; consulte a seção Coleta de amostras e preparação para análise. Costuma ser uma boa prática usar o mesmo método (bem como a matriz) de forma consistente para o

atendimento individual ao paciente devido ao potencial de variabilidade de método para método. Consulte abaixo a seção Valores esperados.

Assim como ocorre com todas as determinações de analitos, o valor de metotrexato deve ser utilizado em conjunto com as informações obtidas na avaliação clínica e em outros procedimentos diagnósticos.

IMPORTANTE: As amostras de pacientes que receberam glucarpidase (carboxipeptidase G2) como terapia de resgate para metotrexato em altas doses ***não*** devem ser analisadas com o Ensaio de Metotrexato ARK. Essas amostras apresentam níveis séricos elevados de ácido 4-[[2,4-diamino-6-(pteridinil)metil]-metilamino]-benzoico (DAMPA)[10-12], resultantes do metabolismo do metotrexato pela glucarpidase. O DAMPA apresenta reatividade cruzada com o anticorpo contra metotrexato utilizado neste ensaio e pode permanecer em circulação por pelo menos cinco a sete dias antes que sejam novamente obtidas medições precisas de metotrexato sérico.[13] Os oncologistas da equipe clínica devem notificar o laboratório quando a glucarpidase for administrada para evitar a emissão de resultados falsamente elevados de metotrexato devido à interferência da DAMPA, o que poderia comprometer a condução da terapia com glucarpidase.[13] Embora a glucarpidase seja bem tolerada e reduza rapidamente os níveis circulantes de MTX, a eliminação renal retardada do MTX ainda pode representar um problema em pacientes adultos e idosos.[14]

11 Valores esperados

Os níveis séricos de metotrexato dependem da indicação terapêutica, da dose, da via de administração, do regime de tratamento, da farmacocinética individual, do metabolismo e de outros fatores clínicos.[1,3] Embora os níveis séricos normalmente atinjam aproximadamente 10 a 100 µmol/L no tratamento do câncer de mama (por exemplo)[15], as concentrações podem exceder 1000 µmol/L[16] durante a terapia com altas doses para osteossarcoma, tendo sido observadas concentrações de até 3100 µmol/L após uma infusão de 4 horas em pacientes pediátricos com osteossarcoma.[17] No tratamento do osteossarcoma[16], a curva de eliminação do metotrexato apresenta ampla variabilidade: 24 horas, 30 a 300 µmol/L; 48 horas, 3 a 30 µmol/L; e 72 horas, menos de 0,3 µmol/L. Uma dose de 10 mg de leucovorina é geralmente administrada por via intravenosa 24 horas após o início da infusão de MTX. As doses subsequentes são ajustadas e administradas de acordo com os níveis de MTX obtidos em 24, 48 e 72 horas. Níveis de metotrexato superiores a 50 µmol/L em 24 horas, 10 µmol/L em 48 horas e 0,5 µmol/L em 72 horas indicam potencial toxicidade e geralmente são tratados com aumento da dose de leucovorina, de acordo com algoritmos terapêuticos, até que o nível de MTX seja <0,1 µmol/L. As diretrizes para a terapia com metotrexato com resgate de leucovorina geralmente recomendam a continuação da leucovorina até que o nível de metotrexato caia abaixo de 0,05 µmol/L.[1, 9] Alguns centros seguem ≤ 0,10 µmol/L.[16, 18]

Das informações de prescrição e de outras fontes: Laboratory Indicators of Toxicity Following Leucovorin Rescue Schedules with High Dose Methotrexate.[1, 9, 19]

Situação clínica	Achados laboratoriais	
	Nível de metotrexato (µmol/L)	**Horas após a administração**
Eliminação normal do metotrexato	~10 ~1 <0,2	24 48 72
Eliminação tardia do metotrexato	>0,2 >0,05	72 96
Eliminação precoce retardada do metotrexato e/ou Evidência de lesão renal aguda	≥50 ≥5 ou ≥100% de aumento na creatinina sérica	24 48 24

A toxicidade renal é um risco significativo e pode ser exacerbada pela coadministração de outros medicamentos, [14, 19] por exemplo, vancomicina.[20] Outras formas de toxicidade podem ocorrer, incluindo distúrbios digestivos (por exemplo, náuseas, vômitos, dor abdominal), distúrbios cutâneo-mucosos (especialmente mucosite), anormalidades hematológicas (por exemplo, neutropenia e trombocitopenia), distúrbios do teste de função hepática e neurotoxicidade.[21-28]

Dado o perfil de aparecimento do metabólito 7-hidroximetotrexato,[15, 27] sua razão molar em relação ao metotrexato de até aproximadamente 100 vezes[29] e sua insolubilidade relativa em comparação com o fármaco original[14, 19], a possível nefrotoxicidade decorrente da precipitação do metabólito nos túbulos renais[29] pode retardar a eliminação do próprio metotrexato.

A terapia com glucarpidase reduz o nível circulante de metotrexato rapidamente, não a droga intracelular. Foi observado um efeito rebote no nível sérico de metotrexato após a terapia com glucarpidase.[14] A eliminação de DAMPA pode levar vários dias antes de não interferir mais no monitoramento do metotrexato por imunoensaio.[13]

12 Características específicas de desempenho

Cada laboratório é responsável por verificar o desempenho utilizando os parâmetros do instrumento estabelecidos para seu analisador. As seguintes

características de desempenho foram obtidas no Sistema Beckman Coulter AU680.

Limite de quantificação (LoQ)

As seguintes características foram determinadas de acordo com CLSI EP17-A2 para o Ensaio de Metotrexato ARK. O desempenho específico do analisador pode variar.

Critério	**Concentração de MTX (µmol/L)**
Limite de branco (LoB); N = 60 µB + 1,645 SD, onde SD = 0,002	0,00
Limite de Detecção (LoD); N = 60 LoB + 1,652 SD, onde SD = 0,012	0,02
Limite de Quantificação (LoQ); N = 40 LoQ – 2 SD > LoD	0,04

Cada laboratório é responsável por determinar os critérios para emissão de resultados das concentrações de metotrexato. A seguinte sugestão do CLSI EP17-A2 pode ser apropriada:

Resultado ≤ LoB:	relatar “não detectado, concentração < LoD”.
LoB < Resultado < LoQ:	relatar “analito detectado; concentração < LoQ”.
Resultado ≥ LoQ	relatar o resultado conforme medido

Faixa de medição

A faixa de medição analítica do Ensaio de Metotrexato ARK é de 0,04 a 1,20 µmol/L. As amostras contendo metotrexato em concentrações mais altas são ensaiadas por diluição da amostra. Relate os valores ensaiados que excedam o LoD de acordo com as informações fornecidas para o LoQ. Multiplique o resultado do ensaio pelo fator de diluição para amostras contendo metotrexato acima da faixa de medição.

Recuperação

A exatidão (recuperação analítica) foi avaliada pela adição de metotrexato concentrado ao soro humano negativo para metotrexato. Um concentrado de estoque certificado de metotrexato altamente puro foi adicionado volumetricamente ao soro humano negativo para metotrexato, representando concentrações de fármaco em toda a faixa de calibração do ensaio. Seis réplicas

de cada amostra foram analisadas em um analisador automatizado de química clínica. Os resultados foram calculados como média e comparados com a concentração-alvo e a porcentagem de recuperação calculada. Os resultados são apresentados abaixo.

$$\% \text{ de recuperação} = 100 \times \frac{\text{concentração média recuperada}}{\text{Concentração teórica}}$$

Teórico Concentração (µmol/L)	Recuperação média Concentração (µmol/L)	Percentual Recuperação (%)
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

Recuperação percentual média: 104,2

Linearidade

Os estudos de linearidade foram realizados como sugerido no CLSI EP6-A. Uma amostra de soro de 1,40 µmol/L foi preparada e as diluições foram feitas proporcionalmente com soro humano negativo para metotrexato. O Ensaio de Metotrexato ARK foi linear de 0,03 a 1,20 µmol/L. Os resultados são apresentados abaixo.

Teórico (µmol/L)	Resultados observados (µmol/L)	Resultados previstos da regressão de 1ª ordem	Resultados previstos da regressão de 2ª ordem	Diferença (µmol/L ou %)
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%

As amostras contendo metotrexato entre 2 e 1200 µmol/L foram preparadas proporcionalmente em soro humano combinado e, em seguida, diluídas até a faixa de calibração com o Tampão de Diluição de Metotrexato ARK. A regressão das concentrações de metotrexato ensaiadas foi linear em toda a faixa.

Comparação de métodos

Estudos de correlação foram realizados utilizando o CLSI EP9-A3. Os resultados do Ensaio de Metotrexato ARK no analisador Beckman Coulter AU680 foram comparados com os resultados obtidos no analisador Roche/Hitachi 917.

As concentrações de metotrexato medidas no Roche/Hitachi 917 variaram de 0,04 a 1050 µmol/L (µM). Os valores do Metotrexato ARK no Beckman Coulter AU680 variaram de 0,04 a 1070 µmol/L. Os resultados da análise de regressão Passing-Bablok[30] para o estudo são mostrados abaixo (com limites de confiança de 95%) para 112 amostras dentro da faixa de medição, bem como para todas as 142 amostras, incluindo aquelas acima da faixa de medição que requerem diluição.

Parâmetro	**Faixa de 0,04 a 1,11 µM**		**Faixa de 0,04 a 1050 µM**	
Inclinação	0,99	(0,96 a 1,00)	1,00	(1,00 a 1,02)
Intercepto em y	0,00	(0,00 a 0,01)	0,00	(0,00 a 0,00)
Coeficiente de correlação (r^2)	0,98	(0,97 a 0,98)	1,00	(1,00 a 1,00)
Número de amostras	112	NA	142	NA

Precisão

A precisão foi determinada conforme descrito no CLSI EP5-A3. O Controle de Metotrexato ARK de seis níveis e o soro humano combinado contendo metotrexato foram utilizados no estudo. Cada nível foi analisado em quadruplicata, duas vezes ao dia, durante 20 dias. Cada execução diária foi separada da seguinte por um intervalo mínimo de duas horas. Foram calculados o DP intraexecução, o DP entre dias, o DP total e os CVs (%). Os resultados são apresentados abaixo. Critérios de aceitação: ≤10% de CV total a >0,1 µmol/L, SD ≤0,01 a ≤0,1 µmol/L.

Amostra	N	Média (µmol/L)	Intraexecução		Entre dias		Total	
			DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV
Controle de Metotrexato ARK								
BAIXO	160	0,08	0,006	7,8	0,004	5,5	0,008	9,6
MÉDIO	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
Soro humano								
BAIXO	160	0,08	0,007	8,9	0,006	7,2	0,009	11,2
MÉDIO	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

Substâncias interferentes

Os estudos de interferência foram conduzidos utilizando o CLSI EP7-A2 como diretriz. Foram avaliadas concentrações clinicamente elevadas das seguintes substâncias endógenas potencialmente interferentes no soro com níveis conhecidos de metotrexato (aproximadamente 0,05 e 0,50 µmol/L). Cada amostra foi ensaiada utilizando o Ensaio de Metotrexato ARK, juntamente com um controle sérico de metotrexato. A medição de metotrexato não foi substancialmente afetada nos níveis de substâncias endógenas testadas.

		Metotrexato (~ 0,05 µmol/L)		Metotrexato (~ 0,50 µmol/L)	
Interferente Substância	Interferente Concentração	Controle sérico	Teste	Controle sérico	Teste (% Controle)
Albumina	12 g/dL	0,05	0,05	0,48	0,50 (103,5)
Bilirrubina - conjugada	70 mg/dL	0,05	0,06	0,48	0,49 (101,4)

Bilirrubina - não conjugada	70 mg/dL	0,05	0,05	0,48	0,48 (101,4)
Colesterol	620 mg/dL	0,05	0,04	0,47	0,48 (103,2)
Gamaglobulina	12 g/dL	0,05	0,06	0,48	0,49 (100,7)
Hemoglobina	1000 mg/dL	0,06	0,06	0,48	0,49 (101,4)
Fator reumatoide	1080 UI/mL	0,06	0,07	0,46	0,45 (96,7)
Triglicerídeos	835 mg/dL	0,05	0,04	0,48	0,48 (98,6)
Ácido úrico	30 mg/dL	0,05	0,06	0,48	0,49 (100,7)

Especificidade

Os metabólitos do metotrexato, os análogos do folato e outros compostos com similaridade estrutural foram testados para determinar se esses compostos afetam a quantificação das concentrações de metotrexato utilizando o Ensaio de Metotrexato ARK. Altos níveis desses compostos foram adicionados a pools de soro contendo; 0,05; ou 0,50 µmol/L de metotrexato. As amostras foram analisadas e as concentrações de metotrexato das amostras contendo interferente foram comparadas a um controle sérico.

Reatividade cruzada ao 7-hidroximetotrexato, o principal metabólito

Após a administração de altas doses de metotrexato (HDMTX), a concentração sérica/plasmática de 7-hidroximetotrexato tipicamente excede a de metotrexato em momentos posteriores. Foi relatado que os níveis de 7-hidroximetotrexato excedem os de metotrexato em até 100 vezes entre 12 e 48 horas após a administração de HDMTX.[15, 27, 29, 31, 33-34]

A reatividade cruzada do 7-hidroximetotrexato na medição de metotrexato foi determinada para o Ensaio de Metotrexato ARK por meio do teste de amostras pareadas contendo (1) 0,05 µmol/L de metotrexato e 5 µmol/L de 7-hidroximetotrexato e (2) 0,50 µmol/L de metotrexato e 50 µmol/L de 7-hidroximetotrexato em soro humano.

O Ensaio de Metotrexato ARK não reagiu de forma cruzada (≤ 0,1%) com o principal metabólito 7-hidroximetotrexato.

Reatividade cruzada ao ácido 2,4-Diamino-N^{10}-metilpteroico (DAMPA)

Como um metabólito menor do metotrexato, não se espera que o DAMPA circule em concentrações que interfeririam na medição do metotrexato.[32] No entanto, após a terapia de resgate com glucarpidase, a concentração sérica de DAMPA pode ser substancial.[13, 14] O Ensaio de Metotrexato ARK reage substancialmente com o metabólito menor DAMPA. Os testes foram realizados na ausência do fármaco de origem, metotrexato. A reatividade cruzada ao DAMPA variou de 76,3% a 100% com base nos dados observados. O ensaio não deve ser usado

durante uma possível terapia compassiva com glucarpidase (carboxipeptidase G2) que converte rapidamente o metotrexato circulante em DAMPA.

Medicamentos que reagem de forma cruzada

O Ensaio de Metotrexato ARK apresenta leve reatividade cruzada com triantereno e trimetoprim; no entanto, esses medicamentos podem ser contraindicados durante o tratamento do câncer com MTX devido a efeitos adversos adicionais quando coadministrados. As estruturas desses compostos correspondem estreitamente à porção do anel de pteridina do metotrexato. Na ausência de metotrexato, foi observada reatividade cruzada com triantereno (1,15%) e trimetoprim (0,01%). Na presença de metotrexato, foi observada reatividade cruzada com triantereno (≤3,3%) e trimetoprim (≤0,5%), com base nos dados obtidos.

Reatividade cruzada a análogos de folato e outros compostos

O Ensaio de Metotrexato ARK não apresentou reatividade cruzada (≤ 0,01%) com análogos de folato ou outros compostos testados em concentrações ≥ 1000 µmol/L.

Composto	Testado (µmol/L)
Adriamicina	1000
Ciclofosfamida	1500
Citosina	1000
Ácido di-hidrofólico	1000
DL-6-Metil-5,6,7,8-tetraidropterina	1000
Ácido fólico	1000
Ácido folínico (leucovorina)	1000
5-Fluorouracil	3000
6-Mercaptopurina	1000
Ácido 5-metiltetraidrofólico	1000
Prednisolona	1000
Pirimetamina	1000
Sulfametoxazol	1600
Ácido tetraidrofólico	1000
Vinblastina	1000
Vincristina	1000

13 Referências

1. Informações de Prescrição. 2008. Methotrexate Injection, USP. Hospira, Inc. Lake Forest, IL.

2. Jonsson, O. G. & 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. Informações de Prescrição de Leucovorina (Fusilev). 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 Marcas registradas

ARK™ é uma marca registrada da ARK Diagnostics, Inc.
Outras marcas ou nomes de produtos são marcas registradas de seus respectivos titulares.

ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 USA

Revisado em junho de 2025
1600-0213-00PT-BR Rev 11