

## ARK™ Methotrexate Assay

Este folheto informativo da ARK Diagnostics, Inc. para o ARK Methotrexate Assay deve ser cuidadosamente lido antes de usar. As Instruções de utilização devem ser rigorosamente cumpridas. A fiabilidade dos resultados do ensaio não pode ser garantida se existirem quaisquer desvios às instruções constantes neste folheto informativo

### Serviço de 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



Emergo Europe  
 Prinsessegracht 20  
 2514 AP Haia  
 Países Baixos

### Legenda dos símbolos utilizados

	Código de lote	 AAAA-MM-DD	Usar até/Data de validade
	Número de catálogo		Fabricante
	Representante Europeu Autorizado		Marcação CE
	Dispositivo Médico para diagnóstico in-vitro		Limites de temperatura
	Consultar as instruções de utilização	 	Reagente1 Reagente 2
<b>Rx Only</b>	Para uso apenas mediante prescrição		

## 1 Nome

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

## 2 Utilização prevista

O ARK Methotrexate Assay é um ensaio imunoenzimático homogéneo destinado à determinação quantitativa de metotrexato em soro ou plasma humanos em analisadores bioquímicos automáticos. Os valores obtidos são utilizados na monitorização dos níveis de metotrexato para assegurar a terapêutica adequada.

As amostras de pacientes que receberam glucarpidase (carboxipeptidase G2) como terapia de resgate de alta dosagem do metotrexato, **não** devem ser testadas com o ARK Methotrexate Assay.

## 3 Sumário e Explicação do Teste

O metotrexato [N-[4[[[(2,4-diamino-6-pteridinil) metil] metilamina] benzoil]-L- ácido glutâmico], antigamente designado de Amethopterin, é um anti metabolito utilizado no tratamento de certas doenças neoplásicas, psoríase grave, e artrite reumatóide em adultos.<sup>1-3</sup> O metotrexato possui toxicidade potencial grave. Os pacientes submetidos à terapia com metotrexato devem ser rigorosamente monitorizados para que os efeitos tóxicos sejam detectados rapidamente. Devem ser consultadas as diretrizes para a terapia de metotrexato com administração de leucovorina.<sup>1</sup> Foram obtidos resultados favoráveis utilizando doses intermédias a altas de metotrexato (aproximadamente 35 mg/m<sup>2</sup> - 12 g/m<sup>2</sup>) com administração de leucovorina (*factor citrovorum*) no tratamento de osteossarcoma, leucemia, linfoma não-Hodgkin, cancro do pulmão e mama.<sup>4-8</sup>

## 4 Princípios do Procedimento

O ARK Methotrexate Assay é um imunensaio homogéneo baseado na competição entre o fármaco presente na amostra e o metotrexato marcado com a enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) para a ligação do reagente ao anticorpo. À medida que o reagente se liga ao anticorpo, a actividade da enzima diminui. Na presença do fármaco contido na amostra, a actividade da enzima aumenta e é directamente proporcional à concentração do fármaco. A enzima activa converte a coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) em NADH, que é medida espectrofotometricamente como a taxa de variação da absorvância. A G6PDH endógena no soro, não interfere com os resultados porque a coenzima NAD só funciona com a enzima bacteriana utilizada no ensaio.

## 5 Reagentes

REF	Descrição do Produto	Quantidade/Volume
5026-0001-00	<b>ARK™ Methotrexate Assay</b>	1 X 16 mL
5026-0001-02	<b>Reagent [R1] – Antibody/Substrate</b> anticorpos policlonais de coelho para o metotrexato, glucose-6-fosfato, nicotinamida adenina dinucleótido, albumina de soro bovino, conservantes e estabilizantes	
5026-0001-03	<b>Reagent [R2] – Enzyme</b> metotrexato marcado com G6PDH bacteriana, tampão, albumina de soro bovino, conservantes e estabilizantes	

### Manuseamento e Conservação dos Reagentes

Os reagentes do ARK Methotrexate Assay são fornecidos líquidos, prontos a usar e podem ser utilizados directamente após a retirada do frigorífico. Quando não estiverem a ser utilizados, os reagentes devem ser armazenados entre 2-8°C (36-46°F), na posição vertical e com as tampas de rosca bem fechadas. Se armazenados como indicado, os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo. Não congelar os reagentes. Evitar a exposição prolongada a temperaturas superiores a 32°C (90°F). **O armazenamento inadequado dos reagentes pode afetar o desempenho do ensaio.**

## 6 Avisos e Precauções

- Para utilização em Diagnóstico *In-Vitro*. Para uso apenas mediante prescrição.
- Os reagentes [R1] e [R2] são fornecidos como um conjunto combinado e não devem ser trocados com reagentes de lotes diferentes.

## 7 Colheita e Preparação da Amostra para Análise

- É necessário soro ou plasma. Por razões de consistência, a utilização da mesma matriz de amostras para pacientes individuais, é considerada uma boa prática.
- O tempo de colheita de metotrexato estará dependente da dose, da duração da infusão, e do estado clínico do paciente. Consulte os protocolos de tratamento específicos para tempo de colheita.
- Não pode ser utilizado sangue total. Podem ser usados os seguintes anticoagulantes com este ensaio.
  - Heparina sódica
  - Heparina de lítio
  - EDTA potássica
- A colheita de sangue deve ser efetuada com tubos de colheita compatíveis para uso em monitorização terapêutica de fármacos (TDM). Cada laboratório

deve estabelecer a aceitação dos tubos de separação de gel para a preparação do soro antes de realizar o ensaio ARK Methotrexate.

- Não provocar a formação de espuma e evitar a congelação e descongelação repetidas para preservar a integridade da amostra, desde o momento em que é colhida, até ao momento em que é analisada.
- A fibrina, as células vermelhas do sangue, e outras partículas podem causar um resultado erróneo. Certifique-se que efetuou uma centrifugação adequada.
- As amostras clarificadas podem ser armazenadas até duas semanas, entre 2 e 8°C. Se o teste for adiado, as amostras podem ser congeladas ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ) antes de serem testadas. Devem ser tomadas ações para limitar o número de ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras demonstraram suportar três ciclos de congelamento-descongelamento, quando armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- **Manusear todas as amostras de pacientes como se fossem potencialmente infecciosas.**

## 8 Procedimento

### Materiais Fornecidos

ARK Methotrexate Assay – **REF** 5026-0001-00

ARK Methotrexate Assay, Roche<sup>®</sup> c pack – **REF** 5026-0001-02

ARK Methotrexate Assay, Roche<sup>®</sup> c pack verde – **REF** 5026-0001-03

### Materiais Necessários – Fornecidos Separadamente

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

Controlos de Qualidade – ARK Methotrexate Control – **REF** 5026-0003-00

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

### Equipamentos

Os reagentes **R1** e **R2** podem necessitar de ser transferidos para recipientes de reagentes específicos do analisador antes da utilização. Evitar a contaminação cruzada do **R1** e **R2**.

### Sequência do ensaio

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

### Calibração

Realizar um procedimento de calibração completa (6 pontos) usando os calibradores ARK Methotrexate A, B, C, D, E, e F; testar os calibradores em duplicado. A calibração é necessária para cada novo número de lote de kit de reagentes. Verificar a curva de calibração em pelo menos dois níveis de controlo de qualidade de acordo com o plano de garantia de qualidade laboratorial estabelecido.

### Quando se deve recalibrar

- Sempre que for utilizado um novo número de lote de reagentes.
- Sempre que for indicado por resultados do controlo de qualidade.
- Sempre que for solicitado por protocolos padrão do laboratório.

### Controlo de Qualidade (CQ)

Os laboratórios devem estabelecer procedimentos de CQ para o ensaio ARK Methotrexate. Todos os requisitos de controlo de qualidade e testes devem ser realizados em conformidade com a legislação local, estadual e/ou regulamentos federais ou requisitos de acreditação.

As boas práticas de laboratório aconselham a que, pelo menos, dois níveis de controlo de qualidade (pontos de decisão médica baixo e alto) sejam testados a cada dia em que as amostras do paciente são analisadas e cada vez que uma calibração for realizada. Monitorizar os valores de controlo para todas as tendências ou mudanças. Se forem detectadas quaisquer tendências ou alterações ou se o controlo não recuperar dentro do intervalo especificado, reveja todos os parâmetros operacionais de acordo com os seus procedimentos clínicos de qualidade laboratorial. Contactar o Serviço de Apoio ao Cliente para obter mais assistência.

### Protocolo de Diluição Manual

O intervalo de medição do ARK Methotrexate Assay situa-se entre 0,04 – 1,20 µmol/L. As amostras e controlos contendo metotrexato em concentrações mais elevadas (>1,20 µmol/L), são testadas por diluição da amostra e dos controlos dentro do intervalo de medição.

Diluir manualmente a amostra mais concentrada ou o controlo de intervalo elevado com o ARK Methotrexate Dilution Buffer preparando uma diluição apropriada em séries de 10 conforme indicado abaixo.

	<b>Volume da Amostra</b>	<b>Volume do Tampão de Diluição</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fator de Diluição</b>
50 µL	Amostra não diluída	450 µL	1:10	10
50 µL	1:10 amostra	450 µL	1:100	100
50 µL	1:100 amostra	450 µL	1:1000	1000
50 µL	1:1000 amostra	450 µL	1:10000	10000

$$\text{Fator de Diluição Manual} = \frac{(\text{Volume da Amostra} + \text{Volume do Tampão de Diluição})}{\text{Volume da Amostra}}$$

Multiplicar o resultado do ensaio pelo fator de diluição.

## 9 Resultados

Para converter  $\mu\text{mol/L}$  em  $\mu\text{g/mL}$ , dividir o valor obtido pelo fator de conversão 2,2005.

## 10 Limitações do Procedimento

Este ensaio foi concebido para ser utilizado apenas com soro e plasma; consulte a secção Colheita e Preparação da Amostra para Análise. Em geral, é recomendável o uso consistente do mesmo método (bem como da matriz) para o tratamento individual de cada paciente, devido ao potencial de variabilidade entre métodos. Consulte a secção Valores Esperados abaixo.

Tal como acontece com todas as determinações de analitos, o valor de metotrexato deve ser usado em conjugação com a informação disponível a partir da avaliação clínica e outros procedimentos de diagnóstico.

**IMPORTANTE:** As amostras de pacientes que receberam glucarpidase (carboxipeptidase G2) como terapia de resgate de alta dosagem do metotrexato, **não** devem ser testadas com o ARK Methotrexate Assay. Nestas amostras aumentaram os níveis séricos de 4-[[2,4-diamino-6-(piridinil) metil]-metilamino] benzóico (DAMPA),<sup>10-12</sup> resultantes do metabolismo de metotrexato por glucarpidase. O DAMPA reage de forma cruzada com o anticorpo metotrexato utilizado neste ensaio, e pode continuar a circular durante pelo menos cinco a sete dias antes que as determinações exatas de metotrexato no soro possam voltar a ocorrer.<sup>13</sup> Os oncologistas da equipa clínica devem notificar o laboratório quando a glucarpidase é administrada, para evitar a ocorrência de concentrações falsamente elevadas de metotrexato devido à interferência por DAMPA que confundiria os esforços da terapia por glucarpidase.<sup>13</sup> Apesar da glucarpidase ser bem tolerada e reduzir rapidamente a circulação de MTX, a eliminação renal tardia de MTX pode ainda constituir um problema para os pacientes adultos e idosos.<sup>14</sup>

## 11 Valores Esperados

Os níveis de metotrexato no soro dependem da indicação para uso, dosagem, modo de administração, esquema de tratamento, farmacocinética individual, metabolismo e outros factores clínicos.<sup>1,3</sup> Enquanto o nível sérico pode atingir tipicamente cerca de 10 a 100  $\mu\text{mol/L}$  no tratamento de cancro da mama (por exemplo),<sup>15</sup> as concentrações podem exceder 1000  $\mu\text{mol/L}$ <sup>16</sup> com a terapia de alta dosagem em osteossarcoma, tendo sido atingidos até 3100  $\mu\text{mol/L}$  de metotrexato na sequência de uma infusão de 4 horas em pacientes pediátricos com osteossarcoma.<sup>17</sup> Para o tratamento de osteossarcoma,<sup>16</sup> o decaimento da curva de metotrexato possui uma ampla variabilidade: 24 horas, 30 a 300  $\mu\text{mol/L}$ ; 48 horas, 3 a 30  $\mu\text{mol/L}$ ; e 72 horas, inferior a 0,3  $\mu\text{mol/L}$ . 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. Os níveis de metotrexato em excesso de 50 µmol/L em 24 horas, 10 µmol/L em 48 horas, e 0,5 µmol/L em 72 horas, prevêem uma toxicidade potencial e são geralmente tratados com um aumento na dose de leucovorina de acordo com algoritmos, até que o nível de MTX seja <0,1 µmol/L. As diretrizes para a terapia de metotrexato com leucovorina recomendam normalmente a continuação do resgate com leucovorina até que o nível de metotrexato decresça para um valor inferior a 0,05 µmol /L.<sup>1,9</sup> Alguns centros utilizam o valor ≤ 0,10 µmol/L.<sup>16,18</sup>

Prescrição e outras informações: Indicadores Laboratoriais de Toxicidade Seguindo esquemas de resgate com Leucovorina com alta dosagem de Metotrexato.<sup>1, 9, 19</sup>

Situação Clínica	Constatações Laboratoriais	
	Nível de Metotrexato (µmol/L)	Horas após a administração
Eliminação Normal de Metotrexato	~10	24
	~1	48
	<0,2	72
Eliminação Tardia de Metotrexato	>0,2	72
	>0,05	96
Eliminação Precoce de Metotrexato	≥50	24
	≥5	48
e/ou	OU	
Evidência de Lesão Renal Aguda	≥100% aumento da creatinina sérica	24

A toxicidade renal é um risco significativo e pode ser exacerbado pela co-administração de outros fármacos,<sup>14,19</sup> por exemplo vancomicina.<sup>20</sup> Podem ocorrer outras formas de toxicidade, incluindo distúrbios digestivos (por exemplo, náuseas, vômitos, dor abdominal), perturbações cutâneas ou das mucosas (em especial mucosite), anomalias hematológicas (por exemplo, neutropenia e trombocitopenia), e neurotoxicidade.<sup>21-28</sup>

Considerando o perfil de aparecimento do metabolito 7-hidroximetotrexato,<sup>15, 27</sup> a sua proporção molar de até cerca de 100 vezes para o metotrexato,<sup>29</sup> a insolubilidade relativa em relação ao fármaco original,<sup>14,19</sup> e a nefrotoxicidade possível devido à precipitação do metabolito em túbulos renais,<sup>29</sup> podem atrasar a eliminação do próprio metotrexato.

A terapia com glucarpidase (disponível para uso compassivo), reduz rapidamente o nível de circulação de metotrexato, mas não do fármaco

intracelular. Foi observado um efeito de diminuição no nível de metotrexato sérico após a terapia com glucarpidase.<sup>14</sup> A eliminação de DAMPA pode demorar alguns dias antes de deixar de interferir com a monitorização de metotrexato através de imunoensaio.<sup>13</sup>

## 12 Características específicas de desempenho

Cada laboratório é responsável pela verificação do desempenho usando os parâmetros do equipamento estabelecidos para o seu analisador. Foram obtidas as seguintes características de desempenho no Sistema Beckman Coulter AU680.

### Limite de Quantificação (LoQ)

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

<b>Critério</b>	<b>Concentração de MTX (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>
Limite do Branco (LoB); N = 60 $\mu\text{B} + 1,645 \text{ SD}$ , sendo $\text{SD} = 0,002$	0,00
Limite de Detecção (LoD); N = 60 $\text{LoB} + 1,652 \text{ SD}$ , sendo $\text{SD} = 0,012$	0,02
Limite de Quantificação (LoQ); N = 40 $\text{LoQ} - 2 \text{ SD} > \text{LoD}$	0,04

Cada laboratório é responsável pela determinação dos critérios de comunicação de dados para as concentrações de metotrexato. A seguinte sugestão do protocolo CLSI EP17-A2 pode ser apropriada:

Resultado $\leq$ LoB	informação “não detetado; concentração $< \text{LoD}$ ”
LoB $<$ Resultado $<$ LoQ	informação “analito detetado; concentração $< \text{LoQ}$ ”
Resultado $\geq$ LoQ	reportar o resultado conforme medição

### Intervalo de Medição

O intervalo de medição do ARK Methotrexate Assay é de 0,04 – 1,20  $\mu\text{mol/L}$ . As amostras e controlos contendo metotrexato em concentrações mais elevadas ( $> 1,20 \mu\text{mol/L}$ ) são analisadas através da diluição da amostra. Reportar os valores obtidos no ensaio que excedam o LoD de acordo com informações fornecidas pelo LoQ. Multiplicar o resultado do ensaio pelo fator de diluição para amostras contendo metotrexato acima do intervalo de medição.



## Recuperação

A precisão (recuperação analítica) foi realizada através da adição de um fármaco concentrado com metotrexato a soro humano negativo para o metotrexato. Um stock certificado, concentrado com metotrexato altamente puro foi volumetricamente adicionado à amostra de soro humano negativo para metotrexato, representando concentrações de fármaco em todo o intervalo de calibração do ensaio. Foram analisadas seis repetições de cada amostra num analisador automatizado de química clínica. Os resultados foram determinados e comparados com a concentração desejada e percentagem de recuperação calculada. Os resultados são apresentados abaixo:

$$\% \text{ Recuperação} = 100 \times \frac{\text{Concentração Média Recuperada}}{\text{Concentração teórica}}$$

<b>Concentração Teórica (µmol/L)</b>	<b>Concentração Média Recuperada (µmol/L)</b>	<b>Percentagem de Recuperação (%)</b>
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

Percentagem média de recuperação: 104,2

## Linearidade

Foram realizados estudos de linearidade, conforme sugerido pelo protocolo EP6-A do CLSI. Foi preparada uma amostra de soro com 1,40  $\mu\text{mol/L}$  e as diluições foram efetuadas proporcionalmente com soro humano negativo para metotrexato. O ensaio de metotrexato ARK foi linear no intervalo 0,03 - 1,20  $\mu\text{mol/L}$ . Os resultados são apresentados abaixo.

Teórico ( $\mu\text{mol/L}$ )	Resultados Observados ( $\mu\text{mol/L}$ )	Resultados Previstos para a 1ª Ordem	Resultados Previstos para a 2ª Ordem	Diferença ( $\mu\text{mol/L}$ or %)
0,00	0,01	-0,002	0,010	NA
0,03	0,04	0,029	0,038	0,009 $\mu\text{mol/L}$
0,05	0,06	0,050	0,057	0,007 $\mu\text{mol/L}$
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  $\mu\text{mol/L}$  foram preparadas de forma proporcional em “pool” de soro humano e, em seguida, diluídas no intervalo de calibração com ARK Methotrexate Dilution Buffer. A regressão das concentrações de metotrexato ensaiadas, foi linear em todo o intervalo.

## Comparação de Métodos

Foram realizados estudos de correlação utilizando o Protocolo EP9-A3 do CLSI. Os resultados do ensaio de metotrexato ARK com o analisador Beckman Coulter AU680 foram comparados com os resultados com o analisador Roche/Hitachi 917.

As concentrações de metotrexato por Roche/Hitachi 917 variou de 0,04 a 1050  $\mu\text{mol/L}$  ( $\mu\text{M}$ ). Os valores de metotrexato ARK com o Beckman Coulter AU680 variaram de 0,04 a 1070  $\mu\text{mol/L}$ . Os resultados da análise através da regressão de Passing-Bablok<sup>30</sup> para o estudo, são apresentados a seguir (com limites de confiança de 95%) para 112 amostras dentro do intervalo medição, bem como para todas as 142 amostras, incluindo as que se situam acima do intervalo de medição e que necessitam de diluição.

Parâmetro	Intervalo 0,04 a 1,11 $\mu\text{M}$		Intervalo 0,04 a 1050 $\mu\text{M}$	
Declive	0,99	(0,96 a 1,00)	1,00	(1,00 a ,02)
Interceção - y	0,00	(0,00 a 0,01)	0,00	(0,00 a 0,00)
Coefficiente 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 Protocolo EP5-A3 do CLSI. No estudo, foram utilizados os seis níveis de ARK Methotrexate Control e "pools" de amostras humanas contendo metotrexato. Cada nível foi testado em quadruplicado, duas vezes por dia durante 20 dias. Cada um dos ensaios diários foi separado por pelo menos duas horas. Foram calculados os valores intra-ensaio, entre dias, o total de DP, e a percentagem de CVs. Os resultados são apresentados abaixo. Critérios de aceitação:  $\leq 10\%$  CV total a  $> 0,1 \mu\text{mol/L}$ , DP  $\leq 0,01$  a  $\leq 0,1 \mu\text{mol/L}$ .

Amostra	N	Média ( $\mu\text{mol/L}$ )	Intra-ensaio		Entre dias		Total	
			DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV
ARK Methotrexate Control								
BAIXO	160	0,08	0,006	7,8	0,004	5,5	0,008	9,6
INTERMÉDIO	160	0,39	0,009	2,2	0,007	1,7	0,012	3,1
ELEVADO	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
INTERMÉDIO	160	0,41	0,011	2,6	0,008	2,1	0,015	3,7
ELEVADO	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 como diretriz o Protocolo EP7-A2 do CLSI. Foram avaliadas concentrações clinicamente elevadas das seguintes substâncias endógenas potencialmente interferentes no soro, com níveis conhecidos de metotrexato (aproximadamente 0,05 e 0,50  $\mu\text{mol/L}$ ). Cada amostra foi testada usando o ARK Methotrexate Assay, juntamente com um soro de controlo de metotrexato. A medição de metotrexato não foi substancialmente afectada nos níveis de substâncias endógenas testados.

Substância Interferente	Concentração Interferente	Metotrexato (~ 0,05 $\mu\text{mol/L}$ )		Metotrexato (~ 0,50 $\mu\text{mol/L}$ )	
		Soro de Controlo	Teste	Soro de Controlo	Teste (% Controlo)
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)
Gama Globulina	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 Reumatóide	1080 IU/mL	0,06	0,07	0,46	0,45 (96,7)
Triglicédeos	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

Foram testados metabolitos de metotrexato, análogos de folato e outros compostos possuindo uma estrutura semelhante, para determinar se estes compostos afectam a quantificação das concentrações de metotrexato usando o ARK Methotrexate Assay. Foram inseridos níveis elevados destes compostos em “pools” de soro sem metotrexato, ou contendo 0,05  $\mu\text{mol/L}$  ou 0,50  $\mu\text{mol/L}$  de metotrexato. As amostras foram analisadas e as concentrações de metotrexato e de amostras contendo interferentes foram comparadas com um soro de controlo.

### Reatividade cruzada com o metabolito principal, o 7-Hidroximetotrexato

Após a administração de uma dosagem elevada de metotrexato (HDMTX), a concentração de 7-hidroximetotrexato no soro/plasma excede tipicamente a do metotrexato em intervalos de tempo posteriores. Tem sido verificado que os níveis de 7-hidroximetotrexato excedem os de metotrexato até 100 vezes, 12 a 48 horas após a administração de HDMTX.<sup>15, 27, 29, 31, 33-34</sup>

A reatividade cruzada com o 7-hidroximetotrexato na medição de metotrexato foi determinada para o ARK Methotrexate Assay testando amostras pareadas contendo ambos (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 ARK Methotrexate Assay não apresentou reação cruzada ( $\leq 0,1\%$ ) com o metabolito principal 7- hidroximetotrexato.

### Reatividade cruzada com o 2,4-diamino-N10-metil ácido pteróico (DAMPA)

Sendo um metabolito secundário do metotrexato, não se espera que o DAMPA circule em concentrações que possam interferir na determinação de metotrexato.<sup>32</sup> No entanto, após a terapia de resgate com glucarpidase, a concentração de DAMPA no soro pode ser significativa<sup>13,14</sup> O ARK Methotrexate Assay apresenta uma reação cruzada substancial com o metabolito menor DAMPA. Os testes foram realizados na ausência do fármaco semelhante ao metotrexato. A reactividade cruzada com DAMPA variou de 76,3% a 100% com base em dados observados. O ensaio não deve ser utilizado durante uma possível terapia compassiva com glucarpidase (carboxipeptidase G2) que converte rapidamente o metotrexato circulante em DAMPA.

### Fármacos que reagem de forma cruzada

O ARK Methotrexate Assay apresenta uma reação cruzada ligeira com o triamterene e o trimetoprim, no entanto estes fármacos podem ser contra-indicados no tratamento MTX do cancro devido a efeitos adversos adicionais, se forem co-administrados. As estruturas destes compostos correspondem rigorosamente à porção de anel de pteridina do metotrexato. Na ausência de metotrexato, observou-se reacção cruzada com o triamtereno (1,15%) e com o trimetoprim (0,01%). Na presença de metotrexato a reatividade cruzada resultou, com base nos dados observados, com o triamtereno  $\leq 3,3\%$  e com o trimetoprim  $\leq 0,5\%$ .

Reatividade cruzada com análogos de folato e outros compostos

O ARK Methotrexate Assay não reagiu de forma cruzada ( $\leq 0,01\%$ ) com análogos de folato ou outros compostos  $\geq 1000 \mu\text{mol/L}$  conforme testado.

<b>Composto</b>	<b>Testado (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>
Adriamicina	1000
Ciclofosfamida	1500
Citosina	1000
Ácido dihidrofólico	1000
DL-6-metil-5,6,7,8-Tetrahydropterina	1000
Ácido fólico	1000
Ácido folínico (leucovorina)	1000
5-Fluorouracil	3000
6-Mercaptopurina	1000
5- Ácido metiltetrahidrofólico	1000
Prednisolona	1000
Pirimetamina	1000
Sulfametoxazol	1600
Ácido tetrahidrofólico	1000
Vinblastina	1000
Vincristina	1000

## 13 Referências

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.

## 14 Marcas Registradas

**ARK**<sup>™</sup> é uma marca registrada da **ARK** Diagnostics, Inc.

Outras marcas ou nomes de produtos são marcas comerciais dos seus respectivos proprietários.



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

Revisto em Agosto de 2020  
1600-0213-00PT Rev 08