

## ARK™ Methotrexate Assay

Leia atentamente este folheto informativo da ARK Diagnostics, Inc. antes de utilizar o Ensaio de metotrexato da ARK. As instruções constantes no folheto informativo têm de ser rigorosamente observadas. Não é possível garantir a fiabilidade dos resultados do ensaio caso não se observem as instruções constantes neste folheto informativo.

Comunique ao fabricante qualquer incidente grave que tenha ocorrido relativamente ao dispositivo, assim como à autoridade competente adequada. Um resumo da segurança e do desempenho está disponível através da EUDAMED (base de dados europeia sobre dispositivos médicos), SRN: US-MF-000023925.

### Assistência 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













EC REP

Emergo Europe  
 Westervoortsedijk 60  
 6827 AT Arnhem  
 The Netherlands

CH REP

MedEnvoy Switzerland  
 Gotthardstrasse 28  
 6302 Zug  
 Switzerland

### Símbolos utilizados

	Código do lote	 YYYY-MM-DD	Data de validade
	Número de Catálogo		Fabricante
	Representante Autorizado		Marcação CE com número do organismo notificado
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>		Limite de temperatura
	Consulte as Instruções de Utilização		Reagente 1/ reagente 2
<b>Rx Only</b>	Para uso exclusivo sujeito a receita médica		

## **1 Nome**

### **ARK™ Methotrexate Assay**

## **2 Utilização prevista**

O Ensaio de metotrexato ARK é um imunoenensaio enzimático homogêneo concebido para a determinação quantitativa de metotrexato no soro ou plasma humanos utilizando analisadores químico-clínicos automatizados. As medições obtidas são utilizadas no controlo dos níveis de metotrexato para ajudar garantir uma terapia adequada.

As amostras de doentes que tenham recebido glucarpidase (carboxipeptidase G2) como terapêutica de resgate de uma dose alta de metotrexato não devem ser testadas 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], anteriormente designado como ametofterina, é um antimetabolito utilizado no tratamento de determinadas doenças neoplásicas, psoríase grave e artrite reumatóide no adulto.<sup>1-3</sup> Metotrexato tem potencial para toxicidade grave. Os doentes submetidos a terapêutica com metotrexato devem ser monitorizados atentamente para que os efeitos tóxicos possam ser prontamente detectados.

A monitorização do metotrexato é habitualmente utilizada em doentes submetidos a tratamento com doses elevadas de metotrexato para o cancro; os resultados são utilizados para orientar a terapêutica de suporte enquanto o metotrexato está a ser eliminado pelos rins. Devem consultar-se as orientações para a terapêutica de resgate de metotrexato com leucovorina.<sup>1</sup> Utilizaram-se doses altas de metotrexato (cerca de 35 mg/m<sup>2</sup> - 12 g/m<sup>2</sup>) com leucovorina (factor citrovorum), com resultados favoráveis, no tratamento de sarcoma osteogénico, leucemia, linfoma não Hodgkin, cancro do pulmão e da mama.<sup>4-8</sup>

## **4 Princípios do Procedimento**

O Ensaio de metotrexato ARK é um imunoenensaio homogêneo, baseado na competição entre o fármaco presente na amostra e metotrexato marcado com a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) pela ligação ao reagente do anticorpo. À medida que se dá a ligação deste último ao anticorpo, a actividade enzimática diminui. Na presença de fármaco proveniente da amostra, a actividade enzimática aumenta, sendo directamente proporcional à concentração do fármaco. A enzima activa converte a coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) para NADH, o que é medido por espectrofotometria como taxa de alteração da absorvância. A G6PDH endógena presente no soro 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	<b>ARK Methotrexate Assay</b>	
5026-0001-02	<b>Reagente R1 – Anticorpo/Substrato</b> Anticorpos policlonais de coelho contra metotrexato, glicose-6-fosfato, nicotinamida adenina dinucleotídeo, albumina sérica bovina, conservantes e estabilizadores	1 X 16 mL
5026-0001-03	<b>Reagente R2 – Enzima</b> Metotrexato marcado com G6PDH bacteriano, tampão, seralbumina bovina, conservante e estabilizadores	1 X 8 mL

REF	Descrição do Produto	Quantidade/Volume
5026-0001-01	<b>ARK Methotrexate Assay</b>	
	<b>Reagente R1 – Anticorpo/Substrato</b> Anticorpos policlonais de coelho contra metotrexato, glicose-6-fosfato, nicotinamida adenina dinucleotídeo, albumina sérica bovina, conservantes e estabilizadores	1 X 28 mL
	<b>Reagente R2 – Enzima</b> Metotrexato marcado com G6PDH bacteriano, tampão, seralbumina bovina, conservante e estabilizadores	1 X 14 mL

### Manuseamento e armazenamento do reagente

Os reagentes para o Ensaio de metotrexato ARK são fornecidos na forma líquida, pronta a usar, e podem ser usados imediatamente depois de retirar do frigorífico. Quando não estiverem a uso, os reagentes têm de 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 são estáveis até à data de validade impressa no rótulo. Não congelar os reagentes. Evitar a exposição prolongada a temperaturas acima de 32°C (90°F). **O armazenamento inadequado de reagentes pode afectar o desempenho do ensaio.**

## 6 Advertências e precauções

- Para utilização em **diagnóstico in vitro**. Requer prescrição médica.
- Os reagentes **R1** e **R2** são fornecidos como conjunto, e não devem ser trocados com reagentes com números de lote diferentes.

## 7 Colheita de amostras e preparação para análise

- Cada laboratório é responsável por fornecer uma amostra válida para análise segundo os respectivos procedimentos de qualidade.
- É necessário soro ou plasma. Para a consistência, é boa prática utilizar a mesma matriz de amostras para cada doente individual.

- O momento de amostragem de metotrexato dependerá da dose, duração da perfusão e estado clínico do doente. Consulte os protocolos de tratamento específicos para ver o momento de amostragem.
- Não pode utilizar-se sangue total. Podem utilizar-se os anticoagulantes seguintes com este ensaio.
  - Heparina sódica
  - Heparina de lítio
  - EDTA de potássio
- A colheita de sangue terá de ser efectuada com tubos de colheita compatíveis para uso com a monitorização terapêutica do fármaco (TDM).
- Siga as recomendações do fabricante do tubo para a colheita, processamento e centrifugação.
- O documento GP44-A4 do CLSI descreve os procedimentos para a minimização de artefactos devido à colheita e manuseamento de amostras para as análises laboratoriais frequentes.<sup>35</sup>
- Não induzir a formação de espuma e evitar congelamento e descongelamento repetidos para preservar a integridade da amostra desde o momento da sua colheita até ao ensaio.
- A presença de fibrina, glóbulos vermelhos e outro material particulado pode levar a resultados erróneos. Assegure uma centrifugação adequada.
- A presença de bolhas ou espuma nas amostras pode levar a uma aplicação curta da amostra e a resultados erróneos.
- Cada laboratório deve consultar a literatura disponível e os dados internos relativos à estabilidade das amostras.
- As amostras clarificadas podem ser armazenadas por até duas semanas a 2 a 8°C. Se o teste for adiado, as amostras devem ser conservadas congeladas ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ) antes da análise. Recomenda-se a limitação do número de ciclos de congelamento e descongelamento. Foi demonstrado que as amostras resistem a 3 ciclos de congelação-descongelação quando armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- **Manuseie todas as amostras de pacientes como se fossem potencialmente infecciosas.**

## 8 Procedimento

### Materiais fornecidos

Ensaio de metotrexato ARK – REF 5026-0001-00 ou 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

Controlos de qualidade – Controlo de metotrexato ARK – REF 5026-0003-00

Tampão de diluição de metotrexato ARK – REF 5026-0004-00

### **Instrumentação**

Antes de serem usados, os reagentes **R1** e **R2** podem precisar de ser transferidos para recipientes específicos do analisador. Evite a contaminação cruzada de **R1** e **R2**.

Muitos analisadores automatizados de química clínica com determinação fotométrica da taxa a 340 nm são adequados. Consulte a folha da aplicação específica do analisador para a programação do Ensaio de metotrexato de ARK, disponível junto do seu distribuidor ou da Assistência ao Cliente da ARK. As Folhas de Protocolo de Aplicação que foram classificadas pela CLIA ou que ostentam a marcação CE foram verificadas pelo fabricante. O laboratório tem a responsabilidade de proceder a toda a validação adequada para a utilização do ensaio com outras configurações ou outros analisadores.

Consulte o manual do operador específico do instrumento quanto à manutenção diária.

### **Sequência do ensaio**

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

### **Calibração**

Realize um procedimento completo de calibração (6 pontos) utilizando os Calibradores de metotrexato A, B, C, D, E e F da ARK, execute os calibradores em duplicado. A calibração é necessária a cada novo número de lote do kit de reagentes. Verifique a curva de calibração com pelo menos dois níveis de controlos de qualidade, conforme o plano de garantia de qualidade laboratorial definido.

### **Quando recalibrar**

- Sempre antes da utilização de reagentes de um número de lote novo
- Sempre que necessário, com base nos resultados do controlo de qualidade
- Sempre que esteja previsto pelos protocolos padrão de laboratório

### **Controlo de Qualidade (CQ)**

Os laboratórios devem estabelecer procedimentos de CQ para o Ensaio de metotrexato ARK. Todos os requisitos de controlos de qualidade e de testes devem ser realizados em conformidade com os regulamentos locais, regionais ou nacionais, ou com os requisitos de acreditação.

As boas práticas de laboratório sugerem que sejam testados no mínimo dois níveis (pontos de decisão médica baixo e alto) de controlo de qualidade a cada dia em que se ensaiarem amostras de pacientes e de cada vez que se efectuar uma calibração. Monitorize os valores de controlo para detectar quaisquer tendências ou desvios. Se detectar quaisquer tendências ou desvios, ou se o controlo não recuperar dentro do intervalo especificado, verifique todos os parâmetros operacionais conforme os seus procedimentos de qualidade de

laboratório clínico. Contacte o Serviço de Assistência ao Cliente para obter mais assistência.

### **Protocolo de diluição manual**

O intervalo de medição do Ensaio de metotrexato ARK é de 0,04 – 1,20 µmol/L. As amostras e controlos que contenham metotrexato em concentrações mais elevadas (> 1,20 µmol/l) são ensaiadas por diluição da amostra e controlos até ao intervalo de medição.

Dilua manualmente a amostra ou controlo com alta concentração usando o tampão de diluição de metotrexato ARK preparando a diluição de dez vezes em série conforme apresentado a seguir.

<b>Amostra Volume</b>	<b>Tampão de diluição Volume</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

Factor 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 de µmol/ em µg/m, divida o valor obtido pelo factor de conversão de 2,2005.

## **10 Limitações do procedimento**

Este ensaio foi concebido para ser usado apenas com soro ou plasma; ver a secção Colheita da amostra e preparação para análise. Em geral é boa prática usar o mesmo método (e a mesma matriz) consistentemente para pacientes individuais devido ao potencial para variabilidade de método para método. Consulte a Secção Valores previstos mais adiante.

Como ocorre com todas as determinações de analitos, o valor de metotrexato deve ser interpretado em conjunto com as informações disponíveis da avaliação clínica e de outros procedimentos diagnósticos.

**IMPORTANTE:** As amostras de doentes que tenham recebido glucarpidase (carboxipeptidase G2) como terapêutica de resgate de uma dose alta de metotrexato **não** devem ser testadas com o Ensaio de metotrexato ARK. Estas amostras apresentam níveis séricos aumentados de ácido 4-[[2,4-diamino-6-(pteridinil)metil]-metilamino]-benzóico (DAMPA)<sup>10-12</sup> que resultam do metabolismo do metotrexato pela glucarpidase. O DAMPA faz uma reacção cruzada com o anticorpo de metotrexato usado neste ensaio e pode continuar em circulação durante pelo menos cinco a sete dias antes de se poder voltar a fazer medições exactas de metotrexato sérico.<sup>13</sup> Os oncologistas da equipa clínica devem notificar o laboratório quando for administrada glucarpidase para evitar a comunicação de concentrações falsamente elevadas de metotrexato devido à interferência de DAMPA, o que iria confundir os esforços da terapêutica com glucarpidase.<sup>13</sup> Embora a glucarpidase seja bem tolerada e reduza rapidamente o metotrexato em circulação, a eliminação renal retardada de metotrexato pode ainda assim ser um problema para os doentes adultos e idosos.<sup>14</sup>

## 11 Valores previstos

Os níveis séricos de metotrexato dependem da indicação de utilização, dosagem, modo de administração, regime de tratamento, farmacocinética individual, metabolismo e outros factores clínicos.<sup>1,3</sup> Embora o nível sérico possa normalmente atingir cerca de 10 a 100  $\mu\text{mol/l}$  no tratamento do cancro da mama (por exemplo),<sup>15</sup> as concentrações podem ultrapassar os 1000  $\mu\text{mol/l}$ <sup>16</sup> com a terapêutica em dose elevada para osteossarcoma, tendo-se atingido os 3100  $\mu\text{mol/l}$  de metotrexato após uma perfusão de 4 horas em doentes pediátricos com osteossarcoma.<sup>17</sup> Para o tratamento do osteossarcoma,<sup>16</sup> a curva de decaimento de metotrexato tem uma elevada variabilidade: 24 horas, 30 a 300  $\mu\text{mol/L}$ ; 48 horas, 3 a 30  $\mu\text{mol/L}$ ; e 72 horas, menos de 0,3  $\mu\text{mol/L}$ . Administra-se habitualmente uma dose de 10 mg de leucovorina por via intravenosa 24 horas após o início da perfusão de MTX. As doses subsequentes são ajustadas e administradas segundo os níveis de MTX obtidos às 24, 48 e 72 horas. Níveis de metotrexato acima de 50  $\mu\text{mol/L}$  às 24 horas, 10  $\mu\text{mol/L}$  às 48 horas e 0,5  $\mu\text{mol/L}$  às 72 horas indicam uma toxicidade potencial e são geralmente tratados com um aumento da dose de leucovorina de acordo com os algoritmos até que o nível de metotrexato seja < 0,1  $\mu\text{mol/L}$ . As orientações para a terapêutica de resgate de metotrexato com leucovorina geralmente recomendam a continuação de leucovorina até que o nível de metotrexato baixe para menos de 0,05  $\mu\text{mol/l}$ .<sup>1, 9</sup> Alguns centros seguem  $\leq 0,10 \mu\text{mol/l}$ .<sup>16, 18</sup> Das informações de prescrição e outras: indicadores laboratoriais de toxicidade após esquemas de tratamento de resgate com leucovorina para metotrexato em dose alta.<sup>1, 9, 19</sup>

Situação clínica	Achados laboratoriais	
	Nível de metotrexato ( $\mu\text{mol/l}$ )	Horas após a administração
Eliminação normal do metotrexato	~10	24
	~1	48
	< 0,2	72
Eliminação retardada (tardia) do metotrexato	> 0,2	72
	> 0,05	96
Eliminação retardada (precoce) do metotrexato	$\geq 50$	24
	$\geq 5$	48
e/ou	OU	
evidência de lesão renal aguda	aumento $\geq 100\%$ da creatinina sérica	24

A toxicidade renal é um risco importante e pode ser exacerbado pela co-administração de outros fármacos,<sup>14, 19</sup> como por exemplo a vancomicina.<sup>20</sup> Podem ocorrer outras formas de toxicidade, incluindo perturbações digestivas (por ex., náusea, vômitos, dor abdominal), perturbações cutâneo-mucosas (sobretudo mucosite), alterações hematológicas (por ex., neutropenia e trombocitopenia), perturbações nos testes à função renal e neurotoxicidade.<sup>21-28</sup>

Dado o perfil de aparecimento do metabolito 7-hidroximetotrexato,<sup>15, 27</sup> a respectiva proporção molar para metotrexato de até cerca de 100 vezes mais<sup>29</sup> e a insolubilidade relativa em comparação com a forma não modificada do fármaco,<sup>14, 19</sup> a possível nefrotoxicidade devido à precipitação do metabolito nos túbulos renais<sup>29</sup> pode retardar a eliminação do metotrexato em si.

A terapêutica com glucarpidase reduz o nível de metotrexato em circulação rapidamente, mas não o fármaco intracelular. Observou-se um efeito de ricochete no nível sérico de metotrexato após a terapêutica com glucarpidase.<sup>14</sup> A eliminação de DAMPA pode demorar vários dias até deixar de interferir com a monitorização de metotrexato através do imunoensaio.<sup>13</sup>

## 12 Características Específicas do Desempenho

Cada laboratório é responsável pela verificação do desempenho usando os parâmetros definidos para o seu analisador. Obtiveram-se as seguintes características de desempenho para o sistema Beckman Coulter AU680.

## Limite de Quantificação (LoQ)

Foram determinadas as seguintes características de acordo com o EP17-A2 do CLSI para o Ensaio de metotrexato ARK. O desempenho específico do analisador pode variar.

<b>Critério</b>	<b>Concentração de metotrexato (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>
Limite de branco (LoB); N = 60 $\mu\text{B} + 1,645 \text{ DP}$ , em que $\text{DP} = 0,002$	0,00
Limite de detecção (LoD); N = 60 $\text{LoB} + 1,652 \text{ DP}$ , em que $\text{DP} = 0,012$	0,02
Limite de quantificação (LoQ); N = 40 $\text{LoQ} - 2 \text{ DP} > \text{LoD}$	0,04

Cada laboratório é responsável pela determinação dos critérios de notificação das concentrações de metotrexato. A seguinte sugestão do EP17-A2 de CLSI pode ser adequada:

Resultado $\leq$ LoB	relatar "não detectado; concentração $<$ LoD"
LoB $<$ resultado $<$ LoQ	relatar "analito detectado; concentração $<$ LoQ"
Resultado $\geq$ LoQ	relatar o resultado tal como medido

## Intervalo de medição

O intervalo de medição analítica do Ensaio de metotrexato ARK é de 0,04 – 1,20  $\mu\text{mol/L}$ . As amostras que contêm metotrexato em concentrações mais elevadas são analisadas por diluição da amostra. Comunicar os valores de ensaio que excedam o LoD de acordo com as informações fornecidas para o LoQ. Multiplicar o resultado do ensaio pelo fator de diluição para amostras que contenham metotrexato acima do intervalo de medição.

## Recuperação

A exactidão (recuperação analítica) realizou-se adicionando o fármaco metotrexato concentrado a soro humano negativo para metotrexato. Adicionou-se volumetricamente um concentrado de metotrexato certificado, de pureza elevada, a soro humano negativo para metotrexato, representando as concentrações de fármaco em todo o intervalo de calibração do ensaio. Ensaíram-se seis replicados de cada amostra num analisador automatizado de química clínica. Calculou-se a média dos resultados e esta foi comparada com a

concentração pretendida, calculando-se o valor de recuperação percentual. Os resultados são apresentados na seguinte tabela.

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

Concentração teórica (µmol/l)	Concentração média recuperada (µmol/l)	Percentagem de 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

Percentagem média de recuperação: 104,2

### Linearidade

Os estudos de linearidade foram realizados como recomendado pelo EP6-A do CLSI. Foi preparada uma amostra de soro com concentração de 1,40 µmol/L e fizeram-se diluições proporcionalmente com soro humano negativo para metotrexato. O Ensaio de metotrexato ARK foi linear entre 0,03 e 1,20 µmol/L. Os resultados são apresentados na seguinte tabela.

Concentração teórica (µmol/l)	Resultados observados (µmol/l)	Resultados previstos de 1. <sup>a</sup> ordem	Resultados previstos de 2. <sup>a</sup> ordem	Diferença (µmol/L ou %)
0,00	0,01	-0,002	0,010	ND
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 que contêm metotrexato entre 2 e 1200 µmol/L foram preparadas proporcionalmente em soro humano agrupado e depois diluídas para a gama de

calibração com o tampão de diluição de metotrexato ARK. A regressão das concentrações de metotrexato ensaiadas foi linear em toda a gama.

### Comparação dos métodos

Realizaram-se estudos de correlação usando o EP9-A3 do CLSI. Os resultados do Ensaio de metotrexato ARK no analisador Beckman Coulter AU680 foram comparados com os resultados do analisador Roche/Hitachi 917.

As concentrações de metotrexato por Roche/Hitachi 917 variaram entre 0,04 e 1050  $\mu\text{mol/L}$  ( $\mu\text{M}$ ). Os valores de metotrexato ARK no Beckman Coulter AU680 variaram entre 0,04 e 1070  $\mu\text{mol/L}$ . Os resultados da análise de regressão Passing-Bablok<sup>30</sup> para o estudo são apresentados abaixo (com limites de confiança de 95%) para 112 amostras dentro do intervalo de medição, bem como para todas as 142 amostras, incluindo as que se encontram acima do intervalo de medição que requerem diluição.

Parâmetro	Intervalo de 0,04 a 1,11 $\mu\text{M}$		Intervalo de 0,04 a 1050 $\mu\text{M}$	
<b>Declive</b>	0,99	(0,96 a 1,00)	1,00	(1,00 a 1,02)
<b>Intersecção no eixo dos y</b>	0,00	(0,00 a 0,01)	0,00	(0,00 a 0,00)
<b>Coefficiente de correlação (<math>r^2</math>)</b>	0,98	(0,97 a 0,98)	1,00	(1,00 a 1,00)
<b>Número de amostras</b>	112	ND	142	ND

### Precisão

A precisão foi determinada conforme descrito no EP5-A3 do CLSI. O Controlo de metotrexato ARK de seis níveis e o soro humano agrupado contendo metotrexato foram utilizados no estudo. Cada nível foi ensaiado em quadruplicado duas vezes por dia durante 20 dias. Houve um intervalo mínimo de duas horas entre cada uma das execuções (quádruplas) do ensaio por dia. Calcularam-se os valores de DP e de percentagem de CV (%) intra-execução entre dias e total. Os resultados são apresentados na seguinte tabela. Critério de aceitação: CV total  $\leq 10\%$  para concentrações  $> 0,1 \mu\text{mol/L}$ , DP  $\leq 0,01$  para concentrações  $\leq 0,1 \mu\text{mol/L}$ .

Amostra	N	Média ( $\mu\text{mol/l}$ )	Intra- execução		Entre dias		Total	
			DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV
Controlo de metotrexato ARK								
LOW (BAIXO)	160	0,08	0,006	7,8	0,004	5,5	0,008	9,6
MID (MÉDIO)	160	0,39	0,009	2,2	0,007	1,7	0,012	3,1
HIGH (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								
LOW (BAIXO)	160	0,08	0,007	8,9	0,006	7,2	0,009	11,2
MID (MÉDIO)	160	0,41	0,011	2,6	0,008	2,1	0,015	3,7
HIGH (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

Realizaram-se estudos de interferência usando o EP7-A2 do CLSI como orientação. Avaliaram-se concentrações clinicamente altas das seguintes substâncias endógenas potencialmente interferentes em soros com níveis conhecidos de metotrexato (cerca de 0,05 e 0,50  $\mu\text{mol/l}$ ). Cada amostra foi analisada com o Ensaio de metotrexato da ARK em conjunto com um controlo de metotrexato em soro. A medição do metotrexato não foi substancialmente afetada nos níveis de substâncias endógenas testadas.

Substância interferente	Concentração do interferente	Metotrexato (~ 0,05 µmol/L)		Metotrexato (~ 0,50 µmol/L)	
		Controlo o soro	Teste	Controlo soro	Teste (% de 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)
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)
Factor reumatóide	1080 UI/ml	0,06	0,07	0,46	0,45 (96,7)
Triglicéridos	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

Testaram-se os metabolitos de metotrexato, análogos de folato e outros compostos com similaridade estrutural para determinar se estes compostos afectam a quantificação das concentrações de metotrexato utilizando o Ensaio de metotrexato ARK. Contaminou-se deliberadamente soro agrupado sem metotrexato e com 0,05 µmol/l ou 0,50 µmol/l de metotrexato. As amostras foram analisadas e as concentrações de metotrexato das amostras que continham substâncias interferentes foram comparadas com um controlo sérico.

### Reatividade cruzada com 7-hidroximetotrexato, o principal metabólito

Após a administração de metotrexato em dose alta (HDMTX), a concentração sérica/plasmática de 7-hidroximetotrexato costuma ultrapassar a do metotrexato nos pontos temporais mais tardios. Registou-se que os níveis de 7-hidroximetotrexato ultrapassam os de metotrexato até 100 vezes nas 12 a 48 horas após a administração de HDMTX.<sup>15, 27, 29, 31, 33-34</sup>

A reatividade cruzada por 7-hidroximetotrexato na medição do metotrexato foi determinada para o Ensaio de metotrexato ARK, testando amostras emparelhadas que continham (1) tanto 0,05 µmol/L de metotrexato como 5 µmol/L de 7-hidroximetotrexato e (2) tanto 0,50 µmol/L de metotrexato como 50 µmol/L de 7-hidroximetotrexato em soro humano.

O Ensaio de metotrexato ARK não produziu reação cruzada ( $\leq 0,1\%$ ) com o metabólito principal 7-hidroximetotrexato.

### Reactividade cruzada ao ácido 2,4-diamino-N<sup>10</sup>-metilpteróico (DAMPA)

Sendo um metabolito de menor importância do metotrexato, não se prevê que DAMPA circule a concentrações que interfiram na medição do metotrexato.<sup>32</sup> Contudo, após a terapêutica de resgate com glucarpidase, a concentração sérica de DAMPA pode ser substancial.<sup>13, 14</sup> O Ensaio de metotrexato ARK apresenta uma reacção cruzada substancial com o metabolito de menor importância DAMPA. Realizaram-se testes na ausência da forma não modificada do fármaco metotrexato. A reactividade cruzada com DAMPA variou entre 76,3% a 100% com base nos dados observados. O ensaio não deve ser utilizado durante a possível terapia compassiva com glucarpidase (carboxipeptidase G2) que converta rapidamente em DAMPA o metotrexato em circulação.

### Fármacos que reagem de forma cruzada

O Ensaio de metotrexato ARK tem uma reacção cruzada ligeira com triamtereno e trimetoprima; no entanto, estes fármacos podem ser contra-indicados para o tratamento do cancro com metotrexato devido a efeitos adversos adicionais se forem co-administrados. As estruturas destes compostos correspondem estreitamente à porção do anel pteridina do metotrexato. Na ausência de metotrexato, foi observada reatividade cruzada com triamtereno (1,15%) e trimetoprima (0,01%). Na presença de metotrexato, a reatividade cruzada com triamtereno ( $\leq 3,3\%$ ) e trimetoprima ( $\leq 0,5\%$ ) resultou com base nos dados observados.

### Reatividade cruzada com análogos do folato e outros compostos

O Ensaio de metotrexato ARK não apresentou reacção cruzada ( $\leq 0,01\%$ ) com análogos do folato ou outros compostos a  $\geq 1000 \mu\text{mol/L}$ , conforme testado.

<b>Composto</b>	<b>Testado (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>
Adriamicina	1000
Ciclofosfamida	1500
Citosina	1000
Ácido di-hidrofólico	1000
DL-6-metil-5,6,7,8-tetra-hidropterina	1000
Ácido fólico	1000
Ácido folínico (leucovorina)	1000
5-fluorouracilo	3000
6-mercaptopurina	1000
Ácido 5-metiltetra-hidrofólico	1000
Prednisolona	1000
Primetamina	1000
Sulfametoxazol	1600
Ácido tetra-hidrofólico	1000
Vinblastina	1000
Vincristina	1000

## Bibliografia

1. *Prescribing information* [Informações de prescrição]. 2008. Methotrexate Injection, USP. Hospira, Inc. Lake Forest, IL.
2. Jonsson, O. G. and Kamen, B. A. 1991. *Methotrexate and childhood leukemia* [Metotrexato e leucemia infantil]. *Cancer Investigation* **9**:53 – 60.
3. Bleyer, W. A. 1978. *The clinical pharmacology of methotrexate: New applications of an old drug* [A farmacologia clínica do metotrexato: Novas aplicações de um velho fármaco]. *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* [Tratamento do osteossarcoma das extremidades com o protocolo T-10, com ênfase nos efeitos da quimioterapia pré-operatória com metotrexato de dose elevada de agente único: um estudo do grupo escandinavo de sarcoma]. *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* [O metotrexato em dose elevada melhora os resultados clínicos em crianças com leucemia linfoblástica aguda]: 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* [Quimioterapia "MACHO" para linfoma de células B em estágio IV e leucemia linfoblástica aguda de células B da infância]. *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* [Cisplatina, 5-fluorouracil em infusão contínua e metotrexato em dose intermédia no tratamento do carcinoma pulmonar de células não pequenas irresssecável]. *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* [Um ensaio aleatório que compara a quimioterapia combinada com mitomicina C, mitozantrona e metotrexato (3M) com vincristina, antraciclina e ciclofosfamida (VAC) no cancro da mama avançado]. *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* [A clivagem enzimática do metotrexato constitui um método de prevenção da toxicidade do fármaco]. *Nature* **239**:395 – 397.
11. Widemann, B. C. et al. 1995. *Carboxypeptidase-G2 rescue in a patient with high dose methotrexate-induced nephrotoxicity* [Recuperação da carboxipeptidase-G2 num doente com nefrotoxicidade induzida por metotrexato em doses elevadas]. *Cancer* **76**:521 – 526.
12. Buchen, S. et al. 2005. *Carboxypeptidase G2 rescue in patients with methotrexate intoxication and renal failure* [Recuperação da carboxipeptidase G2 em doentes com intoxicação por metotrexato e insuficiência renal]. *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* [Dificuldade em medir o metotrexato num doente com nefrotoxicidade induzida por metotrexato em dose elevada]. *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* [Intervenção da glucarpidase (Carboxipeptidase G2) em doentes oncológicos adultos e idosos com disfunção renal e eliminação retardada do metotrexato após terapêutica com doses elevadas de metotrexato]. *The Oncologist* **12**:1299 – 1308.
15. Bore, P. et al. 1987. *Pharmacokinetics of Methotrexate and 7-Hydroxy-Methotrexate After Methotrexate Infusions* [Farmacocinética do metotrexato e do 7-hidroxi-metotrexato após infusões de metotrexato]. *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* [Metotrexato em dose elevada no osteossarcoma: Que as perguntas surjam - Tempo para a aceitação final]. *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* [Farmacocinética populacional do metotrexato em dose elevada após administração intravenosa em doentes pediátricos com osteossarcoma]. *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* [Avaliação do desempenho de um sistema de apoio à decisão para melhorar a farmacoterapia com metotrexato em crianças e jovens adultos com cancro]. *Ther Drug Monit* **33**:99 – 107.

19. Widemann, B. C. and Adamson, P. C. 2006. *Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity* [Compreender e gerir a nefrotoxicidade do metotrexato.] *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* [Comprometimento significativo da depuração de metotrexato em doses elevadas após a administração de vancomicina na ausência de comprometimento renal evidente]. *Annals of Oncology* **13**:327 – 330.
21. Martelli, N. et al. 2011. *Methotrexate pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prognostic value?* [Farmacocinética do metotrexato na leucemia linfoblástica aguda da infância: um valor prognóstico?] *J Clin Pharm Ther* **36**:237 – 245.
22. Mazanec, D. J. and Grisanti, J. M. 1989. *Drug-induced osteoporosis* [Osteoporose induzida por fármacos]. *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* [Neurotoxicidade na leucemia linfoblástica: Comparação entre metotrexato oral e intramuscular e duas doses de radiação]. *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* [Leucoencefalopatia após quimioterapia com metotrexato IV em dose elevada com resgate de leucovorina]. *Cancer Treat Rep* **64**:1261 – 1273.
25. Jacobs, P. et al. 1991. *Methotrexate encephalopathy* [Encefalopatia por metotrexato]. *Eur J Cancer* **27**:1061 – 1062.
26. Flombaum, C. D. and Meyers, P. A. 1999. *High-Dose Leucovorin as Sole Therapy for Methotrexate Toxicity* [Leucovorina em dose elevada como terapia única para a toxicidade do metotrexato]. *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* [Análise do metotrexato e do 7-hidroximetotrexato por cromatografia líquida de alta resolução e estudos clínicos preliminares]. *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* [Glucarpidase, leucovorina e timidina para disfunção renal induzida por metotrexato em doses elevadas: factores clínicos e farmacológicos que afectam o resultado]. *J Clin Oncol* **28**:3979 – 3986.

29. Erttmann, R. et al. 1985. *7-Hydroxy-Methotrexate and Clinical Toxicity Following High-Dose Methotrexate Therapy* [7-hidroxi-metotrexato e toxicidade clínica após terapêutica com doses elevadas de metotrexato]. *J Cancer Res Clin Oncol* **109**:86 – 88.
30. Bablok, W. et al. 1988. *A general regression procedure for method transformation* [Um procedimento geral de regressão para a transformação de métodos]. *Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry* [Aplicação de procedimentos de regressão linear para estudos de comparação de métodos em química clínica]. 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* [7-hidroximetotrexato como metabolito urinário em seres humanos e macacos rhesus que recebem doses elevadas de metotrexato]. *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* [Estudo farmacocinético do metotrexato, do ácido folínico e dos seus metabolitos séricos em crianças tratadas com doses elevadas de metotrexato e leucovorina de resgate]. *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* [Determinação por cromatografia líquida de alta eficiência do metotrexato, 7-hidroximetotrexato, ácido 5-metiltetrahidrofólico e ácido folínico no soro e no líquido cefalorraquidiano]. *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* [Farmacocinética do metotrexato e do 7-hidroxi-metotrexato após infusões de doses elevadas de metotrexato]. *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*. [Procedimentos para o manuseamento e processamento de amostras de sangue para análises laboratoriais frequentes; Orientações aprovadas — Quarta edição.] *CLSI document GP44-A4* [documento GP44-A4 CLSI]. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute* [Instituto de normas clínicas e laboratoriais]; 2010.

## 14 Marcas comerciais

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

Outros nomes de marcas ou produtos são marcas comerciais dos respectivos titulares.



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

Revisto em Junho de 2025  
1600-0213-00PT Rev 11