

**ARK™ Methotrexate Assay**

Lea atentamente la presente ficha técnica de ARK Diagnostics, antes de usar el ensayo de metrotexato de ARK. Aténgase a las instrucciones que figuran en esta ficha técnica. De lo contrario, no se garantiza la fiabilidad de los resultados del ensayo.

Notificar cualquier incidente grave que se haya producido en relación con el producto al fabricante y a la autoridad competente correspondiente, según proceda. Existe un resumen de seguridad y rendimiento disponible a través de EUDAMED (base de datos europea sobre productos sanitarios), SRN: US-MF-000023925.

**Atención al cliente**


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

**Leyenda de los símbolos empleados**

	Código del lote	 YYYY-MM-DD	Fecha de caducidad
	N° de catálogo		Fabricante
	Representante autorizado		Marca CE con el número de organismo notificado
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>		Límite de temperatura
	Consultar las instrucciones para el uso		Reactivo 1 Reactivo 2
<b>Rx Only</b>	Para uso exclusivo bajo prescripción médica		

## 1 **Nombre**

### **ARK™ Methotrexate Assay**

## 2 **Uso previsto**

El Ensayo de metotrexato de ARK es un inmunoensayo enzimático homogéneo concebido para la determinación cuantitativa del metotrexato en suero o plasma humanos en analizadores químico-clínicos automatizados. Las mediciones obtenidas se usan para la monitorización de los niveles de metotrexato con el fin de definir la terapia más apropiada.

Las muestras procedentes de pacientes que hayan sido tratados con glucarpidasa (carboxipeptidasa G2) como quimio protector y con dosis altas de metotrexato *no* deberían ser testados con el Ensayo de metotrexato ARK.

## 3 **Resumen y explicación del ensayo**

El metotrexato [ácido N-[4[[[2,4-diamino-6-pteridinil] metil] metiamino] benzoil]-L-glutámico], conocido anteriormente con el nombre de "ametofterina", es un antimetabolito empleado en el tratamiento de algunas formas de neoplasias, de la psoriasis grave y de la artritis reumatoide en adultos.<sup>1-3</sup> El metotrexato puede resultar gravemente tóxico. Por esta razón es de suma importancia monitorizar continuamente a los pacientes sometidos a terapia con metotrexato con el fin de detectar a tiempo la aparición de efectos tóxicos.

La monitorización del metotrexato se utiliza habitualmente en pacientes sometidos a un tratamiento con dosis altas de metotrexato para el cáncer; los resultados se utilizan para guiar la terapia de apoyo mientras el metotrexato es eliminado por los riñones. Consultar las directrices sobre la terapia con metotrexato asociado a leucovorina como quimio protector.<sup>1</sup> De hecho, se han aplicado dosis intermedias y altas de metotrexato (aprox. 35 mg/m<sup>2</sup> - 12 g/m<sup>2</sup>) con rescate de leucovorina (ácido folínico) obteniendo resultados alentadores en el tratamiento del sarcoma osteogénico, la leucemia, el linfoma no hodgkiniano, el cáncer de pulmón o de pecho.<sup>4-8</sup>

## 4 **Principios del procedimiento**

El Ensayo de metotrexato ARK es un inmunoensayo homogéneo basado en la competición entre el fármaco presente en la muestra y el metotrexato marcado con la enzima glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) a la hora de unirse al anticuerpo del reactivo. Cuando el metotrexato marcado se une al anticuerpo, la actividad enzimática disminuye. En presencia del fármaco de la muestra la actividad enzimática aumenta y es directamente proporcional a la concentración del fármaco. La enzima activa convierte la coenzima NAD (nicotinamida adenina

dinucleotido) en NADH cuyo nivel se mide mediante espectrofotometría al estar en relación con la diferencia de absorbancia. La G6PDH sérica endógena no interfiere en los resultados porque la coenzima NAD funciona sólo con la enzima de procedencia bacteriana usada en el ensayo.

## 5 Reactivos

Ref.	Descripción del producto	Cantidad/Volumen
5026-0001-00	<b>ARK™ Methotrexate Assay</b>	1 X 16 mL
5026-0001-02	<b>Reactivo R1 – Anticuerpo/Sustrato</b>	
5026-0001-03	anticuerpos antimetotrexato policlonales de conejo, glucosa-6-fosfato, nicotinamida adenina dinucleotido, albumina de suero bovino, conservante y estabilizantes	
	<b>Reactivo R2– Enzima</b>	1 X 8 mL
	metotrexato marcado con G6PDH bacteriano, tampón, albumina de suero bovino, conservante y estabilizantes	

REF	Descripción del producto	Cantidad/Volumen
5026-0001-01	<b>ARK™ Methotrexate Assay</b>	
	<b>Reactivo R1 – Anticuerpo/Sustrato</b>	
	anticuerpos antimetotrexato policlonales de conejo, glucosa-6-fosfato, nicotinamida adenina dinucleotide, albumina de suero bovino, conservante y estabilizantes	1 X 28 mL
	<b>Reactivo R2 – Enzima</b>	
	metotrexato marcado con G6PDH bacteriano, tampón, albumina de suero bovino, conservante y estabilizantes	1 X 14 mL

### Manipulación y almacenamiento del reactivo

Los reactivos del Ensayo de metotrexato ARK se suministran en forma líquida, listos para el uso, y pueden ser usados justo después de sacarlos del frigorífico. Cuando no se están usando, los reactivos se deben almacenar a una temperatura entre 2°C y 8°C (36-46°F) de pie y con el tapón de rosca bien cerrado. Si se han almacenado correctamente a las condiciones indicadas, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. No congelar los reactivos. Evitar la exposición prolongada a temperaturas superiores a los 32°C (90°F). **Un almacenamiento incorrecto de los reactivos puede afectar el resultado del ensayo.**

## 6 Advertencias y precauciones

- Para uso diagnóstico *in vitro*. Para uso exclusivo bajo prescripción médica.
- Los reactivos R1 y R2 se suministran asociados en un set y no se deberían intercambiar con reactivos que lleven otro número de lote.

## 7 Recogida de muestras y preparación para el análisis

- Cada laboratorio es responsable de suministrar una muestra válida para el análisis de acuerdo con sus procedimientos de calidad.
  - Se precisan muestras de suero o de plasma. Es buena práctica usar siempre la misma matriz de muestra para el mismo paciente, con el fin de obtener una mayor homogeneidad de los resultados.
  - Los intervalos de recogida de las muestras dependerán de la dosis, de la duración de la infusión y del estado clínico del paciente. Consultar los protocolos específicos del tratamiento para determinar dichos intervalos.
  - No usar sangre entera. Con este ensayo es posible emplear los siguientes anticoagulantes.
    - Heparina de sodio
    - Heparina de litio
    - EDTA potásico
  - Recoger la sangre con tubos adecuados para el uso en la monitorización farmacoterapéutica (TDM por sus siglas en inglés).
  - Siga las recomendaciones del fabricante del tubo de recogida para la recogida, el procesamiento y la centrifugación.
  - El documento GP44-A4 del CLSI describe los procedimientos para minimizar los artefactos debidos a la recogida y manipulación de muestras para pruebas de laboratorio usuales.<sup>35</sup>

Cada laboratorio debe comprobar la aceptabilidad de los tubos de gel separador, para la preparación del suero antes de ejecutar el Ensayo de metotrexato ARK.
  - No provocar la formación de espuma y evitar los congelamientos y descongelamientos reiterados con el fin de conservar la integridad de la muestra desde el momento de su recogida hasta el momento en el que se ejecuta el ensayo.
  - La presencia de fibrina, de hematíes o de otras partículas suspendidas puede alterar el resultado. La centrifugación debe ser correcta.
  - La presencia de burbujas o espuma en las muestras puede originar una entrega incompleta de la muestra o resultados erróneos.
  - Cada laboratorio debe consultar la bibliografía disponible y los datos internos relativos a la estabilidad de la muestra.
  - Las muestras clarificadas pueden ser almacenadas un máximo de dos semanas a una temperatura entre 2°C y 8°C. Si no se prevé ejecutar el ensayo dentro de estos plazos, las muestras también se pueden congelar ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ). El número de ciclos de congelación-descongelación no debe ser excesivo. Se ha comprobado que las muestras resisten tres ciclos de congelación-descongelación si se almacenan a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
  - **Manipular todas las muestras procedentes de pacientes como potencialmente infecciosas.**

## 8 Procedimiento

### Material suministrado

Ensayo de metotrexato ARK – REF 5026-0001-00, 5026-0001-01

Ensayo de metotrexato ARK, Roche® c pack – REF 5026-0001-02

Ensayo de metotrexato ARK, Roche® c pack verde – REF 5026-0001-03

### Material requerido (se suministra por separado)

Calibrador de metotrexato ARK – REF 5026-0002-00

Controles de calidad – Control de metotrexato ARK – REF 5026-0003-00

Tampón de dilución de metotrexato ARK – REF 5026-0004-00

### Instrumentación

Antes del uso puede ser necesario transferir los reactivos R1 y R2 a recipientes específicos para el instrumento de análisis. Evitar la contaminación cruzada entre R1 y R2.

Existen numerosos analizadores químico-clínicos automatizados con determinación fotométrica de la tasa a 340 nm que son adecuados. Consultar la hoja de aplicación específica del analizador para programar el Ensayo de metotrexato de ARK disponible en su distribuidor o en el servicio de atención al cliente de ARK. Las Hojas de Protocolo de Aplicación que han sido categorizadas CLIA o llevan el distintivo CE han sido verificadas por el fabricante. Es responsabilidad del laboratorio realizar toda la validación apropiada para el uso del ensayo con otros ajustes o analizadores.

Consultar el manual de instrucciones específico del instrumento para el mantenimiento diario.

### Secuencia del ensayo

Para ejecutar correctamente el ensayo o la calibración, véase el manual del instrumento.

### Calibración

Ejecutar una calibración completa (de 6 puntos) usando los Calibradores de metotrexato de ARK A, B, C, D, E, y F, realizar doble ejecución para cada calibrador. Con cada nuevo número de lote del kit de reactivos es preciso ejecutar una nueva calibración. Verificar la curva de calibración con controles de calidad de al menos dos niveles en conformidad con el plan de aseguramiento de calidad fijado en el laboratorio.

## Cuándo repetir la calibración

- Siempre que se vayan a utilizar reactivos de un nuevo lote
- Siempre que resulte necesario en base a los resultados del control de calidad
- Siempre que lo prevean los protocolos estándar del laboratorio

## Control de calidad (QC)

Los laboratorios deben establecer procedimientos de QC para el Ensayo de metotrexato ARK. Todos los controles de calidad y las pruebas se deben ejecutar en cumplimiento de las normas locales, regionales o nacionales y de los requisitos de acreditación.

La buena práctica de laboratorio sugiere que sean testados al menos dos niveles (puntos de decisión médica alto y bajo) del control de calidad todos los días, que se realice el ensayo de las muestras del paciente y que se efectúe una calibración cada vez. Monitorizar constantemente que los valores de control no presenten ninguna tendencia ni desviación. Si se detecta alguna tendencia o desviación o si el control no cae dentro del margen especificado, comprobar todos los parámetros operativos siguiendo los procedimientos de calidad clínicos y del laboratorio. Para más información, contactar con nuestro servicio de atención al cliente.

## Protocolo de dilución manual

Los márgenes de medición del Ensayo de metotrexato ARK son 0,04 - 1,20 µmol/L. Las muestras y los controles que contengan metotrexato en mayores concentraciones (>1,20 µmol/L) se ensayan diluyendo la muestra y los controles para que entren dentro de los márgenes de medición.

Diluir manualmente la muestra de alta concentración o el control con el tampón de dilución de metotrexato ARK, preparando la correspondiente serie de diluciones en progresión decimal como se muestra aquí abajo.

	<b>Volumen de muestra</b>	<b>Volumen muestra</b>	<b>Dilución</b>	<b>Factor de dilución</b>
50 µL	Muestra sin diluir	450 µL	1:10	10
50 µL	Muestra 1:10	450 µL	1 (100)	100
50 µL	Muestra 1:100	450 µL	1:1000	1000
50 µL	Muestra 1:1000	450 µL	1:10000	10000

$$\text{Factor de dilución manual} = \frac{(\text{Volumen de la muestra} + \text{Volumen del tampón de dilución})}{\text{Volumen de la muestra}}$$

Multiplicar el resultado del ensayo por el factor de dilución.

## 9 Resultados

Para convertir  $\mu\text{mol/L}$  en  $\mu\text{g/mL}$ , dividir el valor obtenido por el factor de conversión de 2,2005.

## 10 Limitaciones del procedimiento

Este ensayo está concebido exclusivamente para su uso con suero o plasma; atenerse al apartado "Recogida de muestras y preparación para el análisis". Generalmente es buena práctica seguir el mismo método (y la misma matriz) en el tratamiento de cada paciente debido al potencial de variabilidad de un método a otro. Véase el apartado "Valores previstos".

Como ocurre normalmente, el valor de metotrexato debería ser usado siempre en relación con la información disponible de la evaluación clínica y de otros procedimientos diagnósticos.

**IMPORTANTE:** Las muestras procedentes de pacientes que hayan sido tratados con glucarpidasa (carboxipeptidasa G2) como quimio protector y con dosis altas de metotrexato **no** deberían ser testados con el Ensayo de metotrexato ARK. Estas muestras presentan niveles séricos altos de ácido 4-[[2,4-diamino-6-(pteridinil)metil]-metilamino]-benzoico (DAMPA)<sup>10-12</sup>, un compuesto que resulta del metabolismo del metotrexato por acción de la glucarpidasa. El DAMPA presenta reacción cruzada con el anticuerpo antimetotrexato usado en este ensayo y puede seguir circulando durante al menos cinco o siete días antes de poder realizar mediciones exactas del metotrexato sérico.<sup>13</sup> Los oncólogos del equipo médico deben avisar al laboratorio cuando se haya administrado glucarpidasa con el fin de evitar resultados que, debido a la interferencia del DAMPA, aparezcan concentraciones erróneamente elevadas de metotrexato; estos resultados mermarían las evaluaciones de la terapia con glucarpidasa.<sup>13</sup> La glucarpidasa es bien tolerada y reduce rápidamente el MTX circulante, pero la eliminación renal lenta del metotrexato puede seguir siendo un problema para pacientes adultos o mayores <sup>14</sup>

## 11 Valores previstos

Los niveles séricos de metotrexato dependen de la indicación de uso, de la dosificación, de la modalidad de administración, del tratamiento, de la farmacocinética individual, del metabolismo y de otros factores clínicos.<sup>1,3</sup> Mientras el nivel sérico alcanza normalmente concentraciones de metotrexato entre 10 y 100  $\mu\text{mol/L}$  en el tratamiento del cáncer de pecho (por ejemplo),<sup>15</sup> las concentraciones pueden llegar a sobrepasar las 1000  $\mu\text{mol/L}$ <sup>16</sup> en la terapia de alta dosis para el osteosarcoma. Se han alcanzado incluso concentraciones de 3100  $\mu\text{mol/L}$  en pacientes pediátricos afectados por osteosarcoma después de una infusión de 4 horas.<sup>17</sup> La curva de descomposición del metotrexato es muy

variable en el tratamiento del osteosarcoma<sup>16</sup>: 24 horas, 30 a 300  $\mu\text{mol/L}$ ; 48 horas, 3 a 30  $\mu\text{mol/L}$ ; y 72 horas, menos de 0,3  $\mu\text{mol/L}$ . Se suele administrar una dosis intravenosa de 10 mg de leucovorina 24 horas después de inyectar la infusión de MTX. En base a los niveles de MTX obtenidos a las 24, 48 y 72 horas se ajustarán las dosis siguientes. Los niveles de metotrexato que sobrepasen las 50  $\mu\text{mol/L}$  a las 24 horas, las 10  $\mu\text{mol/L}$  a las 48 horas y las 0,5  $\mu\text{mol/L}$  a las 72 horas anuncian toxicidad potencial y suelen ser tratadas aumentando la dosis de leucovorina en conformidad con los algoritmos hasta que el nivel de MTX sea  $<0,1 \mu\text{mol/L}$ . Los protocolos terapéuticos que prevén metotrexato con rescate de leucovorina suelen recomendar el mantenimiento de la leucovorina hasta que el nivel de metotrexato caiga por debajo de 0,05  $\mu\text{mol/L}$ .<sup>1, 9</sup> Algunos centros se atienen a  $\leq 0,10 \mu\text{mol/L}$ .<sup>16, 18</sup>

Sobre la prescripción médica y otras informaciones: Indicadores de toxicidad en laboratorio siguiendo programas de rescate de leucovorina con altas dosis de metotrexato.<sup>1, 9, 19</sup>

Situación clínica	Resultados de laboratorio	
	Nivel de metotrexato ( $\mu\text{mol/L}$ )	Horas después de la administración
Eliminación normal del metotrexato	~10	24
	~1	48
	<0,2	72
Retraso tardío en la eliminación de metotrexato	>0,2	72
	>0,05	96
Retraso precoz en la eliminación de metotrexato	$\geq 50$	24
	$\geq 5$	48
y/o Evidencia de lesión renal aguda	0 $\geq 100\%$ aumento de la creatinina sérica	24

La toxicidad renal es un riesgo significativo y puede aumentar si el paciente asume también otros fármacos,<sup>14, 19</sup> por ejemplo, la vancomicina.<sup>20</sup> Pueden aparecer otras formas de toxicidad, como trastornos digestivos (p. ej., náuseas, vómito, dolor abdominal), trastornos cutáneos o de las mucosas (especialmente mucositis), anomalías hematológicas (p. ej., neutropenia y trombocitopenia), anomalías en pruebas de funcionalidad hepática, y neurotoxicidad.<sup>21-28</sup>

Dado el perfil de aparición del metabolito 7-hidrometotrexato,<sup>15, 27</sup> su relación molar respecto al metotrexato, que puede llegar a ser aproximadamente 100 veces superior,<sup>29</sup> y la mayor insolubilidad respecto al fármaco original,<sup>14, 19</sup> una

eventual nefrotoxicidad debida a la precipitación del metabolito en los túbulo renales <sup>29</sup> puede retrasar la eliminación del metotrexato mismo.

El tratamiento con glucarpidasa reduce rápidamente el nivel circulante de metotrexato, pero no el fármaco intracelular. Se ha observado un efecto rebote en el nivel sérico de metotrexato tras el tratamiento con glucarpidasa.<sup>14</sup> La eliminación del DAMPA puede tomar varios días antes de que deje de interferir en la monitorización del metotrexato mediante inmunoensayo.<sup>13</sup>

## 12 Características de rendimiento específicas

Cada laboratorio es responsable de verificar el rendimiento usando los parámetros establecidos para sus analizadores. Las características de rendimiento que se indican a continuación fueron obtenidas con un analizador Beckman Coulter AU680.

### Límite de cuantificación (LoQ)

Los datos técnicos siguientes fueron determinados en conformidad con los protocolos EP17-A2 del CLSI para el Ensayo de metotrexato ARK. El rendimiento específico de cada analizador puede variar.

Criterio	Concentración de MTX (µmol/L)
Límite de blanco (LoB); N = 60 µB + 1,645 DE, donde DE = 0,002	0,00
Límite de detección (LoD); N = 60 LoB + 1,652 DE, donde DE = 0,012	0,02
Límite de cuantificación (LoQ); N = 40 LoQ – 2 DE > LoD	0,04

Cada laboratorio deberá determinar los criterios para la realización del informe sobre las concentraciones de metotrexato. Las siguientes propuestas procedentes de los protocolos EP17-A2 del CLSI pueden resultar útiles:

Resultado ≤ LoB	indicar en el informe “no detectado; concentración < LoD”
LoB < resultado < LoQ	indicar en el informe “analito detectado; concentración < LoQ”
Resultado ≥ LoQ	indicar en el informe el resultado medido

### Margen de medición

El rango de medición analítica del Ensayo de metotrexato de ARK es de 0,04 - 1,20  $\mu\text{mol} / \text{l}$ . Las muestras que contienen metotrexato en concentraciones más elevadas se ensayan por dilución de la muestra. Notificar los valores ensayados que excedan la LoD de acuerdo con la información facilitada para LoQ. Multiplicar el resultado ensayado por el factor de dilución para muestras que contengan metotrexato por encima del rango de medición.

### Recuperación

La recuperación analítica se calculó añadiendo metotrexato concentrado a suero humano negativo al metotrexato. Fue añadido un volumen determinado de un concentrado procedente de un lote certificado de metotrexato altamente puro al suero humano negativo al metotrexato, representándose así las concentraciones del fármaco a través del margen de calibración del ensayo. Fueron ensayadas seis réplicas de cada muestra en un analizador químico-clínico automatizado. Fue calculado el promedio de los resultados y comparado con la concentración teórica para calcular el valor porcentaje de la recuperación. Los resultados se muestran abajo.

$$\% \text{ Recuperación} = 100 \times \frac{\text{Concentración media recuperada}}{\text{Concentración teórica}}$$

Concentración teórica ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentración recuperada teórica ( $\mu\text{mol/L}$ )	Porcentaje de Recuperación (%)
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

Promedio de recuperación en %: 104,2

## Linealidad

Se realizaron estudios de linealidad con el procedimiento propuesto en el protocolo E6-A del CLSI. Se preparó una muestra de suero de 1,40  $\mu\text{mol/L}$  y se usó para hacer diluciones proporcionales con suero humano negativo al metotrexato. El ensayo de metotrexato ARK ha resultado lineal entre 0,03 y 1,20  $\mu\text{mol/l}$ . Los resultados se muestran abajo.

Teórico ( $\mu\text{mol/L}$ )	Resultados observados ( $\mu\text{mol/L}$ )	Resultados (predicción de primer orden)	Resultados (predicción de segundo orden)	Diferencia ( $\mu\text{mol/L}$ o %)
0,00	0,01	-0,002	0,010	no disponible
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 %

Las muestras que contienen metotrexato en una concentración entre 2 y 1200  $\mu\text{mol/L}$  se diluyeron en primer lugar, proporcionalmente con una mezcla de los sueros de un grupo de personas y, en segundo lugar, se alargaron hasta entrar en el margen de calibración con el tampón de dilución de metotrexato ARK. La regresión de las concentraciones de metotrexato ensayadas era lineal a lo largo de todo el margen.

## Comparación de métodos

Fueron investigadas las correlaciones ateniéndose al protocolo EP9-A3 del CLSI. Fueron comparados los resultados del Ensayo de metotrexato de ARK obtenidos en el analizador modelo Beckman Coulter AU680 con los resultados suministrado por el analizador modelo Roche/Hitachi 917.

Las concentraciones de metotrexato obtenidas con Roche/Hitachi 917 oscilaban entre 0,04 y 1050  $\mu\text{mol/l}$  ( $\mu\text{M}$ ). Por otro lado, los valores de metotrexato de ARK obtenidos con el Beckman Coulter AU680 se encontraban entre 0,04 y 1070  $\mu\text{mol/l}$ . Abajo aparecen los resultados del análisis de la regresión de Passing-Bablok<sup>30</sup> de este estudio (con límites de confianza del 95%) para 112 muestras dentro del margen de medición y para 142 muestras incluyendo las que estaban por encima del margen de medición requiriendo dilución.

Parámetros	Margen de 0,04 a 1,11 µM		Margen de 0,04 a 1050 µM	
	Pendiente	0,99	(0,96 a 1,00)	1,00
Intersección con y	0,00	(0,00 a 0,01)	0,00	(0,00 a 0,00)
Coefficiente de correlación (r <sup>2</sup> )	0,98	(0,97 a 0,98)	1,00	(1,00 a 1,00)
Número de muestras	112	no disponible	142	no disponible

### Precisión

La precisión fue determinada con el procedimiento descrito en el protocolo EP5-A3 del CLSI. En este estudio fue empleado el Control de metotrexato ARK de seis niveles y muestras de procedencia humana mezcladas que contenían metotrexato. Cada nivel fue ensayado por cuadruplicado dos veces al día durante 20 días. Cada una de las series diarias estaba separada por al menos dos horas. Fue calculada la precisión intraserial y la interdiaria, la DE total y los CVs porcentuales. Los resultados se muestran abajo. Criterios de aceptación: ≤10% total CV a >0,1 µmol/L, DE≤0,01 a ≤0,1 µmol/L.

Muestra	No.	Promedio (µmol/L)	Intraserial		Interdiaria		Total	
			DE	%CV	DE	%CV	DE	%CV
Control de metotrexato ARK								
LOW	160	0,08	0,006	7,8	0,004	5,5	0,008	9,6
MID	160	0,39	0,009	2,2	0,007	1,7	0,012	3,1
HIGH	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
Suero humano								
LOW	160	0,08	0,007	8,9	0,006	7,2	0,009	11,2
MID	160	0,41	0,011	2,6	0,008	2,1	0,015	3,7
HIGH	160	0,82	0,038	4,6	0,031	3,8	0,050	6,1
5	160	5,2	0,278	5,3	0,381	7,3	0,464	8,9
50	160	53,0	1,624	3,1	3,319	6,3	3,705	7,0
500	160	507,9	12,222	2,4	22,957	4,5	26,177	5,2

## Sustancias interferentes

Fueron realizados estudios de interferencias en conformidad con las indicaciones de la guía EP7-A2 del CLSI. Fueron evaluadas concentraciones clínicamente altas de las siguientes sustancias endógenas, potencialmente interferentes en suero con niveles conocidos de metotrexato (aprox. 0,05 y 0,50  $\mu\text{mol/L}$ ). Fue ensayada cada muestra usando el Ensayo de metotrexato ARK, junto con un control sérico de metotrexato. La medición del metotrexato no se vio sustancialmente afectada a los niveles de sustancias endógenas testadas.

Sustancia interferente	Concentración interferente	Metotrexato (~ 0,05 $\mu\text{mol/L}$ )		Metotrexato (~ 0,50 $\mu\text{mol/L}$ )	
		Control sérico	Prueba	Control sérico	Prueba (% Control)
Albúmina	12 g/dL	0,05	0,05	0,48	0,50 (103,5)
Bilirubina (conjugada)	70 mg/dL	0,05	0,06	0,48	0,49 (101,4)
Bilirubina (no 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)
Gamma 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)
Factor reumatoide	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)

## Especificidad

Los metabolitos de metotrexato, los análogos del ácido fólico y otros compuestos de estructura similar, fueron testados para determinar si dichos compuestos influyen sobre la cuantificación de la concentración de metotrexato, usando el Ensayo de metotrexato ARK. Se añadieron altos niveles de estas sustancias en las muestras de suero mezclado, sin metotrexato, con 0,05  $\mu\text{mol/L}$  o con 0,50  $\mu\text{mol/L}$  de metotrexato. Las muestras fueron analizadas y las concentraciones de metotrexato de las muestras que contenían los interferentes se compararon con un control sérico.

### Reactividad cruzada con 7-hidroximetotrexato, el metabolito principal

Después de administrar metotrexato de alta dosis (HDMTX), la concentración sérica/plasmática de 7 hidroximetotrexato supera típicamente la del metotrexato en los ensayos más tardíos. Hay evidencias de que los niveles de 7-hidroximetotrexato superan los de metotrexato, siendo hasta 100 veces

superiores entre las 12 y las 48 horas después de la administración de HDMTX.<sup>15, 27, 29, 31, 33-34</sup>

La reactividad cruzada con 7-hidroximetotrexato en la medición de metotrexato fue determinada para el Ensayo de metotrexato ARK probando muestras de dos en dos que contenían (1) ambas 0,05  $\mu\text{mol/L}$  de metotrexato y 5  $\mu\text{mol/L}$  de 7-metotrexato y (2) ambas 0,50  $\mu\text{mol/L}$  de metotrexato y 50  $\mu\text{mol/L}$  de 7-hidroximetotrexato en suero humano.

El Ensayo de metotrexato ARK no presenta reactividad cruzada ( $\leq 0,1\%$ ) con el metabolito principal, es decir, con el 7-hidroximetotrexato.

#### Reactividad cruzada con ácido 2,4-Diamino- $N^{10}$ -metilpteroico (DAMPA)

El DAMPA es un metabolito de menor importancia que el metotrexato, por lo que no está previsto que circule a concentraciones que puedan interferir en la medición del metotrexato.<sup>32</sup> Sin embargo, la terapia de rescate con glucarpidasa puede hacer aumentar sustancialmente la concentración sérica del DAMPA.<sup>13, 14</sup> El ensayo de metotrexato RK presenta una reacción cruzada considerable con el metabolito menor DAMPA. Se realizaron pruebas en ausencia de metotrexato. El margen de reactividad cruzada con DAMPA iba del 76,3% al 100% en base a los datos observados. No debería ser usado este ensayo en terapia de uso compasivo con glucarpidasa (carboxipeptidasa G2) que convierte rápidamente el metotrexato circulante en DAMPA.

#### Fármacos que provocan reacción cruzada

El Ensayo de metotrexato ARK presenta una ligera reactividad cruzada con triamtereno y trimetoprima. Sin embargo, estos fármacos suelen estar contraindicados en los casos de tratamiento de cáncer con MTX debido a los efectos adversos de la administración conjunta. Las estructuras de estos compuestos son muy parecidas a la porción anular pteridínica de la molécula de metotrexato. En ausencia de metotrexato se observó reactividad cruzada con triamterene (1,15%) y trimetoprim (0,01%). En presencia de metotrexato, la reactividad cruzada con triamterene resultó  $\leq 3,3\%$  y con trimetoprim  $\leq 0,5\%$  en base a los datos observados.

Reactividad cruzada con análogos del ácido fólico y otros compuestos

El Ensayo de metotrexato ARK no presenta reacción cruzada ( $\leq 0,01\%$ ) con análogos del ácido fólico ni otros compuestos a  $\geq 1000 \mu\text{mol/L}$  como resulta de las pruebas.

<b>Compuesto</b>	<b>Probado (<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-fluorouracilo	3000
6-mercaptopurina	1000
Ácido 5-metiltetrahidrofólico	1000
Prednisolona	1000
Pirimetamina	1000
Sulfametoxazol	1600
Ácido tetrahidrofólico	1000
Vinblastina	1000
Vincristina	1000

## 13 Bibliografía

1. Prescribing information. 2008. Methotrexate Injection, USP. Hospira, Inc. Lake Forest, IL.
2. Jonsson, O. G. and Kamen, B. A. 1991. Methotrexate and childhood leukemia. *Cancer Investigation* **9**:53 – 60.
3. Bleyer, W. A. 1978. The clinical pharmacology of methotrexate: New applications of an old drug. *Cancer* **41**:36 – 51.
4. Saeter, G. et al. 1991. Treatment of osteosarcoma of the extremities with the T-10 protocol, with emphasis on the effects of preoperative chemotherapy with single-agent high-dose methotrexate: A scandinavian sarcoma group study. *Journal of Clinical Oncology* **9**:1766 – 1775.
5. Abromowitch, M. et al. 1988. High-dose methotrexate improves clinical outcome in children with acute lymphoblastic leukemia: St. Jude total therapy study X. *Medical and Pediatric Oncology* **16**:297 – 303.
6. Hann, I. M. et al. 1990. 'MACHO' chemotherapy for stage IV B cell lymphoma and B cell acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *British Journal of Haematology* **76**:359 – 364.
7. Wheeler, C. A. et al. 1991. Cisplatin, continuous infusion 5-fluorouracil, and intermediate dose methotrexate in the treatment of unresectable non-small cell carcinoma of the lung. *Cancer* **67**:892 – 895.
8. Powles, T. J. et al. 1991. A randomized trial comparing combination chemotherapy using mitomycin C, mitozantrone and methotrexate (3M) with vincristine, anthracycline and cyclophosphamide (VAC) in advanced breast cancer. *Br J Cancer* **64**:406 – 410.
9. Leucovorin (Fusilev) Prescribing Information. 2008. Spectrum Pharmaceuticals, Inc. Irvine, CA.
10. Chabner, B. A. et al. 1972. Enzymatic cleavage of methotrexate provides a method for prevention of drug toxicity. *Nature* **239**:395 – 397.
11. Widemann, B. C. et al. 1995. Carboxypeptidase-G2 rescue in a patient with high dose methotrexate-induced nephrotoxicity. *Cancer* **76**:521 – 526.
12. Buchen, S. et al. 2005. Carboxypeptidase G2 rescue in patients with methotrexate intoxication and renal failure. *British Journal of Cancer* **92**:480 – 487.

13. Al-Turkmani, M. R. et al., 2010. Difficulty Measuring Methotrexate in a Patient with High-Dose Methotrexate–Induced Nephrotoxicity. *Clin Chem* **56**:1792 – 1796.
14. Schwarz, S. et al. 2007. Glucarpidase (Carboxypeptidase G2) intervention in adult and elderly cancer patients with renal dysfunction and delayed methotrexate elimination after high-dose methotrexate therapy. *The Oncologist* **12**:1299 – 1308.
15. Bore, P. et al. 1987. Pharmacokinetics of Methotrexate and 7-Hydroxy-Methotrexate After Methotrexate Infusions. *Cancer Drug Delivery* **4**:177 – 183.
16. Jaffe, N. and Gorlick, R. 2008. High-Dose Methotrexate in Osteosarcoma: Let the Questions Surcease—Time for Final Acceptance. *J Clin Oncol* **26**:4365 – 4366.
17. Colom, H. et al. 2009. Population Pharmacokinetics of High-Dose Methotrexate After Intravenous Administration in Pediatric Patients With Osteosarcoma. *Ther Drug Monit* **31**:76 – 85.
18. Dombrowsky, E. et al. 2011. Evaluating performance of a decision support system to improve methotrexate pharmacotherapy in children and young adults with cancer. *Ther Drug Monit* **33**:99 – 107.
19. Widemann, B. C. and Adamson, P. C. 2006. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* **11**:694 – 703.
20. Blum, R. et al. 2002. Significant impairment of high-dose methotrexate clearance following vancomycin administration in the absence of overt renal impairment. *Annals of Oncology* **13**:327 – 330.
21. Martelli, N. et al. 2011. Methotrexate pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prognostic value? *J Clin Pharm Ther* **36**:237 – 245.
22. Mazanec, D. J. and Grisanti, J. M. 1989. Drug-induced osteoporosis. *Cleve Clin J of Med* **56**:297 – 303.
23. Chessells, J. M. et al. 1990. Neurotoxicity in lymphoblastic leukaemia: Comparison of oral and intramuscular methotrexate and two doses of radiation. *Archives of Disease in Childhood* **65**:416 – 422.
24. Allen, J. C. et al. 1980. Leukoencephalopathy following high-dose IV methotrexate chemotherapy with leucovorin rescue. *Cancer Treat Rep* **64**:1261 – 1273.
25. Jacobs, P. et al. 1991. Methotrexate encephalopathy. *Eur J Cancer* **27**:1061 – 1062.

26. Flombaum, C. D. and Meyers, P. A. 1999. High-Dose Leucovorin as Sole Therapy for Methotrexate Toxicity. *J Clin Oncol* **17**:1589 – 1594.
27. Collier, C. P. et al. 1982. Analysis of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate by high-performance liquid chromatography and preliminary clinical studies. *Ther Drug Monit* **4**:371 – 380.
28. Widemann, B. C. et al. 2010. Glucarpidase, leucovorin, and thymidine for high-dose methotrexate-induced renal dysfunction: clinical and pharmacologic factors affecting outcome. *J Clin Oncol* **28**:3979 – 3986.
29. Erttmann, R. et al. 1985. 7-Hydroxy-Methotrexate and Clinical Toxicity Following High-Dose Methotrexate Therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* **109**:86 – 88.
30. Bablok, W. et al. 1988. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part III. *J. Clin Chem Clin Biochem* **26**:783 – 790.
31. Jacobs, S. A. et al. 1976. 7-Hydroxymethotrexate as a urinary metabolite in human subjects and rhesus monkeys receiving high dose methotrexate. *J Clin Invest* **57**:534 – 538.
32. Wolfrom, C. et al. 1990. Pharmacokinetic study of methotrexate, folinic acid and their serum metabolites in children treated with high-dose methotrexate and leucovorin rescue. *Eur J Clin Pharmacol* **39**:377 – 383.
33. Belz, S. et al. 1994. High-performance liquid chromatographic determination of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, 5-methyltetrahydrofolic acid and folinic acid in serum and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B Biomed Appl* **661**:109 – 118.
34. Breithaupt, H. and Kuenzlen, E. 1982. Pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate following infusions of high dose methotrexate. *Cancer Treat Rep* **66**:1733 – 1741.
35. CLSI. *Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline—Fourth Edition* [Procedimientos para la manipulación y el procesamiento de muestras de sangre para pruebas de laboratorio comunes; Directriz aprobada — Cuarta edición]. *CLSI document GP44-A4* [Documento GP44-A4 del CLSI]. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute* [Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio]; 2010.

## 14 Marcas registradas

**ARK**<sup>™</sup> es una marca registrada de **ARK** Diagnostics, Inc.

Donde aparezcan otros nombres de producto, estos también podrían ser marcas registradas



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

Revisado en junio del 2025  
1600-0213-00ES Rev 11