

## Ensaio de metotrexato II ARK

Leia atentamente este folheto informativo da ARK Diagnostics, Inc. antes de utilizar o ensaio de metotrexato II 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

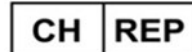


48089 Fremont Blvd  
 Fremont, CA 94538 EUA  
 Tel: 1-877-869-2320  
 Fax: 1-510-270-6298  
 customersupport@ark-tdm.com  
 www.ark-tdm.com







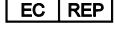





EC REP

Emergo Europe  
 Westervoortsedijk 60  
 6827 AT Arnhem  
 Países Baixos



MedEnvoy Switzerland  
 Gotthardstrasse 28  
 6302 Zug  
 Switzerland

### Símbolos utilizados

	Código do lote	 DD.MM. AAAA	Data de validade
	Número de Catálogo		Fabricante
	Representante Autorizado		Marca 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

*Ensaio de metotrexato II* **ARK**

## 2 Utilização prevista

O ensaio de metotrexato II ARK é um imunoensaio enzimático homogéneo concebido para a determinação quantitativa de metotrexato no soro ou plasma humanos utilizando analisadores químico-clínicos automatizados. Os resultados são utilizados na monitorização dos níveis de metotrexato a fim de assegurar uma terapêutica adequada.

As amostras obtidas 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 II 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>1,4</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>5-9</sup>

## 4 Princípios do Procedimento

O ensaio de metotrexato é um imunoensaio enzimático homogéneo. O ensaio utiliza anticorpos específicos que conseguem ligar-se ao metotrexato. O ensaio baseia-se na competição entre um fármaco marcado com glicose-6-fosfato-desidrogenase (rG6PDH) recombinante e o fármaco livre da amostra, para uma quantidade fixa de locais específicos de ligação ao anticorpo. Na ausência de fármaco livre na amostra, o anticorpo anti-metotrexato monoclonal de coelho liga-se ao fármaco marcado com rG6PDH e causa uma diminuição na actividade enzimática. 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
5071-0001-00	<b>Ensaio de metotrexato II ARK</b> <b>Reagente R1 – Anticorpo/Substrato</b> Anticorpo monoclonal de coelho para metotrexato, glicose-6-fosfato, nicotinamida adenina dinucleótido, seralbumina bovina, azida sódica e estabilizadores	1 x 16 ml
	<b>Reagente R2 – Enzima</b> Metotrexato marcado com rG6PDH bacteriano, tampão, seralbumina bovina, azida sódica e estabilizadores	1 x 8 mL
5071-0001-01	<b>Ensaio de metotrexato II ARK</b> <b>Reagente R1 – Anticorpo/Substrato</b> Anticorpo monoclonal de coelho para metotrexato, glicose-6-fosfato, nicotinamida adenina dinucleótido, seralbumina bovina, azida sódica e estabilizadores	1 X 28 ml
	<b>Reagente R2 – Enzima</b> Metotrexato marcado com rG6PDH bacteriano, tampão, seralbumina bovina, azida sódica e estabilizadores	1 X 14 ml

### Manuseamento e armazenamento do reagente

Os reagentes para o ensaio de metotrexato II 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.**

Os produtos de metotrexato II ARK contêm ≤ 0,09% de azida sódica. Como medida de precaução, a canalização afectada e a instrumentação devem ser devidamente enxaguadas com água para mitigar a possível acumulação de azidas metálicas explosivas. Não são necessárias precauções especiais para o manuseamento dos outros componentes do ensaio.

## 6 Advertências e precauções

- Para **diagnóstico *in vitro***, utilização laboratorial profissional.
- Requer prescrição médica. *Atenção: A lei federal dos EUA restringe a venda deste dispositivo por um médico ou profissional devidamente autorizado.*

- Os reagentes **R1** e **R2** são fornecidos como conjunto, e não devem ser trocados com reagentes com números de lote diferentes.
- Os reagentes contêm  $\leq 0,09\%$  de azida sódica.
- O ensaio deve ser utilizado exclusivamente em conjunto com informação fornecida por avaliações clínicas e outros procedimentos de diagnóstico.

## 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>10</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, células sanguíneas vermelhas 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.
- Com base em estudos realizados pela ARK Diagnostics, as amostras clarificadas podem ser armazenadas por até uma semana entre 2 a 8 °C com base nos dados de suporte. Se o teste for adiado mais de uma semana, as amostras devem ser conservadas congeladas ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ) até quatro semanas antes da análise. Recomenda-se a limitação do número de ciclos de congelamento e descongelamento; os dados de suporte não mostram nenhum impacto adverso com três ciclos de congelamento e descongelamento.
- **Manuseie todas as amostras de pacientes como se fossem potencialmente infecciosas.**

## 8 Procedimento

### Materiais fornecidos

Ensaio de metotrexato II ARK – **REF** 5071-0001-00, 5071-0001-01

### Materiais necessários – Fornecidos separadamente

Calibrador de metotrexato II ARK – **REF** 5071-0002-00

Controlos de qualidade – Controlo de metotrexato II ARK – **REF** 5071-0003-00

Controlos de qualidade – Controlo de metotrexato II ARK – **REF** 5071-0003-01

Controlos de qualidade – Controlo de metotrexato II ARK – **REF** 5071-0003-02

Tampão de diluição de metotrexato II ARK – **REF** 5071-0004-00

### 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 II 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 marca CE foram verificadas pelo fabricante. É da responsabilidade do laboratório efetuar toda a validação adequada para a utilização do ensaio com outras configurações ou 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 II A, B, C, D, E e F da ARK; execute os calibradores em duplicado. É necessária a calibração com cada novo lote de número 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 II 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**

Para estimar os níveis de fármaco nas amostras que ultrapassam o limite superior de quantificação, dilua manualmente a amostra com o tampão de diluição de metotrexato II ARK. Multiplique o resultado ensaiado pelo factor de diluição.

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

Foi validado um intervalo alargado do ensaio até aos 1200 µmol/L através de diluições 1:10 em série da amostra, de 1:10, 1:100 ou 1:1000 conforme o necessário.

## **9 Resultados**

Registe as unidades dos resultados em µmol/l ou µg/ml. Para converter de µmol/l em µg/ml, divida o valor obtido pelo factor de conversão de 2,2005. O valor de metotrexato deste ensaio deve ser usado em conjunto com outras informações clínicas. Ver o manual do operador específico do instrumento para quaisquer códigos de resultados erróneos.

## **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.

**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 II ARK. Estas amostras apresentam níveis séricos aumentados de ácido 4-[[2,4-diamino-6-(pteridinil)metil]-metilamino]-benzóico (DAMPA)<sup>11-13</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>14</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>14</sup> Embora a glucarpidase seja bem tolerada e reduza rapidamente o MTX em circulação, a eliminação renal retardada de MTX pode ainda assim ser um problema para os doentes adultos e idosos.<sup>15</sup>

## 11 Valores previstos

Os níveis séricos de metotrexato dependem da indicação de utilização, dosagem, modo de administração, regime de tratamento, farmacocinética individual 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>16</sup> as concentrações podem ultrapassar os 1000  $\mu\text{mol/l}$ <sup>17</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>18</sup> Para o tratamento do osteossarcoma,<sup>17</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 MTX 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>1,4</sup> Alguns centros seguem  $\leq 0,10 \mu\text{mol/l}$ .<sup>17, 19</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>1,4,</sup>  
20

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>15, 20</sup> como por exemplo a vancomicina.<sup>21</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>22-29</sup>

Dado o perfil de aparecimento do metabolito 7-hidroximetotrexato,<sup>16, 28</sup> a respectiva proporção molar para metotrexato de até cerca de 100 vezes mais<sup>30</sup> e a insolubilidade relativa em comparação com a forma não modificada do fármaco,<sup>15, 20</sup> a possível nefrotoxicidade devido à precipitação do metabolito nos túbulos renais<sup>30</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>15</sup> A eliminação de DAMPA pode demorar vários dias até deixar de interferir com a monitorização de metotrexato através do imunoensaio.<sup>14</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 analisador automatizado de química clínica Beckman Coulter AU680®.

## Sensibilidade

### Limite de Quantificação (LoQ)

O LOQ do ensaio de metotrexato II ARK foi determinado segundo o EP17-A2 do CLSI e define-se como sendo a concentração mais baixa para a qual se observa uma precisão ( $\leq 0,010$  DP) e recuperação ( $\pm 0,010$   $\mu\text{mol/l}$  do valor nominal) inter-ensaio aceitáveis. O LOQ foi determinado como sendo de  $0,030$   $\mu\text{mol/l}$  e pode depender do desempenho específico do analisador.

Concentração nominal ( $\mu\text{mol/l}$ )	Média das médias ( $\mu\text{mol/l}$ )	DP	CV (%)
0,030	0,034	0,002	4,87
0,040	0,043	0,002	4,01
0,050	0,052	0,003	4,00

### Intervalo de medição

O intervalo de medição analítica do Ensaio de metotrexato II ARK é de  $0,030$  a  $1,300$   $\mu\text{mol/l}$ . As amostras contendo metotrexato em concentrações mais elevadas ( $> 1,300$   $\mu\text{mol/l}$ ) podem ser ensaiadas através de diluição da amostra até ao intervalo de medição para um resultado quantitativo, ou podem ser incluídas no relatório como tendo sido detectado o fármaco mas com valores acima do intervalo de medição. Multiplique o resultado ensaiado pelo factor de diluição para obter a concentração de metotrexato na amostra não diluída. Registe os resultados abaixo deste intervalo como  $< 0,030$   $\mu\text{mol/l}$  ou abaixo de um LOQ mais elevado, específico do analisador, estabelecido no seu laboratório. Registe os resultados acima deste intervalo como  $> 1,300$   $\mu\text{mol/l}$  ou acima do LOQ superior mais elevado, específico do analisador, estabelecido no seu laboratório.

## 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 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.

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

<b>Concentração composto (µmol/l)</b>	<b>Concentração composto (µmol/l)</b>	<b>Percentagem Recuperação</b>
0,060	0,063	104,4
0,100	0,105	105,2
0,300	0,322	107,2
0,600	0,628	104,7
1,000	1,079	107,9
1,200	1,293	107,8

### **Linearidade**

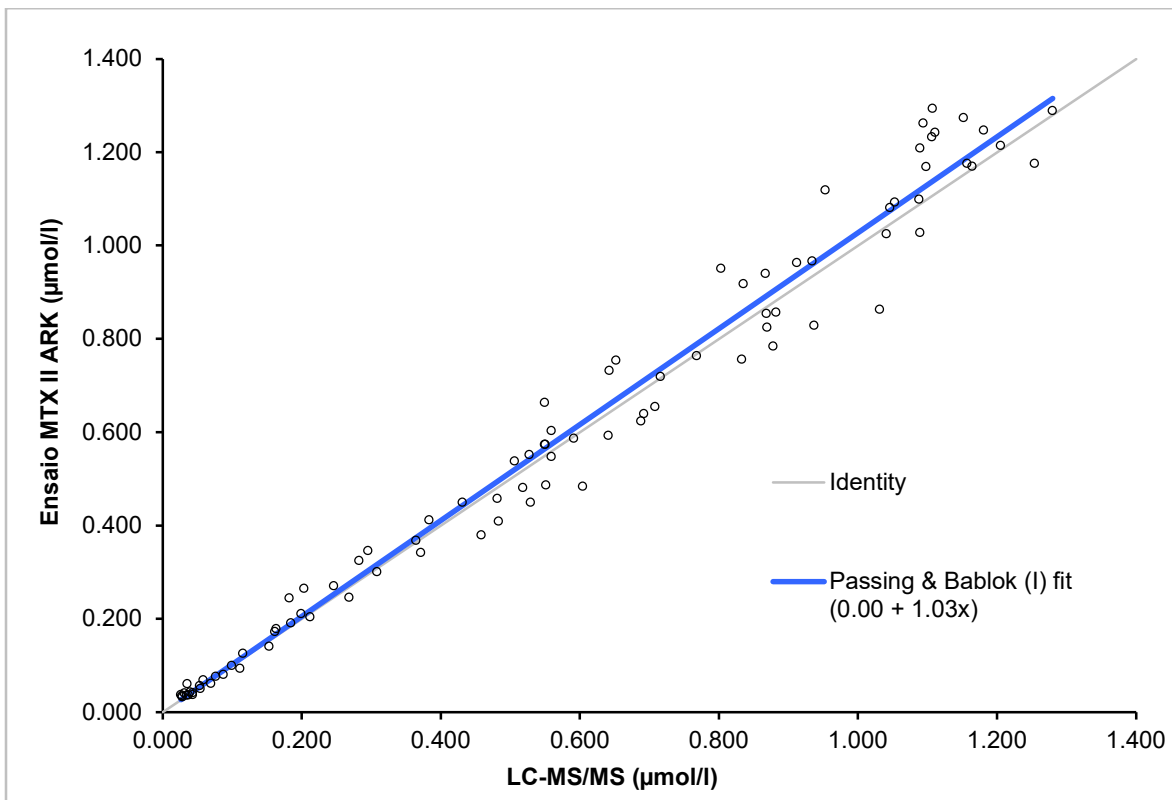
Realizaram-se estudos de linearidade conforme sugerido no Protocolo EP06-Ed2 do CLSI. Preparou-se uma amostra de soro a 1,600 µmol/l, fazendo-se diluições proporcionalmente com soro humano negativo para metotrexato. As concentrações de metotrexato variaram entre os 0,030 a 1,300 µmol/l. Foi demonstrada uma relação linear entre os 0,030 e os 1,300 µmol/l. Os resultados são apresentados na seguinte tabela.

<b>Concentração nominal (µmol/l)</b>	<b>Resultados observados (µmol/l)</b>	<b>Resultados previstos (µmol/l)</b>	<b>% de diferença</b>
0,000	0,000	NA	NA
0,030	0,035	0,033	5,78
0,060	0,062	0,065	-4,96
0,130	0,129	0,141	-8,73
0,260	0,296	0,283	4,66
0,390	0,399	0,424	-5,98
0,520	0,549	0,565	-2,89
0,650	0,721	0,707	2,07
0,780	0,877	0,848	3,36
0,910	1,012	0,989	2,32
1,040	1,157	1,131	2,34
1,170	1,261	1,272	-0,87
1,300	1,380	1,413	-2,40

## Comparação dos métodos

Realizaram-se estudos de correlação usando o Protocolo EP9-A3 do CLSI. As medições de metotrexato no soro humano (de doentes tratados com terapêutica de metotrexato em dose elevada) através do ensaio de metotrexato II ARK foram comparadas com as obtidas através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em simultâneo (LC-MS/MS). As concentrações de metotrexato variaram entre os 0,026 a 1,280  $\mu\text{mol/l}$  com LC-MS/MS. Os resultados da análise de regressão de Passing-Bablok<sup>31</sup> para o estudo são apresentados a seguir (com limites de confiança a 95%).

Declive	1,03	(1,00 a 1,06)
Intersecção no eixo dos y	0,00	(-0,01 a 0,01)
Coefficiente de correlação ( $r^2$ )	0,98	(0,96 a 0,98)
Número de amostras	90	



Também se procedeu a uma comparação do método relativamente ao ensaio de metotrexato ARK original para 123 amostras de doentes com valores de metotrexato entre os 0,054 a 1,168. As estatísticas com os intervalos de confiança da comparação Passing-Bablok são um declive = 0,98 (0,95 a 1,01); intersecção no eixo dos y = -0,02 (-0,03 a -0,01); e um coeficiente de correlação ( $r^2$ ) = 0,97 (0,96 a 0,98).

## Precisão

A precisão foi determinada conforme descrito no Protocolo EP5-A3 do CLSI. Usaram-se no estudo os seis níveis de controlo do metotrexato II ARK (Baixo, Médio, Alto, 5, 50 e 500) e as seis amostras de soro humano agrupado correspondentes. 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:  $\leq 10\%$  do CV total.

Amostr a	N	Média ( $\mu\text{mol/l}$ )	intra- execução		Reprodutibili dade		Total	
			DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
Controlo de metotrexato II ARK								
BAIXO	160	0,069	0,002	2,84	0,001	1,23	0,002	3,00
MÉDIO	160	0,411	0,006	1,40	0,002	0,43	0,006	1,40
ALTO	160	0,811	0,014	1,79	0,008	0,97	0,017	2,05
5	160	4,868	0,070	1,44	0,036	0,74	0,077	1,58
50	160	49,660	1,108	2,23	0,397	0,80	1,141	2,30
500	160	493,769	8,012	1,62	2,483	0,50	8,012	1,62
Soro humano								
BAIXO	160	0,070	0,002	2,50	0,001	1,49	0,002	2,88
MÉDIO	160	0,404	0,008	1,86	0,003	0,65	0,008	1,92
ALTO	160	0,846	0,016	1,93	0,008	0,95	0,017	2,06
5	160	5,247	0,076	1,45	0,028	0,54	0,078	1,49
50	160	51,614	0,723	1,40	0,285	0,55	0,777	1,51
500	160	507,988	7,632	1,50	4,240	0,83	8,538	1,68

## Substâncias Interferentes

Realizaram-se estudos de interferência usando o Protocolo EP07-A3 do CLSI como orientação. Avaliaram-se concentrações clinicamente altas das seguintes substâncias potencialmente interferentes em soros com níveis conhecidos de metotrexato (cerca de 0,050 e 0,500  $\mu\text{mol/l}$ ). Cada amostra foi analisada com o ensaio de metotrexato II da ARK em conjunto com um controlo de metotrexato em soro. As medições de metotrexato ficaram dentro dos  $\pm 10\%$  de interferência ou  $\pm 0,010 \mu\text{mol/l}$  do controlo no soro quando as concentrações de metotrexato foram  $\leq 0,100 \mu\text{mol/l}$ .

Substância interferente	Concentração composto	Resultados	
		$\pm \mu\text{mol/l}$ relativamente ao controlo (0,050 $\mu\text{mol/l}$ de metotrexato)	% de interferência (0,500 $\mu\text{mol/L}$ de metotrexato)
Albumina humana	12 g/dL	0,002	-1,04
Bilirrubina (conjugada)	72 mg/dL	0,001	1,96
Bilirrubina (não conjugada)	72 mg/dL	0,003	0,23
Colesterol	500 mg/dl	0,005	3,49
Gamaglobulina humana	12 g/dL	0,003	2,42
Hemoglobina	1000 mg/dL	-0,006	-2,72
Factor reumatóide	1080 UI/ml	0,001	3,52
Triglicéridos	1000 mg/dL	-0,007	7,48
Ácido úrico	30 mg/dL	0,000	1,60

## 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 II ARK. Contaminou-se deliberadamente soro agrupado sem metotrexato e com 0,050  $\mu\text{mol/l}$  ou 0,500  $\mu\text{mol/l}$  de metotrexato. As amostras foram analisadas e as concentrações de metotrexato das amostras que continham substâncias interferentes foram comparadas com um controlo sérico.

### Interferência com 7- hidroximetotrexato, o principal metabolito.

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>16, 28, 30, 32, 34-35</sup>

A reactividade cruzada com 7-hidroximetotrexato metotrexato foi determinada para o Ensaio de metotrexato II ARK testando quer 0,050 quer 0,500 µmol/l de metotrexato com 50 µmol/L de 7-hidroximetotrexato no soro humano (excesso de 1000 e 100 vezes). A reatividade cruzada a este metabolito foi insignificante, inferior a 0,01%. Um excesso extremo de 1000 vezes do metabolito 7-hidroximetotrexato causa menos de 10% de interferência na medição do metotrexato no Ensaio de metotrexato II ARK.

#### 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 II 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 19% a 58% com base nos dados observados. O ensaio não deve ser utilizado durante a terapêutica com glucarpidase (carboxipeptidase G2) que converta rapidamente em DAMPA o metotrexato em circulação.

#### Interferência com análogos do folato e outros compostos

Os compostos indicados a seguir não interferiram com o ensaio de metotrexato II ARK quando testados na presença de metotrexato ( $\pm 10\%$  de interferência a uma concentração de 0,500 µmol/l de metotrexato e  $\pm 0,010$  µmol/l relativamente ao controlo a uma concentração de 0,050 µmol/l de metotrexato). As concentrações dos compostos foram testadas segundo as orientações EP37 do CLSI.

<b>Composto</b>	<b>Conc. Testada (µmol/l)</b>
Adriamicina	1000
Ciclofosfamida	2200
Citosina	1000
Ácido di-hidrofólico	1000
Ácido tetra-hidrofólico	1000
DL-6-metil-5,6,7,8-tetra-hidropterina	1000
Ácido fólico	1000
Ácido folínico	1000

5-fluorouracilo	3000
6-mercaptipurina	1000
Ácido 5-metiltetra-hidrofólico	1000
Prednisolona	1000
Pirimetamina	1000
Sulfametoxazol	1600
Vinblastina	1000
Vincristina	1000
Trimetoprima	150
Triamtereno	25

## Bibliografía

1. Prescribing Information. 2011. 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. Leucovorin (Fusilev) Prescribing Information. 2020. Acrotech Biopharma LLC, East Windsor, NJ .
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

9. 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.
10. CLSI. *Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline—Fourth Edition*. CLSI document GP44-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
11. Chabner, B. A. et al. 1972. Enzymatic cleavage of methotrexate provides a method for prevention of drug toxicity. *Nature* **239**:395 – 397.
12. Widemann, B. C. et al. 1995. Carboxypeptidase-G2 rescue in a patient with high dose methotrexate-induced nephrotoxicity. *Cancer* **76**:521 – 526.
13. Buchen, S. et al. 2005. Carboxypeptidase G2 rescue in patients with methotrexate intoxication and renal failure. *British Journal of Cancer* **92**:480 – 487.
14. Al-Turkmani, M. R. et al., 2010. Difficulty Measuring Methotrexate in a Patient with High-Dose Methotrexate-Induced Nephrotoxicity. *Clin Chem* **56**:1792 – 1796.
15. Prescribing information. 2012. VORAXAZE® (glucarpidase) For Injection, for intravenous use, BTG International Inc. West Conshohocken, PA.
16. Bore, P. et al. 1987. Pharmacokinetics of Methotrexate and 7-Hydroxy-Methotrexate After Methotrexate Infusions. *Cancer Drug Delivery* **4**:177 – 183.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Widemann, B. C. and Adamson, P. C. 2006. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* **11**:694 – 703.
21. 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.
22. Martelli, N. et al. 2011. Methotrexate pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prognostic value? *J Clin Pharm Ther* **36**:237 – 245.

23. Mazanec, D. J. and Grisanti, J. M. 1989. Drug-induced osteoporosis. *Cleve Clin J of Med* **56**:297 – 303.
24. 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.
25. Allen, J. C. et al. 1980. Leukoencephalopathy following high-dose IV methotrexate chemotherapy with leucovorin rescue. *Cancer Treat Rep* **64**:1261 – 1273.
26. Jacobs, P. et al. 1991. Methotrexate encephalopathy. *Eur J Cancer* **27**:1061 – 1062.
27. Flombaum, C. D. and Meyers, P. A. 1999. High-Dose Leucovorin as Sole Therapy for Methotrexate Toxicity. *J Clin Oncol* **17**:1589 – 1594.
28. 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.
29. 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.
30. Erttmann, R. et al. 1985. 7-Hydroxy-Methotrexate and Clinical Toxicity Following High-Dose Methotrexate Therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* **109**:86 – 88.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. Breithaupt, H. and Kuenzlen, E. 1982. Pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate following infusions of high dose methotrexate. *Cancer Treat Rep* **66**:1733 – 1741.

## 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 EUA**

Revisado em maio de 2025  
1600-1222-00PT Rev 05