ARK *Methotrexate II Assay*

Tento príbalový leták spoločnosti ARK Diagnostics, Inc. pre test ARK Methotrexate II Assay sa musí pred použitím pozorne prečítať. Pokyny uvedené v tomto príbalovom letáku sa musia dodržiavať. Spoľahlivosť výsledkov stanovenia nemožno zaručiť, ak dôjde k akýmkoľvek odchýlkam od pokynov uvedených v tomto príbalovom letáku.

Každú závažnú nehodu, ktorá sa vyskytla v súvislosti s produktom, nahláste výrobcovi a podľa potreby príslušnému kompetentnému orgánu. Súhrn parametrov bezpečnosti a výkonu je k dispozícii prostredníctvom Eudamed (Európska databáza zdravotníckych pomôcok), SRN: US-MF-000023925.

Zákaznícky servis

ARK Diagnostics, Inc.

48089 Fremont Blvd

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

www.ark-tdm.com

CE
2797

EC REP
Emergo Europe
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

CH REP
MedEnvoy Switzerland
Gotthardstrasse 28
6302 Zug
Switzerland

Kľúč k použitým symbolom

LOT	Kód šarže	YYYY-MM-DD	Spotrebujte do/Dátum exspirácie
REF	Katalógové číslo		Výrobca
EC REP	Autorizovaný zástupca	CE 2797	Značka CE s číslom notifikovanej osoby
IVD	Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro		Teplotné obmedzenie
	Prečítajte si návod na použitie	R1 R2	Reagencia 1/Reagencia 2
Rx Only	Len na lekársky predpis		

© 2026, ARK Diagnostics, Inc.

Súprava reagencií REF 5071-0001-00, 5071-0001-01

1 Názov

ARK *Methotrexate II Assay*

2 Určené použitie

ARK Methotrexate II Assay je homogénna enzýmová imunoanalýza určená na kvantitatívne stanovenie metotrexátu v ľudskom sére alebo plazme na automatizovaných analyzátoroch klinickej chémie. Získané merania sa používajú pri monitorovaní hladín metotrexátu, čo pomáha zabezpečiť vhodnú liečbu.

Vzorky získané od pacientov, ktorí dostávali glukarpidázu (karboxypeptidáza G2) ako záchrannú liečbu vysokými dávkami metotrexátu, by sa nemali testovať pomocou testu ARK Methotrexate II Assay.

3 Zhrnutie a vysvetlenie testu

Metotrexát [N-[4[[(2,4-diamino-6-pteridinyl) methyl] methylamino]benzoyl]-L-glutámová kyselina], predtým Amethopterin, je antimetabolit používaný pri liečbe niektorých neoplastických ochorení, závažnej psoriázy a reumatoidnej artritídy u dospelých.[1-3] Metotrexát má potenciál závažnej toxicity. Pacienti podstupujúci liečbu metotrexátom by mali byť dôkladne monitorovaní, aby sa čo najskôr zistili toxické účinky.

Monitorovanie metotrexátu sa bežne používa u pacientov podstupujúcich liečbu rakoviny vysokými dávkami metotrexátu; výsledky sa používajú na usmernenie podpornej liečby, zatiaľ čo metotrexát sa vylučuje obličkami. Usmernenia pre liečbu metotrexátom so záchranou pomocou leukovorínu by sa mali konzultovať.[1,4] Pri liečbe osteogénneho sarkómu, leukémie, non-Hodgkinovho lymfómu, rakoviny pľúc a prsníka sa s priaznivými výsledkami použili stredné až vysoké dávky metotrexátu (približne 35 mg/m^2 – 12 g/m^2) so záchranou pomocou leukovorínu (citrovorum faktor).[5-9]

4 Zásady postupu

Test ARK Methotrexate II Assay je homogénna enzýmová imunoanalýza. Test využíva špecifické protilátky, ktoré sa môžu viazať na metotrexát. Test je založený na kompetícii medzi liečivom označeným rekombinantnou glukóza-6-fosfátdehydrogenázou (rG6PDH) a voľným liečivom zo vzorky, pre fixné množstvo špecifických väzbových miest protilátok. Pri neprítomnosti voľného liečiva zo vzorky sa králičia monoklonálna anti-metotrexátová protilátka viaže na liečivo označené rG6PDH a spôsobuje pokles aktivity enzýmu. V prítomnosti

liečiva zo vzorky sa aktivita enzýmu zvyšuje a priamo súvisí s koncentráciou liečiva. Aktívny enzým premieňa koenzým nikotínamidadenín-dinukleotid (NAD) na NADH, ktorý sa meria spektrofotometricky ako rýchlosť zmeny absorbancie. Endogénna sérová G6PDH neinterferuje s výsledkami, pretože koenzým NAD funguje len s bakteriálnym enzýmom použitým v stanovení.

5 Reagencie

REF	Opis produktu	Množstvo/objem
5071-0001-00	**ARK Methotrexate II Assay** **Reagencia R1 – protilátka/substrát** Králičia monoklonálna protilátka na metotrexát, glukóza-6-fosfát, nikotínamid adenín dinukleotid, hovädzí sérový albumín, azid sodný a stabilizátory	1 × 16 ml
	Reagencia R2 – enzým Metotrexát označený bakteriálnym rG6PDH, tlmivým roztokom, hovädzím sérovým albumínom, azidom sodným a stabilizátormi	1 × 8 ml
5071-0001-01	**ARK Methotrexate II Assay** **Reagencia R1 – protilátka/substrát** Králičia monoklonálna protilátka na metotrexát, glukóza-6-fosfát, nikotínamid adenín dinukleotid, hovädzí sérový albumín, azid sodný a stabilizátory	1 × 28 ml
	Reagencia R2 – enzým Metotrexát označený bakteriálnym rG6PDH, tlmivým roztokom, hovädzím sérovým albumínom, azidom sodným a stabilizátormi	1 × 14 ml

Manipulácia s reagenciamii a ich skladovanie

Reagencie ARK Methotrexate II Assay sa dodávajú v tekutej forme, pripravené na použitie, a môžu sa používať priamo z chladničky. Ak sa reagencie nepoužívajú, musia sa skladovať pri teplote 2 – 8 °C (36 – 46 °F), vo zvislej polohe a s pevne uzavretými skrutkovacími uzávermi. Ak sa reagencie skladujú podľa pokynov, sú stabilné až do dátumu exspirácie vytlačeného na štítku. Reagencie nezmrazujte. Vyhnite sa dlhodobému vystaveniu teplotám nad 32 °C (90 °F). **Nesprávne skladovanie reagencií môže ovplyvniť výkonnosť testu.**

Produkty ARK Methotrexate II obsahujú ≤0,09 % azidu sodného. Ako preventívne opatrenie sa má dotknuté potrubie vrátane prístrojového vybavenia dôkladne prepláchnuť vodou, aby sa obmedzilo možné hromadenie výbušných kovových azidov. Pokiaľ ide o ostatné zložky testu, nevyžaduje sa žiadna špeciálna manipulácia.

6 Upozornenia a bezpečnostné opatrenia

- Na **diagnostiku in vitro,** laboratórne profesionálne použitie.
- Len na lekársky predpis. *Upozornenie: Federálne zákony USA obmedzujú predaj tejto pomôcky na licencovaného praktického lekára alebo na jeho príkaz.*

- Reagencie R1 a R2 sa dodávajú ako párová súprava a nesmú sa zamieňať s reagenciami z rôznych čísel šarží.
- Reagencie obsahujú ≤0,09 % azidu sodného.
- Tento test sa má používať iba v spojení s informáciami dostupnými z klinických vyšetrení a iných diagnostických postupov.

7 Odber vzoriek a príprava na analýzu

- Každé laboratórium je zodpovedné za dodanie platnej vzorky na analýzu podľa svojich postupov kvality.
- Vyžaduje sa sérum alebo plazma. Z dôvodu konzistentnosti je dobrou praxou používať u jednotlivých pacientov rovnakú matricu vzorky.
- Čas odberu metotrexátu bude závisieť od dávky, trvania infúzie a klinického stavu pacienta. Časy odberu nájdete v protokoloch špecifickej liečby.
- Celú krv nemožno použiť. Pri tomto teste sa môžu použiť tieto antikoagulanciá.
    - Sodný heparín
    - Lítium-heparín
    - EDTA draslíka
- Odber krvi sa musí vykonávať pomocou odberových skúmaviek kompatibilných s terapeutickým monitorovaním liečiv (TDM).
- Postupujte podľa odporúčaní výrobcu odberových skúmaviek týkajúcich sa odberu, spracovania a centrifugácie.
- Dokument CLSI GP44-A4 opisuje postupy na minimalizáciu artefaktov spôsobených odberom a manipuláciou so vzorkami pri bežných laboratórnych testoch.[10]
- Nevyvolávajte penenie a vyhnite sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu, aby sa zachovala integrita vzorky od okamihu jej odberu až do okamihu jej analýzy.
- Fibrín, červené krvinky a iné tuhé častice môžu spôsobiť chybný výsledok. Zabezpečte primeranú centrifugáciu.
- Prítomnosť bublín alebo peny vo vzorkách môže viesť k dodaniu nedostatočnému objemu vzorky a chybným výsledkom.
- Každé laboratórium by malo vychádzať z dostupnej literatúry a interných údajov týkajúcich sa stability vzoriek.
- Na základe štúdií vykonaných spoločnosťou ARK Diagnostics sa môžu vyčírené vzorky skladovať až jeden týždeň pri teplote 2 až 8 °C na základe podporných údajov. Ak sa testovanie odloží o viac ako jeden týždeň, vzorky sa musia pred testovaním skladovať zmrazené (≤ -10 °C) najviac štyri týždne. Treba dbať na obmedzenie počtu cyklov zmrazovania a rozmrazovania; podporné údaje nepreukázali žiadny nepriaznivý vplyv troch cyklov zmrazovania a rozmrazovania.
- **So všetkými vzorkami pacientov zaobchádzajte, ako keby boli potenciálne infekčné.**

8 Postup

Poskytnuté materiály
ARK Methotrexate II Assay – REF 5071-0001-00, 5071-0001-01

Potrebné materiály – poskytnuté samostatne
ARK Methotrexate II Calibrator – REF 5071-0002-00
Kontroly kvality – ARK Methotrexate II Control – REF 5071-0003-00
Kontroly kvality – ARK Methotrexate II Control – REF 5071-0003-01
Kontroly kvality – ARK Methotrexate II Control – REF 5071-0003-02
ARK Methotrexate II Dilution Buffer – REF 5071-0004-00

Nástroje
Pred použitím môže byť potrebné preniesť reagencie R1 a R2 do nádob na reagencie špecifických pre analyzátor. Zabráňte krížovej kontaminácii R1 a R2.

Vhodné sú mnohé automatizované analyzátory klinickej chémie s fotometrickým stanovením rýchlosti pri 340 nm. Pozrite si aplikačný list špecifický pre analyzátor na naprogramovanie testu ARK Methotrexate II Assay, ktorý je k dispozícii u vášho distribútora alebo v zákazníckom servise ARK. Aplikačné protokoly, ktoré boli kategorizované podľa CLIA alebo nesú označenie CE, boli overené výrobcom. Laboratórium zodpovedá za vykonanie všetkých príslušných validácií pri použití testu s inými nastaveniami alebo analyzátormi.

Dennú údržbu nájdete v návode na obsluhu konkrétneho prístroja.

Postup stanovenia
Ak chcete spustiť stanovenie alebo vykonať kalibráciu, pozrite si návod na obsluhu konkrétneho prístroja.

Kalibrácia
Vykonajte úplnú kalibráciu (6-bodový postup) pomocou kalibrátorov ARK Methotrexate II A, B, C, D, E a F; kalibrátory analyzujte v duplikáte. Pri každom novom čísle šarže reagenčnej súpravy je potrebná kalibrácia. Kalibračnú krivku overte aspoň dvoma úrovňami kontroly kvality podľa stanoveného plánu zabezpečenia kvality laboratória.

Kedy rekalibrovať
- Vždy, keď sa použije nové číslo šarže reagencií
- Kedykoľvek to naznačujú výsledky kontroly kvality
- Kedykoľvek to vyžadujú štandardné laboratórne protokoly

Kontrola kvality (QC)

Laboratóriá musia zaviesť postupy kontroly kvality pre ARK Methotrexate II Assay. Všetky požiadavky na kontrolu kvality a testovanie sa musia vykonávať v súlade s miestnymi, štátnymi a/alebo federálnymi predpismi alebo akreditačnými požiadavkami.

Správna laboratórna prax odporúča, aby sa v každý deň, keď sa analyzujú vzorky pacientov, a pri každej vykonanej kalibrácii testovali aspoň dve úrovne kontroly kvality (nízky a vysoký medicínsky rozhodovací bod). Sledujte kontrolné hodnoty pre akékoľvek trendy alebo zmeny. Ak sa zistia akékoľvek trendy alebo posuny, alebo ak kontrola nie je v stanovenom rozmedzí, skontrolujte všetky prevádzkové parametre v súlade s postupmi kvality vášho klinického laboratória. Ak potrebujete ďalšiu pomoc, obráťte sa na zákaznícky servis.

Protokol manuálneho riedenia
Ak chcete odhadnúť hladiny liečiva vo vzorkách presahujúcich hornú hranicu kvantifikácie, vzorku manuálne zrieďte riediacim tlmivým roztokom ARK Methotrexate II Dilution Buffer. Nameraný výsledok vynásobte zrieďovacím pomerom.

$$\text{Manuálny zrieďovací pomer} = \frac{\text{(objem vzorky + objem riediaceho tlmivého roztoku)}}{\text{Objem vzorky}}$$

Rozšírený rozsah testu bol validovaný až do 1200 µmol/l prostredníctvom sériových 1 : 10 riedení vzoriek 1 : 10, 1 : 100 alebo 1 : 1000 podľa potreby.

9 Výsledky

Uvádzajte jednotky výsledku ako µmol/l alebo µg/ml. Ak chcete konvertovať µmol/l na µg/ml, vydeľte získanú hodnotu konverzným faktorom 2,2005. Hodnota metotrexátu z tohto testu sa má použiť v spojení s ďalšími klinickými informáciami. Všetky chybové kódy výsledkov nájdete v návode na obsluhu konkrétneho prístroja.

10 Obmedzenia postupu

Tento test je určený len na použitie so sérom alebo plazmou; pozri oddiel **Odber vzoriek a príprava na analýzu**. Vzhľadom na možnú variabilitu medzi metódami je vo všeobecnosti vhodné používať pri starostlivosti o konkrétneho pacienta konzistentne rovnakú metódu (ako aj rovnakú matricu). Pozri nižšie oddiel **Očakávané hodnoty**.

DÔLEŽITÉ: Vzorky od pacientov, ktorí dostávali glukarpidázu (karboxypeptidáza G2) ako záchrannú liečbu vysokými dávkami metotrexátu, by sa nemali testovať pomocou testu ARK Methotrexate II Assay. Tieto vzorky majú zvýšené hladiny kyseliny 4-[[2,4-diamino-6- (pteridinyl)metyl]-metylamino]-benzoovej (DAMPA)[11-13] v sére, ktoré vyplývajú z metabolizmu metotrexátu glukarpidázou. DAMPA

krížovo reaguje s protilátkou metotrexátu použitou v tomto teste a môže naďalej cirkulovať najmenej päť až sedem dní pred návratom presných meraní metotrexátu v sére.[14] Onkológovia v klinickom tíme by mali oznámiť laboratóriu, keď sa podáva glukarpidáza, aby sa zabránilo hláseniu falošne zvýšených koncentrácií metotrexátu v dôsledku interferencie kyselinou DAMPA, ktorá by zmiatla úsilie pri liečbe glukarpidázou.[14] Zatiaľ čo glukarpidáza je dobre tolerovaná a rýchlo znižuje cirkulujúci MTX, oneskorená renálna eliminácia MTX môže byť stále problémom pre dospelých a starších pacientov.[15]

11 Očakávané hodnoty

Hladiny metotrexátu v sére závisia od indikácie na použitie, dávkovania, spôsobu podávania, liečebného režimu, individuálnej farmakokinetiky, metabolizmu a ďalších klinických faktorov.[1,3] Zatiaľ čo hladina v sére môže zvyčajne dosahovať približne 10 až 100 µmol/l pri liečbe rakoviny prsníka (napríklad),[16] koncentrácie môžu prekročiť 1000 µmol/l[17] pri liečbe osteosarkómu vysokými dávkami, a po 4-hodinovej infúzii u pediatrických pacientov s osteosarkómom sa dosiahla koncentrácia metotrexátu až 3100 µmol/l.[18] Pri liečbe osteosarkómu[17] má krivka rozpadu metotrexátu širokú variabilitu: 24 hodín, 30 až 300 µmol/l; 48 hodín, 3 až 30 µmol/l; a 72 hodín, menej ako 0,3 µmol/l. Dávka 10 mg leukovorínu sa zvyčajne podáva intravenózne 24 hodín po začatí infúzie MTX. Následné dávky sa upravujú a podávajú podľa hladín MTX získaných po 24, 48 a 72 hodinách. Hladiny metotrexátu nad 50 µmol/l po 24 hodinách, 10 µmol/l po 48 hodinách a 0,5 µmol/l po 72 hodinách naznačujú potenciálnu toxicitu a zvyčajne sa liečia zvýšením dávky leukovorínu v súlade s algoritmami, kým hladina MTX nie je <0,1 µmol/l. Usmernenia pre liečbu metotrexátom s leukovorínovou záchranou zvyčajne odporúčajú pokračovanie leukovorínu, kým hladina metotrexátu neklesne pod 0,05 µmol/l.[1, 4] Niektoré strediská dodržujú koncentráciu ≤0,10 µmol/l.[17, 19]

Z predpisovania a ďalších informácií: Laboratórne ukazovatele toxicity po záchranných harmonogramoch leukovorínu s vysokou dávkou metotrexátu.[1, 4, 20]

Klinická situácia	Laboratórne nálezy	
	Hladina metotrexátu (µmol/l)	**Hodiny po podaní**
Normálne vylúčenie metotrexátu	~10 ~1 <0,2	24 48 72
Oneskorené neskoré vylúčenie metotrexátu	>0,2 >0,05	72 96
Oneskorené predčasné vylúčenie metotrexátu a/alebo	≥50 ≥5 ALEBO	24 48

Dôkaz akútneho poškodenia obličiek	≥100 % nárast kreatinínu v sére	24

Renálna toxicita je významné riziko a môže sa zhoršiť súbežným podávaním iných liekov,[15, 20] napríklad vankomycínu.[21] Môžu sa vyskytnúť iné formy toxicity vrátane tráviacich porúch (napr. nevoľnosť, vracanie, bolesť brucha), kožno-mukóznych porúch (najmä mukozitída), hematologických abnormalít (napr. neutropénia a trombocytopénia), porúch pečeňových testov a neurotoxicity.[22-29]

Vzhľadom na profil vzhľadu metabolitu 7-hydroxymetotrexátu,[16, 28] jeho molárny pomer k metotrexátu až do 100-násobku,[30] a relatívnu nerozpustnosť v porovnaní s materským liekom[15, 20] môže možná nefrotoxicita v dôsledku zrážania metabolitu v renálnych tubuloch[30] oddialiť vylúčenie samotného metotrexátu.

Liečba glukarpidázou rýchlo znižuje cirkulujúcu hladinu metotrexátu, nie intracelulárneho liečiva. Po liečbe glukarpidázou bol pozorovaný rebound efekt v sérovej hladine metotrexátu.[15] Vylúčenie DAMPA môže trvať niekoľko dní, kým prestane interferovať s monitorovaním metotrexátu imunoanalýzou.[14]

12 Špecifické výkonnostné charakteristiky

Každé laboratórium zodpovedá za overenie výkonnosti pomocou parametrov prístroja stanovených pre jeho analyzátor. Nasledujúce výkonnostné charakteristiky boli získané na automatizovanom analyzátore klinickej chémie Beckman Coulter AU680®.

Citlivosť

Limit kvantifikácie (LOQ)

LOQ pre ARK Methotrexate II Assay sa stanovila podľa CLSI EP17-A2 a je definovaná ako najnižšia koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje prijateľná presnosť medzi testmi (≤0,010 SD) a výťažnosť (±0,010 µmol/l nominálu). LOQ bola stanovená na 0,030 µmol/l a môže závisieť od výkonnosti konkrétneho analyzátora.

Nominálna koncentrácia (µmol/l)	Celkový priemer (µmol/l)	SD	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

Rozsah merania

Rozsah analytického merania testu ARK Methotrexate II Assay je 0,030 – 1,300 µmol/l. Vzorky obsahujúce metotrexát vo vyšších koncentráciách (>1,300 µmol/l) môžu byť testované zriedením vzorky do rozsahu merania pre kvantitatívny výsledok alebo inak hlásené ako zistené nad rozsahom merania. Výsledok testu vynásobte faktorom riedenia, aby ste získali koncentráciu metotrexátu v nezriedenej vzorke. Výsledky pod týmto rozsahom uvádzajte ako <0,030 µmol/l alebo pod vyššou hodnotou LOQ špecifickou pre analyzátor stanovenou vo vašom laboratóriu. Výsledky nad týmto rozsahom uvádzajte ako >1,300 µmol/l alebo nad hornou hodnotou LOQ špecifickou pre analyzátor stanovenou vo vašom laboratóriu.

Výťažnosť

Presnosť (analytická výťažnosť) sa hodnotila pridaním koncentrovaného metotrexátového liečiva do ľudského séra negatívneho na metotrexát. Certifikovaný zásobný koncentrát vysoko čistého metotrexátu sa objemovo pridal do ľudského séra negatívneho na metotrexát tak, aby reprezentoval koncentrácie liečiva v celom rozsahu testu. Každá vzorka sa analyzovala v šiestich replikátoch na automatizovanom analyzátore klinickej chémie. Výsledky sa spriemerovali, porovnali s cieľovou koncentráciou a vypočítala sa percentuálna výťažnosť. Výsledky sú uvedené nižšie.

$$\% \text{ výťažnosť} = 100 \times \frac{\text{priemerná stanovená koncentrácia}}{\text{Teoretická koncentrácia}}$$

Teoretická koncentrácia (µmol/l)	Priemerná vyťažená hodnota koncentrácia (µmol/l)	Percento Výťažnosť
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

Linearita

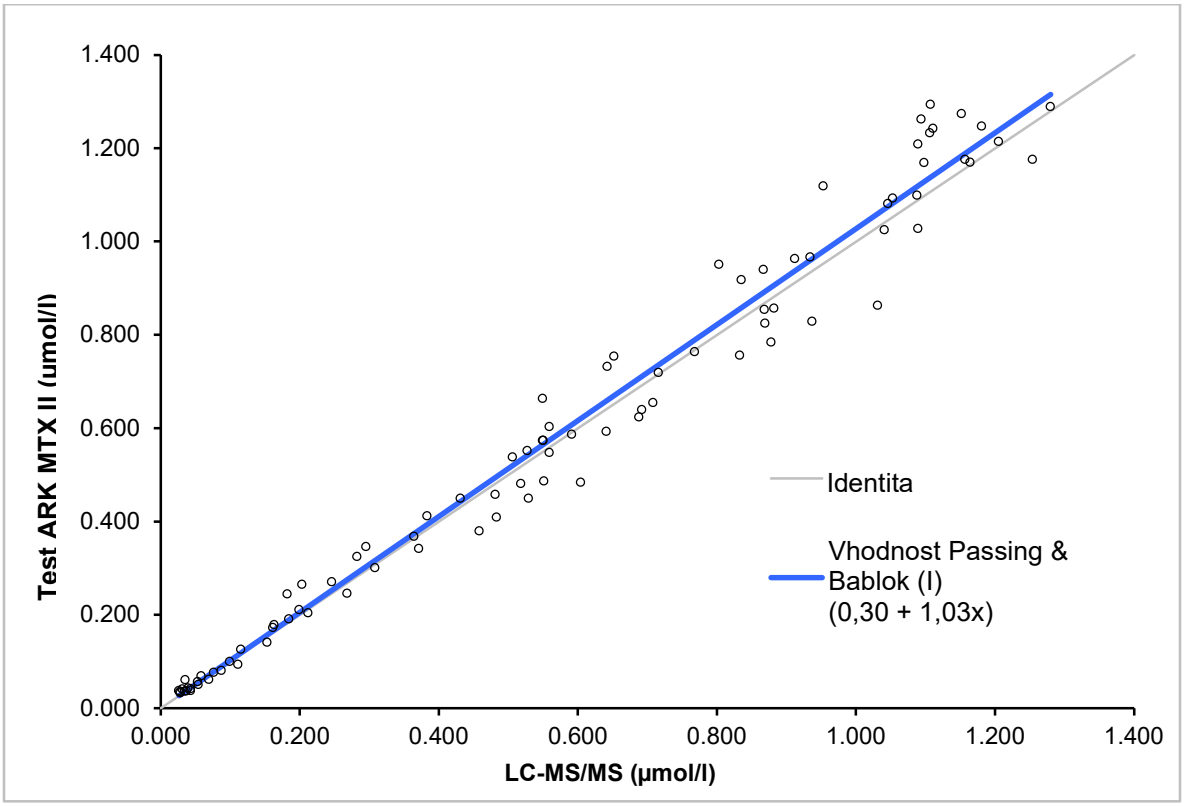
Štúdie linearity boli vykonané podľa návrhu v protokole CLSI EP06-Ed2. Pripravila sa vzorka séra s koncentráciou 1,600 µmol/l a riedenia sa vykonali proporcionálne s ľudským sérom negatívnym na metotrexát. Koncentrácie metotrexátu sa pohybovali od 0,030 do 1,300 µmol/l. Bol preukázaný lineárny vzťah medzi 0,030 a 1,300 µmol/l. Výsledky sú uvedené nižšie.

Nominálna koncentrácia (µmol/l)	Pozorované výsledky (µmol/l)	Predpokladané výsledky (µmol/l)	Rozdiel v %
0,000	0,000	–	–
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

Porovnanie metód

Korelačné štúdie boli vykonané pomocou protokolu CLSI EP9-A3. Merania metotrexátu v ľudskom sére (od pacientov liečených vysokými dávkami metotrexátu) testom ARK Methotrexate II Assay boli porovnané s meraniami získanými kvapalinovou chromatografiou s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS). Koncentrácie metotrexátu sa pri LC-MS/MS pohybovali od 0,026 do 1,280 µmol/l. Výsledky regresnej analýzy Passing-Bablok[31] pre štúdiu sú uvedené nižšie (s 95 % intervalmi spoľahlivosti).

Sklon	1,03	(1,00 až 1,06)
Priesečník s osou y	0,00	(-0,01 až 0,01)
Korelačný koeficient (r^2)	0,98	(0,96 až 0,98)
Počet vzoriek	90	



Porovnanie metódy bolo vykonané aj s pôvodným testom ARK Methotrexate Assay pre 123 vzoriek pacientov s hodnotami metotrexátu v rozmedzí od 0,054 do 1,168. Štatistiky s intervalmi spoľahlivosti z porovnania Passing-Bablok sú sklon = 0,98 (0,95 až 1,01); priesečník s osou y = -0,02 (-0,03 až -0,01); a korelačný koeficient (r^2) = 0,97 (0,96 až 0,98).

Presnosť

Presnosť bola stanovená tak, ako je opísané v protokole CLSI EP5-A3. V štúdii bolo použitých všetkých šesť kontrolných úrovní ARK Methotrexate II Control (Low, Mid, High, 5, 50 a 500) a šesť zodpovedajúcich poolovaných náprotivkov vzoriek ľudského séra. Každá úroveň sa analyzovala v štyroch replikátoch dvakrát denne počas 20 dní. Jednotlivé analytické série v rámci dňa boli od seba oddelené najmenej dvoma hodinami. Vypočítali sa smerodajné odchýlky a percentá CV v rámci série, medzi dňami a celkové hodnoty. Výsledky sú uvedené nižšie. Akceptačné kritérium: celkové CV ≤10 %.

			V rámci cyklu		Medzi dňami		Celkové	
Vzorka	**N**	**Priemer (µmol/l)**	**SD**	**CV (%)**	**SD**	**CV (%)**	**SD**	**CV (%)**
ARK Methotrexate II Control								
NÍZKA	160	0,069	0,002	2,84	0,001	1,23	0,002	3,00
STREDNÁ	160	0,411	0,006	1,40	0,002	0,43	0,006	1,40
VYSOKÁ	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
Ľudské sérum								
NÍZKA	160	0,070	0,002	2,50	0,001	1,49	0,002	2,88
STREDNÁ	160	0,404	0,008	1,86	0,003	0,65	0,008	1,92
VYSOKÁ	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

Interferujúce látky

Štúdie interferencie boli vykonané s použitím protokolu CLSI EP07-A3 ako usmernenia. Hodnotili sa klinicky vysoké koncentrácie nasledujúcich potenciálne interferujúcich látok v sére so známymi hladinami metotrexátu (približne 0,050 a 0,500 µmol/l). Každá vzorka sa analyzovala pomocou testu ARK Methotrexate II Assay spolu so sérovou kontrolou obsahujúcou metotrexát. Merania metotrexátu boli v rozmedzí ±10 % interferencie alebo ±0,010 µmol/l sérovej kontroly, keď koncentrácie metotrexátu boli ≤0,100 µmol/l.

		Výsledky	
Interferujúca látka	**Interferencia koncentrácia**	**± µmol/l z kontroly (0,050 µmol/l metotrexátu)**	**% interferencia (0,500 µmol/L metotrexátu)**
Ľudský albumín	12 g/dl	0,002	-1,04
Bilirubín – konjugovaný	72 mg/dl	0,001	1,96
Bilirubín – nekonjugovaný	72 mg/dl	0,003	0,23
Cholesterol	500 mg/dl	0,005	3,49
Ľudský gamaglobulín	12 g/dl	0,003	2,42
Hemoglobín	1000 mg/dl	-0,006	-2,72
Reumatoidný faktor	1080 IU/ml	0,001	3,52
Triglyceridy	1000 mg/dl	-0,007	7,48
Kyselina močová	30 mg/dl	0,000	1,60

Špecifickosť

Metabolity metotrexátu, analógy kyseliny listovej a iné zlúčeniny so štrukturálnou podobnosťou boli testované s cieľom určiť, či tieto zlúčeniny ovplyvňujú kvantifikáciu koncentrácií metotrexátu pomocou testu ARK Methotrexate II Assay. Vysoké hladiny týchto zlúčenín boli pridané do sérových poolov obsahujúcich žiadny metotrexát, 0,050 µmol/l alebo 0,500 µmol/l metotrexátu. Vzorky boli analyzované a koncentrácie metotrexátu vo vzorkách obsahujúcich interferenciu boli porovnané so sérovou kontrolou.

Interferencia so 7-hydroxymetotrexátom, hlavným metabolitom

Po podaní vysokých dávok metotrexátu (HDMTX) sérová/plazmatická koncentrácia 7-hydroxymetotrexátu v neskorších časových bodoch zvyčajne prevyšuje koncentráciu metotrexátu. Bolo hlásené, že hladiny 7-hydroxymetotrexátu až 100-násobne prevyšujú hladiny metotrexátu 12 až 48 hodín po podaní HDMTX.[16, 28, 30, 32, 34-35]

Krížová reaktivita s metotrexátom 7-hydroxymetotrexátu bola stanovená pre test ARK Methotrexate II Assay testovaním 0,050 aj 0,500 µmol/l metotrexátu v ľudskom sére doplnenom o 50 µmol/l 7-hydroxymetotrexátu (1000- a 100-násobný prebytok). Krížová reaktivita na tento metabolit bola zanedbateľná pri menej ako 0,01 %. Extrémny 1000-násobný prebytok metabolitu 7-hydroxymetotrexátu spôsobuje menej ako 10 % interferenciu pri meraní metotrexátu v teste ARK Methotrexate II Assay.

Krížová reaktivita s kyselinou 2,4-diamino-N^{10}-metylpterovou (DAMPA)

Neočakáva sa, že DAMPA ako vedľajší metabolit metotrexátu bude cirkulovať v koncentráciách, ktoré by interferovali pri meraní metotrexátu.[32] Po záchrannej liečbe glukarpidázou však môže byť sérová koncentrácia DAMPA značná.[13, 14] Test ARK Methotrexate II Assay výdatne krížovo reaguje s vedľajším metabolitom DAMPA. Testy boli vykonané v neprítomnosti materského lieku metotrexát. Krížová reaktivita na DAMPA sa na základe pozorovaných údajov pohybovala od 19 % do 58 %. Test sa nesmie používať počas liečby glukarpidázou (karboxypeptidáza G2), ktorá rýchlo premieňa cirkulujúci metotrexát na DAMPA.

Interferencia s analógmi kyseliny listovej a inými zlúčeninami

Zlúčeniny uvedené nižšie neinterferovali s testom ARK Methotrexate II Assay pri testovaní v prítomnosti metotrexátu (±10 % interferencia pri koncentrácii metotrexátu 0,500 µmol/l a ±0,010 µmol/l z kontroly pri koncentrácii metotrexátu 0,050 µmol/l). Koncentrácie zlúčenín boli testované podľa usmernení CLSI EP37.

Zlúčenina	**Testovaná konc. (µmol/l)**
Adriamycín	1000
Cyklofosfamid	2200
Cytozín	1000
Kyselina dihydrolistová	1000
Kyselina tetrahydrolistová	1000
DL-6-metyl-5,6,7,8-tetrahydropterín	1000
Kyselina listová	1000
Kyselina folínová	1000
5-fluóruracil	3000
6-merkaptopurín	1000
Kyselina 5-metyltetrahydrolistová	1000
Prednizolón	1000
Pyrimetamín	1000
Sulfametoxazol	1600
Vinblastín	1000
Vinkristín	1000
Trimetoprim	150
Triamterén	25

13 Referencie

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-hydroxy-methotrexate following infusions of high dose methotrexate. *Cancer Treat Rep* **66**:1733 – 1741.

14 Ochranné známky

ARK™ je ochranná známka spoločnosti **ARK** Diagnostics, Inc.
Iné značky alebo názvy produktov sú ochrannými známkami ich príslušných držiteľov.

ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 USA

Revidované v máji 2025
1600-1222-00SK Rev 05