


ARK™ Methotrexate Assay












Bitte lesen Sie diese Packungsbeilage von ARK Diagnostics, Inc. für den ARK Methotrexat-Test vor der Verwendung des Tests sorgfältig durch und befolgen Sie die Anweisungen. Die Zuverlässigkeit der Testergebnisse kann nicht garantiert werden, wenn von den Anweisungen in der Packungsbeilage abgewichen wird.

Kundenservice

 **ARK Diagnostics, Inc.**
 48089 Fremont Blvd
 Fremont, CA 94538 USA
 Tel.: +1-877-869-2320
 Fax: +1-510-270-6298
 customersupport@ark-tdm.com
 www.ark-tdm.com

 
 Emergo Europe
 Prinsessegracht 20
 2514 AP Den Haag
 Niederlande

Verwendete Symbole

	Chargenkennzeichnung	 JJJJ-MM- TT	Verwendbar bis/ Verfallsdatum
	Bestellnummer		Hersteller
	Autorisierte EU-Vertretung		CE-Zeichen
	Medizinprodukt zur in-vitro-Diagnostik		Temperaturgrenzen
	Lesen Sie die Gebrauchsanweisung	 	Reagenz 1 Reagenz 2
Rx Only	Für Berufsgebrauch		

© 2020, **ARK Diagnostics, Inc.** Reagenzkit  **5026-0001-00; 5026-0001-02;
5026-0001-03**

1 Name

ARKTM Methotrexate Assay

2 Verwendungszweck

Der ARK Methotrexat-Test ist ein homogener Enzymimmuntest zur quantitativen Bestimmung von Methotrexat in Humanserum oder -plasma auf automatisierten klinisch-chemischen Analysegeräten. Die erhaltenen Messwerte werden zum Monitoring der Methotrexatspiegel verwendet, um eine angemessene Therapie sicherzustellen.

Proben von Patienten, die Glucarpidase (Carboxypeptidase G2) notfallmäßig als Schutz gegen hohe Methotrexatkonzentrationen erhalten haben, sollten **nicht** mit dem ARK Methotrexat-Test gemessen werden.

3 Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Methotrexat [N-[4[[[2,4-D-6-Pteridiny]methyl]methylamino]benzoyl]-L-Glutaminsäure], früher Amethopterin, ist ein Antimetabolit, der zur Behandlung bestimmter neoplastischer Erkrankungen, schwerer Psoriasis und rheumatoider Arthritis bei Erwachsenen eingesetzt wird.¹⁻³ Methotrexat hat das Potential, schwere Toxizitäten zu verursachen. Patienten, bei denen eine Methotrexat-Therapie durchgeführt wird, sollten streng überwacht werden, um toxische Effekte schnell zu erkennen. Die Richtlinien für die Methotrexat-Therapie mit Leucovorinschutz sollten beachtet werden.¹ Mittlere bis hohe Methotrexat-Gaben (ungefähr 35 mg/m² - 12 g/m²) mit Leucovorinschutz (Citrovorum-Faktor) wurden mit guten Ergebnissen zur Behandlung von osteogenen Sarkomen, Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphomen sowie Lungen- und Brustkrebs eingesetzt.⁴⁻⁸

4 Grundlagen des Verfahrens

Der ARK Methotrexat-Test ist ein homogener Enzymimmuntest, bei dem der Wirkstoff in der Probe mit einem mit dem Enzym Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) markierten Methotrexat um die Bindung an dem Antikörperreagenz konkurriert. Wenn Letzteres den Antikörper bindet, sinkt die Enzymaktivität. Ist in der Probe das Medikament vorhanden, erhöht sich die Enzymaktivität direkt proportional zur Wirkstoffkonzentration. Das aktive Enzym wandelt das Koenzym Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) in NADH um, das spektralphotometrisch als Änderungsgeschwindigkeit der Absorptionsraten gemessen wird. Das endogene G6PDH im Serum stört die Ergebnisse nicht, da das Koenzym NAD nur mit dem bakteriellen Enzym interagiert, das in diesem Test verwendet wird.

5 Reagenzien

Ref.-Nr.	Produktbeschreibung	Anzahl/Volumen
5026-0001-00	ARK™ Methotrexate Assay	1 x 16 ml
5026-0001-02	Reagenz R1 – Antikörper/Substrat	
5026-0001-03	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper für Methotrexat, Glukose-6-Phosphat, Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, bovines Serumalbumin, Konservierungsmittel und Stabilisatoren	
	Reagenz R2 – Enzym	1 x 8 ml
	Mit bakteriellem G6PDH markiertes Methotrexat, Puffer, bovines Serumalbumin, Konservierungsmittel und Stabilisatoren	

Handhabung und Lagerung der Reagenzien

Die Reagenzien für den ARK Methotrexat-Test werden als gebrauchsfertige Flüssigkeiten geliefert und können direkt aus dem Kühlschrank verwendet werden. Werden die Reagenzien nicht verwendet, müssen sie bei 2–8 °C aufrecht und mit fest verschlossenem Schraubverschluss gelagert werden. Bei Lagerung entsprechend den Anweisungen sind die Reagenzien bis zum auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Frieren Sie die Reagenzien nicht ein. Vermeiden Sie längere Einwirkung von Temperaturen über 32°C. **Unsachgemäße Lagerung der Reagenzien kann die Testleistung beeinträchtigen.**

6 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Zur **In-vitro-Diagnostik**. Für Berufsgebrauch.
- Reagenzien **R1** und **R2** werden als zusammengehöriger Satz geliefert und dürfen nicht mit Reagenzien anderer Chargen gemischt werden.

7 Probenentnahme und Vorbereitung für die Analyse

- Benötigt wird Serum oder Plasma. Aus Konsistenzgründen ist zu empfehlen, immer die gleiche Probenmatrix für den einzelnen Patienten zu verwenden.
- Die Entnahmezeit der Methotrexat-Probe hängt von der Dosis, der Infusionsdauer und dem klinischen Zustand des Patienten ab. Beachten Sie für die Entnahmezeit spezifische Behandlungsprotokolle.
- Vollblut kann nicht verwendet werden. Mit diesem Test dürfen die folgenden Antigerinnungsmittel verwendet werden.
 - Natrium-Heparin
 - Lithium-Heparin
 - Kalium-EDTA

- Die Blutabnahme muss mit Entnahmeröhrchen erfolgen, die mit der Verwendung in der Medikamentenüberwachung (TDM) kompatibel sind.
- Vermeiden Sie Schaumbildung und ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen, um die Integrität der Proben von der Entnahme bis zum Zeitpunkt der Analyse zu bewahren.
- Fibrin, rote Blutkörperchen und andere Partikel können fehlerhafte Ergebnisse verursachen. Achten Sie auf eine ausreichende Zentrifugation.
- Geklärte Proben können bis zu zwei Wochen bei 2-8 °C gelagert werden. Wenn die Messung später erfolgen soll, können die Proben vor der Messung eingefroren werden (≤ -10 °C, bis zu vier Wochen). Die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen sollten Sie auf ein Minimum begrenzen. Proben, die bei -20°C gelagert wurden, konnten drei Gefrier-Auftau-Zyklen überstehen.
- **Behandeln Sie alle Patientenproben als potentiell infektiöses Material.**

8 Testverfahren

Mitgelieferte Materialien

ARK Methotrexat-Test – **REF** 5026-0001-00

ARK Methotrexat-Test, Roche® cobas c pack – **REF** 5026-0001-02

ARK Methotrexat-Test, Roche® cobas c pack grün – **REF** 5026-0001-03

Benötigte Materialien – nicht im Lieferumfang inbegriffen

ARK Methotrexat-Kalibrator – **REF** 5026-0002-00

Qualitätskontrollen – ARK Methotrexat-Kontrolle – **REF** 5026-0003-00

ARK Methotrexat-Verdünnungspuffer – **REF** 5026-0004-00

Geräte

Die Reagenzien **R1** und **R2** können vor der Verwendung in gerätespezifische Reagenzbehälter umgefüllt werden. Vermeiden Sie eine Kreuzkontamination von **R1** und **R2**.

Testabfolge

Informationen zur Durchführung bzw. zur Kalibrierung des Tests finden Sie im Benutzerhandbuch des betreffenden Gerätes.

Kalibrierung

Führen Sie eine vollständige 6-Punkt-Kalibrierung mit den ARK Methotrexat-Kalibratoren A, B, C, D, E und F durch. Testen Sie jeden Kalibrator in Zweifachbestimmung. Die Kalibrierung ist für jede neue Reagenzkit-Chargennummer erforderlich. Überprüfen Sie die Kalibrationskurve mit mindestens zwei Qualitätskontrollkonzentrationen entsprechend dem festgelegten Laborplan zur Qualitätssicherung.

Zeitpunkt der Neukalibrierung

- Immer dann, wenn eine neue Reagenz-Chargennummer verwendet wird.

- Wenn eine Neukalibrierung aufgrund der Ergebnisse der Qualitätskontrolle angezeigt ist.
- Wenn eine Neukalibrierung laut Standard-Laborprotokollen vorgeschrieben ist.

Qualitätskontrolle (QK)

Labore sollten Qualitätskontrollverfahren für den ARK Methotrexat-Test festlegen. Alle Anforderungen an die Qualitätskontrolle und alle Messungen sollten unter Berücksichtigung der lokalen, Landes- und Bundesvorschriften oder Akkreditierungsanforderungen durchgeführt werden.

In der Laborpraxis hat es sich bewährt, dass mindestens zwei Qualitätskontrollkonzentrationen (unterer und oberer medizinischer Entscheidungspunkt) an jedem Tag getestet werden, an dem Patientenproben gemessen werden und jedes Mal, wenn eine Kalibrierung durchgeführt wird. Überwachen Sie die Kontrollwerte auf Trends oder Verschiebungen. Wenn Sie Trends oder Verschiebungen erkennen oder eine Wiederfindung innerhalb des definierten Kontrollbereiches nicht möglich ist, prüfen Sie alle Betriebsparameter entsprechend den Qualitätsverfahren Ihres Labors. Kontaktieren Sie den Kundenservice für weitere Unterstützung.

Protokoll für manuelle Verdünnung

Der Messbereich des ARK Methotrexat-Tests beträgt 0,04 – 1,20 µmol/l. Proben und Kontrollen, die höhere Methotrexat-Konzentrationen enthalten (>1,20 µmol/l), können gemessen werden, indem die Proben bzw. Kontrollen durch Verdünnung in den Messbereich gebracht werden.

Verdünnen Sie Proben oder Kontrollen mit hoher Wirkstoffkonzentration manuell mit dem ARK Methotrexat-Verdünnungspuffer, indem Sie, wie unten gezeigt, die entsprechende 10-fache Serienverdünnung herstellen.

Proben-		Verdünnungs-	Verdünnung	Verdünnungs-
volumen		puffer-		-faktor
		Volumen		
50 µl	Unverdünnte Probe	450 µl	1:10	10
50 µl	1:10 Probe	450 µl	1:100	100
50 µl	1:100 Probe	450 µl	1:1000	1000
50 µl	1:1000 Probe	450 µl	1:10000	10000

$$\text{Manueller Verdünnungsfaktor} = \frac{(\text{Volumen der Probe} + \text{Volumen des Verdünnungspuffers})}{\text{Probenvolumen}}$$

Multiplizieren Sie das Testergebnis mit dem Verdünnungsfaktor.

9 Ergebnisse

Um $\mu\text{mol/l}$ in $\mu\text{g/ml}$ umzurechnen, dividieren Sie die erhaltenen Ergebnisse durch den Umrechnungsfaktor 2,2005.

10 Grenzen des Verfahrens

Dieser Test ist nur für die Nutzung mit Serum oder Plasma bestimmt; weitere Informationen finden Sie im Abschnitt **Probenentnahme und Vorbereitung für die Analyse**. Es hat sich allgemein in der Praxis bewährt, das gleiche Verfahren (und die gleiche Matrix) einheitlich für die einzelnen Patienten zu verwenden, da es möglich ist, dass Unterschiede zwischen verschiedenen Methoden existieren. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt **Erwartete Werte**.

Wie bei allen Analytbestimmungen sollten auch bei Methotrexat die Messwerte in Zusammenhang mit Informationen aus klinischen Untersuchungen und anderen diagnostischen Verfahren verwendet werden.

WICHTIG: Proben von Patienten, die Glucarpidase (Carboxypeptidase G2) notfallmäßig als Schutz gegen hohe Methotrexatkonzentrationen erhalten haben, sollten **nicht** mit dem ARK Methotrexat-Test gemessen werden. Diese Proben enthalten durch den Abbau von Methotrexat durch Glucarpidase eine erhöhte Serum-Konzentration von 4-[[2,4-Diamino-6-(pteridiny)methyl]-methylamino]-Benzoessäure (DAMPA).¹⁰⁻¹² DAMPA zeigt eine Kreuzreaktivität mit dem in diesem Test verwendeten Methotrexat-Antikörper. DAMPA kann mindestens fünf bis sieben Tage lang im Blut zirkulieren, bevor wieder präzise Methotrexat-Serumkonzentrationen gemessen werden können.¹³ Die klinischen Onkologen sollten das Labor informieren, wenn Glucarpidase eingesetzt wurde, um so die Weitergabe fälschlich erhöhter Methotrexatwerte infolge einer Interferenz mit DAMPA und somit die Störung einer Glucarpidase-Therapie zu vermeiden.¹³ Obwohl Glucarpidase meist gut vertragen wird und zirkulierendes Methotrexat schnell abbaut, kann eine verzögerte Eliminierung von MTX über die Niere dennoch Probleme bei erwachsenen und älteren Patienten verursachen.¹⁴

11 Erwartete Werte

Methotrexat-Serumkonzentrationen sind abhängig von der Indikation für den Einsatz, der Dosierung, der Art der Gabe, dem Behandlungsschema, der individuellen Pharmakokinetik, dem Metabolismus und anderen klinischen Faktoren.^{1,3} Während die Serumkonzentrationen zum Beispiel bei der Behandlung von Brustkrebs typischerweise bei ungefähr 10 bis 100 $\mu\text{mol/l}$ liegen, können bei einer Hochdosis-Therapie von Osteosarkomen Konzentrationen von über 1000 $\mu\text{mol/l}$ auftreten¹⁶, und während einer 4-

stündigen Infusion bei pädiatrischen Osteosarkom-Patienten wurden bis zu 3100 $\mu\text{mol/l}$ gemessen.¹⁷

Bei der Osteosarkom-Behandlung¹⁶ zeigt die Methotrexat-Zerfallskurve eine hohe Variabilität: 24 Stunden: 30 bis 300 $\mu\text{mol/l}$; 48 Stunden: 3 bis 30 $\mu\text{mol/l}$; 72 Stunden: $< 0,3 \mu\text{mol/l}$. Eine Dosis von 10 mg Leucovorin wird üblicherweise 24 Stunden nach Beginn der MTX-Infusion intravenös gegeben. Die anschließenden Dosierungen werden entsprechend den MTX-Konzentrationen nach 24, 48 und 72 Stunden angepasst und verabreicht: Methotrexat-Konzentrationen höher als 50 $\mu\text{mol/l}$ nach 24 Stunden, 10 $\mu\text{mol/l}$ nach 48 Stunden und 0,5 $\mu\text{mol/l}$ nach 72 Stunden weisen auf eine mögliche Toxizität hin und führen üblicherweise zu einer erhöhten Leucovorin-Dosis entsprechend dem Behandlungsalgorithmus, bis die MTX-Konzentration bei $<0,1 \mu\text{mol/l}$ liegt. In Richtlinien zur Methotrexat-Therapie mit Leucovorinschutz wird meist die Fortsetzung der Leucovorin-Gabe empfohlen, bis die Methotrexat-Konzentration unter 0,05 $\mu\text{mol/l}$ fällt.^{1, 9} Einige Zentren verwenden $\leq 0,10 \mu\text{mol/l}$ als Zielwert.^{16, 18}

Aus Gebrauchsinformationen und anderen Informationsquellen: Labor-Indikatoren für Toxizitäten nach Hochdosis-Methotrexatgaben mit Leucovorinschutz.^{1, 9, 19}

Klinische Situation	Laborwerte	
	Methotrexat-Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	Stunden nach Verabreichung
Normale Methotrexat-Eliminierung	~ 10	24
	~ 1	48
	$< 0,2$	72
Verzögerte späte Methotrexat-Eliminierung	$> 0,2$	72
	$> 0,05$	96
Verzögerte frühe Methotrexat-Eliminierung	≥ 50	24
	≥ 5	48
und/ oder	ODER	
Hinweise auf akute Nierenschäden	$\geq 100\%$ Zunahme von Serum-Kreatinin	24

Nephrotoxizität ist ein erhebliches Risiko und kann durch die gleichzeitige Verabreichung anderer Medikamente wie Vancomycin²⁰ verstärkt werden^{14, 19} Auch andere Toxizitäten können auftreten; hierzu zählen u.a. Störungen des Verdauungssystems (z.B. Übelkeit, Erbrechen, Schmerzen im Bauchraum), Haut-/Schleimhautstörungen (hauptsächlich Mukositis), hämatologische Abnormalitäten (z.B. Neutropenie und Thrombozytopenie), Störungen von Leberfunktionstests und Neutotoxizitäten.²¹⁻²⁸

Aufgrund des Erscheinungsprofils des Metaboliten 7-Hydroxymethotrexat^{15, 27}, seinem molaren Verhältnis zu Methotrexat, das bis zu dem ca. 100-fachen betragen kann²⁹, seiner im Vergleich zum Ursprungsmedikament relativen Unlöslichkeit^{14, 19} sowie der möglichen Nephrotoxizität durch Präzipitation des Metaboliten in den Nierenkanälen²⁹ kann möglicherweise der Abbau von Methotrexat verlangsamt sein.

Die Glucarpidase-Therapie (verfügbar für Compassionate Use) verringert schnell die Konzentration von zirkulierendem Methotrexat, aber nicht des intrazellulären Medikamentes, und eine Wiedezunahme von Methotrexat-Serumkonzentrationen nach Glucarpidase-Therapie wurde beobachtet.¹⁴ Die Eliminierung von DAMPA kann mehrere Tage dauern, bevor es die Überwachung von Methotrexat durch den Immunoassay nicht mehr stört.¹³

12 Spezifische Leistungsmerkmale

Jedem Labor obliegt die Überprüfung der Leistungsmerkmale mit den für das jeweilige Analysegerät festgelegten Geräteparametern. Die folgenden Leistungsmerkmale wurden auf einem Beckman Coulter AU680-System ermittelt.

Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantitation, LoQ)

Die folgenden Charakteristika wurden für den ARK Methotrexat-Test entsprechend CLSI EP17-A2 bestimmt. Die gerätespezifischen Leistungsmerkmale können variieren.

Kriterium	MTX-Konzentration (µmol/l)
Erfassungsgrenze (Limit of Blank, LoB); N = 60 µB + 1,645 SD , wobei SD = 0,002	0,00
Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD); N = 60 LoB + 1,652 SD, wobei SD = 0,012	0,02
Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantitation, LoQ); N = 40 LoQ – 2 SD > LoD	0,04

Jedes Labor ist dafür verantwortlich, Kriterien zur Herausgabe von Methotrexat-Werten festzulegen. Im Dokument CLSI EP17-A2 werden folgende Vorschläge gemacht:

Ergebnis \leq LoB	“nicht detektiert; Konzentration $<$ LoD”
LoB $<$ Ergebnis $<$ LoQ	“Analyt nachgewiesen; Konzentration $<$ LoQ”
Ergebnis \geq LoQ	Weitergabe des Ergebnisses wie gemessen

Messbereich

Der Messbereich des ARK Methotrexat-Tests beträgt 0,04 – 1,20 $\mu\text{mol/l}$. Proben, die höhere Methotrexat-Konzentrationen enthalten ($>1,20 \mu\text{mol/l}$), können gemessen werden, indem die Proben durch Verdünnung in den Messbereich der Kalibrationskurve gebracht werden. Messergebnisse, die höher als der LoD-Wert liegen, sollten wie unter **Nachweisgrenzen** beschrieben weitergegeben werden. Für Proben mit Methotrexat-Konzentrationen oberhalb des Messbereichs multiplizieren Sie das Testergebnis mit dem Verdünnungsfaktor.

Wiederfindung

Die Genauigkeit (analytische Wiederfindung) wurde durch Zusatz des konzentrierten Wirkstoffes Methotrexat zu Methotrexat-freiem Humanserum bestimmt. Eine Stocklösung konzentrierten, hochreinen Methotrexats wurde volumetrisch Methotrexat-freiem Humanserum zugesetzt, um Wirkstoffkonzentrationen im gesamten Messbereich zu erhalten. Sechs Replikate jeder Probe wurden auf einem automatisierten klinischen-chemischen Analysegerät gemessen. Aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert gebildet und die prozentuale Wiederfindung unter Berücksichtigung der Sollkonzentration berechnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

$$\text{Prozentuale Wiederfindung} = 100 \times \frac{\text{Mittlere wiedergefundene Konzentration}}{\text{Theoretische Konzentration}}$$

Theoretische Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	Wiedergefundene Konzentration Mittelwert ($\mu\text{mol/l}$)	Prozentuale Wiederfindung (%)
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

Mittlere prozentuale Wiederfindung: 104,2

Linearität

Es wurden Linearitätsstudien entsprechend den Empfehlungen des CLSI Protokolls EP6-A durchgeführt. Es wurde eine Serumprobe von 1,40 µmol/l vorbereitet und proportional mit Methotrexat-freiem Humanserum verdünnt. Der ARK Methotrexate Assay war linear zwischen 0,03 und 1,20 µmol/L. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

Theoretischer Wert (µmol/l)	Gemessener Wert (µmol/l)	Prognostizierte Ergebnisse 1. Ordnung	Prognostizierte Ergebnisse 2. Ordnung	Differenz (µmol/l oder %)
0,00	0,01	-0,002	0,010	k. A.
0,03	0,04	0,029	0,038	0,009 µmol/l
0,05	0,06	0,050	0,057	0,007 µmol/l
0,12	0,13	0,124	0,125	1,1 %
0,24	0,24	0,250	0,243	-2,7 %
0,36	0,36	0,375	0,363	-3,2 %
0,48	0,49	0,501	0,486	-3,0 %
0,72	0,72	0,753	0,740	-1,8 %
0,96	1,02	1,005	1,003	-0,2 %
1,20	1,27	1,257	1,277	1,6 %

Proben mit Methotrexat-Konzentrationen zwischen 2 und 1200 µmol/l wurden proportional in gepooltem Humanserum angesetzt und dann mit ARK Methotrexat-Verdünnungspuffer in den Messbereich verdünnt. Die Regression der gemessenen Methotrexat-Konzentrationen war über den gesamten Messbereich linear.

Methodenvergleich

Korrelationsstudien wurden nach dem CLSI EP9-A3 durchgeführt. Die Ergebnisse für den ARK Methotrexate Assay am Beckman Coulter AU680 wurden mit den Ergebnissen für den Roche/Hitachi 917 verglichen.

Die mit dem Roche/Hitachi 917 ermittelten Methotrexat-Konzentrationen lagen zwischen 0,04 und 1050 $\mu\text{mol/L}$ (μM). Die mit dem Beckman Coulter AU680 ermittelten Werte für den ARK Methotrexate Assay lagen zwischen 0,04 und 1070 $\mu\text{mol/L}$. Die Ergebnisse der Passing-Bablok³⁰-Regressionsanalyse für die Studie finden Sie weiter unten (mit einem Konfidenzintervall von 95 %), sowohl für die 112 Proben innerhalb des Messbereichs als auch für die 142 Proben im erweiterten Messbereich, die verdünnt werden mussten.

Parameter	Bereich 0,04 bis 1,11 μM		Bereich 0,04 bis 1050 μM	
Steigung	0,99	(0,96 bis 1,00)	1,00	(1,00 bis 1,02)
y-Schnittpunkt	0,00	(0,00 bis 0,01)	0,00	(0,00 bis 0,00)
Korrelationskoeffizient (r^2)	0,98	(0,97 bis 0,98)	1,00	(1,00 bis 1,00)
Anzahl Proben	112	k. A.	142	k. A.

Präzision

Die Präzision wurde bestimmt, wie im CLSI EP5-A3 beschrieben. Für die Studie wurden Methotrexat-Kontrollen mit sechs verschiedenen Konzentrationen und gepoolte Humanserumproben verwendet. Jede Probe wurde in Vierfachbestimmung zweimal pro Tag über 20 Tage lang gemessen. Zwischen den Messläufen eines Tages lagen mindestens zwei Stunden. Es wurden die SD-Werte innerhalb der Messläufe, Tag-zu-Tag, der Gesamt-SD-Wert und die prozentualen Variationskoeffizienten (VKs) berechnet. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst. Akzeptanzkriterien: $\leq 10\%$ Gesamt-VK bei $> 0,1 \mu\text{mol/l}$ und $\text{SD} \leq 0,01$ bei $\leq 0,1 \mu\text{mol/l}$.

Probe	N	Mittelwert ($\mu\text{mol/l}$)	Innerhalb der Messläufe		Tag-zu-Tag		Gesamt	
			SD	%VK	SD	%VK	SD	%VK
ARK Methotrexat-Kontrollen								
NIEDRIG	160	0,08	0,006	7,8	0,004	5,5	0,008	9,6
MITTEL	160	0,39	0,009	2,2	0,007	1,7	0,012	3,1
HOCH	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
Humanserum								
NIEDRIG	160	0,08	0,007	8,9	0,006	7,2	0,009	11,2
MITTEL	160	0,41	0,011	2,6	0,008	2,1	0,015	3,7
HOCH	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

Störende Substanzen

Interferenzstudien wurden nach dem CLSI EP7-A2 als Richtlinie durchgeführt. Getestet wurden klinisch hohe Konzentrationen der nachstehenden potenziell störenden Substanzen in Serum mit bekannten Methotrexat-Konzentrationen (ungefähr 0,05 und 0,50 µmol/l). Die Proben wurden mit dem ARK-Methotrexat-Test gemessen; zusätzlich wurde eine Methotrexat-Serumkontrolle getestet. Bei der Methotrexat-Bestimmung zeigten sich in Gegenwart der getesteten endogenen Substanzen bei den getesteten Konzentrationen keine wesentlichen Störungen.

Störende Substanz	Störende Substanz Konzentration	Methotrexat (~ 0,05 µmol/l)		Methotrexat (~ 0,50 µmol/l)	
		Serum-Kontrolle	Test	Serum-Kontrolle	Test (% Kontrolle)
Albumin	12 g/dl	0,05	0,05	0,48	0,50 (103,5)
Bilirubin – konjugiert	70 mg/dl	0,05	0,06	0,48	0,49 (101,4)
Bilirubin –unkonjugiert	70 mg/dl	0,05	0,05	0,48	0,48 (101,4)
Cholesterin	620 mg/dl	0,05	0,04	0,47	0,48 (103,2)
Gamma-Globulin	12 g/dl	0,05	0,06	0,48	0,49 (100,7)
Hämoglobin	1000 mg/dl	0,06	0,06	0,48	0,49 (101,4)
Rheumafaktor	1080 IE/ml	0,06	0,07	0,46	0,45 (96,7)
Triglyzeride	835 mg/dl	0,05	0,04	0,48	0,48 (98,6)
Harnsäure	30 mg/dl	0,05	0,06	0,48	0,49 (100,7)

Spezifität

Methotrexat-Abbauprodukte, Folat-Analoga und andere Komponenten mit struktureller Ähnlichkeit wurden getestet, um zu bestimmen, ob diese Verbindungen die Quantifizierung der Methotrexat-Konzentrationen mit dem ARK Methotrexat-Test beeinträchtigen. Hohe Konzentrationen dieser Verbindungen wurden Serumpools ohne Methotrexat oder mit 0,05 µmol/l bzw. 0,50 µmol/l Methotrexat zugesetzt. Die Proben wurden gemessen und die Methotrexat-Konzentration in der Probe mit der Störsubstanz mit der Methotrexat-Konzentration der Serumkontrolle verglichen.

Kreuzreaktivität mit 7-Hydroxymethotrexat, dem Hauptmetaboliten

Nach Verabreichung von Hochdosis-Methotrexat (HDMTX) liegt die Konzentration von 7-Hydroxymethotrexat im Serum/Plasma nach einiger Zeit häufig höher als die von Methotrexat. Es wurde gezeigt, dass 7-Hydroxymethotrexat-Konzentrationen 12 bis 48 Stunden nach der HDMTX-Gabe bis zu 100-fach höher liegen können als die Methotrexat-Konzentration.^{15, 27, 29, 31, 33-34}

Kreuzreaktivität mit 7-Hydroxymethotrexat bei der Messung von Methotrexat mit dem ARK Methotrexat-Test wurde bestimmt, indem Proben paarweise gemessen wurden, die (1) 0,05 µmol Methotrexat und 5 µmol/l 7-Hydroxymethotrexat bzw. (2) 0,50 µmol/l Methotrexat und 50 µmol/l 7-Hydroxymethotrexat in Humanserum enthielten.

Der ARK Methotrexat-Test wie keine Kreuzreaktion ($\leq 0,1\%$) mit dem Hauptmetaboliten 7-Hydroxymethotrexat auf.

Kreuzreaktivität mit 4-[[2,4-Diamino-6-(pteridinyl)methyl]-methylamino]-Benzoesäure (DAMPA)

DAMPA wird als ein Neben-Abbauprodukt von Methotrexat nicht in Konzentrationen in der Zirkulation erwartet, die mit der Messung von Methotrexat interferieren.³² Nach einer Therapie mit Glucarpidaseschutz kann die DAMPA-Konzentration im Serum allerdings erheblich erhöht sein.^{13,14} Der ARK Methotrexat-Test zeigt eine beträchtliche Kreuzreaktivität mit dem Neben-Abbauprodukt DAMPA. Bei Tests, die in Abwesenheit der Ursprungssubstanz Methotrexat durchgeführt wurden, laut den ermittelten Daten lag die Kreuzreaktivität zu DAMPA zwischen 76,3% und 100%. Der Test sollte nicht verwendet werden, wenn möglicherweise eine Compassionate-Therapie mit Glucarpidase (Carboxypeptidase G2) durchgeführt wird, durch die zirkulierendes Methotrexat schnell in DAMPA umgesetzt wird.

Kreuzreaktivität mit Medikamenten

Der ARK Methotrexat-Test zeigt eine leichte Kreuzreaktivität mit Triamteren und Trimethoprim; diese Medikamente sind jedoch durch eine Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen für die Verabreichung während einer MTX-

Krebstherapie kontraindiziert. Die Strukturen dieser Komponenten haben große strukturelle Ähnlichkeit mit dem Methotrexat-Pteridin-Rest. In Abwesenheit von Methotrexate wurde eine Kreuzreaktivität zu Triamteren (1,15%) und Trimethoprim (0,01%) beobachtet. In Gegenwart von Methotrexate ergab sich aus den ermittelten Daten eine Kreuzreaktivität zu Triamteren ($\leq 3,3\%$) und Trimethoprim ($\leq 0,5\%$).

Kreuzreaktivität mit Folatanaloga und anderen Verbindungen

Der ARK Methotrexat-Test zeigte bei $\geq 1000 \mu\text{mol/l}$ keine Kreuzreaktivität ($\leq 0,01\%$) mit den getesteten Folatanaloga und anderen getesteten Verbindungen.

Verbindung	Getestet ($\mu\text{mol/l}$)
Adriamycin	1000
Cyclophosphamid	1500
Cytosin	1000
Dihydrofolsäure	1000
DL-6-Methyl-5,6,7,8-Tetrahydropterin	1000
Folsäure	1000
Folinsäure (Leucovorin)	1000
5-Fluoruracil	3000
6-Mercaptopurin	1000
5-Methyltetrahydrofolsäure	1000
Prednisolon	1000
Pyrimethamin	1000
Sulfamethoxazol	1600
Tetrahydrofolsäure	1000
Vinblastin	1000
Vincristin	1000

13 Literatur

1. Gebrauchsinformation. 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) Gebrauchsinformation. 2008. Spectrum Pharmaceuticals, Inc. Irvine, CA.
10. Chabner, B. A. et al. 1972. Enzymatic cleavage of methotrexate provides a method for prevention of drug toxicity. *Nature* **239**:395 – 397.
11. Widemann, B. C. et al. 1995. Carboxypeptidase-G2 rescue in a patient with high dose methotrexate-induced nephrotoxicity. *Cancer* **76**:521 – 526.
12. Buchen, S. et al. 2005. Carboxypeptidase G2 rescue in patients with methotrexate intoxication and renal failure. *British Journal of Cancer* **92**:480 – 487.

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

26. Flombaum, C. D. and Meyers, P. A. 1999. High-Dose Leucovorin as Sole Therapy for Methotrexate Toxicity. *J Clin Oncol* **17**:1589 – 1594.
27. Collier, C. P. et al. 1982. Analysis of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate by high-performance liquid chromatography and preliminary clinical studies. *Ther Drug Monit* **4**:371 – 380.
28. Widemann, B. C. et al. 2010. Glucarpidase, leucovorin, and thymidine for high-dose methotrexate-induced renal dysfunction: clinical and pharmacologic factors affecting outcome. *J Clin Oncol* **28**:3979 – 3986.
29. Erttmann, R. et al. 1985. 7-Hydroxy-Methotrexate and Clinical Toxicity Following High-Dose Methotrexate Therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* **109**:86 – 88.
30. Bablok, W. et al. 1988. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part III. *J. Clin Chem Clin Biochem* **26**:783 – 790.
31. Jacobs, S. A. et al. 1976. 7-Hydroxymethotrexate as a urinary metabolite in human subjects and rhesus monkeys receiving high dose methotrexate. *J Clin Invest* **57**:534 – 538.
32. Wolfrom, C. et al. 1990. Pharmacokinetic study of methotrexate, folinic acid and their serum metabolites in children treated with high-dose methotrexate and leucovorin rescue. *Eur J Clin Pharmacol* **39**:377 – 383.
33. Belz, S. et al. 1994. High-performance liquid chromatographic determination of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, 5-methyltetrahydrofolic acid and folinic acid in serum and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B Biomed Appl* **661**:109 – 118.
34. Breithaupt, H. and Kuenzlen, E. 1982. Pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate following infusions of high dose methotrexate. *Cancer Treat Rep* **66**:1733 – 1741.

14 Warenzeichen

ARK[™] ist ein Warenzeichen von **ARK** Diagnostics, Inc.

Sonstige Marken- oder Produktnamen sind Warenzeichen der betreffenden Inhaber.



ARK Diagnostics, Inc.
Fremont, CA 94538 USA

Überarbeitet August 2020
1600-0213-00DE Rev 08