

QUY TRÌNH

23.229.(21).QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG METHOTREXATE

I. NGUYÊN LÝ

Methotrexate (MTX, amethopterin) là chất chống chuyển hóa folate. Có cấu trúc tương tự như aminopterin – cũng có dẫn xuất từ acid folic. Cấu trúc phân tử của Methotrexate khác với acid folic ở điểm nó có nhóm hydroxyl thay vì nhóm 4-amino trên vòng pteridine và không có nhóm methyl tại vị trí N.

Methotrexate là thuốc chống ung thư sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với các loại thuốc chống ung thư khác cho điều trị bệnh bạch cầu và các bệnh khác. Methotrexate ở liều thấp tương đối đã được sử dụng trong điều trị bệnh không ác tính như bệnh vẩy nến nặng, hen suyễn, viêm khớp dạng thấp, sarcoidosis, liệu pháp cấy ghép. Liều trung bình đến cao của Methotrexate với việc giải cứu leucovorin đã cho kết quả khả quan trong điều trị sarcoma tạo xương, bệnh bạch cầu, non – Hodgkin, lymphoma, ung thư ngực và phổi.

Mức nồng độ Methotrexate được theo dõi để tránh tình trạng ngộ độc do quá liều và xác định thời điểm can thiệp với liệu pháp “giải cứu leucovorin”. Phản ứng phụ bao gồm suy tủy, viêm miệng, buồn nôn, nôn, co giật, bất thường ở gan và thận, thiếu máu, giảm bạch cầu, giảm tiểu cầu, loãng xương, ngộ độc thần kinh, bệnh lý chất trắng. Hiện tại không có chỉ định cho sử dụng liệu pháp Methotrexate liều thấp.

Xét nghiệm Methotrexate là xét nghiệm miễn dịch vi hạt hóa phát quang (CMIA) để định lượng methotrexate trong huyết thanh hay huyết tương người trên hệ thống ARCHITECT i System. Nồng độ xác định giúp theo dõi mức nồng độ methotrexate để đảm bảo điều trị thích hợp. Mẫu thử, Anti- Methotrexate phủ lên vi hạt thuận từ, dung dịch pha loãng đặc hiệu và chất kết hợp Methotrexate có đánh dấu acridinium - được kết hợp lại để tạo nên hỗn hợp phản ứng. Anti- Methotrexate phủ lên các vi hạt thuận từ gắn với Methotrexate hiện diện trong mẫu và chất kết hợp có đánh dấu acridinium. Sau khi rửa, dung dịch Pre-trigger và Trigger được thêm vào hỗn hợp phản ứng. Kết quả phản ứng miễn dịch hóa phát quang được tính bằng các đơn vị ánh sáng tương đối (RLUs). Sự tương quan tỉ lệ nghịch giữa lượng Methotrexate trong mẫu và RLUs được bộ phận quang học trong máy ARCHITECT phát hiện.

II. CHUẨN BỊ

1. Cán bộ thực hiện: 01 Bác sỹ hoặc 01 cán bộ đại học và 01 kỹ thuật viên chuyên ngành Hóa sinh.

2. Phương tiện, hóa chất

2.1. Phương tiện

Máy có thể phân tích: Architect plus Ci8200, hãng Abbott

Máy ly tâm, Pipet các loại, Ống nghiệm, giá đựng ống nghiệm

Tủ lạnh để bảo quản hóa chất, chất hiệu chuẩn, QC và mẫu bệnh phẩm

2.2. Hóa chất

Thuốc thử bao gồm: Hóa chất chuẩn, hóa chất được ổn định đến ngày ghi trên nắp hộp với điều kiện không mở nắp và bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C. Độ ổn định sau khi mở, bảo quản 2-8°C trong lọ đóng kín là hai tuần.

2.3. Các dụng cụ tiêu hao khác

Ống nghiệm; Bông, cồn sát trùng, bơm tiêm hoặc kim lấy máu, dây ga rô.

Găng tay, nước rửa tay, khăn lau tay, khẩu trang;

3. Người bệnh

Cần giải thích mục đích của xét nghiệm để bệnh nhân và người nhà bệnh hiểu, từ đó có thể hợp tác trong quá trình lấy máu.

4. Phiếu xét nghiệm: có đầy đủ thông tin về bệnh nhân bao gồm họ tên, tuổi, khoa phòng, chẩn đoán, tình trạng mẫu, tên BS chỉ định, ngày giờ chỉ định, ngày giờ lấy mẫu, các loại thuốc đã sử dụng (nếu có)...

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy mẫu bệnh phẩm và xử lý mẫu:

- Bệnh phẩm phải được lấy đúng kỹ thuật vào ống xét nghiệm tiêu chuẩn. Có thể sử dụng ống không chống đông hoặc ống có chất chống đông bằng Li- Heparin.

- Bệnh phẩm được nhận từ các khoa lâm sàng và bộ phận lấy mẫu phòng khám. Nhân viên nhận mẫu lấy thông tin bệnh nhân từ phần mềm quản lý Bệnh viện, in và dán barcode vào ống bệnh phẩm, sau đó cho ly tâm 4000 vòng trong 5 phút trước khi tiến hành kỹ thuật.

- Mẫu nên được bảo quản tránh ánh sáng. Mẫu ổn định 1 ngày tại nhiệt độ phòng. Bảo quản huyết thanh/huyết tương ở 2- 8°C trong vòng 14 ngày, ở -20°C được 45 ngày. Rã đông 1 lần. Để bệnh phẩm, chất chuẩn, QC ở nhiệt độ phòng (20-25°C) và lắc đều trước khi tiến hành xét nghiệm.

- Không sử dụng các mẫu sau: Mẫu bị bất hoạt nhiệt, bị trộn lẫn, tiêu huyết, bị nhiễm khuẩn.

- Để kết quả chính xác, huyết tương/huyết thanh người không nên có fibrin, hồng cầu và những vật thể lạ khác. Mẫu huyết tương từ bệnh nhân có kháng đông hoặc điều trị tan huyết khối có thể chứa fibrin do quá trình đông máu chưa hoàn tất.

2. Tiến hành kỹ thuật

Máy xét nghiệm, hóa chất đã được chuẩn trước khi thực hiện phân tích. Cần chuẩn lại sau 7 ngày hoặc khi thay đổi lô hóa chất. Kiểm tra chất lượng nằm trong giới hạn cho phép. Hàng ngày, chạy nội kiểm (QC) 2 mức: mức bình thường và không bình thường. Đối chiếu với luật về kiểm tra chất lượng nếu đạt thì tiến hành phân tích mẫu .

2.1. Hiệu chuẩn (Calibration)

- Thực hiện chạy lặp lại mẫu chuẩn A-F. Nên ưu tiên nạp mẫu chuẩn trước.

- Kiểm tra một mẫu ở mỗi nồng độ của mẫu chứng Architect Methotrexate TP để đánh giá thử nghiệm hiệu chuẩn. Phải bảo đảm mức nồng độ mẫu chứng (control) nằm trong phạm vi chấp nhận. Khoảng hiệu chuẩn: 0.000- 1.500 $\mu\text{mol/L}$ (0.000- 0.82 $\mu\text{g/mL}$).

- Khi đường cong hiệu chuẩn Methotrexate được chấp nhận và lưu lại, không cần thực hiện hiệu chuẩn cho tất cả các mẫu xét nghiệm sau đó, trừ khi:

+ Sử dụng lô thuốc mới

+ Kết quả QC nằm ngoài khoảng cho phép

2.2. Kiểm tra chất lượng (QC)

Theo khuyến cáo, chạy một mẫu chứng ở mỗi nồng độ (thấp, trung bình và cao) mỗi 24h. Mỗi phòng xét nghiệm nên thành lập khoảng giá trị mẫu chứng. Nếu mẫu chứng vượt ngưỡng, kết quả xét nghiệm liên quan sẽ không được chấp nhận và phải kiểm tra máy và thuốc chuẩn lại. Có thể tiến hành hiệu chuẩn lại.

Nếu giá trị mẫu chứng đã pha loãng vượt ngưỡng, kết quả sẽ không được chấp nhận. Mẫu thử và mẫu chứng phải chuẩn bị lại.

2.3. Thực hiện chạy mẫu: Đưa bệnh phẩm vào phân tích theo protocol của máy. Khi có kết quả thí phân tích và đối chiếu với phiếu xét nghiệm, trả, lưu kết quả vào hệ thống mạng, in phiếu kết quả xét nghiệm và trả kết quả cho người bệnh đúng thời gian quy định.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. **Đơn vị mặc định của phương pháp** là $\mu\text{mol/L}$.

Để chuyển đổi kết quả từ $\mu\text{mol/L}$ sang $\mu\text{g/mL}$:

Công thức chuyển đổi: $\text{Nồng độ } \mu\text{mol/L} \times 0,45444 = \mu\text{g/mL}$

- Khoảng đo: $0.040 \mu\text{mol/L}$ (LOQ) - $1.500 \mu\text{mol/L}$ ($0.018 - 0.682 \mu\text{g/mL}$).

2. Giá trị mong đợi

Không có mối quan hệ chính xác giữa nồng độ Methotrexate trong huyết thanh và hiệu quả chống ung thư, mặc dù mức nồng độ dưới xấp xỉ $0.02 \mu\text{mol/L}$ được cho là cần cho sự tổng hợp DNA. Sự tương quan giữa nồng độ huyết thanh Methotrexate và thời lượng tế bào khối u tiếp xúc với nó đã được chứng minh để dự đoán độc tính Methotrexate.

Điều trị nồng độ cao Methotrexate với phương pháp giải cứu leucovorin, bệnh nhân với nồng độ Methotrexate 24h trong huyết thanh $> 10 \mu\text{mol/L}$, 48h $> 1.0 \mu\text{mol/L}$ và 72h $> 0.1 \mu\text{mol/L}$ làm tăng nguy cơ nhiễm độc.

Độc tính thường xuất hiện trong sự tạo thành ức chế myelo, viêm miệng, buồn nôn, nôn, co giật và bất thường ở gan, thận. Thiếu máu, giảm bạch cầu, giảm tiểu cầu, loãng xương, da và niêm mạc với kết quả tử vong cũng đã được báo cáo. Độc tính thần kinh và bệnh lý chất trắng cũng được báo cáo như tác dụng phụ liên quan đến Methotrexate.