

Instructions for use



Sanquin Reagents B.V.
Plesmanlaan 125
1066 CX Amsterdam
The Netherlands

Phone: +31 20 5123599
Fax: +31 20 5123570
Reagents@sanquin.nl
www.sanquin.org/biologics

MabTrack level infliximab

REF M2920

IVD CE

96

308_v07 04/2022 (da)

Kun til professionelt brug

ELISA til kvantitativ måling af indholdet af lægemidlet infliximab

Ab	BUF	CAL	CONJ	HRP
Antistoffer mod	Buffer	Kalibrator	Konjugat	HRP

HUM	IFX	MOU	REK	TNF
Human	Infliximab	Mus	Rekombinant	TNF

WELL	≥ - ≤
Well	Interval

På-tænkt anvendelse

MabTrack-niveau infliximab er en enzymforbundet immunanalyse (ELISA) til hurtig, reproducerbar og specifik kvantitativ bestemmelse af alle lægemidler med det aktive stof infliximab i humane plasma- og serumprøver.

Generel information

Det terapeutiske antistof infliximab påvirker tumornekrosefaktoren (TNF) og administreres hyppigt til patienter, der lider af reumatoid arthritis, tarmsygdomme, hudsygdomme og cancer. TNF spiller en vigtig rolle ved inflammation og forårsager f.eks. smerter, hævede led og stivhed hos patienter med reumatoid arthritis. Hæmning af TNF menes derfor at lindre nogle af disse symptomer og dermed forbedre patienternes livskvalitet. Plasma- og serumniveauer af TNF-hæmmere varierer kraftigt blandt patienterne og korrelerer tydeligt med patienternes kliniske symptomer. Hos ca. 8%-43% af patienter, der behandles med infliximab, dannes der antistoffer direkte mod infliximab. Dette kan delvist hindre TNF-hæmmerens funktion og kan forårsage en reduktion af plasmakoncentrationen af TNF-hæmmeren. Identifikation af lægemiddelindholdet kan være vigtig ved patientjusterede behandlingsplaner, da et lavt indhold ofte er indikation for dannelse af antistoffer mod infliximab. Derudover kan et lavt indhold være tegn på, at infliximab ikke virker effektivt inden rebound af kliniske symptomer. Som alternativ foreslås det, at doseringen af infliximab til patienter, der reagerer godt på infliximab, kan reduceres i overensstemmelse med serumkoncentrationerne. Test af lægemiddelindholdet kan derfor hjælpe med at tilpasse medicineringen eller skifte til en anden TNF-hæmmer. Denne infliximab level ELISA er blevet udviklet med henblik på hurtig, reproducerbar og specifik kvantitativ bestemmelse af infliximab-koncentrationer i plasma og serum.

Klinisk optimale intervaller, f.eks. terapeutiske intervaller, blev bestemt hos Sanquin Diagnostic Services med infliximab ELISA for reumatoid arthritis, der skal være mindst 3,0 µg/mL (Van de Bemt *et al.* 2013). For colitis ulcerosa er det optimale område 3-7 µg/mL (Vande Casteele *et al.*).

Mabtrack level infliximab sættet på er kalibreret efter WHO's internationale standard, der sælges af National Institute for Biological Standards and Control (#16/170).

Principper for testen

MabTrack level infliximab ELISA er en "sandwichtype" enzym-immunoassay. TNF indfanges i mikrotiterpladerne af monoklonale antistoffer belagt i mikrotiterbrønde af polystyren. Infliximab i prøven, kalibrator eller kontrollerne binder sig til TNF i mikrotiterpladen. Ubundet materiale fjernes derefter ved vask. Derefter tilføjes et peberrod-peroxidase-mærket monoklonalt antistof mod lægemidlet. Antistoffet binder sig til det infliximab/TNF/anti-TNF-kompleks, der er til stede i mikrotiterbrønden. Når ubundet HRP-konjugat er fjernet ved vask, tilsættes der substratopløsning til brøndene. Et farvet produkt dannes i proportion til den mængde infliximab, der er til stede i prøven, kalibratoren og kontrollerne. Når reaktionen afsluttes ved tilsætning af en stopopløsning, måles absorbansen i en mikrotiterpladelæser. Ud fra absorbansen i prøverne og kalibratorkurven kan koncentrationen af infliximab bestemmes ved interpolation med kalibratorkurven.

Pakkens indhold

Mouse-anti-TNF/recombinant TNF pre-coated microtiter plate	12 x 8 brønde	-	REF M2911	klar til brug
Calibrator 1-6	6 x 1 mL	sorte hætter	REF M2922	klar til brug
Control 1	1 x 1 mL	gennemsigtig hætte	REF M2923	klar til brug, terapeutisk interval
Control 2	1 x 1 mL	gennemsigtig hætte	REF M2924	klar til brug, terapeutisk interval
Human anti-infliximab HRP-conjugate	1 x 12,5 mL	brun flaske	REF M2925	klar til brug
Wash buffer stock solution	1 x 50 mL	hvid flaske	REF M1805	fortyndes 1:20 i destilleret vand
HPE dilution buffer	1 x 50 mL	hvid flaske	REF M2940	klar til brug
TMB substrate solution	1 x 12,5 mL	brun flaske	REF M1821	klar til brug

Stop solution 0,18 M H ₂ SO ₄	1 x 13,0 mL	hvid flaske	REF M1823	klar til brug
Plate seals	10 x	-	-	-

- Den fladbundede mikrotiterplade består af 12 strimler med 8 brugsklare brønde. Alle brøndene er belagt med TNF-specifikt monoklonalt antistof fra mus og rekombinant TNF. Mikrotiterpladen er vakuumsforseglet i en plastikpose indeholdende tørremiddel. Analysesættet giver mulighed for at bruge mikrotiterpladen flere gange. Afgør det antal strimler, der skal bruges til antallet af prøver, plus 8 brønde, der skal bruges til at køre kalibratorer og kontroller. Fjern strimler, der ikke skal anvendes, fra mikrotiterpladen, og pak dem ind igen i plastikposen med tørremiddel.
- Efter åbning kan alle reagenser og mikrotiterpladestrimlerne bruges i ≤ 6 uger, hvis de opbevares ved 2-8 °C.
- Se vedlagte informationsseddel vedrørende specifikke infliximab-koncentrationer i kalibrator 1-6 og i kontrol 1 og kontrol 2.

Yderligere materialer og/eller udstyr

- Destilleret eller deioniseret vand.
- Kalibrerede pipetter (5-1000 µL).
- Multikanalspipette (30-300 µL).
- Målebægre, kolber, cylinderflasker og væskebeholdere til forberedelse af reagenser.
- Mikrotiterpladelæser (til læsning af OD ved 450 nm).

Forholdsregler

Kun til in-vitro-diagnose. Reagenserne bør opbevares ved 2–8 °C. Utætte eller beskadigede flasker må ikke bruges. Reagenser (uåbnede eller åbenede) må ikke anvendes efter den udløbsdato, der er trykt på flaskens etiket. Det kan ikke antages, at reagenterne er fri for smittefarlige stoffer. Man skal være forsigtig ved brugen og bortskaffelsen af alle beholdere og deres indhold. Bortskaffelsen af spild efter fuldførelse af testen skal udføres i henhold til laboratoriets regulativer.

Testprocedure

Indsamling og forberedelse af prøver

1. Der skal anvendes prøver med dalværdier til at måle koncentrationen af infliximab. Derfor skal prøver tages senest 24 timer INDEN, at lægemidlet injiceres, for at sikre, at de angivne, forventede niveauer afspejler dalværdien for patienten.
2. Der må kun anvendes serum og EDTA plasma i analysen.
3. Separer plasma eller serum fra blodcellerne senest 4 timer efter prøvetagning og udfør analyserne med det samme. Hvis analyse af prøverne udsættes, kan de opbevares ved 2-8 °C i 72 timer. Hvis prøverne ikke analyseres inden for 72 timer, skal de nedfryses. De kan opbevares nedfrosne ved ≤ -18 °C i 12 måneder.
4. Opmål prøverne i portioner for at undgå, at de nedfryses og optøs flere gange.
5. Inden analyse skal frosne prøver optøs ved stuetemperatur. Der må ikke anvendes vandbad ved 37 °C eller 56 °C til optøning.
6. Prøverne skal blandes, inden der forberedes fortyndinger.

Prøvefortynding

1. Enkeltbestemmelser af patientprøver kan bruges, når målingerne udføres på godkendte protokoller på automatiserede ELISA-systemer. Ved manuel testning anbefales det at udføre dobbeltbestemmelser for hver prøve.
2. Der kan anvendes en fortynding i forholdet 1:1500 i denne analyse til at måle infliximab-niveauet hos patienter.
3. Hvis prøvekoncentrationen er for høj til at opnå en præcis koncentration, skal testen gentages med en prøvefortynding i forholdet 1:2000 for at få et pålideligt resultat.
4. Hvis koncentrationen af prøven er for lav til at opnå en præcis koncentration, skal testen gentages med en prøvefortynding i forholdet 1:200 for at få et pålideligt resultat.

Fortynding	Prøvetype	HPE-volumen
1:50	5 µL ufortyndet patientprøve	245 µL
1:200	50 µL 1:50 for-fortyndet patientprøve	150 µL
1:1500	10 µL 1:50 for-fortyndet patientprøve	290 µL
1:2000	5 µL 1:50 for-fortyndet patientprøve	195 µL

Forberedelse af brugsklar vaskebufferopløsning

Forbered en brugsklar opløsning ved at tilsætte 50 mL stamopløsning af vaskebufferen (hele indholdet af en flaske) til 950 mL destilleret vand. Den brugsklare opløsning kan opbevares i op til 2 måneder ved 2-8 °C.

Forberedelse af ELISA-testproceduren

1. Lad alle reagenser få stuetemperatur (18-25 °C).
2. Hele analysen skal udføres ved stuetemperatur (18-25 °C), uden at prøverne omrystes.
3. Brøndene må ikke stå utildækkede eller udtørrede i længere tid mellem inkubationstrinene.
4. Fjern forsigtigt alle luftbobler fra brøndene inden inkubation.
5. Undgå krydskontaminering ved at bruge engangspipettespidser ved hver overførsel og nye pladeforseglinger ved hvert inkubations-/fikseringstrin i ELISA-eksperimentet.
6. Bland alle reagenser grundigt, men forsigtigt inden brug (uden dannelse af skum).

Udførelse af ELISA-testproceduren

1. Tag mikrotiterpladen med det påkrævede antal mikrotiterpladestrimler ud af posen. De ubrugte strimler kan opbevares i plastikposen med tørremiddel.
2. Klargør vaskebufferen og prøverne ifølge protokollen.
3. Tilsæt 100 μ L pr. brønd af kalibratorer, kontroller eller fortyndede patientprøver i overensstemmelse med det foreslåede layout for mikrotiterpladen eller dit eget layout. Luk hætteglassene med kalibratorer og kontroller efter brug for at forhindre fordampning.
4. Dæk mikrotiterpladen til med klæbeforsegling, og inkuber i 1 time.
5. Aspirer supernatanter fra brønde, fyld hver brønd med 250 μ L fortyndet vaskebuffer. Lad vaskebufferen i hver brønd stå i 30-60 sekunder pr. vaskecyklus, og tøm derefter brøndene. Efter (manuel og automatisk) vask skal al væske tømmes af mikrotiterpladen ved at banke den let mod sugepapir med åbningerne nedad for at fjerne alle rester af vaskebuffer. Gentag dette fire gange. Efter den sidste vask skal brøndene være tørre!
6. Tilsæt 100 μ L anti-infliximab HRP-konjugat i hver brønd.
7. Dæk mikrotiterpladen til med klæbeforsegling, og inkuber i 1 time.
8. Aspirer supernatanter fra brønde, fyld hver brønd med 250 μ L fortyndet vaskebuffer. Lad vaskebufferen i hver brønd stå i 30-60 sekunder pr. vaskecyklus, og tøm derefter brøndene. Efter (manuel og automatisk) vask skal al væske tømmes af mikrotiterpladen ved at banke den let mod sugepapir med åbningerne nedad for at fjerne alle rester af vaskebuffer. Gentag dette fire gange. Efter den sidste vask skal brøndene være tørre! Gentag dette fire gange. Efter den sidste vask skal brøndene være tørre!
9. Tilsæt 100 μ L TMB-substratopløsning i hver brønd.
10. Inkuber mikrotiterpladen i mørke. Den må ikke rystes. Kontroller farvedannelsen hvert 5. minut. Når den blå farve er dannet i de positive brønde, og de blinde stadig er farveløse, skal reaktionen stoppes. Den gennemsnitlige inkubationstid er 10 ± 1 minut.
11. Stop reaktionen ved at tilsætte 100 μ L stopopløsning i hver brønd.
12. Mål mikrotiterpladen i en ELISA-læser ved 450 nm. Læs pladen inden for 30 minutter efter tilsætning af stopopløsningen. Der må anvendes en anden bølgelængde på 540-620 nm som reference under målingen.

Foreslået layout af mikrotiterpladen

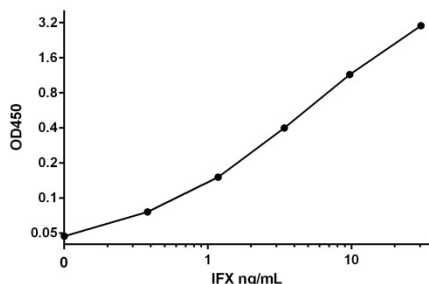
Kalibreringskurven og kontrollerne skal inkluderes i hver kvantitativ analysekørsel. De kan udføres på en enkelt række. De medfølgende reagenser giver brugeren mulighed for at bruge mikrotiterpladen i en til maks. fire kørsler. Det foreslåede mikrotiterplade-layout er til en enkelt kørsel.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	prøve 1 FORT 1	prøve 5 FORT 1	prøve 9 FORT 1	prøve 13 FORT 1	prøve 17 FORT 1	prøve 21 FORT 1	prøve 25 FORT 1	prøve 29 FORT 1	prøve 33 FORT 1	prøve 37 FORT 1	prøve 41 FORT 1
B	CAL2	prøve 1 FORT 1	prøve 5 FORT 1	prøve 9 FORT 1	prøve 13 FORT 1	prøve 17 FORT 1	prøve 21 FORT 1	prøve 25 FORT 1	prøve 29 FORT 1	prøve 33 FORT 1	prøve 37 FORT 1	prøve 41 FORT 1
C	CAL3	prøve 2 FORT 1	prøve 6 FORT 1	prøve 10 FORT 1	prøve 14 FORT 1	prøve 18 FORT 1	prøve 22 FORT 1	prøve 26 FORT 1	prøve 30 FORT 1	prøve 34 FORT 1	prøve 38 FORT 1	prøve 42 FORT 1
D	CAL4	prøve 2 FORT 1	prøve 6 FORT 1	prøve 10 FORT 1	prøve 14 FORT 1	prøve 18 FORT 1	prøve 22 FORT 1	prøve 26 FORT 1	prøve 30 FORT 1	prøve 34 FORT 1	prøve 38 FORT 1	prøve 42 FORT 1
E	CAL5	prøve 3 FORT 1	prøve 7 FORT 1	prøve 11 FORT 1	prøve 15 FORT 1	prøve 19 FORT 1	prøve 23 FORT 1	prøve 27 FORT 1	prøve 31 FORT 1	prøve 35 FORT 1	prøve 39 FORT 1	prøve 43 FORT 1
F	CAL6 = blank	prøve 3 FORT 1	prøve 7 FORT 1	prøve 11 FORT 1	prøve 15 FORT 1	prøve 19 FORT 1	prøve 23 FORT 1	prøve 27 FORT 1	prøve 31 FORT 1	prøve 35 FORT 1	prøve 39 FORT 1	prøve 43 FORT 1
G	CTRL 1	prøve 4 FORT 1	prøve 8 FORT 1	prøve 12 FORT 1	prøve 16 FORT 1	prøve 20 FORT 1	prøve 24 FORT 1	prøve 28 FORT 1	prøve 32 FORT 1	prøve 36 FORT 1	prøve 40 FORT 1	prøve 44 FORT 1
H	CTRL 2	prøve 4 FORT 1	prøve 8 FORT 1	prøve 12 FORT 1	prøve 16 FORT 1	prøve 20 FORT 1	prøve 24 FORT 1	prøve 28 FORT 1	prøve 32 FORT 1	prøve 36 FORT 1	prøve 40 FORT 1	prøve 44 FORT 1

Resultater

1. Enhver intern eller online tilgængelig softwaremetode kan anvendes til beregning af koncentrationer. Brug en ikke-lineær regressionsanalyse til kurvetilpasning. Det anbefales at anvende en logistisk regressionsanalyse med fire parametre (4PL), men en logistisk regressionsanalyse med fem parametre (5PL) eller kurvetilpasning vha. tredjegradspolynomium kan også anvendes. Der gives en generel metode til beregning i hånden.
2. Noter absorbansen ved 450 nm for hver brønd indeholdende en kalibrator.
3. Plot absorbansen på Y-aksen på en lineær skala, og plot infliximab-koncentrationen i kalibratorprøven på X-aksen på en logaritmisk skala, og indtegn den kurve, der passer bedst.
4. Noter absorbansen ved 450 nm for hver brønd indeholdende en specifik prøve.
5. Lokaliser den gennemsnitlige nettoabsorbansværdi, der findes for hver prøve på den lodrette akse og følg en vandret linje, til den skærer kalibratorkurven.
6. Tegn en vertikal linje fra skæringspunktet på kalibratorkurven mod X-aksen.
7. Ved skæringspunktet med X-aksen aflæses infliximab-koncentrationen på den vandrette akse.
8. Gang den opnåede infliximab-koncentration med fortyndingsforholdet for prøven. Dette er den faktiske koncentration af infliximab i prøven. Der skal anvendes et fortyndingsforhold på 1:1500 for kontrol 1 og kontrol 2.
9. Beregn gennemsnittet af begge duplikatværdier for prøven.

Eksempel på standardkurve efter 10 minutters farvedannelse:



Fortolkning

Den optimale terapeutiske koncentration af infliximab afhænger af sygdommen i kombination med patientens specifikke karakteristika. Hvis Level-testen udføres til diagnostiske formål og/eller for at fastlægge patientens behandlingsplan, må den fundne koncentration aldrig udgøre en definitiv diagnose, men skal anses som indikation for den kliniske situation, der muligvis vil kræve yderligere diagnostisk undersøgelse. De kliniske parametre skal bruges sammen med infliximab-koncentrationen i beslutningsprocessen. Derudover skal der måles antistoffer mod infliximab, anti-infliximab for patienter med en lav koncentration af disse, hvilket skal tilføjes til resultaterne af immunogenicitetstesten og de kliniske parametre i beslutningsprocessen.

Indikation for terapeutiske niveauer for patienter, der behandles med infliximab*	
Raske donorer og patienter, der ikke behandles med infliximab	negativ
Subterapeutiske niveauer af infliximab	< 3,0 µg/mL
Normale terapeutiske niveauer af infliximab	3-7 µg/mL **
Forhøjede niveauer af infliximab	> 7,0 µg/mL

* Der gives kun indikationer for terapeutiske værdier, og hvert laboratorium må definere egne cutoff-værdier til diagnostiske formål.

** Det normale, terapeutiske niveau er den koncentration, hvor en patient har større sandsynlighed for et godt til moderat klinisk respons. Det normale, terapeutiske niveau er ikke nødvendigvis lig med det optimale terapeutiske niveau. Det optimale, terapeutiske niveau er relateret til sygdommen og patientens individuelle parametre.

Specifikationer

De citerede værdier for testens specifikke ydeevne repræsenterer typisk resultater og må ikke ses som specifikationer for dette analysesæt. Vedlagte informationssejdel indeholder det specifikke analyseinterval for sættet og for infliximab-koncentrationen i kalibratorerne.

Genfindning	: 94% ved 2 µg/mL (1:1500)	
Kvantificeringsgrænse	: 0,08 µg/mL (1:200)	
nedre	: 0,08 µg/mL (1:200)	
øvre (overflødig antigen)	: intet overflødig antigen observeret (47 µg/mL ved 1:2000)	
Præcision	Total præcision	præcision mellem kørsler
0,30 µg/mL (1:200)	: 11,0%	9,5%
2,14 µg/mL (1:1500)	: 8,8%	5,8%
17,3 µg/mL (1:2000)	: 7,4%	6,5%
Lineært interval	: 0.22-39.7 µg/mL	
Ingen krydsreaktivitet med	: TNF-hæmmerne infliximab, etanercept og golimumab	
Interferensfaktorer	: Interferens < 20% med:	
	hæmoglobin	- 5 og 40 mg/mL
	konjugeret bilirubin	- 0,02 og 0,5 mg/mL
	ukonjugeret bilirubin	- 0,1 og 1,5 mg/mL
	triglycerider	- 15 og 50 mg/mL
	humant serumalbumin	- 60 og 80 mg/mL
	reumatoid faktor (RA)	- 1600 U/mL
Metodesammenligning	: 70 patientprøver blev sammenlignet med Sanquin Diagnostic Services' egen, validerede metode	
assay	: Passing and Bablock: $y = 0,91x + 0,04$	
analyse	: Spearman correlation: 0,99	

Begrænsninger

- Analysesættet er alene fremstillet til professionel brug, og brugeren skal være uddannet i og bekendt med ELISA-testprocedurer.
- ELISA fungerer optimalt, hvis alle pipetter og systemer bliver kontrolleret og fuldt vedligeholdt i overensstemmelse med fremgangsmåden beskrevet af producenten.
- Kun manuel analyse af dette sæt, som beskrevet i denne brugsanvisning, er valideret af Sanquin. Alle krav i denne brugsanvisning er valideret med den manuelle analysemetode. Hvis sættet anvendes på en ELISA-automat, skal testen valideres af brugeren inden brug. Kravene i denne brugsanvisning er ikke gyldige for sættets ydeevne på en ELISA-maskine.
- Hvis kontrollerne ikke ligger inden for det angivne interval, er resultaterne ikke gyldige, og testen skal gentages.
- Da kontrollerne er fortyndet på forhånd, kan de ikke bruges til at kontrollere prøve- og reagenspræparater af brugeren.
- Prøver, der har en optisk tæthed ved OD450 nm uden for kalibratorkurven, er ikke gyldige og kan ikke bruges til beregninger. Ekstrapolering af resultaterne er ikke acceptabelt. Sådanne prøver skal måles i mindre eller større fortyndingsforhold.

- Der kan fås falskt positive eller negative resultater, hvis prøverne anvendes med interferensfaktorer, der er højere end angivet i specifikationerne.
- Kun plader, HRP-konjugat, kalibratorer og kontrolenheder, der følger med sættet, må bruges. Brug ikke komponenter fra forskellige partier. Disse er ikke udskiftelige. HPE-prøvebuffer, TMB, Stop og Wash-buffer må dog anvendes fra andre MabTrack-sæt, forudsat at materialerne er inden for deres holdbarhed, materialerne er opbevaret i lukkede flasker ved 2-8 °C, og åbnes højst 6 måneder tidligere. Disse komponenter kan blandes før udførelse af ELISA, f.eks. for at overvinde problemer med dødvolumen. Batchnumre og udløbsdatoer kan findes på hver mærkat på de separate komponenter.
- Reagenser eller reagensrester (f.eks. dødvolumen) må ikke blandes med indholdet i nyåbnede hætteglas.
- Hætter og hætteglas må ikke byttes rundt, hætterne skal sættes på de tilhørende hætteglas.
- Der må ikke tilsættes NaN₃ til reagenserne, da det påvirker testens ydeevne.
- Der må ikke anvendes aluminiumsfolie under inkubationstrinene.
- Den koncentrerede buffer kan indeholde saltkrystaller. Opvarm den koncentrerede buffer KORT til 37°C til at opløse krystallerne, før De tilbereder arbejdsbufferen.

Referencer

1. van den Bemt B.J.F.; Annals of the Rheumatic Diseases. 2008;67:1697-1701.
2. Aarden L.; Current Opinion in Immunology. 2008;20(4):431-435.
3. de Vries M.K.; Annals of the Rheumatic Diseases. 2007;66(9):1252-1254.
4. Wolbink G.J.; Arthritis & Rheumatology. 2006;54(3):711-715.
5. Van der Bemt B.J.F.; British Journal of Clinical Pharmacology. 2013;76(6):939-945.
6. Vande Casteele N.; Gastroenterology. 2015;148:1320-1329.

For en liste over flere publikationer fra Sanquin om infliximab, se www.sanquin.org/biologics.

Det garanteres, at produkter fra Sanquin virker som beskrevet i producentens originale brugsanvisning. Det er af afgørende betydning, at procedurerne, testlayouts samt anbefalede reagenser og udstyr overholdes nøje. Sanquin fraskriver sig ethvert ansvar, som opstår som følge af nogen afvigelse heraf.