

# Instructions for use



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

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

**MabTrack ADA adalimumab**

REF M2950

IVD CE

48

309\_v04 01/2019 (pt)

*Exclusivamente para uso  
professional*

## ELISA para a medição semi-quantitativa de anticorpos contra adalimumab

ADA	ADL	BUF	CONJ	HRP
Anticorpos anti-medicamento	Adalimumab	Tampão	Conjugado	HRP

HUM	WELL	Level
Humano	Poço	Nível

### Informação geral

O ELISA MabTrack ADA adalimumab é um imunoensaio associado a enzimas (ELISA) para a determinação semi-quantitativa rápida, replicável e específica de anticorpos contra adalimumab em amostras de plasma e soro humano. Juntamente com a medição dos níveis do medicamento adalimumab, o ensaio MabTrack ADA adalimumab é importante para os regimes de tratamento ajustados ao doente. Os níveis baixos de medicamento são frequentemente uma indicação da formação de anticorpos contra adalimumab. Em cerca de 25 a 30% dos doentes com artrite reumatóide tratados com adalimumab, os anticorpos formam-se directamente para o idiótipo de adalimumab. Isto pode prejudicar a função do inibidor de TNF e pode causar uma redução na concentração plasmática do inibidor de TNF. Monitorizando atentamente os níveis de medicamento e a formação de anticorpos juntamente com a actividade da doença, é possível ao médico determinar objectivamente a actividade do medicamento num determinado doente e elaborar regimes de tratamento específicos para esse doente. O anticorpo terapêutico adalimumab afecta o factor de necrose tumoral (TNF) e é frequentemente administrado a doentes que sofrem de artrite reumatóide, patologias intestinais, doenças dermatológicas e cancro. O TNF desempenha um papel importante na inflamação, pode causar dor, articulações inchadas e rigidez nos doentes com artrite reumatóide e úlceras nos doentes com doença intestinal. Pensa-se, portanto, que a inibição do TNF alivia alguns destes sintomas, melhorando assim a qualidade de vida dos doentes. Os níveis plasmáticos e séricos dos inibidores do TNF são altamente variáveis entre doentes e correlacionam-se claramente com os sintomas clínicos dos doentes.

### Princípio do teste

O ELISA MabTrack ADA adalimumab é um imunoensaio enzimático "de tipo sanduíche". Nas placas de microtítulo, adalimumab é captado no poliestireno dos poços de microtítulo. Os anticorpos anti-adalimumab livres, presentes na amostra do doente, no nível 1-2 e no controlo positivo e negativo ligam-se ao adalimumab na placa de microtítulo. O material não ligado é então removido através de lavagem. Em seguida, adiciona-se adalimumab marcado com peroxidase de rábano-silvestre (HRP). O adalimumab marcado com HRP liga-se ao complexo adalimumab/ anti-adalimumab presente na superfície do poço de microtítulo. Após a remoção do conjugado de HRP não ligado através de lavagem, adiciona-se a solução substrato aos poços. Forma-se um produto colorido em quantidade proporcional à quantidade de anticorpos anti-adalimumab presentes na amostra e nos controlos. Após a reacção ter terminado, através da adição de uma solução de paragem, mede-se a absorvância num leitor de placas de microtítulo. A partir da absorvância das amostras e dos títulos, as amostras podem ser qualificadas como tendo resultado negativo (-), positivo (fraco) (+) ou positivo forte (++) quanto a anticorpos anti-adalimumab.

### Conteúdo da embalagem

Adalimumab pre-coated microtiter plate	6 x 8 poços	-	REF M2951	pronto a utilizar
Level 1	3 x 0,50 mL	tampas transparentes	REF M295201	pronto a utilizar
Level 2	3 x 0,50 mL	tampas transparentes	REF M295202	pronto a utilizar
Control +	3 x 0,50 mL	tampas transparentes	REF M295203	pronto a utilizar
Control -	3 x 0,50 mL	tampas transparentes	REF M295204	pronto a utilizar
Adalimumab HRP-conjugate	3 x 3,5 mL	frasco castanho	REF M2957	pronto a utilizar
Wash buffer stock solution	1 x 50 mL	frasco branco	REF M1805	diluir 1:20 em água destilada
HPE dilution buffer	1 x 50 mL	frasco branco	REF M2940	pronto a utilizar
TMB substrate solution	1 x 12,5 mL	frasco castanho	REF M1821	pronto a utilizar
Stop solution 0,18 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 x 13,0 mL	frasco branco	REF M1823	pronto a utilizar
Plate seals	10 x	-	-	-

- A placa de microtítulo de fundo plano consiste em 6 tiras de 8 poços prontos a utilizar. Todos os poços estão revestidos com adalimumab. A placa de microtítulo encontra-se vedada, a vácuo, numa bolsa de plástico com dessecante. O kit proporciona a flexibilidade de utilizar a placa de microtítulo em 3 ocasiões distintas. Determine o número de tiras necessárias para testar o número pretendido de amostras, mais 4 poços necessários para a série de controlos. Retire as tiras que não irão ser utilizadas da estrutura da placa de microtítulo e embale-as novamente na bolsa de plástico que contém o dessecante.
- Depois de abertos, os frascos do nível 1, nível 2, controlo positivo, controlo negativo e conjugado de HRP terão de ser eliminados.

#### **Materiais e/ou equipamentos adicionais**

- Água destilada ou desionizada.
- Pipetas calibradas (5-1000  $\mu\text{L}$ ).
- Pipeta multicanal (30-300  $\mu\text{L}$ ).
- Provetas, balões Erlenmeyer, copos graduados e recipientes de vidro necessários para a preparação dos reagentes.
- Leitor de placas de microtítulo (para leitura da OD a 450 nm).

#### **Precauções**

Exclusivamente para o diagnóstico in vitro. Os reagentes devem ser armazenados entre 2–8°C. Frascos danificados ou com fugas não devem ser usados. Os reagentes (por abrir ou abertos) não devem ser utilizados para além do prazo de validade impresso no rótulo do frasco. Não é de todo adequado assumir que os reagentes se encontram isentos de agentes infecciosos. A manipulação e a destruição de cada recipiente devem ser efectuadas com cuidado. A eliminação de resíduos deve ser tratada de acordo com o regulamento do seu laboratório, depois de completado o teste.

#### **Procedimento de teste**

##### **Colheita e preparação das amostras**

1. Terão de utilizar-se amostras colhidas no vale para medir a concentração de anticorpos anti-adalimumab, pelo que as amostras terão de ser colhidas nas 24 horas ANTES de o medicamento ser injectado. As amostras colhidas em pontos temporais diferentes podem conter níveis de medicamento que interfiram no teste.
2. Só podem utilizar-se soro e plasma EDTA no ensaio.
3. Separar o plasma ou soro das células sanguíneas no prazo de 4 horas após a colheita e realizar as análises imediatamente. Se o teste das amostras for adiado, estas podem conservar-se a 2-8 °C durante 24 horas. Se as amostras não foram analisadas no prazo de 24 horas, terão de ser conservadas congeladas; podem conservar-se a  $\leq -18$  °C durante 2 meses.
4. Fazer alíquotas de amostras para evitar ciclos de congelação-descongelação.
5. Antes do ensaio, as amostras congeladas terão de ser descongeladas à temperatura ambiente. Não utilizar banhos de água a 37 °C ou 56°C para a descongelação.
6. Misturar as amostras imediatamente antes de preparar as diluições.

##### **Diluição das amostras**

1. Quando as medições forem efetuadas de acordo com os protocolos validados relativos aos sistemas automatizados ELISA, podem ser utilizadas determinações únicas de amostras de pacientes. Ao efetuar o teste manualmente, aconselha-se a realização de determinações em duplicado para cada amostra.
2. Terá de utilizar-se uma diluição de 1:10 neste ensaio para medir os níveis de anticorpos anti-adalimumab nos doentes.

Diluição	Tipo de amostra	Volume do tampão de diluição para HPE
1:10	20 $\mu\text{L}$ de amostra do doente não diluída	180 $\mu\text{L}$

##### **Preparação da solução tampão de lavagem na concentração de trabalho**

Preparar uma solução na concentração de trabalho acrescentando 50 mL da solução tampão concentrada de lavagem (este é o volume total de um frasco) a 950 mL de água destilada. A solução na concentração de trabalho pode ser conservada até 2 meses a 2-8°C.

##### **Preparação para o procedimento de teste ELISA**

1. Permitir que todos os reagentes alcancem a temperatura ambiente (18-25 °C).
2. O ensaio completo terá de ser realizado à temperatura ambiente (18-25 °C) sem agitar.
3. Não permita que os poços fiquem descobertos ou sequem durante períodos alargados entre os passos da incubação.
4. Retire cuidadosamente todas as bolhas de ar dos poços antes da incubação.
5. Para evitar a contaminação cruzada, utilize pontas de pipeta descartáveis para cada transferência e utilize novos vedantes de placa para cada passo de incubação/fixação na experiência ELISA.
6. Misturar todos os reagentes minuciosamente mas cuidadosamente antes de utilizar (sem fazer espuma).

##### **Realização do procedimento de teste ELISA**

1. Retirar da bolsa a placa de microtítulo com o número necessário de tiras de placa de microtítulo. As tiras não utilizadas podem ser guardadas na bolsa de plástico com o dessecante.
2. Preparar o tampão de lavagem e as amostras segundo o protocolo.
3. Acrescentar 100  $\mu\text{L}$  por poço de níveis, controlos ou amostras do doente diluídas segundo a disposição proposta na placa de microtítulo ou segundo a sua própria disposição.
4. Cobrir a placa de microtítulo com vedante adesivo e incubar durante 1 hora.
5. Aspirar o sobrenadante dos poços e encher cada poço com 250  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem diluído. Deixar o tampão de lavagem em cada poço durante 30 a 60 segundos por ciclo de lavagem, em seguida esvaziar os poços. Depois da lavagem (manual e automática), eliminar cuidadosamente todo o líquido da placa de microtítulo, aplicando ligeiras pancadas sobre papel absorvente, mantendo as aberturas viradas para baixo, para retirar todo o tampão de lavagem residual. Repetir esta operação quatro vezes. Após a lavagem final os poços têm de estar secos!
6. Acrescentar 100  $\mu\text{L}$  do conjugado de HRP adalimumab a cada poço.
7. Cobrir a placa de microtítulo com vedante adesivo e incubar durante 1 hora.
8. Aspirar o sobrenadante dos poços e encher cada poço com 250  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem diluído. Deixar o tampão de lavagem em cada poço durante 30 a 60 segundos por ciclo de lavagem, em seguida esvaziar os poços. Depois da lavagem (manual e automática), eliminar cuidadosamente todo o líquido da placa de microtítulo, aplicando ligeiras pancadas sobre papel absorvente, mantendo as aberturas viradas para baixo, para retirar todo o tampão de lavagem residual. Repetir esta operação quatro vezes. Após a lavagem final os poços têm de estar secos!
9. Acrescentar 100  $\mu\text{L}$  de solução substrato TMB a cada poço.
10. Incubar a placa de microtítulo no escuro e não agitar. Verificar a formação de cor a cada 5 minutos; quando a cor azul se desenvolver nos poços positivos (controlo positivo e níveis 1 e 2) e o controlo negativo ainda estiver transparente, a reacção terá de ser interrompida. O tempo médio de incubação é de  $10 \pm 1$  minutos.
11. Interromper a reacção acrescentando 100  $\mu\text{L}$  de solução de paragem por poço.

12. Medir a placa de microtítulo num leitor ELISA a A450 nm. Ler a placa nos 30 minutos após a adição da solução de paragem. É permitido utilizar um segundo comprimento de onda de referência de 540-620 nm durante a medição.

**Disposição proposta na placa de microtítulo**

Os níveis e os controlos terão de ser incluídos em todas as séries de análise semi-quantitativa. Os reagentes fornecidos dão ao utilizador a possibilidade de utilizar a placa de microtítulo em uma a, no máximo, três séries. Apresenta-se uma disposição proposta na placa de microtítulo para utilizar numa única série.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CTRL -	Amostra 3	Amostra 7	Amostra 11	Amostra 15	Amostra 19						
B	Nível 1	Amostra 3	Amostra 7	Amostra 11	Amostra 15	Amostra 19						
C	Nível 2	Amostra 4	Amostra 8	Amostra 12	Amostra 16	Amostra 20						
D	CTRL +	Amostra 4	Amostra 8	Amostra 12	Amostra 16	Amostra 20						
E	Amostra 1	Amostra 5	Amostra 9	Amostra 13	Amostra 17	Amostra 21						
F	Amostra 1	Amostra 5	Amostra 9	Amostra 13	Amostra 17	Amostra 21						
G	Amostra 2	Amostra 6	Amostra 10	Amostra 14	Amostra 18	Amostra 22						
H	Amostra 2	Amostra 6	Amostra 10	Amostra 14	Amostra 18	Amostra 22						

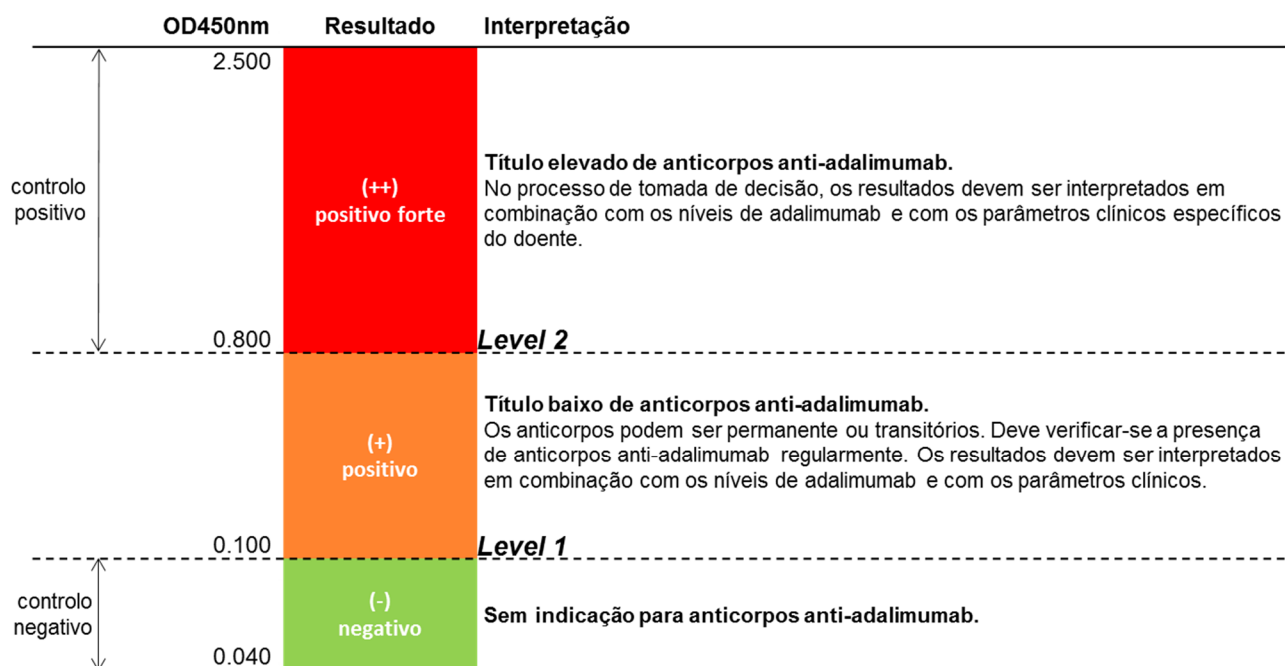
**Resultados**

1. Registrar a absorvância a 450 nm para cada poço com os níveis e os controlos.
2. Registrar a absorvância a 450 nm para cada poço com uma amostra específica.
3. Calcular a média dos valores duplicados para a amostra.
4. Comparar o resultado das amostras com o dos níveis.

**Interpretação**

O ELISA anti-adalimumab proporciona 2 intervalos semi-quantitativos quanto à presença de anticorpos anti-adalimumab, por ex., negativo (-) e positivo (+ e ++), indicados pelo nível 1. O nível 2 é um cut-off secundário e arbitrário que pode ser utilizado para classificar os doentes como tendo um resultado positivo (fraco) (+) e positivo forte (++) para a presença de anticorpos anti-adalimumab. Este cut-off arbitrário baseia-se em estudos da Sanquin Diagnostic Services. O nível 2 só pode ser utilizado como uma indicação da quantidade de anticorpos, não pode ser utilizado como um cut-off oficial de diagnóstico. Os Níveis 1 e 2 contêm concentrações fixas de anticorpos anti-medicamento. As concentrações de anticorpos anti-medicamento foram medidas através do Imunoensaio Radiológico interno da Sanquin Diagnostic Services. O Nível 1 continha 27 AU/mL (SD 3, n = 8) e o Nível 2 245 AU/mL (SD 16, n = 8). Para a interpretação dos resultados, a OD450 nm das amostras deve comparar-se com a OD450 nm dos cut-offs conforme descrito na figura abaixo (os resultados da OD450 nm apresentados na figura são resultados típicos e devem ser considerados indicativos). A interpretação dos resultados só é válida quando a OD450 nm do controlo positivo é > nível 2 e a OD450 nm do controlo negativo é < nível 1.

A análise do intervalo semi-quantitativo de anticorpos anti-adalimumab de um doente depende fortemente da subclasse de IgG dos anticorpos e do nível de adalimumab dos doentes. Não é possível detectar os anticorpos IgG4 anti-adalimumab, pelo que um resultado negativo neste teste não exclui a presença de anticorpos anti-adalimumab da subclasse IgG4. Além disso, não é possível determinar com fiabilidade os anticorpos anti-adalimumab quando o nível de adalimumab é > 0,5 µg/mL. Ao realizar o teste anti-adalimumab para fins de diagnóstico e/ou para determinar o protocolo de tratamento do doente, o intervalo semi-quantitativo encontrado nunca pode proporcionar um diagnóstico definitivo, mas terá de ser considerado como sendo uma indicação da situação clínica, requerendo possivelmente outros exames complementares de diagnóstico. No processo de tomada de decisão, terão de utilizar-se as características específicas do doente e os parâmetros clínicos, juntamente com a concentração do medicamento adalimumab e o intervalo anti-adalimumab.



#### Especificações

Precisão	: As amostras de soro e plasma EDTA com dose elevada (cut-off + 30%) e baixa (cut-off - 30%) foram medidas em duplicado em 20 séries. Todos os resultados foram medidos correctamente em pelo menos 19/20 resultados.
Factores de interferência	: Às amostras de soro e plasma EDTA adicionaram-se concentrações 30% abaixo e acima do valor de cut-off (nível 1). Não se obtiveram falsos resultados positivos nem falsos resultados negativos com: <ul style="list-style-type: none"> <li>hemoglobina - 1 e 50 mg/mL</li> <li>bilirrubina conjugada - 0,02 e 0,5 mg/mL</li> <li>bilirrubina não conjugada - 0,1 e 1,5 mg/mL</li> <li>triglicéridos - 15 e 50 mg/mL</li> <li>albumina sérica humana - 80 mg/ml</li> <li>factor reumatóide (AR) - 1600 U/mL</li> <li>adalimumab - 0,1 µg/mL</li> </ul>
Cut-off	Mediram-se amostras de plasma EDTA de dadores saudáveis do banco de sangue (n = 50), isentas de anticorpos anti-adalimumab ou de adalimumab. O nível 1 de cut-off é a média + cinco vezes o desvio-padrão.
Comparação de métodos	Concordância de 89% com o Theradiag ADA-ADL kit, testado com 50 amostras positivas (OD450 ≥ nível 1) e 40 amostras negativas (OD450 < nível 1). Kappa 0,75; a robustez da concordância é "boa".

#### Limitações

- O kit foi concebido exclusivamente para utilização profissional, o utilizador terá de ter formação e estar familiarizado com os procedimentos de teste ELISA.
- Para um desempenho ideal do teste ELISA, certifique-se de que todas as pipetas e sistemas são verificados e são alvo de um serviço de manutenção completo de acordo com os procedimentos descritos pelos fabricantes.
- Apenas o teste manual deste kit, conforme descrito nestas instruções de utilização, foi validado pela Sanquin. Todas as afirmações destas instruções de utilização foram validadas com o procedimento de teste manual. Se utilizar o kit num sistema automatizado ELISA, o teste terá de ser validado pelo utilizador antes da utilização. As afirmações destas instruções de utilização não são válidas para o desempenho deste kit num aparelho ELISA.
- Terão de utilizar-se apenas os reagentes fornecidos com o kit; não utilize reagentes de lotes diferentes ou de lotes de kit diferentes, uma vez que não são intercambiáveis. No entanto, podem utilizar-se as soluções de HPE, TMB, solução de paragem e tampão de lavagem de outros kits Sanquin para materiais biológicos, desde que os materiais estejam dentro do respectivo prazo de validade e se tenham conservado em frascos fechados a uma temperatura de 2-8 °C.
- Os reagentes ou restos de reagentes (por ex. volume morto) não podem ser misturados com o conteúdo de frascos recém-abertos.
- As tampas e os frascos não são intercambiáveis, as tampas têm de voltar a ser colocadas nos frascos correspondentes.
- Não pode acrescentar-se NaN<sub>3</sub> aos reagentes, uma vez que tal afecta a realização do teste.
- Não utilizar folha de alumínio durante os passos de incubação.
- Os níveis de adalimumab no vale devem medir-se com o mabTrack level adalimumab ELISA (M2910) antes da determinação de anti-adalimumab. A interpretação dos resultados só pode fazer-se considerando em simultâneo os níveis de adalimumab e de anticorpos.
- O ELISA MabTrack ADA adalimumab é sensível ao medicamento. Os níveis de adalimumab ≥ 0,5 µg/mL podem interferir com o resultado e causar resultados negativos. O cut-off fornecido de 0,5 µg/mL é, contudo, apenas uma indicação; a quantidade de

interferência depende da afinidade do anticorpo anti-adalimumab para o medicamento. O cut-off foi determinado com o MabTrack level adalimumab ELISA (M2910) e com um anticorpo monoclonal anti-adalimumab de alta afinidade.

- O MabTrack ADA adalimumab é um teste ELISA com ligação por pontes. Não é possível detectar os anticorpos anti-adalimumab da subclasse IgG4 com este tipo de teste ELISA porque na IgG4 os braços f(ab') de uma molécula reconhecem epítomos diferentes e, como tal, não conseguem "fazer a ponte" entre duas moléculas de adalimumab.
- Uma vez que os controlos já vêm pré-diluídos, não podem ser utilizados para verificar a preparação da amostra e do reagente pelo utilizador.
- Podem obter-se falsos resultados positivos ou negativos quando as amostras são utilizadas com factores de interferência superiores aos indicados nas especificações.
- O tampão concentrado pode conter cristais de sal. Antes de preparar o tampão de titulação de trabalho, aquecer o tampão concentrado BREVEMENTE até atingir 37°C, a fim de dissolver os cristais.

#### **Referências**

1. Vogelzang E.H.; Annals of the Rheumatic Diseases. 2014;73(12):2178-2182.
2. Pouw M.F.; Annals of the Rheumatic Diseases. 2015;74(3):513-518.
3. Bartelds G.M.; Journal of the American Medical Association. 2011;305(14):1460-1468.
4. Aarden L.; Current Opinion in Immunology. 2008;20(4):431-435.
5. Hart M.H.; J Immunol Meth 2011;372:196-203

**Para ver uma lista completa de todas as referências publicadas pela Sanquin sobre adalimumab, consulte [www.sanquin.org/biologics](http://www.sanquin.org/biologics)**

*Os produtos Sanquin têm garantia de desempenho conforme descrito nas instruções de utilização do fabricante original. É essencial uma adesão rigorosa aos procedimentos, configurações de teste, reagentes e equipamento recomendados. A Sanquin declina qualquer responsabilidade em caso de desvio em relação ao acima mencionado.*