

# 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 (sv)

Endast för professionellt bruk

## ELISA för semikvantitativ mätning av antikroppar mot adalimumab

ADA	ADL	BUF	CONJ	HRP
Anti-läkemedelsantikroppar	Adalimumab	Buffert	Konjugat	Pepparrotsperoxidas

HUM	WELL	Level
Human	Brunn	Standard med känd koncentration

### Allmän information

MabTrack ADA adalimumab ELISA är en enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) för snabb, reproducerbar och specifik semikvantitativ bestämning av antikroppar mot adalimumab i humant plasma- och serumprov. Förutom mätningen av läkemedelskoncentration av adalimumab, är MabTrack ADA adalimumab viktig för patientanpassade behandlingsscheman. Låga läkemedelskoncentrationer är ofta en indikation på att antikroppar bildats mot adalimumab. Hos cirka 25 till 30% av de patienter med reumatoid artrit som behandlas med adalimumab bildas antikroppar riktade mot idiotypen för adalimumab. Detta kan hindra funktionen hos TNF-hämmare och orsaka en minskning av koncentrationen av TNF-hämmaren i plasma.

Genom att noga övervaka läkemedelsnivåerna och bildningen av antikroppar i kombination med sjukdomsaktiviteten kan läkaren objektivt fastställa läkemedlets aktivitet hos en enskild patient och utforma patientspecifika behandlingsscheman. Den terapeutiska antikroppen adalimumab påverkar TNF (tumörnekrosfaktorn) och ges ofta till patienter som lider av reumatoid artrit, tarmrubbingar, dermatologiska sjukdomar och cancer. TNF spelar en viktig roll vid inflammationer och kan orsaka smärta, svullna leder och stelhet hos patienter med reumatoid artrit och magsår hos patienter med inflammatorisk tarmsjukdom. Genom behandling med TNF-hämmare anser man därför kunna lindra några av dessa symtom och därigenom förbättra patienternas livskvalitet. Koncentrationerna av TNF-hämmare i plasma och serum varierar mycket mellan olika patienter och korrelerar tydligt med patientens kliniska symtom.

### Testprincip

MabTrack ADA adalimumab ELISA är en enzymkopplad immunadsorberande analys av "sandwich-typ". På mikrotiterplattorna fångas Adalimumab till mikrotiterbrunnar av polystyren. Fria antikroppar mot adalimumab, som finns i patientprovet, level 1-2 (standarder med känd koncentration) och den positiva och negativa kontrollen, binder till adalimumab på mikrotiterplattan. Icke bundet material kan sedan tvättas bort. Därefter adderas adalimumab märkt med pepparrotsperoxidas (HRP). HRP-märkt adalimumab binder till adalimumab/anti-adalimumab-komplexet som finns på ytan av mikrotiterbrunnarna. Efter att icke bundet HRP-konjugat tvättats bort tillförs substratlösning i brunnarna. En färgad produkt bildas i proportion till den mängd anti-adalimumab-antikroppar som finns i provet och kontrollerna. När reaktionen har avbrutits genom en tillsats av stopplösning mäts absorbansen i en mikrotiterplattläsare. Genom jämförelse mellan absorbansen för proverna och standarder med kända koncentrationer kan proverna kvalificeras som negativa (-), (svagt) positiva (+), starkt positiva (+ +) med avseende på anti-adalimumab antikroppar.

### Förpackningens innehåll

Adalimumab pre-coated microtiter plate	6 x 8 brunnar	-	REF M2951	redo att använda
Level 1	3 x 0,50 mL	klara proppar	REF M295201	redo att använda
Level 2	3 x 0,50 mL	klara proppar	REF M295202	redo att använda
Control +	3 x 0,50 mL	klara proppar	REF M295203	redo att använda
Control -	3 x 0,50 mL	klara proppar	REF M295204	redo att använda
Adalimumab HRP-konjugat	3 x 3,5 mL	brun flaska	REF M2957	redo att använda
Wash buffer stock solution	1 x 50 mL	vit flaska	REF M1805	späds 1:20 i destillerat vatten
HPE dilution buffer	1 x 50 mL	vit flaska	REF M2940	redo att använda
TMB substrate solution	1 x 12,5 mL	brun flaska	REF M1821	redo att använda
Stop solution 0,18 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 x 13,0 mL	vit flaska	REF M1823	redo att använda
Plate seals	10 x	-	-	-

- Den flatbottnade mikrotiterplattan består av 6 separata remsor med 8 brunnar som är redo att använda. Alla brunnar är belagda med adalimumab. Mikrotiterplattan är vakuumslutad i en plastpåse innehållande torkmedel. Den flexibla satsen gör att mikrotiterplattan kan användas vid tre olika tillfällen. Avgör hur många remsor som krävs för att testa önskat antal prover och räkna med ytterligare fyra brunnar för kontrollerna. Ta bort de remsor som inte behövs från ramen på mikrotiterplattan och packa dem på nytt i plastpåsar med torkmedel.
- Öppnade ampuller med level 1 och level 2, positiv kontroll, negativ kontroll och HRP-konjugat måste kasseras efter användning.

### Ytterligare material och/eller utrustning

- Destillerat eller avjoniserat vatten.
- Kalibrerade pipetter (5-1000  $\mu$ L).
- Flerkanalspipett (30-300  $\mu$ L).
- Bägare, kolvar, cylindrar och vätskebehållare som krävs för att förbereda reagens.
- Mikrotiterplattläsare (för läsning av OD vid 450 nm).

### Säkerhetsföreskrifter

Reagenserna skall endast användas för in-vitro-diagnostik. Reagenserna bör förvaras i 2–8°C. Läckande eller skadade reagensflaskor får ej användas. Reagenser (oöppnade eller öppnade) bör inte användas efter det utgångsdatum som är tryckt på flaskans etikett. Det kan inte uteslutas att reagenserna innehåller några smittfarliga ämnen. Iakttag försiktighet vid användning och hantering av behållare och deras innehåll. Bortförskaffande av avfall, efter testets slutförande, ska ske i enlighet med laboratoriets egna föreskrifter.

### Testutförande

#### Provtagning och provberedning

1. Dalvärdesprover måste användas för att mäta koncentrationen av antikroppar mot adalimumab, och proverna måste därför samlas in inom 24 timmar INNAN läkemedlet injiceras. Prover som tagits vid andra tidpunkter kan innehålla koncentrationer av läkemedel som stör testet.
2. Det är endast serum och EDTA-plasma som kan användas i analysen.
3. Separera plasma eller serum från blodcellerna inom 4 timmar efter provtagningen och utför analysen omedelbart. Om analysen av proverna fördröjs kan de förvaras vid 2-8°C i 24 timmar. Om proverna inte analyseras inom 24 timmar måste de förvaras frysta, och de kan då förvaras vid  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  i 2 månader.
4. Dela upp proverna i aliquoter för att inte behöva tina upp och frysa dem igen.
5. Före analysen måste de frysta proverna tinas i rumstemperatur. Använd inte vattenbad med temperaturer på 37 °C eller 56 °C för upptining.
6. Blanda proverna precis innan du bereder spädningarna.

#### Spädning av proverna

1. Enskilda bestämningar av patientprover kan användas när mätningar utförs på godkända protokoll på automatiserade ELISA-system. Rekommendationen är att utföra dubbla bestämningar för varje prov när de testas manuellt.
2. En spädning på 1:10 måste användas i den här analysen för att mäta koncentrationen av antikroppar mot adalimumab hos patienter.

Spädning	Provtyp	HPE spädningsbuffert
1:10	20 $\mu$ L utspätt patientprov	180 $\mu$ L

#### Beredning av tvättbuffertlösning med effektiv styrka

Bered en lösning med effektiv styrka genom att tillsätta 50 mL av stamlösningen för tvättbufferten (dvs. hela innehållet i en flaska) i 950 mL destillerat vatten. Lösningen med effektiv styrka kan förvaras i upp till 2 månader vid 2-8°C.

#### Förberedelse för ELISA-testproceduren

1. Se till att alla reagenser uppnår rumstemperatur (18-25 °C).
2. Hela analysen måste utföras vid rumstemperatur (18-25 °C) utan skakning.
3. Låt inte brunnarna stå otäckta eller torra under längre perioder mellan inkubationsstegen.
4. Avlägsna noga alla luftbubblor från brunnarna före inkubation.
5. Undvik korskontaminering genom att använda engångspipettspetsar för varje överföring och använd nya plattföseglingar för varje inkubations-/fixeringssteg i ELISA-experimentet.
6. Blanda alla reagenser noga men varsamt innan du använder dem (skum får inte bildas).

#### Genomförande av ELISA-testproceduren

1. Ta ut mikrotiterplattan med önskat antal remsor från påsen. De oanvända remsorna kan förvaras i plastpåsen med torkmedlet.
2. Förbered tvättbufferten och proverna enligt rutinerna.
3. Tillsätt 100  $\mu$ L av standard med känd koncentration (level), kontroll eller utspätt patientprov i varje brunn enligt den föreslagna layouten för mikrotiterplattan eller din egen layout.
4. Täck över mikrotiterplattan med självhäftande försegling och inkubera plattan i 1 timme.
5. Aspirera supernatanterna från brunnarna. Fyll varje brunn med 250  $\mu$ L utspädd tvättbuffert. Lämna tvättbufferten i brunnarna i 30 till 60 sekunder per tvättcykel och töm därefter brunnarna. Efter tvätt (manuell och automatiserad tvätt) avyttrar du noga all vätska från mikrotiterplattan genom att knacka plattan mot ett absorberande papper med öppningarna riktade nedåt för att avlägsna alla rester av tvättbufferten. Upprepa detta fyra gånger. Efter den sista tvätten måste brunnarna vara helt torra!
6. Tillsätt 100  $\mu$ L av adalimumab-HRP-konjugatet i varje brunn.
7. Täck över mikrotiterplattan med självhäftande försegling och inkubera plattan i 1 timme.
8. Aspirera supernatanterna från brunnarna. Fyll varje brunn med 250  $\mu$ L utspädd tvättbuffert. Lämna tvättbufferten i brunnarna i 30 till 60 sekunder per tvättcykel och töm därefter brunnarna. Efter tvätt (manuell och automatiserad tvätt) avyttrar du noga all vätska från mikrotiterplattan genom att knacka plattan mot ett absorberande papper med öppningarna riktade nedåt för att avlägsna alla rester av tvättbufferten. Upprepa detta fyra gånger. Efter den sista tvätten måste brunnarna vara helt torra!
9. Tillsätt 100  $\mu$ L av TMB-substratlösningen i varje brunn.
10. Inkubera mikrotiterplattan i mörker och skaka den inte. Kontrollera färgbildningen var femte minut. När den blå färgen har utvecklats i de positiva brunnarna (positiv kontroll och level 1 och 2) och blankproven fortfarande är färglösa måste reaktionen avbrytas. Den genomsnittliga inkubationstiden är  $10 \pm 1$  minuter.
11. Stoppa reaktionen genom att tillsätta 100  $\mu$ L stopplösning i varje brunn.
12. Mät mikrotiterplattan i en ELISA-läsare vid 450 nm. Läs av plattan högst 30 minuter efter det att stopplösningen tillsatts. En andra våglängd på 540-620 nm kan användas som referens vid mätningen.

### Föreslagen layout för mikrotiterplatta

Standarderna med känd koncentration och kontrollerna måste inkluderas i varje semikvantitativ analysomgång. Med de reagenser som tillhandahålls kan användaren använda mikrotiterplattan för en till maximalt tre omgångar. En plattlayout föreslås för användning i en enskild omgång.

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

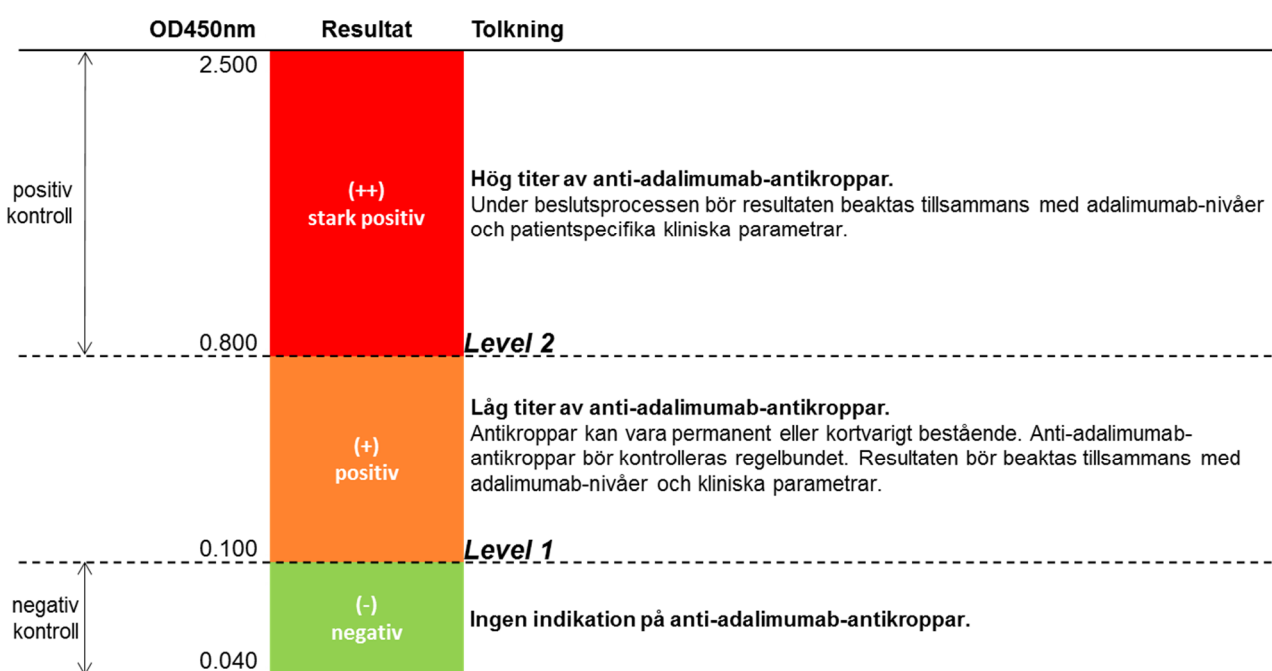
### Resultat

1. Registrera absorbansen vid 450 nm för varje brunn som innehåller standard för känd koncentration och kontroller.
2. Registrera absorbansen vid 450 nm för varje brunn som innehåller ett specifikt prov.
3. Beräkna medelvärdet av provets duplikatvärden.
4. Jämför resultatet för proverna med standarderna för känd koncentration.

### Tolkning

Anti-adalimumab-ELISA ger två semi-kvantitativa intervaller för förekomst av anti-adalimumab-antikroppar, t.ex. negativt (-) och positivt (+ och ++), indikerade av level 1, en standard med känd koncentration. Level 2 är en andra och godtycklig brytpunkt som kan användas för att klassificera patienter i (svagt) positiva (+) och starkt positiva (++) med avseende på förekomst av anti-adalimumab-antikroppar. Denna godtyckliga brytpunkt är baserad på studier utförda av Sanquin Diagnostic Services. Level 2 kan endast användas som en indikation på mängden av antikroppar, den kan inte användas som en officiell diagnostisk brytpunkt. Nivå 1 och 2 består av fasta koncentrationer av antiläkemedelsantikroppar. Koncentrationerna av antiläkemedelsantikropparna mättes i den interna radioimmunanalysen hos Sanquin Diagnostic Services. Nivå 1 består av 27 AU/mL (SD 3, n = 8) och nivå 2 av 245 AU/mL (SD 16, n = 8). Vid tolkningen av resultaten ska OD450 nm för proverna jämföras med OD450 nm för brytpunkterna enligt beskrivning i figurerna nedan (resultaten för OD450 nm som anges i figuren är typiska resultat och bör betraktas som indikativa). Tolkningen av resultaten är endast giltig om OD450 nm för den positiva kontrollen är > level 2 och OD 450 nm för den negativa kontrollen är < level 1.

Analysen av det semi-kvantitativa intervallet av anti-adalimumab-antikroppar för en patient är starkt beroende av underklassen av IgG-antikroppar och patientens adalimumab-nivå. IgG4-anti-adalimumab-antikroppar kan inte detekteras och därför utesluter inte ett negativt resultat i detta test förekomst av anti-adalimumab-antikroppar av underklassen IgG4. Anti-adalimumab-antikroppar kan inte bestämmas tillförlitligt när adalimumab-nivån är > 0,5 µg/mL. När du utför anti-adalimumab-testet för diagnostiska ändamål och/eller för att fastställa patientens behandlingsprotokoll kan det semi-kvantitativa intervallet som erhålls aldrig användas för en definitiv diagnos, utan måste betraktas som en indikation på en klinisk situation som eventuellt kräver ytterligare diagnostisk utredning. Under beslutsprocessen måste de patientspecifika egenskaperna och de kliniska parametrarna beaktas tillsammans med läkemedelskoncentrationen av adalimumab och intervallet av anti-adalimumab.



## Specifikationer

Precision	: Höga (brytpunkt + 30%) och låga (brytpunkt - 30%) serum- och EDTA-plasmaprover mättes i duplikat i 20 körningar. Alla resultat mättes korrekt i minst 19/20 resultat.
Interferensfaktorer	: Serum- och EDTA-plasmaprover preparerades 30% under och över brytpunkten (level 1). Inga falskt positiva eller falskt negativa resultat erhålls med: hemoglobin - 1 och 50 mg/mL konjugerat bilirubin - 0,02 och 0,5 mg/mL okonjugerat bilirubin - 0,1 och 1,5 mg/mL triglycerider - 15 och 50 mg/mL humanserumalbumin - 80 mg/mL reumafaktor (RA) - 1600 U/mL adalimumab - 0,1 µg/mL
Brytpunkt	EDTA-plasmaprover från friska blodgivare (n = 50) fria från anti-adalimumab-antikroppar eller adalimumab mättes. Brytpunkt level 1 är medelvärde + fem gånger standardavvikelsen.
Metodjämförelse	Överensstämmelse på 89% med Theradiag ADA-ADL kit, testat med 50 positiva prover (OD450 ≥ level 1) och 40 negativa prover (OD450 < level 1). Kappa 0,75; styrkan i överensstämmelsen är "god".

## Begränsningar

- Satsen är endast avsedd för professionellt bruk. Användaren måste ha genomgått utbildning och vara väl förtrogen med ELISA-testprocedurer.
- Säkerställ att alla pipetter och system är kontrollerade och omfattas av fullständig underhållsservice, enligt det förfarande som tillverkaren föreskriver, för att få optimal prestanda vid ELISA-testningen.
- Endast manuell testning av denna sats, enligt beskrivning i denna bruksanvisning, är validerad för Sanquin. Alla krav i denna bruksanvisning är validerade med det manuella testförfarandet. När testet används i en ELISA-automat måste testet valideras av användaren innan det används. Kraven i denna bruksanvisning gäller inte om testet av satsen utförs i en ELISA-automat.
- Endast de reagenser som ingår i satsen får användas. Använd inte reagenser från andra satser eller partier, de är inte utbytbara sinsemellan. Emellertid kan HPE, TMB, stopp- och tvättbuffert användas från andra biologiska Sanquin-kit, förutsatt att materialens hållbarhetstid inte har passerats och att materialen förvarats i tillslutna flaskor vid 2–8 °C.
- Reagenser eller rester av reagenser (t.ex. dödvolym) kan inte blandas med innehållet i nyöppnade ampuller.
- Proppar och ampuller är inte utbytbara sinsemellan. Propparna måste sättas tillbaka i motsvarande ampuller.
- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> kan inte tillsättas till reagensen, detta påverkar testets prestanda.
- Använd inte aluminiumfolie under inkubationsstegen.
- Dalvärdesnivåer av adalimumab bör mätas med MabTrack level adalimumab ELISA (M2910) innan anti-adalimumab bestäms. Tolkningen av resultaten kan endast utföras om både adalimumab-nivåer och -antikroppar beaktas.
- MabTrack ADA adalimumab ELISA är läkemedelskänslig. Adalimumab-koncentrationer ≥ 0,5 µg/mL kan störa testet och ge upphov till negativa resultat. Den tillhandahållna brytpunkten på 0,5 µg/mL är emellertid endast en indikation. Storleken på störningen beror på anti-adalimumab-antikroppens affinitet för läkemedlet. Brytpunkten bestämdes med MabTrack level adalimumab ELISA (M2910) och en monoklonal anti-adalimumab-antikropp med hög affinitet.
- MabTrack ADA adalimumab är en s.k. "bridging ELISA". Anti-adalimumab-antikroppar av underklassen IgG4 kan inte detekteras med denna typ av ELISA eftersom f(ab')<sub>2</sub>-armarna i en IgG4-molekyl känner igen olika epitoper, och kan därför inte "bilda en bro" (bridge) mellan två adalimumab-molekyler.
- Eftersom kontrollerna är utspädda på förhand kan de inte användas för att kontrollera användarens prov- och reagensberedning.
- Falskt positiva eller negativa resultat kan erhållas när proverna används med interferensfaktorer som är högre än vad som indikeras i specifikationerna.
- Den koncentrerade bufferten kan innehålla saltkristaller. Före den utspädda bufferten framställs, värm den koncentrerade bufferten KORT till 37°C för att lösa upp kristallerna.

## Referenser

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

Om du vill ha en komplett lista över alla referenser som Sanquin publicerat för adalimumab, se [www.sanquin.org/biologics](http://www.sanquin.org/biologics)

Sanquin produkter ger garanterat de prestanda som beskrivs i originaltillverkarens bruksanvisning. Det är mycket viktigt att strängt följa beskrivna procedurer, testupställningar och rekommenderade reagensmedel och apparatur. Sanquin fransäger sig allt ansvar till följd av att detta försummas.