

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 infliximab

REF M2960

IVD CE

48

310_v04 01/2019 (da)

Kun til professionelt brug

ELISA til semikvantitativ måling af antistoffer mod infliximab

ADA	IFX	BUF	CONJ	HRP
Antistoffer mod lægemidlet	Infliximab	Buffer	Konjugat	HRP

HUM	WELL	Level
Human	Well	Niveau

Generel information

MabTrack ADA infliximab ELISA er en enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) til hurtig, reproducerbar og specifik semikvantitativ bestemmelse af antistoffer mod infliximab i humane plasma- og serumprøver. Sammen med måling af infliximabindholdet er MabTrack ADA infliximab vigtig for patientjusterede behandlingsplaner. Et lavt lægemiddelindhold er ofte indikation for dannelse af antistoffer mod infliximab. Hos ca. 8-43% af patienter med reumatoid arthritis, der behandles med infliximab, dannes der antistoffer direkte mod infliximabs idiotype. Dette kan hindre TNF-hæmmerens funktion og kan forårsage en reduktion af TNF-hæmmerens plasmakoncentration. Ved hjælp af nøje monitorering af lægemiddelindhold og antistofdannelse i kombination med sygdomsaktiviteten er det muligt for lægen at bestemme lægemiddelaktiviteten objektivt hos den individuelle patient og at udforme patientspecifikke behandlingsplaner. 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 kan forårsage smerter, hævede led og stivhed hos patienter med reumatoid arthritis og sår hos patienter med tarmsygdomme. 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.

Testprincip

MabTrack ADA infliximab ELISA er en "sandwichtype" enzym-immunoassay. Infliximab indfanges i mikrotiterpladerne i mikrotiterbrønde af polystyren. Frie antistoffer mod infliximab i patientprøven, niveau 1-2 og positive og negative kontroller binder sig til infliximab på mikrotiterpladen. Ubundet materiale fjernes derefter ved vask. Derefter tilføjes peberrod-peroxidsemærket infliximab. HRP-mærket infliximab binder sig til infliximab/anti-infliximab-komplekset på overfladen af mikrotiterbrønden. Når ubundet HRP-konjugat er fjernet ved vask, tilsættes der substratopløsning til brøndene. Et farvet produkt dannes i proportion til den mængde antistoffer mod infliximab, der er til stede i prøven og kontrollerne. Når reaktionen afsluttes ved tilsætning af en stopopløsning, måles absorbansen i en mikrotiterpladelæser. Ud fra absorbansen i prøverne og niveauerne kan prøverne kvalificeres som negative (-), (svage) positive (+), stærke positive (+ +) for antistoffer mod infliximab.

Pakkens indhold

Infliximab pre-coated microtiter plate	6 x 8 brønde	-	REF M2961	klar til brug
Level 1	3 x 0,50 mL	gennemsigtige hætter	REF M296201	klar til brug
Level 2	3 x 0,50 mL	gennemsigtige hætter	REF M296202	klar til brug
Control +	3 x 0,50 mL	gennemsigtige hætter	REF M296203	klar til brug
Control -	3 x 0,50 mL	gennemsigtige hætter	REF M296204	klar til brug
Infliximab HRP-konjugat	3 x 3,5 mL	brun flaske	REF M2967	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 6 strimler med 8 brugsklare brønde. Alle brønde er belagt med infliximab. Mikrotiterpladen er vakuumforseglet i en plastikpose indeholdende tørremiddel. Analysesættet giver mulighed for at bruge mikrotiterpladen 3 separate gange. Afgrø det antal strimler, der skal bruges til antallet af prøver, plus 4 brønde, der skal bruges til at køre kontroller. Fjern strimler, der ikke skal anvendes, fra mikrotiterpladen, og pak dem ind igen i plastikposen med tørremiddel.
- Flasker med niveau 1, niveau 2, positiv kontrol, negativ kontrol og HRP-konjugat skal kasseres efter brug, hvis de har været åbnet.

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.
- Mikrotiterpladelæsere (til læsning af OD ved 450 nm).

Forsigtighedsregler

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 24 timer. Hvis prøverne ikke analyseres inden for 24 timer, skal de nedfryses. De kan opbevares nedfrosne ved ≤ -18 °C i 2 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 skal anvendes en fortynding i forholdet 1:10 i denne analyse til at måle antistoffer mod infliximab hos patienter.

Fortynding	Prøvetype	HPE-volumen
1:10	20 μL ufortyndet patientprøve	180 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 μL pr. brønd af kontroller eller fortyndede patientprøver i overensstemmelse med det foreslåede layout for mikrotiterpladen eller dit eget layout.
4. Dæk mikrotiterpladen til med klæbeforsegling, og inkuber i 1 time.
5. Aspirer supernatanter fra brønde, fyld hver brønd med 250 μL 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!
6. Tilsæt 100 μL 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 μL 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 μL 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 (positiv kontrol og niveau 1 og 2), og den negative kontrol stadig er farveløs, skal reaktionen stoppes. Den gennemsnitlige inkubationstid er 10 ± 1 minut.
11. Stop reaktionen ved at tilsætte 100 μL 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 bølglængde på 540-620 nm som reference under målingen.

Foreslået layout af mikrotiterpladen

Kontrollerne skal inkluderes i hver semikvantitativ analysekørsel. De medfølgende reagenser giver brugeren mulighed for at bruge mikrotiterpladen i en til maks. 3 kørsler. Det foreslåede mikrotiterplade-layout er til en enkelt kørsel.

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

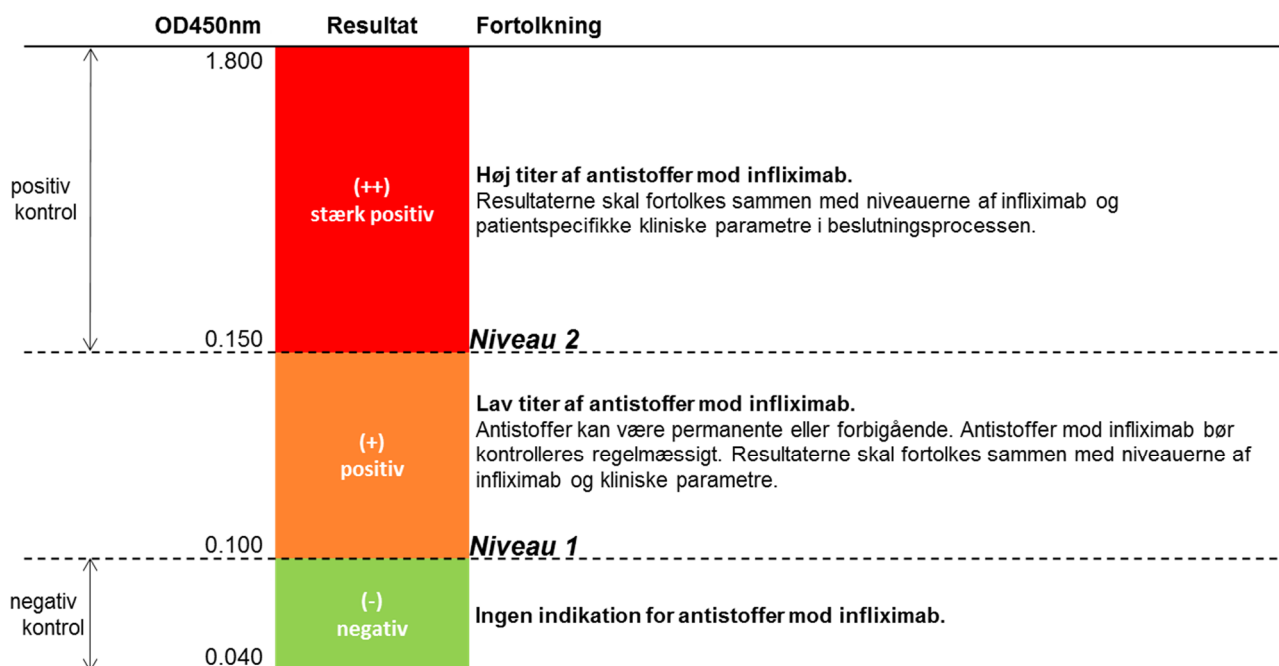
Resultater

1. Noter absorbansen ved 450 nm for hver brønd indeholdende kontroller.
2. Noter absorbansen ved 450 nm for hver brønd indeholdende en specifik prøve.
3. Beregn gennemsnittet af begge værdier for prøven.
4. Sammenlign prøveresultaterne med kontrolresultaterne.

Fortolkning

Anti-infliximab ELISA-testen giver 2 semikvantitative intervaller for tilstedeværelse af antistoffer mod infliximab, f.eks. negative (-) og positive (+ og ++), angivet af niveau 1. Niveau 2 er en sekundær og arbitrær cutoff-værdi, der kan bruges til at klassificere patienter i (svage) positive (+) og stærke positive (++) for tilstedeværelse af antistoffer mod infliximab. Denne arbitrære cutoff-værdi er baseret på studier udført af Sanquin Diagnostic Services. Niveau 2 kan kun bruges som indikation for mængden af antistof, men ikke som officiel diagnostisk cutoff-værdi. Niveau 1 og 2 indeholder faste koncentrationer af anti-medicinske antistoffer. Koncentrationerne af anti-medicinske antistoffer blev målt i den interne radioimmunoassay hos Sanquin Diagnostic Services. Niveau 1 indeholdt 25 AU/mL (SD 3, n = 8) og niveau 2 59 AU/mL (SD 3, n = 8). Ved fortolkning af resultaterne skal OD450 nm af prøverne sammenlignes med OD450 nm af cutoff-værdierne som beskrevet i nedenstående figur (resultaterne af OD450 nm i figuren er typiske resultater og bør anses som indikative). Fortolkningen af resultaterne er kun gyldig, når OD450 nm af den positive kontrol er > niveau 2, og OD450 nm af den negative kontrol er < niveau 1.

Analysen af det semikvantitative interval af antistoffer mod infliximab hos en patient afhænger i høj grad af antistoffernes IgG-subklasse og patientens infliximabniveau. IgG4 antistoffer mod infliximab kan ikke detekteres. Derfor kan et negativt resultat af denne test ikke udelukke tilstedeværelse af antistoffer mod infliximab af IgG4-subklassen. Derudover kan antistoffer mod infliximab ikke bestemmes pålideligt, hvis infliximab-niveauet er > 0,5 µg/mL. Hvis anti-infliximab-testen udføres til diagnostiske formål og/eller for at fastlægge patientens behandlingsplan, må det fundne semikvantitative interval aldrig udgøre en definitiv diagnose, men skal anses som indikation for den kliniske situation, der muligvis vil kræve yderligere diagnostisk undersøgelse. Patientspecifikke egenskaber og kliniske parametre skal bruges sammen med infliximabkoncentration og intervallet af antistoffer mod infliximab i beslutningsprocessen.



Specifikationer

Præcision	: Høje (cutoff + 30%) og lave (cutoff - 30%) serum- og EDTA-plasmaprøver blev målt i duplikat i 20 kørsler. Alle resultater blev korrekt målt i mindst 19/20 resultater.
Interferensfaktorer	: Serum- og EDTA-plasmaprøver blev spiket 30% under og over cutoff-værdien (niveau 1). Der opnås ingen falskt positive eller falskt negative resultater med: hæmoglobin - 1 og 50 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 - 80 mg/mL reumatoid faktor (RA) - 1600 U/mL infiximab - 0,1 µg/mL
Cutoff	EDTA-plasmaprøver fra raske bloddonorer (n = 50) uden antistoffer mod infiximab eller infiximab blev målt. Cutoff-værdien for niveau 1 er middel + fem gange standardafvigelse.
Metodesammenligning	Konkordans på 94% med Theradiag ADA-IFX-kit, analyseret med 50 positive prøver (OD450 ≥ niveau 1) og 40 negative prøver (OD450 < niveau 1). Kappa 0,88; styrken af overensstemmelsen er "god".

Begrænsninger

- Analysesættet er alene fremstillet til professionel brug, og brugeren skal være uddannet i og bekendt med ELISA- testprocedurer.
- ELISA-testens optimale performance opnås bedst ved at sørge for, at alle pipetter og systemer kontrolleres vedligeholdes korrekt ifølge producenternes procedurer.
- 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 performance på en ELISA-maskine.
- Kun de reagenser, der er med i sættet, må bruges. Brug ikke reagenser fra forskellige batcher eller lot – de kan ikke erstatte hinanden. Dog kan HPE-, TMB-, stop- og vaskebuffer fra andre Sanquin-kits anvendes til biologi, forudsat at materialerne ikke har overskredet deres udløbstid, og at de har været opbevaret i lukkede flasker ved 2-8 °C.
- 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 performance.
- Der må ikke anvendes aluminiumsfolie under inkubationstrinene.
- Dalniveauer af infiximab skal måles med MabTrack level infiximab ELISA (M2920) inden antistoffer mod infiximab bestemmes. Fortolkningen af resultaterne kan kun udføres, hvis både infiximab-niveauer og antistoffer tages i betragtning.
- MabTrack ADA infiximab ELISA-testen er lægemiddelfølsom. Infiximab-niveauer ≥ 0,5 µg/mL kan interferere med resultatet og forårsage negative resultater. Den givne cutoff-værdi på 0,5 µg/mL er dog kun en indikation, mængden af interferens afhænger af affiniteten af antistof mod infiximab for lægemidlet. Cutoff-værdien blev bestemt med MabTrack level infiximab ELISA (M2920) og et monoklonalt antistof af høj affinitet mod infiximab.
- MabTrack ADA infiximaber en bridging ELISA. Antistoffer mod infiximab af IgG4-subklassen kan ikke detekteres med denne type ELISA-test, fordi i IgG4 genkender f(ab') armene i et molekyle forskellige epitoper og kan derfor ikke danne bro (bridging) mellem to infiximab-molekyler.
- Da kontrollerne er fortyndet på forhånd, kan de ikke bruges til at kontrollere prøve- og reagenspræparater af brugeren.
- Der kan fås falskt positive eller negative resultater, hvis prøverne anvendes med interferensfaktorer, der er højere end angivet i specifikationerne.
- Den koncentrerede buffer kan indeholde saltkrystaller. Opvarm den koncentrerede buffer KORT til 37°C til at opløse krystallerne, før De tilbereder arbejdsbufferen.

Litteratur

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. Van Schouwenburg P.A.; J Clin Immunol. 2012;32:1000-1006.
6. Hart M.H.; J Immunol Meth 2011;372:196-203

En komplet liste over al litteratur, der er publiceret af Sanquin om infiximab, findes på www.sanquin.org/biologics

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