

# 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 (it)

Solo per uso professionale

### ELISA per la misurazione semi-quantitativa degli anticorpi per infliximab

ADA	IFX	BUF	CONJ	HRP
Anticorpi anti-farmaco	Infliximab	Tampone	Coniugato	HRP

HUM	WELL	Level
Umano	Pozzetto	Livello

### Informazioni generali

MabTrack ADA infliximab ELISA è un test immunoenzimatico (ELISA) per l'analisi semi-quantitativa rapida, riproducibile e specifica, volta a determinare la presenza di anticorpi anti-infliximab in campioni di plasma e siero umano. MabTrack ADA infliximab, assieme alla misurazione dei livelli di infliximab, è importante nel caso di regimi terapeutici personalizzati. Un livello ridotto di infliximab indica spesso la formazione di anticorpi contro di esso. In circa l'8-43% dei pazienti affetti da artrite reumatoide e trattati con infliximab, la formazione di anticorpi è rivolta direttamente al dominio variabile di infliximab. Ciò può ostacolare la funzionalità di questo inibitore del TNF e ridurre la concentrazione plasmatica.

Grazie al monitoraggio accurato dei livelli ematici del farmaco e della formazione di anticorpi, nonché dell'attività della patologia, il medico è in grado di stabilire in modo oggettivo l'attività del farmaco per ogni singolo paziente e di elaborare regimi terapeutici personalizzati. L'anticorpo terapeutico infliximab agisce sul fattore di necrosi tumorale (TNF) ed è spesso somministrato a pazienti affetti da artrite reumatoide, disturbi all'intestino, patologie dermatologiche o neoplasia. Il TNF riveste un ruolo importante nella comparsa di infiammazioni e può causare dolore, gonfiore articolare e rigidità in caso di artrite reumatoide, oppure ulcere nei pazienti con patologie del tratto intestinale. Si ritiene, pertanto, che l'inibizione di tale fattore possa alleviare alcuni sintomi e migliorare la qualità di vita dei pazienti. I livelli plasmatici e sierici degli inibitori del TNF variano ampiamente da un paziente all'altro e sono chiaramente correlati ai sintomi clinici che si manifestano.

### Principio del test

Il test ELISA per gli MabTrack ADA infliximab è un test immunoenzimatico di tipo "sandwich". Utilizza piastre di microtitolazione con pozzetti in polistirene, nei quali infliximab viene catturato. Gli anticorpi anti-infliximab liberi presenti nel campione del paziente, nei livelli 1-2 e nei pozzetti di controllo positivi e negativi si legano all'infliximab nella piastra per microtitolazione. Il materiale non legato viene lavato via. Successivamente si aggiunge infliximab marcato con perossidasi di rafano (HRP). L'infliximab HRP-marcato si lega al complesso infliximab/anti-infliximab presente sulla superficie del pozzetto per microtitolazione. Dopo il lavaggio necessario per rimuovere il materiale coniugato alla perossidasi di rafano non legato, ai pozzetti viene aggiunto il substrato. Si ottiene così un prodotto che assume una diversa colorazione in base alla quantità di anti-infliximab presenti nel campione e nei pozzetti di controllo. La reazione viene interrotta aggiungendo una soluzione bloccante e l'assorbanza viene misurata nel lettore di piastre per microtitolazione. Secondo l'assorbanza dei campioni e dei livelli, i campioni vengono qualificati come negativi (-), (debolmente) positivi (+) e fortemente positivi (+ +) per gli anticorpi anti-infliximab.

### Contenuto della confezione

Infliximab pre-coated microtiter plate	6 x 8 pozzetti	-	REF M2961	pronto all'uso
Level 1	3 x 0,50 mL	tappi trasparenti	REF M296201	pronto all'uso
Level 2	3 x 0,50 mL	tappi trasparenti	REF M296202	pronto all'uso
Control +	3 x 0,50 mL	tappi trasparenti	REF M296203	pronto all'uso
Control -	3 x 0,50 mL	tappi trasparenti	REF M296204	pronto all'uso
Infliximab HRP-conjugate	3 x 3,5 mL	bottiglia marrone	REF M2967	pronto all'uso
Wash buffer stock solution	1 x 50 mL	bottiglia bianca	REF M1805	diluire in acqua distillata 1:20
HPE dilution buffer	1 x 50 mL	bottiglia bianca	REF M2940	pronto all'uso
TMB substrate solution	1 x 12,5 mL	bottiglia marrone	REF M1821	pronto all'uso
Stop solution 0,18 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 x 13,0 mL	bottiglia bianca	REF M1823	pronto all'uso
Plate seals	10 x	-	-	-

- La piastra per microtitolazione con fondo piatto è composta da 6 strisce contenenti ciascuna 8 pozzetti pronti all'uso. Le pareti dei pozzetti sono rivestite con infliximab. La piastra è contenuta in una busta di plastica sottovuoto con un agente essiccante. Il kit consente di utilizzare la piastra per microtitolazione in 3 diverse occasioni. È sufficiente stabilire il numero di strisce di pozzetti necessarie per analizzare i campioni, aggiungere 4 pozzetti per il controllo, rimuovere le strisce inutilizzate dalla piastra e ricollocarle all'interno della busta di plastica con l'agente essiccante.

- Una volta aperti, i flaconcini di livello 1, livello 2, controllo positivo, controllo negativo e coniugato HRP devono essere gettati dopo l'uso.

#### Attrezzature e/o materiali aggiuntivi

- Acqua distillata o deionizzata.
- Pipette calibrate (5-1000  $\mu$ L).
- Pipetta multicanale (30-300  $\mu$ L).
- Becher, beute, provette e contenitori necessari per la preparazione dei reagenti.
- Lettore di piastre per titolazione (per densità ottica di 450 nm).

#### Avvertenze

Unicamente per uso diagnostico in vitro. Conservare i reagenti a temperature comprese tra 2–8 °C. Non utilizzare flaconcini danneggiati o non sigillati. Non utilizzare i reagenti (aperti o non aperti) oltre la data di scadenza riportata sull'etichetta del flaconcino. I reagenti non possono essere considerati esenti da agenti infettivi. Prestare la massima cura nell'utilizzo e nello smaltimento di ciascun flacone e del rispettivo contenuto. Lo smaltimento dei rifiuti, al termine del test, dovrà essere eseguito nel rispetto delle normative interne di laboratorio.

#### Procedura del test

##### Prelievo e preparazione dei campioni

1. Poiché i campioni del livello minimo sono utilizzati per misurare la concentrazione di anti-infliximab, è necessario che siano prelevati entro 24 ore PRIMA dell'iniezione della dose per assicurarsi che i livelli indicati del farmaco attesi riflettano il livello minimo del paziente.
2. Il plasma EDTA e il siero sono le sole componenti del campione utilizzate per l'analisi.
3. Separare il plasma o il siero dalle cellule ematiche entro 4 ore dal prelievo ed eseguire immediatamente il test. In caso di posticipazione del test, è possibile conservare plasma e siero per 24 ore a 2-8 °C. Se l'analisi non è eseguita entro 24 ore dal prelievo, è necessario congelare i campioni e conservarli a una temperatura  $\leq$  -18 °C per un massimo di 2 mesi.
4. Dividere i campioni in contenitori diversi per evitare cicli di congelamento-scongelo.
5. Prima di procedere con il test, lasciar scongelare i campioni a temperatura ambiente. Non utilizzare bagni termostatici a 37 °C o 56 °C per scongelare i campioni.
6. Mescolare i campioni appena prima della preparazione della diluizione.

##### Diluizione dei campioni

1. Quando le misurazioni sono effettuate secondo protocolli validati su sistemi ELISA automatizzati, è possibile usare singole determinazioni dei campioni dei pazienti. Quando analizzati manualmente, si raccomanda di eseguire determinazioni in duplicato per ogni campione.
2. Per misurare i livelli di infliximab nei pazienti, è possibile diluire il campione con un rapporto di 1:10.

Diluizione	Tipo di campione	Volume HPE
1:10	20 $\mu$ L di campione paziente non diluito	180 $\mu$ L

#### Preparazione della soluzione tampone di lavaggio alla concentrazione richiesta

Preparare una soluzione alla concentrazione richiesta aggiungendo 50 mL della soluzione tampone (volume di una bottiglia) a 950 mL di acqua distillata. La soluzione alla concentrazione richiesta può essere conservata a 2-8 °C per un massimo di 2 mesi.

#### Preparazione per la procedura del test ELISA

1. Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (18-25 °C).
2. Il test deve essere eseguito a temperatura ambiente (18-25 °C) senza agitare il campione.
3. Fare in modo che i pozzetti non restino senza coperchio o asciutti per periodi prolungati di tempo tra le diverse fasi di incubazione.
4. Rimuovere con cautela le bolle d'aria dai pozzetti prima dell'incubazione.
5. Per evitare la contaminazione crociata, utilizzare pipette con puntali monouso per ciascun trasferimento e coperture sigillanti nuove durante ogni fase di incubazione/fissaggio del test ELISA.
6. Mescolare i reagenti lentamente ma in maniera completa prima dell'uso, evitando la formazione di schiuma.

#### Esecuzione della procedura del test ELISA

1. Rimuovere la piastra per microtitolazione dalla busta e selezionare il numero di strisce necessarie. Riporre quelle inutilizzate nella sacca con il materiale essiccante.
2. Preparare il tampone di lavaggio e i campioni secondo il protocollo.
3. Aggiungere 100  $\mu$ L per ogni pozzetto di controllo o campione diluito secondo la configurazione suggerita o personalizzata della piastra per microtitolazione.
4. Ricoprire la piastra per microtitolazione con la copertura adesiva sigillante e incubare per 1 ora.
5. Aspirare il soprannatante dai pozzetti e riempire ciascun pozzetto con 250  $\mu$ L di tampone di lavaggio diluito. Lasciare il tampone di lavaggio in ciascun pozzetto per 30-60 secondi per ciclo di lavaggio, quindi vuotare i pozzetti. Dopo il lavaggio (manuale e automatico), rimuovere accuratamente ogni traccia di liquido dalla piastra per microtitolazione picchiettandola sulla carta assorbente con le aperture rivolte verso il basso per rimuovere completamente il tampone di lavaggio residuo. Ripetere questa operazione quattro volte. Dopo il quarto lavaggio i pozzetti devono essere asciutti!
6. Aggiungere 100  $\mu$ L di coniugato HRP infliximab in ciascun pozzetto.
7. Ricoprire la piastra per microtitolazione con la copertura adesiva sigillante e incubare per 1 ora.
8. Aspirare il soprannatante dai pozzetti e riempire ciascun pozzetto con 250  $\mu$ L di tampone di lavaggio diluito. Lasciare il tampone di lavaggio in ciascun pozzetto per 30-60 secondi per ciclo di lavaggio, quindi vuotare i pozzetti. Dopo il lavaggio (manuale e automatico), rimuovere accuratamente ogni traccia di liquido dalla piastra per microtitolazione picchiettandola sulla carta assorbente con le aperture rivolte verso il basso per rimuovere completamente il tampone di lavaggio residuo. Ripetere questa operazione quattro volte. Dopo il quarto lavaggio i pozzetti devono essere asciutti!
9. Aggiungere 100  $\mu$ L di soluzione substrato TMB in ciascun pozzetto.
10. Incubare la piastra per microtitolazione al buio senza agitare. Controllare la colorazione ogni 5 minuti. Interrompere la reazione quando il colore blu compare nei pozzetti positivi (controllo positivo e livello 1 e 2), mentre i pozzetti di controllo negativi restano incolori. Il tempo medio di incubazione è di 10  $\pm$  1 minuti.

11. Interrompere la reazione aggiungendo 100  $\mu$ L di soluzione bloccante in ciascun pozzetto.
12. Misurare la piastra per microtitolazione con un lettore ELISA da 450 nm. Misurare la piastra entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione bloccante. È consentito usare una seconda lunghezza d'onda di riferimento di 540-620 nm durante la misurazione.

#### Configurazione suggerita della piastra per microtitolazione

I controlli devono essere inclusi in ciascun ciclo di analisi semi-quantitativa. I reagenti forniti consentono di utilizzare la piastra per microtitolazione per un massimo di 3 cicli di analisi. Viene proposta una configurazione della piastra per microtitolazione per un unico ciclo di analisi.

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

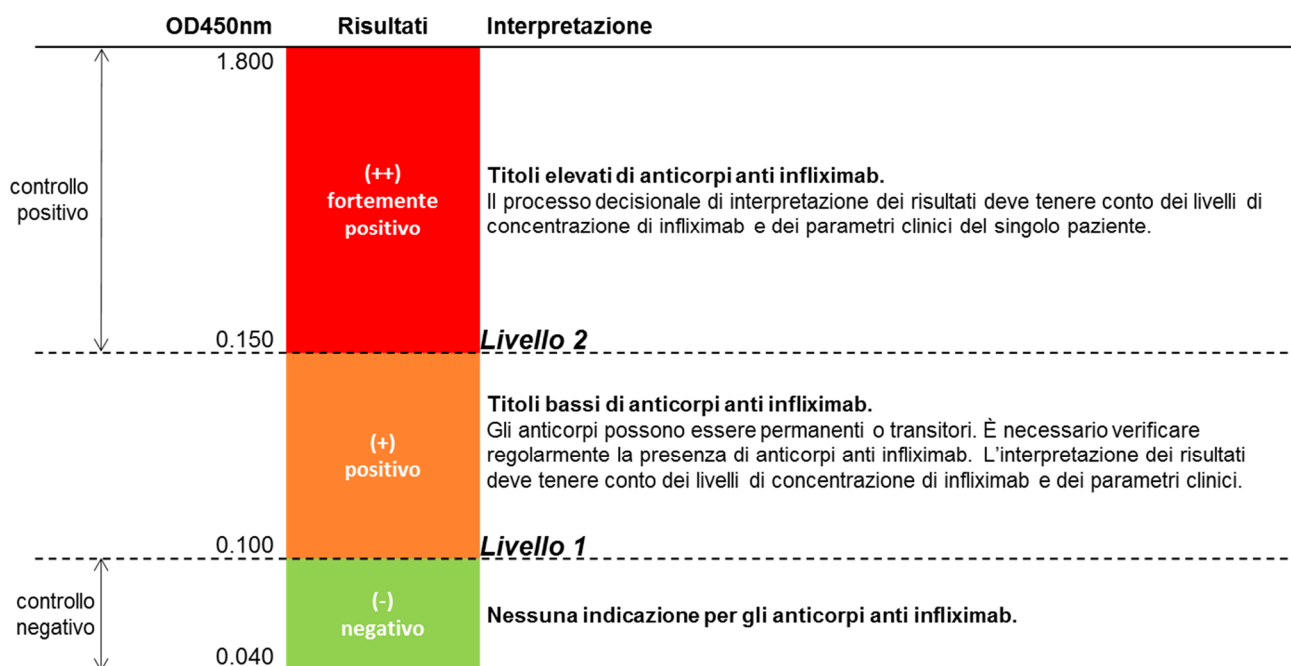
#### Risultati

1. Registrare l'assorbanza a 450 nm per ciascun pozzetto contenente i controlli.
2. Registrare l'assorbanza a 450 nm per ciascun pozzetto contenente un campione specifico.
3. Calcolare la media dei valori duplicati per il campione.
4. Confrontare i risultati dei campioni con i controlli.

#### Interpretazione

Il test ELISA anti-infliximab definisce 2 intervalli semi-quantitativi per valutare la presenza di anticorpi anti-infliximab, ossia negativo (-) e positivo (+ e ++), indicati dal livello 1. Il livello 2 costituisce un cut-off secondario e arbitrario e può essere utilizzato per classificare i pazienti come (debolmente) positivi (+) e fortemente positivi per la presenza di anticorpi anti-infliximab. Tale cut-off arbitrario è basato su studi condotti da Sanquin Diagnostic Services. È possibile utilizzare il livello 2 solo come indicazione del quantitativo di anticorpi; non può essere utilizzato come cut-off diagnostico ufficiale. I livelli 1 e 2 contengono concentrazioni fisse di anticorpi anti-farmaco. Le concentrazioni degli anticorpi anti-farmaco sono state misurate nel dosaggio radioimmunologico interno presso Sanquin Diagnostic Services. Il livello 1 conteneva 25 UA/mL (DS 3, n = 8) e il livello 2 59 UA/mL (DS 3, n = 8). Per l'interpretazione dei risultati, i valori della densità ottica a 450 nm dei campioni devono essere confrontati con i valori di cut-off della densità ottica a 450 nm come indicato nella figura qui sotto (i valori indicati nella figura rappresentano risultati tipici e devono essere considerati indicativi). L'interpretazione dei risultati è considerata valida esclusivamente quando i valori della densità ottica a 450 nm del controllo positivo sono > livello 2, mentre quelli del controllo negativo sono < livello 1.

L'analisi dell'intervallo semi-quantitativo degli anticorpi anti-infliximab di un paziente dipende in gran parte dalla sottoclasse IgG degli anticorpi e dai livelli di infliximab nel paziente. Gli anticorpi IgG4 anti-infliximab non possono essere rilevati e pertanto un risultato negativo in questo test non esclude la presenza di anticorpi anti-infliximab della sottoclasse IgG4. Inoltre, è impossibile determinare il livello di anticorpi anti-infliximab in maniera affidabile quando il livello di concentrazione di infliximab è > 0,5  $\mu$ g/mL. Quando si esegue il test anti-infliximab a scopo diagnostico e/o per stabilire il protocollo terapeutico del paziente, l'intervallo semi-quantitativo rilevato non fornisce una diagnosi definitiva ma deve essere considerato come indicazione della condizione clinica, che può necessitare di ulteriori indagini a scopo diagnostico. Il processo decisionale deve tenere conto dei parametri clinici e delle caratteristiche del singolo paziente, assieme alla concentrazione ematica di infliximab e all'intervallo degli anticorpi anti-infliximab.



#### Specifiche

Precisione	: Campioni di siero e di plasma EDTA con concentrazioni elevate (cut-off + 30%) e basse (cut-off - 30%) sono stati sottoposti a doppia misurazione per 20 cicli di analisi. Tutte le misurazioni sono risultate corrette in almeno 19/20 risultati.
Fattori di interferenza	: Campioni di siero e di plasma EDTA sono stati arricchiti al 30% sopra e sotto il cut-off (livello 1). Non sono stati riscontrati falsi positivi o falsi negativi con: emoglobina - 1 e 50 mg/mL bilirubina coniugata - 0,02 e 0,5 mg/mL bilirubina non coniugata - 0,1 e 1,5 mg/mL trigliceridi - 15 e 50 mg/mL albumina sierica umana - 80 mg/mL fattore reumatoide (RA) - 1600 U/mL infliximab - 0,1 µg/mL
Cut-off	Sono stati misurati campioni di plasma EDTA provenienti da donatori di sangue sani (n = 50) privi di anticorpi anti-infliximab o di infliximab. Il livello 1 di cut-off corrisponde alla media + cinque volte la deviazione standard.
Metodo di confronto	Concordanza del 94% con Theradiag ADA-IFX kit, testato con 50 campioni positivi (valore della densità ottica a 450 nm ≥ livello 1) e con 40 campioni negativi (valore della densità ottica a 450 nm < livello 1). Kappa 0,88; grado di concordanza "molto buono".

#### Limitazioni

- Il kit è stato progettato solo per uso professionale. L'utilizzatore deve essere qualificato e avere familiarità con le procedure del test ELISA.
- Per un'esecuzione ottimale del test ELISA, assicurarsi che le pipette e i sistemi vengano controllati e che siano mantenuti completamente secondo le procedure indicate dai produttori.
- Come descritto in queste IU, solo l'impiego manuale del kit è convalidato da Sanquin. Tutte le indicazioni contenute in queste IU sono convalidate con la procedura di impiego manuale. Quando si utilizza il kit su un'apparecchiatura automatizzata per test ELISA, il test deve essere convalidato dall'utilizzatore prima dell'uso. Le indicazioni contenute in queste IU non sono convalidate per il corretto funzionamento del kit su un'apparecchiatura ELISA.
- Utilizzare solo ed esclusivamente i reagenti contenuti nel kit. Non utilizzare reagenti di altra provenienza o contenuti in altri kit, poiché non sono intercambiabili. Tuttavia, è possibile usare un tampone HPE, TMB, bloccante e di lavaggio proveniente da altri kit Sanquin per biofarmaci, purché i materiali non siano scaduti e i materiali siano stati conservati in flaconi chiusi a 2-8 °C.
- I reagenti o le eccedenze di reagenti (ad es., volumi morti) non devono essere mescolati al contenuto di fiale appena aperte.
- I tappi e le fiale non sono intercambiabili, pertanto occorre inserire il tappo corretto sulla fiala corrispondente.
- Non aggiungere NaN<sub>3</sub> ai reagenti poiché ciò può compromettere le prestazioni del test.
- Non utilizzare fogli di alluminio durante le fasi di incubazione.
- I livelli minimi di infliximab devono essere misurati con MabTrack level infliximab ELISA (M2920) prima della determinazione degli anticorpi anti-infliximab. L'interpretazione dei risultati può essere eseguita solo tenendo in considerazione sia i livelli di infliximab che i livelli di anticorpi.
- Il test ELISA per gli MabTrack ADA infliximab è sensibile ai farmaci. Livelli di concentrazione di infliximab ≥ 0,5 µg/mL possono interferire con l'esito del test e causare risultati negativi. Tuttavia, il cut-off di 0,5 µg/mL è solo un'indicazione e la gravità dell'interferenza dipende dall'affinità degli anticorpi anti-infliximab per il farmaco. Il cut-off è stato determinato con MabTrack level infliximab ELISA (M2920) e un anticorpo anti-infliximab monoclonale a elevata affinità.

- MabTrackADA infliximab è un test ELISA con anticorpo ponte. Gli anticorpi anti-infliximab della sottoclasse IgG4 non possono essere rilevati con questo tipo di test ELISA poiché negli IgG4 le braccia f(ab') di una molecola riconoscono epitopi diversi e pertanto non possono "fare da ponte" tra due molecole di infliximab.
- Il liquido di controllo è pre-diluito, pertanto l'utilizzatore non può impiegarlo per controllare la preparazione del campione e del reagente.
- Se si utilizzano campioni con fattori di interferenza superiori rispetto a quelli indicati nei specifiche, è possibile ottenere risultati negativi o falsi positivi.
- Il tampone concentrato può contenere cristalli di sale. Prima di preparare il tampone alla concentrazione di lavoro, riscaldare BREVEMENTE il tampone concentrato a 37°C per dissolvere i cristalli.

#### **Referenze**

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

**Per un elenco completo delle pubblicazioni di Sanquin su infliximab andare al sito [www.sanquin.org/biologics](http://www.sanquin.org/biologics)**

*Si garantisce che i prodotti Sanquin daranno i risultati indicati nelle istruzioni d'uso del fabbricante originario. È essenziale attenersi rigorosamente a queste indicazioni circa le procedure e layout di prova e utilizzare i reagenti e le apparecchiature raccomandate. Sanquin declina ogni responsabilità per eventuali conseguenze derivanti dalla mancata osservanza di queste norme.*