

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 (no)

Kun til profesjonell bruk

ELISA til semikvantitative målinger av antistoffer mot infliximab

ADA	IFX	BUF	CONJ	HRP
Antistoffer mot legemidler	Infliximab	Buffer	Konjugat	HRP

HUM	WELL	Nivå
Humant	Brønn	Nivå

Generell informasjon

MabTrack ADA infliximab ELISA er en enzymkoblet immunologisk analyse (ELISA) for rask, reproducerbar og spesifikk semikvantitativ bestemmelse av antistoffer mot infliximab i humane plasma- og serumprøver. Sammen med målingen av infliximab-legemiddelnivåer er MabTrack ADA infliximab viktig for pasientjusterte behandlingsplaner. Lave legemiddelnivåer er ofte en indikasjon på antistoffdannelse mot infliximab. Hos ca. 8 til 43% av pasientene med revmatoid artritt behandlet med infliximab, dannes antistoffer rettet mot det variable domenet for infliximab. Dette kan hemme funksjonen av TNF-hemmeren, og kan forårsake en reduksjon i plasmakonsentrasjonen av TNF-hemmeren.

Ved nøye å overvåke legemiddelnivåer og antistoffdannelse i kombinasjon med sykdomsaktivitet kan legen objektivt fastslå legemiddelaktivitet hos en enkeltpasient og tilordne spesifikke behandlingsplaner. Det terapeutiske antistoffet infliximab påvirker tumornekrosefaktor (TNF) og administreres ofte til pasienter som lider av revmatisk artritt, tarmforstyrrelser, dermatologiske sykdommer og kreft. TNF spiller en viktig rolle i betennelse, og kan forårsake smerter, hovne ledd og stivhet hos pasienter med revmatoid artritt, og sår hos pasienter med tarmsykdom. Hemming av TNF antas derfor å lindre noen av disse symptomene og dermed forbedre pasientenes livskvalitet. Plasma- og serumnivåer av TNF-hemmere varierer sterkt mellom pasienter, og har klar sammenheng med de kliniske symptomene hos pasienter.

Testprinsipp

MabTrack ADA infliximab ELISA er en immunologisk enzymanalyse av «sandwich»-typen. I mikrotiterplatene fanges infliximab opp i mikrotiterbrønner av polystyren. Frie antistoffer mot infliximab som finnes i pasientprøven samt i nivå 1-2 og positive og negative kontroller, bindes til infliximab på mikrotiterplaten. Ubundet materiale fjernes deretter ved bruk av vasking. Deretter tilsettes pepperrotperoksidase-merket infliximab. HRP-merket infliximab bindes til infliximab/ anti-infliximab-komplekset på overflaten av mikrotiterbrønnen. Etter at ubundet HRP-konjugat er vasket bort, tilsettes substratløsning i brønnene. Et farget produkt dannes proporsjonalt med mengden anti-infliximab-antistoff i prøven og kontrollene. Når reaksjonen avsluttes ved å tilsette en stoppløsning, måles absorbans i en mikrotiterplateleser. Fra absorbansen for prøver og de for nivåene kan prøvene kvalifiseres som negative (-), (svakt) positive (+) og sterkt positive (++) for anti-infliximab-antistoffer.

Pakningens innhold

Infliximab-forhåndsbelagt mikrotiterplate	6 x 8 brønner	-	REF M2961	bruksklar
Nivå 1	3 x 0,50 mL	gjennomsiktige hetter	REF M296201	bruksklar
Nivå 2	3 x 0,50 mL	gjennomsiktige hetter	REF M296202	bruksklar
Kontroll +	3 x 0,50 mL	gjennomsiktige hetter	REF M296203	bruksklar
Kontroll -	3 x 0,50 mL	gjennomsiktige hetter	REF M296204	bruksklar
Infliximab HRP-konjugat	3 x 3,5 mL	brun flaske	REF M2967	bruksklar
Vaskebuffer-konsentratløsning	1 x 50 mL	hvit flaske	REF M1805	fortynn 1:20 i destillert vann
HPE-fortynningsbuffer	1 x 50 mL	hvit flaske	REF M2940	bruksklar
TMB-substratløsning	1 x 12,5 mL	brun flaske	REF M1821	bruksklar
Stoppløsning 0,18 M H ₂ SO ₄	1 x 13,0 mL	hvit flaske	REF M1823	bruksklar
Plateforseglinger	10 x	-	-	-

- Mikrotiterplaten med flat bunn består av 6 strimler med 8 bruksklare brønner. Alle brønner er belagt med infliximab. Mikrotiterplaten er vakuumsforseglet i en plastpose som inneholder tørkemiddel. Settet gir fleksibilitet til å bruke mikrotiterplaten i tre separate situasjoner. Fastslå antallet strimler som kreves for å teste det ønskede antallet prøver, samt fire brønner påkrevd for å kjøre kontrollene. Fjern strimler som ikke vil bli brukt fra mikrotiterplaten ramme, og legg dem tilbake i plastposen som inneholder tørkemiddelet.
- Hetteglass av nivå 1, nivå 2, positiv kontroll, negativ kontroll og HRP-konjugat etter åpning skal kasseres etter bruk.

Påkrevede tilleggsmaterialer

- Destillert eller avionisert vann
- Kalibrerte pipetter (5-1000 μL).
- Multikanalpipette (30-300 μL).
- Begre, flasker, sylindere og væskebeholdere som kreves for klargjøring av reagenser
- Mikrotiterplateleser (til avlesning av OD ved 450 nm).

Forsiktighetsregler

Kun til in vitro diagnostisk bruk. Reagensene skal oppbevares ved 2-8 °C. Hetteglass som er skadet eller lekket skal ikke brukes. Reagenser (åpnet eller uåpnet) skal ikke brukes etter utløpsdatoen som er trykket på hetteglassets etikett. Reagensene kan ikke antas å være frie for smittefare. Det må utvises forsiktighet ved avhending av alle beholdere og deres innhold. Avfallshåndtering etter at testen er fullført skal gjøres i henhold til reglene ved ditt laboratorium.

Testprosedyre

Innsamling og preparering av prøver

1. Siden prøver ved bunnivå må brukes for å måle konsentrasjonen av anti-infliximab, skal prøver tas innen 24 timer FØR legemiddelet injiseres for å påse at de indikerte forventede nivåene reflekterer pasientens bunnivå.
2. Kun serum og EDTA-plasma kan brukes i analysen.
3. Separer plasma eller serum fra blodcellene innen 4 timer etter innsamling, og utfør analysene umiddelbart. Hvis testing av prøvene blir forsinket, kan de oppbevares ved 2-8 °C i 24 timer. Hvis prøver ikke analyseres innen 24 timer, må prøvene oppbevares frosne, og kan oppbevares ved ≤ -18 °C i 2 måneder.
4. Alikvoter prøver for å unngå fryse-/tinesykluser.
5. Før analysen må frosne prøver tines i romtemperatur. Ikke bruk vannbad på 37 °C eller 56 °C til opptining.
6. Bland prøvene rett før klargjøring av fortyngninger.

Fortynning av prøvene

1. Pasientprøvene kan testes én gang når målingene utføres på validerte protokoller på automatiserte ELISA-systemer. Når de testes manuelt, anbefales det å teste hver prøve to ganger.
2. En fortyngning på 1:10 kan brukes i denne analysen for å måle nivåene av anti-infliximab-antistoff i pasienter.

Fortynning	Prøvetype	HPE-volum
1:10	20 μL ufortynnet pasientprøve	180 μL

Klargjøre vaskebufferens oppløsning av arbeidsstyrke

Klargjør en løsning av arbeidsstyrke ved å tilsette 50 mL av vaskebufferkonsentratløsningen (dette er totalvolumet i én flaske) i 950 mL destillert vann. Oppløsningen av arbeidsstyrke kan oppbevares i 2 måneder ved 2-8 °C.

Klargjøring for ELISA-testprosedyren

1. La alle reagenser romtempereres (18-25 °C).
2. Den fullstendige analysen må utføres i romtemperatur (18-25 °C) uten rysting.
3. Brønnene må ikke være udekte eller tørre i lange perioder mellom inkubasjonstrinnene.
4. Fjern alle luftbobler fra brønnene før inkubasjon.
5. For å unngå krysskontaminering må du bruke engangspipettespisser til hver overføring og bruke nye plateforseglinger for hvert inkubasjons-/fikseringstrinn i ELISA-eksperimentet.
6. Bland alle reagenser grundig, men forsiktig før bruk (uten skumdannelse).

Ytelse av ELISA-testprosedyren

1. Fjern mikrotiterplaten med det nødvendige antallet mikrotiterplatestrimler fra posen. De ubrukte strimlene kan oppbevares i plastposen med tørkemiddelet.
2. Klargjør vaskebufferen og prøvene i samsvar med protokollen.
3. Tilsett 100 μL pr. brønn med kontroller eller ufortynnete pasientprøver i samsvar med forslaget til mikrotiterplatelayout eller din egen layout.
4. Dekk til mikrotiterplaten med en klebende forsegling, og inkuber i 1 time.
5. Aspirer supernatanter fra brønnene, fyll hver brønn med 250 μL fortynnet vaskebuffer. La vaskebufferen ligge i hver av brønnene i 30–60 sekunder per vaskesyklus. Tøm deretter brønnene. Etter vaskingen (manuell og automatisert vasking) må all væske fra mikrotiterplaten kasseres fullstendig. Dette gjøres ved å trykke platen mot absorberende papir med åpningene vendt nedover, slik at alle restene av vaskebufferen fjernes. Gjenta dette fire ganger. Brønnene må være tørre etter den siste vaskingen!
6. Tilsett 100 μL av infliximab HRP-konjugatet i hver brønn.
7. Dekk til mikrotiterplaten med en klebende forsegling, og inkuber i 1 time.
8. Aspirer supernatanter fra brønnene, fyll hver brønn med 250 μL fortynnet vaskebuffer. La vaskebufferen ligge i hver av brønnene i 30–60 sekunder per vaskesyklus. Tøm deretter brønnene. Etter vaskingen (manuell og automatisert vasking) må all væske fra mikrotiterplaten kasseres fullstendig. Dette gjøres ved å trykke platen mot absorberende papir med åpningene vendt nedover, slik at alle restene av vaskebufferen fjernes. Gjenta dette fire ganger. Brønnene må være tørre etter den siste vaskingen!
9. Tilsett 100 μL TMB-sustratløsning i hver brønn.
10. Inkuber mikrotiterplaten på et mørkt sted, uten å ryste den. Undersøk fargedannelsen hvert 5. minutt. Når den blå fargen er utviklet i de positive brønnene (positiv kontroll og nivå 1 og 2) og den negative kontrollen fremdeles er fargeløs, skal reaksjonen stanses. Gjennomsnittlig inkubasjonstid er 10 ± 1 minutter.
11. Stans reaksjonen ved å tilsette 100 μL stoppløsning pr. brønn.
12. Mål mikrotiterplaten i en ELISA-leser ved 450 nm. Les av platen innen 30 minutter etter tilsetning av stoppløsningen. Det er tillatt å bruke en annen referansebølgelengde på 540-620 nm under målingen.

Forslag til mikrotiterplatelayout

Kontrollene må inkluderes for hver semikvantitative analysekjøring. Med de medfølgende reagensene kan brukeren bruke mikrotiterplaten i én til maksimalt tre kjøringer. Et forslag til mikrotiterlayout er angitt for bruk i én enkeltkjøring.

	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	Nivå 1	Prøve 3	Prøve 7	Prøve 11	Prøve 15	Prøve 19						
C	Nivå 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						

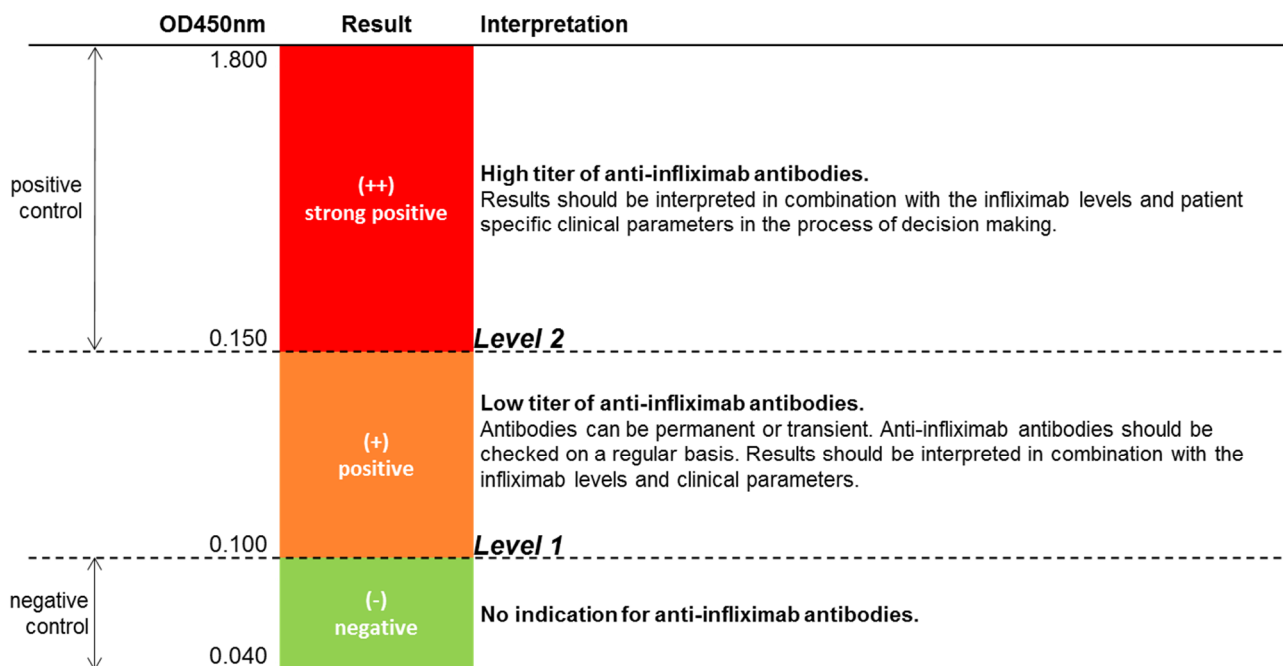
Resultater

1. Registrer absorbansen ved 450 nm for hver brønn som inneholder kontrollen.
2. Registrer absorbansen ved 450 nm for hver brønn som inneholder en spesifikk prøve.
3. Beregn gjennomsnittet av duplikatverdiene for prøven.
4. Sammenlign resultatene av prøvene med kontrollene.

Fortolkning

Anti-infliximab ELISA gir 2 semikvantitative områder for forekomst av anti-infliximab-antistoffer, f.eks. negative (-) og positive (+ og ++), indikert av nivå 1. Nivå 2 er en sekundær og arbitrær cut-off som kan brukes til å klassifisere pasienter som (svakt) positive (+) og sterkt positive (++) for forekomst av anti-infliximab-antistoffer. Denne arbitrære cut-off-verdien er basert på undersøkelser utført av Sanquin Diagnostic Services. Nivå 2 kan kun brukes som en indikasjon på mengden antistoff, og kan ikke brukes som en offisiell diagnostisk cut-off. Nivå 1 og 2 inneholder faste konsentrasjoner av antistoffer mot biologiske legemidler. Konsentrasjonene av antistoffer mot biologiske legemidler ble målt i det interne radioimmunoassayet ved Sanquin Diagnostic Services. Nivå 1 inneholdt 25 AU/mL (SD 3, n = 8) og Nivå 2 59 AU/mL (SD 3, n = 8). For fortolkning av resultatene skal OD450 nm av prøvene sammenlignes med OD450 nm av cut-off-verdiene, som beskrevet i figuren nedenfor (resultatene for OD450 nm angitt i figuren er typiske resultater, og bør anses som en indikasjon). Fortolkning av resultatene er kun gyldig når OD450 nm for den positive kontrollen er > nivå 2 og OD450 nm for den negative kontrollen er < nivå 1.

Analysen av det semikvantitative området for anti-antistoffer hos en pasient avhenger sterkt av IgG-underklassen av antistoffene og pasientens infliximab-nivå. Siden IgG4 anti-infliximab-antistoffer ikke kan påvises, utelukker ikke et negativt resultat i denne testen at det finnes anti-infliximab-antistoffer i IgG4-underklassen. I tillegg kan ikke anti-infliximab-antistoffer fastslås med sikkerhet når infliximab-nivået er > 0,5 µg/mL. Når anti-infliximab-testen utføres for diagnostiske formål og/eller for å fastslå pasientens behandlingsprotokoll, kan det påviste semikvantitative området aldri gi en definitiv diagnose, men skal anses som en indikasjon på den kliniske situasjonen som kan kreve ytterligere diagnostisk evaluering. Pasientspesifikke egenskaper og kliniske parametere skal brukes sammen med infliximab-legemiddelkonsentrasjonen og anti-infliximab-området i beslutningstakingprosessen.



Spesifikasjoner

Presisjon	: Høy (cut-off + 30%) og lav (cut-off - 30%) serum- og EDTA-plasmaprøver ble målt i duplikat i 20 kjøringer. Alle resultater ble korrekt målt i de siste 19/20 resultatene.
Interferensfaktorer	: Serum- og EDTA-plasmaprøver ble anriket 30% under og over cut-off-verdien (nivå 1). Ingen falskt positive eller falskt negative resultater oppnås med: hemoglobin - 1 og 50 mg/mL bilirubin konjugert - 0,02 og 0,5 mg/mL bilirubin ukonjugert - 0,1 og 1,5 mg/mL triglyserider - 15 og 50 mg/mL humant serumalbumin - 80 mg/mL revmatoid faktor (RA) - 1600 E/mL infiximab - 0,1 µg/mL
Cut-off	EDTA-plasmaprøver fra friske blodbankdonorer (n = 50) fri for anti-infiximab-antistoffer eller infiximab ble målt. Cut-off-nivå 1 er gjennomsnittlig + fem ganger standardavvik.
Metodesammenligning	Samsvar på 94% med Theradiag ADA-IFX-settet, testet med 50 positive prøver (OD450 ≥ nivå 1) og 40 negative prøver (OD450 < nivå 1). Kappa 0,88; graden av samsvar er «svært god».

Begrensninger

- Settet er kun beregnet på profesjonell bruk, og brukeren må være opplært og kjent med ELISA-testprosedyrene.
- For optimal ytelse av ELISA må du påse at alle pipetter og systemer er undersøkt og under full vedlikeholdsservice i samsvar med prosedyrene beskrevet av produsenten.
- Kun manuell testing av dette settet, som beskrevet i denne bruksanvisningen, er validert av Sanquin. Alle påstander i denne bruksanvisningen er validert med den manuelle testprosedyren. Når settet brukes på et ELISA-apparat, må testen valideres av brukeren før bruk. Påstandene i denne bruksanvisningen gjelder ikke for ytelse av dette settet på et ELISA-apparat.
- Kun reagenser som leveres med settet, kan brukes. Ikke bruk reagenser fra ulike omganger eller fra ulike settpartier, da disse ikke kan brukes om hverandre. Det kan imidlertid brukes HPE-, TMB-, stopp- og vaskebuffer fra andre Sanquin-sett for biologiske midler, forutsatt at holdbarhetsdatoen for materialene ikke er overskredet og materialene har vært lagret i lukkede beholdere ved 2–8 °C.
- Reagenser eller rester av reagenser (f.eks. dødvolum) kan ikke blandes med innhold i nyåpnede hetteglass.
- Hetter og hetteglass kan ikke brukes om hverandre – hettene må settes på de tilsvarende hetteglassene.
- NaN₃ kan ikke tilsettes i reagenser, da dette påvirker testens ytelse.
- Ikke bruk aluminiumsfolie under inkubasjonstrinnene.
- Bunnivåer av infiximab bør måles med MabTrack level infiximab ELISA (M2920) før anti-infiximab bestemmes. Fortolkningen av resultatene kan kun utføres når infiximab-nivåer og antistoffer tas i betraktning.
- MabTrack ADA infiximab ELISA er legemiddelfølsom. Infiximab-nivåer ≥ 0,5 µg/mL kan forstyrre utfallet og forårsake negative resultater. Den angitte cut-off-verdien på 0,5 µg/mL er imidlertid kun en indikasjon, mengden interferens avhenger av affiniteten til anti-infiximab-antistoffet for legemiddelet. Cut-off ble bestemt med MabTrack level infiximab ELISA (M2920) og et monoklonalt anti-infiximab-antistoff med høy affinitet.
- MabTrack ADA infiximab er en brodannende ELISA. Anti-infiximab-antistoffer i IgG4-underklassen kan ikke påvises med denne typen ELISA, siden i IgG4 gjenkjenner f(ab')-gruppene til et molekyl ulike epitoper, og derfor ikke kan danne en «bro» mellom de to infiximab-molekylene.
- Siden kontrollene er forhåndsfortynnet, kan de ikke brukes for å undersøke prøve- og reagensklargjøring av brukeren.
- Falskt positive eller negative resultater kan forekomme når prøver brukes med høyere interferensfaktorer enn de som er angitt i spesifikasjonene.
- Bufferkonsentratet kan inneholde saltkrystaller. Før tilberedning av den bruksklare bufferen, må du varme opp bufferkonsentratet RASKT til 37 °C for å løse opp krystallene.

Referanser

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

Se www.sanquin.org/biologics for en fullstendig liste over alle referanser utgitt av Sanquin vedrørende infiximab.

Det garanteres at produkter fra Sanquin virker som beskrevet i produsentens originale bruksanvisning. Det er av avgjørende betydning at prosedyrer, testutforminger og anbefalte reagenser og utstyr overholdes nøye. Sanquin fraskriver seg ethvert ansvar som følge av noe avvik fra dette.