

# 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

**MabTrackADA infliximab**

REF M2960

IVD CE

48

310\_v04 01/2019 (es)

*Sólo para uso profesional*

## ELISA para la medición semicuantitativa de los anticuerpos frente a infliximab

ADA	IFX	BUF	CONJ	HRP
Anticuerpos antifármaco	Infliximab	Tampón	Conjugado	HRP

HUM	WELL	Level
Humano	Pocillo	Concentración

### Información general

El ensayo ELISA de MabTrack ADA de infliximab es un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para la determinación semicuantitativa rápida, reproducible y específica de las concentraciones de anticuerpos frente a infliximab en muestras de plasma y suero humanos. Junto con la medición de las concentraciones farmacológicas de infliximab, el MabTrack ADA infliximab es importante para establecer los planes de tratamiento personalizados para cada paciente. Las concentraciones bajas del fármaco suelen ser un indicador de la formación de anticuerpos frente a infliximab. Entre el 8 y el 43%, aproximadamente, de los pacientes con artritis reumatoide que recibieron tratamiento con infliximab presentaron formación de anticuerpos dirigidos contra el dominio de la variable del infliximab. Esto puede dificultar la función del inhibidor del TNF y reducir la concentración plasmática del inhibidor del TNF. Mediante el seguimiento de las concentraciones farmacológicas, la formación de anticuerpos y la actividad de la enfermedad, el médico puede determinar de forma objetiva la actividad farmacológica en cada paciente y diseñar planes de tratamiento personalizados para cada caso. El anticuerpo terapéutico infliximab afecta al factor de necrosis tumoral (TNF) y se suele administrar a pacientes que padecen artritis reumatoide, trastornos intestinales, enfermedades dermatológicas y cáncer. El TNF desempeña un papel importante en la inflamación y puede producir dolor, rigidez e hinchazón en las articulaciones en los pacientes con artritis reumatoide y úlceras en los pacientes que padecen enfermedades cónicas. Por lo tanto, se cree que la inhibición del TNF puede aliviar algunos de estos síntomas y, en consecuencia, mejorar la calidad de vida de los pacientes. Las concentraciones plasmáticas y séricas de los inhibidores del TNF varían mucho entre pacientes y están claramente vinculadas a los síntomas clínicos de estos.

### Principio de la prueba

El ELISA de MabTrack ADA de infliximab es un inmunoensayo enzimático de «tipo sándwich». En las placas de pocillos, los pocillos de poliestireno capturan el infliximab. Los anticuerpos anti-infliximab libres, que están presentes en la muestra del paciente, las concentraciones 1 y 2, y los controles positivo y negativo se fijan al infliximab en la placa de pocillos. El material que no se ha fijado se elimina al lavar la placa. Posteriormente, se añade infliximab marcado con peroxidasa de rábano (HRP). El infliximab marcado con HRP se fija al complejo infliximab/anti-infliximab que se encuentra en la superficie del pocillo de microtitulación. Después de lavar el pocillo para eliminar el conjugado de HRP no fijado, se añade una solución de sustrato. Entonces, se formará un producto coloreado proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-infliximab presentes en la muestra y los controles. Una vez añadida la solución de interrupción para terminar la reacción, se mide la absorbancia en un lector de placas de pocillos. A partir de la absorbancia de las muestras y de la de las concentraciones, las muestras pueden clasificarse como negativas (-), (débilmente) positivas (+) y fuertemente positivas (+ +) en relación con anticuerpos anti-infliximab.

### Contenido del envase

Infliximab pre-coated microtiter plate	6 x 8 pocillos	-	REF M2961	listo para usar
Level 1	3 x 0,50 mL	tapones transparentes	REF M296201	listo para usar
Level 2	3 x 0,50 mL	tapones transparentes	REF M296202	listo para usar
Control +	3 x 0,50 mL	tapones transparentes	REF M296203	listo para usar
Control -	3 x 0,50 mL	tapones transparentes	REF M296204	listo para usar
Infliximab HRP-conjugate	3 x 3,5 mL	frasco marrón	REF M2967	listo para usar
Wash buffer stock solution	1 x 50 mL	frasco blanco	REF M1805	diluir al 1:20 en agua destilada
HPE dilution buffer	1 x 50 mL	frasco blanco	REF M2940	listo para usar
TMB substrate solution	1 x 12,5 mL	frasco marrón	REF M1821	lista para usar
Stop solution 0,18 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 x 13,0 mL	frasco blanco	REF M1823	lista para usar
Plate seals	10 x	-	-	-

- La placa de pocillos de fondo plano contiene 6 filas de 8 pocillos listos para usar. Todos los pocillos están recubiertos con infliximab. La placa de pocillos está envasada al vacío en una bolsa de plástico que contiene secante. El kit permite utilizar la placa de pocillos en tres distintas ocasiones. Determine el número de filas que necesita para analizar el número de muestras deseado y añada 4 pocillos para los controles. Extraiga las filas que no vaya a utilizar del bastidor de la placa de pocillos y vuelva a introducirlas en la bolsa de plástico que contiene el secante.
- Una vez abiertos, los viales de concentración 1, concentración 2, control positivo, control negativo y conjugado de HRP deben desecharse tras su uso.

#### **Materiales y/o equipos adicionales**

- Agua destilada o desionizada.
- Pipetas aforadas (5-1000  $\mu\text{L}$ ).
- Pipeta multicanal (30-300  $\mu\text{L}$ ).
- Vasos de precipitados, matraces, probetas y recipientes para los líquidos necesarios para preparar los reactivos.
- Lector de placas de pocillos (para leer la OD a 450 nm).

#### **Precauciones**

Sólo para el uso diagnóstico in vitro. Se recomienda guardar los reactivos a 2–8 °C. No usar los viales que pierden líquido o dañados. No usar los reactivos (abiertos o cerrados) después de la fecha de vencimiento, que aparece en la etiqueta del vial. No se puede garantizar que los reactivos están libres de agentes infecciosos. Usar y desechar cada recipiente y su contenido con cuidado. La eliminación de residuos después de concluir el análisis, debe realizarse conforme a las regulaciones de su laboratorio.

#### **Procedimiento de la prueba**

##### **Recogida y preparación de las muestras**

1. Para medir la concentración de anticuerpos anti-infliximab se deben utilizar muestras de concentración mínima. Por lo tanto, esas muestras se deben tomar en las 24 horas ANTERIORES a la inyección del fármaco para asegurarse de que los niveles esperados indicados reflejan el nivel de concentración mínima del paciente.
2. En el ensayo solo se puede utilizar suero y plasma con AEDT.
3. Separe el plasma o el suero de los glóbulos sanguíneos en las 4 horas posteriores a la recogida de las muestras y realice los análisis inmediatamente. Si se retrasa el análisis de las muestras, estas se pueden almacenar a una temperatura de entre 2 y 8 °C durante 24 horas. Si no se analizan las muestras en un periodo de 24 horas, estas se deben congelar. Pueden almacenarse a  $\leq -18$  °C durante 2 meses.
4. Divida las muestras en partes iguales para evitar ciclos de congelación y descongelación.
5. Antes de realizar el ensayo, se deben descongelar las muestras a temperatura ambiente. No descongele las muestras con baños María a 37 °C o 56 °C.
6. Mezcle las muestras justo antes de preparar las diluciones.

##### **Dilución de las muestras**

1. Se pueden utilizar determinaciones únicas de muestras de pacientes si las mediciones se realizan en protocolos validados en sistemas ELISA automatizados. Si el análisis se realiza manualmente, se recomienda llevar a cabo determinaciones por duplicado de cada muestra.
2. Para medir las concentraciones de anticuerpos anti-infliximab de los pacientes, en este ensayo se puede utilizar una relación de dilución de 1:10.

Dilución	Tipo de muestra	Volumen de HPE
1:10	20 $\mu\text{L}$ de muestra del paciente sin diluir	180 $\mu\text{L}$

##### **Preparación de la solución lista para usar del tampón de lavado**

Para preparar la solución lista para usar, añada 50 mL de la solución madre de tampón de lavado (este es el volumen total de un frasco) a 950 mL de agua destilada. La solución lista para usar se puede almacenar a una temperatura de entre 2 y 8 °C durante un periodo de hasta 2 meses.

##### **Preparación para el procedimiento de la prueba ELISA**

1. Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-25 °C).
2. El ensayo se debe realizar a temperatura ambiente (18-25 °C) y sin agitado.
3. No deje que los pocillos permanezcan descubiertos o secos durante periodos de tiempo prolongados entre las fases de incubación.
4. Elimine con cuidado todas las burbujas de aire de los pocillos antes de la incubación.
5. Para evitar la contaminación cruzada, utilice puntas de pipeta desechables para cada transferencia y sellos de placas nuevos para cada fase de incubación/fijación del experimento ELISA.
6. Mezcle todos los reactivos minuciosamente antes de utilizarlos (sin formar espuma).

##### **Realización del procedimiento de la prueba ELISA**

1. Extraiga de la bolsa la placa de pocillos con el número de filas de pocillos que necesite. Las filas que no se utilicen se pueden almacenar en la bolsa de plástico con secante.
2. Prepare el tampón de lavado y las muestras según el protocolo.
3. Añada 100  $\mu\text{L}$  de controles o muestras de pacientes diluidas por pocillo según la disposición propuesta para la placa de pocillos o según su propio diseño.
4. Cubra la placa de pocillos con la tapa adhesiva e incúbela durante 1 hora.
5. Aspire el sobrenadante de los pocillos y rellene cada uno con 250  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado diluido. Deje el tampón de lavado en cada pocillo de 30 a 60 segundos en cada ciclo de lavado, a continuación vacíe los pocillos. Tras el lavado (lavado manual y automatizado), deshágase minuciosamente de todo el líquido de la microplaca secándolo con papel absorbente con las aperturas bocabajo para eliminar todo el tampón de lavado residual. Repita este proceso cuatro veces. Tras el lavado final los pocillos deben estar secos!
6. Añada 100  $\mu\text{L}$  del conjugado de HRP de infliximab a cada pocillo.
7. Cubra la placa de pocillos con la tapa adhesiva e incúbela durante 1 hora.
8. Aspire el sobrenadante de los pocillos y rellene cada uno con 250  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado diluido. Deje el tampón de lavado en cada pocillo de 30 a 60 segundos en cada ciclo de lavado, a continuación vacíe los pocillos. Tras el lavado (lavado manual y

automatizado), deshágase minuciosamente de todo el líquido de la microplaca secándolo con papel absorbente con las aperturas bocabajo para eliminar todo el tampón de lavado residual. Repita este proceso cuatro veces. Tras el lavado final los pocillos deben estar secos!

9. Añada 100  $\mu$ L de la solución de sustrato TMB a cada pocillo.
10. Incube la placa de pocillos en la oscuridad y no la agite. Compruebe la formación de color cada 5 minutos. Cuando se haya formado el color azul en los pocillos positivos (control positivo y concentración 1 y 2) y el control negativo siga incoloro, se debe detener la reacción. El tiempo promedio de incubación es de  $10 \pm 1$  minutos.
11. Para detener la reacción, añada 100  $\mu$ L de solución de interrupción por pocillo.
12. Mida la placa de pocillos en un lector ELISA a A450 nm. Lea la placa en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de interrupción. Se permite utilizar una segunda longitud de onda de referencia de 540-620 nm durante la medición.

#### Disposición propuesta de la placa de pocillos

Los controles deben incluirse en cada serie de análisis semicuantitativo que se realice. Los reactivos que se proporcionan ofrecen al usuario la posibilidad de utilizar la placa de pocillos en un máximo de tres series. A continuación, se propone una disposición de la placa de pocillos para una sola serie.

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

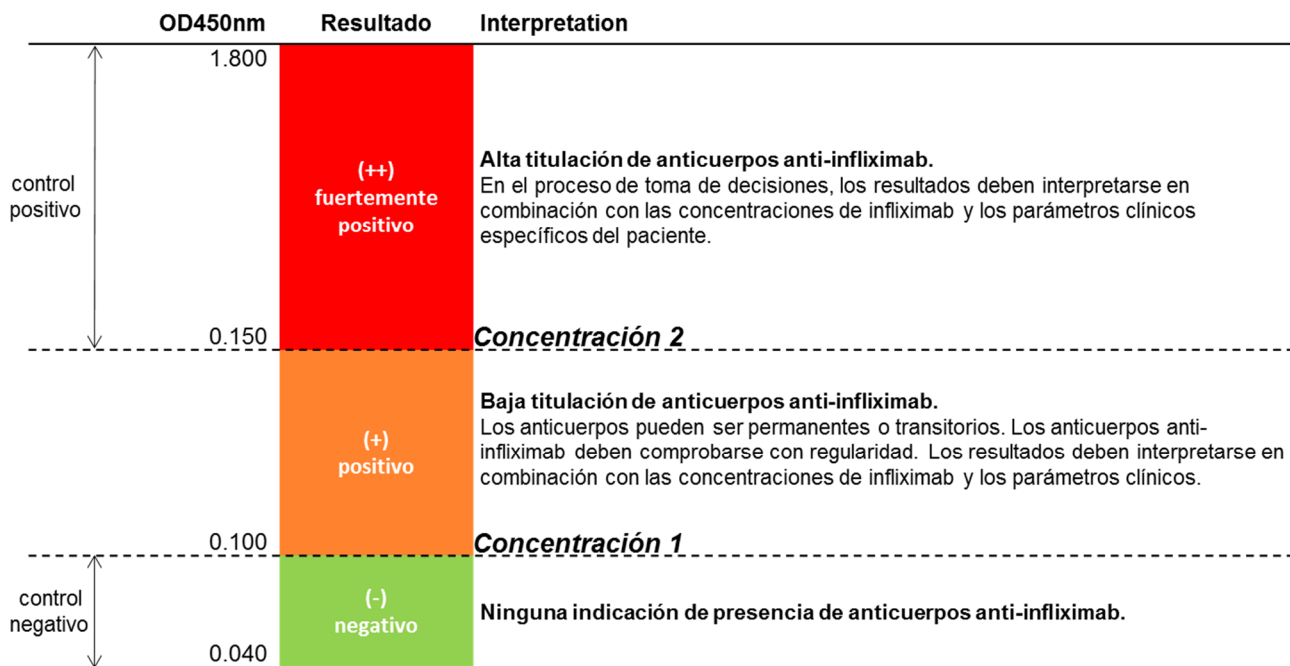
#### Resultados

1. Registre la absorbancia a 450 nm de cada pocillo que contenga los controles.
2. Registre la absorbancia a 450 nm de cada pocillo que contenga una muestra específica.
3. Calcule la media de los valores de la muestra multiplicados por dos.
4. Compare el resultado de las muestras con los controles.

#### Interpretación

El ensayo ELISA para determinación de la concentración de anticuerpos anti-infliximab proporciona dos rangos semicuantitativos para establecer la presencia de anticuerpos anti-infliximab, por ejemplo, negativo (-) y positivo (+ y ++), indicado por la concentración 1. La concentración 2 es un valor de corte secundario y arbitrario que se puede utilizar para clasificar a los pacientes como (débilmente) positivos (+) y fuertemente positivos (++) en relación con la presencia de anticuerpos anti-infliximab. Este corte arbitrario se basa en estudios realizados por Sanquin Diagnostic Services. La concentración 2 solo se puede utilizar como indicador de la cantidad de anticuerpos y, por tanto, no se puede utilizar como valor de corte diagnóstico oficial. Los niveles 1 y 2 contienen concentraciones fijas de anticuerpos antifármaco. Las concentraciones de anticuerpos antifármaco se midieron en el radioinmunoensayo interno en Sanquin Diagnostic Services. El nivel 1 contenía 25 AU/mL (DE 3, n = 8) y el nivel 2 59 AU/mL (DE 3, n = 8). Para la interpretación de los resultados, la OD a 450 nm de las muestras debe compararse con la OD a 450 nm de los valores de corte, tal y como se describe en la figura a continuación (los resultados de OD a 450 nm que se proporcionan en la figura son los resultados típicos y deben considerarse indicativos). La interpretación de los resultados solo es válida cuando la OD a 450 nm del control positivo es superior a la concentración 2 y la OD a 450 nm del control negativo es inferior a la concentración 1.

El análisis del rango semicuantitativo de anticuerpos anti-infliximab de un paciente depende en gran medida de la subclase de IgG de los anticuerpos y de la concentración de infliximab de los pacientes. Los anticuerpos anti-infliximab IgG4 no se pueden detectar; por consiguiente, un resultado negativo de este análisis no excluye la presencia de anticuerpos anti-infliximab de la subclase IgG4. Además, la presencia de anticuerpos anti-infliximab no se puede determinar de manera fiable si la concentración de infliximab es  $> 0,5 \mu\text{g/mL}$ . Cuando se realiza la prueba de presencia de anticuerpos anti-infliximab con fines diagnósticos o para determinar el protocolo de tratamiento del paciente, el rango semicuantitativo obtenido nunca puede ofrecer un diagnóstico definitivo, sino que se debe considerar como una señal de la situación clínica que pueda requerir un estudio diagnóstico más profundo. En el proceso de toma de decisiones, se deben tener en cuenta tanto los parámetros clínicos como el cuadro clínico específico del paciente junto con la concentración farmacológica de infliximab y el rango de anticuerpos anti-infliximab.



#### Especificaciones

Precisión	: Las muestras de suero y plasma con AEDT con valores altos (valor de corte + 30%) y bajos (valor de corte -30 %) se midieron por duplicado en 20 series. Todos los resultados se midieron correctamente en al menos 19/20 resultados.																					
Factores de interferencia	: Los valores máximos de suero y plasma con AEDT fueron un 30 % inferiores y superiores al valor de corte (concentración 1). No se obtuvieron resultados falsos positivos ni falsos negativos con: <table border="0"> <tr> <td>hemoglobina</td> <td>-</td> <td>1 y 50 mg/mL</td> </tr> <tr> <td>bilirrubina conjugada</td> <td>-</td> <td>0,02 y 0,5 mg/mL</td> </tr> <tr> <td>bilirrubina no conjugada</td> <td>-</td> <td>0,1 y 1,5 mg/mL</td> </tr> <tr> <td>triglicéridos</td> <td>-</td> <td>15 y 50 mg/mL</td> </tr> <tr> <td>seroalbúmina humana</td> <td>-</td> <td>80 mg/mL</td> </tr> <tr> <td>factor reumatoide (AR)</td> <td>-</td> <td>1600 U/mL</td> </tr> <tr> <td>infliximab</td> <td>-</td> <td>0,1 mg/mL</td> </tr> </table>	hemoglobina	-	1 y 50 mg/mL	bilirrubina conjugada	-	0,02 y 0,5 mg/mL	bilirrubina no conjugada	-	0,1 y 1,5 mg/mL	triglicéridos	-	15 y 50 mg/mL	seroalbúmina humana	-	80 mg/mL	factor reumatoide (AR)	-	1600 U/mL	infliximab	-	0,1 mg/mL
hemoglobina	-	1 y 50 mg/mL																				
bilirrubina conjugada	-	0,02 y 0,5 mg/mL																				
bilirrubina no conjugada	-	0,1 y 1,5 mg/mL																				
triglicéridos	-	15 y 50 mg/mL																				
seroalbúmina humana	-	80 mg/mL																				
factor reumatoide (AR)	-	1600 U/mL																				
infliximab	-	0,1 mg/mL																				
Valor de corte	Se midieron muestras de plasma con AEDT de donantes sanos procedentes de bancos de sangre (n = 50) libres de anticuerpos anti-infliximab o infliximab. El nivel de concentración de corte 1 es la media más cinco veces la desviación estándar.																					
Comparación de métodos	Concordancia del 94% con Theradiag ADA-IFX kit, analizada con 50 muestras positivas (OD450 ≥ concentración 1) y 40 muestras negativas (OD450 < concentración 1). Kappa 0,88; la fuerza de concordancia es «muy buena».																					

#### Limitaciones

- El kit se ha diseñado solo para uso profesional. El usuario debe estar formado y familiarizado con los procedimientos de la prueba ELISA.
- Para un rendimiento óptimo de ELISA, asegúrese de que se han comprobado todas las pipetas y todos los sistemas y que estos se han sometido a un plan de mantenimiento completo según los procedimientos descritos por los fabricantes.
- Sanquin solo ha validado la prueba manual de este kit tal y como se describe en estas IFU. Todas las declaraciones de estas IFU se han validado con el procedimiento de prueba manual. Antes de utilizar el kit en un ensayo ELISA automático, el usuario debe validar la prueba. Las declaraciones de estas IFU no son válidas para realizar este kit en una máquina para ensayos ELISA.
- Solo se deben utilizar los reactivos que se facilitan con el kit. No utilice reactivos de otros lotes o de lotes de kits diferentes. Los reactivos no son intercambiables. Sin embargo, es posible utilizar tampones de lavado, parada, TMB o HPE de otros kits para productos biológicos de Sanquin; siempre y cuando los materiales no hayan superado su vida útil y se almacenen en botellas cerradas a 2-8 °C.
- Los reactivos o los restos de reactivos (por ejemplo, el volumen muerto) no se pueden mezclar con el contenido de viales recién abiertos.
- Los tapones y los viales no son intercambiables. Los tapones se deben volver a colocar en los viales correspondientes.
- No se puede añadir NaN<sub>3</sub> a los reactivos, pues esto afecta al rendimiento de la prueba.
- No utilice papel de aluminio durante las fases de incubación.
- Deben medirse los niveles de concentración mínima de infliximab con el ensayo MabTrack level infliximab ELISA (M2920) antes de determinar la concentración de anticuerpos anti-infliximab. La interpretación de los resultados solo se puede realizar teniendo en cuenta tanto las concentraciones de infliximab como las de los anticuerpos.
- El ensayo ELISA de MabTrack ADA de infliximab es sensible al fármaco. Las concentraciones de infliximab ≥ 0,5 µg/mL pueden interferir en el resultado y derivar en resultados negativos. El valor de corte dispuesto de 0,5 µg/mL es, no obstante, una mera

indicación. La intensidad de la interferencia depende de la afinidad del anticuerpo anti-infliximab en relación con el fármaco. El valor de corte se determinó con el ensayo MabTrack level infliximab ELISA (M2920) y un anticuerpo anti-infliximab monoclonal de alta afinidad.

- El ensayo de MabTrack ADA infliximab es un ensayo ELISA puente. Los anticuerpos anti-infliximab de la subclase IgG4 no se pueden detectar en este tipo de ensayo ELISA, dado que en la IgG4 los fragmentos Fab de una molécula reconocen diferentes epítopos y, por tanto, no puede actuar de puente entre las dos moléculas de infliximab.
- Cuando se prediluyen los controles, el usuario no puede utilizarlos para comprobar la muestra y la preparación de los reactivos.
- Es posible obtener resultados falsos positivos o falsos negativos cuando se utilizan muestras con factores de interferencia superiores a los indicados en las especificaciones.
- El tampón concentrado puede contener cristales de sal. Antes de preparar el tampón de carga de trabajo, calentar el tampón concentrado POR POCO TIEMPO a 37°C para disolver los cristales.

#### **Referencias**

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.

**Para obtener una lista completa de todas las referencias publicadas por Sanquin sobre infliximab, visite [www.sanquin.org/biologics](http://www.sanquin.org/biologics)**

*Se garantiza que los productos Sanquin funcionarán tal como se describe en las instrucciones de uso del fabricante original. Es fundamental el cumplimiento estricto en relación a los procedimientos, los diseños de prueba y los reactivos y equipos recomendados. Sanquin rechaza toda responsabilidad que surja de cualquier desvío de ellos.*