

# Instructions for use



Sanquin Reagents B.V.  
Plesmanlaan 125  
1066 CX Amsterdam  
The Netherlands

Phone: +31 20 5123599  
Fax: +31 20 5123570  
Reagents@sanquin.nl  
www.sanquin.org/biologics

**MabTrack level infliximab**

REF M2920

IVD CE

96

308\_v08 06/2023 (sv)

Endast för professionellt bruk

## ELISA för kvantitativ mätning av läkemedelskoncentrationer av infliximab

Ab	BUF	CAL	CONJ	HRP
Antikroppar mot	Buffert	Kalibrator	Konjugat	HRP

HUM	IFX	MOU	REK	TNF
Humant	Infliximab	Mus	Rekombinant	TNF

WELL	≥ - ≤
Brunn	Intervall

## Avsedd användning

MabTrack level infliximab är en enzymkopplad immunanalys (ELISA) för snabb, reproducerbar och specifik kvantitativ bestämning av alla läkemedel som innehåller den aktiva substansen infliximab i humana plasma- och serumprover.

## Allmän information

Den terapeutiska chimära antikroppen infliximab påverkar tumörnekrosfaktor alfa (TNF) och ges ofta till patienter som lider av reumatoid artrit, tarmrubbingar, dermatologiska sjukdomar och cancer. TNF spelar en viktig roll vid inflammationer och kan till exempel orsaka smärta, svullna leder och stelhet hos patienter med reumatoid artrit. Genom behandling med TNF-hämmare anses 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. Hos cirka 8%-43% av de patienter som behandlas med infliximab bildas antikroppar riktade mot infliximab. Detta kan delvis hindra funktionen hos TNF-hämmaren och orsaka en minskning av koncentrationen av TNF-hämmaren i plasma. Att identifiera läkemedelskoncentrationer kan vara viktigt vid patientanpassade behandlingsscheman eftersom låga läkemedelskoncentrationer ofta är en indikation på att antikroppar bildats mot infliximab. Dessutom kan låga läkemedelskoncentrationer vara ett tecken på ineffektivitet hos infliximab innan kliniska symtom återkommer. Alternativt föreslås att dosen av infliximab sänks i enlighet med serumkoncentrationen för patienter som svarar väl på infliximab. Tester av läkemedelskoncentration kan därför vara till hjälp vid anpassning av patientens medicinering eller byte till en alternativ TNF-hämmare. Denna infliximab level ELISA är avsedd för snabb, reproducerbar och specifik kvantifiering av infliximabkoncentrationer i humana plasma- och serumprover.

Optimala kliniska nivåer, dvs. terapeutisk brytpunkt, har fastställts på Sanquin Diagnostic Services med infliximab ELISA för reumatoid artrit till att vara minst 3,0 µg/mL (Van de Bemt *et al.* 2013). För inflammatorisk tarmsjukdom är det optimala intervallet 3-7 µg/mL (Vande Casteele *et al.*).

Mabtrack level infliximab kittet är kalibrerat enligt WHO International Standard och säljs av National Institute for Biological Standards and Control (#16/170)).

## Testprincip

MabTrack level infliximab ELISA är en enzymkopplad immunanalys av "sandwich-typ". På mikrotiterplattorna fångas TNF av monoklonala antikroppar bundna till mikrotiterbrunnar av polystyren. Infliximab, som finns i patientprovet, kalibratortest eller kontrollerna binds till TNF på mikrotiterplattan. Icke bundet material kan sedan tvättas bort. Därefter läggs en monoklonal anti-läkemedelsantikropp märkt med HRP (pepparrotsperoxidas) till. Denna antikropp binds till den sammansättning av infliximab/TNF/anti-TNF som finns i mikrotiterbrunnen. Efter att icke bundet HRP-konjugat tvättats bort tillförs substratlösning i brunnen. En färgad produkt bildas i proportion till den mängd infliximab som finns i provet, kalibratortest och kontrollerna. När reaktionen har avbrutits genom en tillsats av stopplösning mäts absorbansen i en mikrotiterplattläsare. Med hjälp av absorbansen från proverna och kalibratortestkurvan kan koncentrationen av infliximab fastställas genom interpolering med kalibratortestkurvan.

### Förpackningens innehåll

Mouse-anti-TNF/recombinant TNF pre-coated microtiter plate	12 x 8 brunnar	-	REF	M2911	klart att använda
Calibrator 1-6	6 x 1 mL	svarta proppar	REF	M2922	klart att använda
Control 1	1 x 1 mL	klar propp	REF	M2923	klart att använda, terapeutisk nivå
Control 2	1 x 1 mL	klar propp	REF	M2924	klart att använda, terapeutisk nivå
Human anti-infliximab HRP-conjugate	1 x 12,5 mL	brun flaska	REF	M2925	klart 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	klart att använda
TMB substrate solution	1 x 12,5 mL	brun flaska	REF	M1821	klart att använda
Stop solution 0,18 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 x 13,0 mL	vit flaska	REF	M1823	klart att använda
Plate seals	10 x	-	-	-	-

- Mikrotiterplattan med platt botten innehåller 12 remsor med vardera 8 brunnar som är klara att använda. Alla brunnar är belagda med TNF-specifik monoklonal musantikropp och rekombinant TNF. Mikrotiterplattan är vakuumsförluten i en plastpåse innehållande torkmedel. Den flexibla satsen gör att mikrotiterplattan kan användas vid olika tillfällen. Avgör hur många remsor som krävs för att testa önskat antal prover och räkna med ytterligare 8 brunnar för kalibratorer och kontroller. Ta bort de remsor som inte behövs från ramen på mikrotiterplattan och packa dem på nytt i plastpåsar med torkmedel.
- När du öppnat förpackningen kan alla reagens och mikrotiterplattremsor användas i ≤ 6 veckor om de förvaras vid 2-8 °C.
- Det informationsblad som medföljer satsen innehåller information om specifika infliximabkoncentrationer i kalibrator 1-6 samt i kontroll 1 och kontroll 2.

### Ytterligare material och/eller utrustning

- Destillerat eller avjoniserat vatten.
- Kalibrerade pipetter (5-1000 µL).
- Multikanalpipett (30-300 µL).
- 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 (öppnade eller öppnade) bör inte användas efter det utgångsdatum som är tryckt på flaskans etikett. Det kan inte uteslutas att reagenserna innehåller några smittfarliga ämnen.

Tvätta händerna noggrant efter hantering. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

lakttag försiktighet vid användning och hantering av behållare och deras innehåll. Bortförskaffande av avfall, efter testets slutförande, ska ske i enlighet med laboratoriets egna föreskrifter.

Orsakar allvarlig ögonirritation. VID ÖGONKONTAKT: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta bort eventuella kontaktlinser om det är enkelt. Fortsätt skölja. Om ögonirritation kvarstår: uppsök läkarvård. Absorbiera spill för att förhindra materiella skador.

### Testutförande

#### Provtagning och provberedning

1. Dalvärdesprover måste användas för att mäta koncentrationen av infliximab, och proverna måste därför samlas in inom 24 timmar INNAN läkemedlet injiceras för att säkerställa att de angivna förväntade nivåerna återspeglar patientens dalnivå.
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 72 timmar. Om proverna inte analyseras inom 72 timmar måste de förvaras frysta, och de kan då förvaras vid ≤ -18 °C i 12 månader.
4. Dela upp proverna i alikvoter för att inte behöva tina upp och frysa dem igen.
5. Före analysen måste de frysta proverna tinas i rumstemperatur. Använd inte vattenbad med temperaturen 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 1:1500 kan användas i den här analysen för att mäta patienters nivåer av infliximab.
3. Om koncentrationen i provet är för hög för att en exakt koncentration ska kunna erhållas upprepar du testet med en spädning på 1:2000 för att erhålla ett tillförlitligt resultat.
4. Om koncentrationen i provet är för låg för att en exakt koncentration ska kunna erhållas upprepar du testet med en spädning på 1:200 för att erhålla ett tillförlitligt resultat.

Spädning	Provtyp	HPE-volym
1:50	5 µL outspätt patientprov	245 µL
1:200	50 µL patientprov förutspätt 1:50	150 µL
1:1500	10 µL patientprov förutspätt 1:50	290 µL
1:2000	5 µL patientprov förutspätt 1:50	195 µL

### Beredning av tvättbuffertlösning med effektiv styrka

Bered en lösning med effektiv styrka genom att tillsätta 50 mL av tvättstamlösningen (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-testutförandet

1. Se till att alla reagens 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 plattförseglingar för varje inkubations-/fixeringssteg i ELISA-experimentet.
6. Blanda alla reagens noga men varsamt innan du använder dem (skum får inte bildas).

### Genomförande av ELISA-testutförandet

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. Lägg till 100 µL kalibrator, kontroll eller utspätt patientprov i varje brunn enligt den föreslagna layouten för mikrotiterplattan eller din egen layout. Förslut flaskorna som innehåller kalibrators och kontroller efter användning för att förhindra avdunstning.
4. Täck över mikrotiterplattan med självhäftande försegling och inkubera plattan i 1 timme.
5. Aspirera supernatanterna från brunnarna. Fyll varje brunn med 250 µL 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 µL av anti-infliximab-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 µL 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 µL 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 och blankproven fortfarande är färglösa måste reaktionen avbrytas. Den genomsnittliga inkubationstiden är  $10 \pm 1$  minuter.
11. Stoppa reaktionen genom att tillsätta 100 µL stopplösning i varje brunn.
12. Mät mikrotiterplattan i en ELISA-läsare vid 450 nm. Läs av plattan högst 30 minuter från det att stopplösningen tillsatts. En andra våglängd på 540–620 nm kan användas som referens vid mätningen.

### Föreslagen layout för mikrotiterplatta

Kalibreringskurvan och kontrollerna måste inkluderas i varje kvantitativ analysomgång. De kan utföras i en och samma rad. Med de reagens som tillhandahålls kan användaren använda mikrotiterplattan för en till maximalt fyra omgångar. En plattlayout föreslås för användning i en enskild omgång.

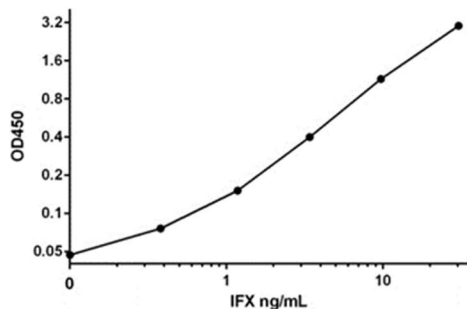
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	prov 1 DIL 1	prov 5 DIL 1	prov 9 DIL 1	prov 13 DIL 1	prov 17 DIL 1	prov 21 DIL 1	prov 25 DIL 1	prov 29 DIL 1	prov 33 DIL 1	prov 37 DIL 1	prov 41 DIL 1
B	CAL2	prov 1 DIL 1	prov 5 DIL 1	prov 9 DIL 1	prov 13 DIL 1	prov 17 DIL 1	prov 21 DIL 1	prov 25 DIL 1	prov 29 DIL 1	prov 33 DIL 1	prov 37 DIL 1	prov 41 DIL 1
C	CAL3	prov 2 DIL 1	prov 6 DIL 1	prov 10 DIL 1	prov 14 DIL 1	prov 18 DIL 1	prov 22 DIL 1	prov 26 DIL 1	prov 30 DIL 1	prov 34 DIL 1	prov 38 DIL 1	prov 42 DIL 1
D	CAL4	prov 2 DIL 1	prov 6 DIL 1	prov 10 DIL 1	prov 14 DIL 1	prov 18 DIL 1	prov 22 DIL 1	prov 26 DIL 1	prov 30 DIL 1	prov 34 DIL 1	prov 38 DIL 1	prov 42 DIL 1
E	CAL5	prov 3 DIL 1	prov 7 DIL 1	prov 11 DIL 1	prov 15 DIL 1	prov 19 DIL 1	prov 23 DIL 1	prov 27 DIL 1	prov 31 DIL 1	prov 35 DIL 1	prov 39 DIL 1	prov 43 DIL 1
F	CAL6 = blank	prov 3 DIL 1	prov 7 DIL 1	prov 11 DIL 1	prov 15 DIL 1	prov 19 DIL 1	prov 23 DIL 1	prov 27 DIL 1	prov 31 DIL 1	prov 35 DIL 1	prov 39 DIL 1	prov 43 DIL 1
G	CTRL 1	prov 4 DIL 1	prov 8 DIL 1	prov 12 DIL 1	prov 16 DIL 1	prov 20 DIL 1	prov 24 DIL 1	prov 28 DIL 1	prov 32 DIL 1	prov 36 DIL 1	prov 40 DIL 1	prov 44 DIL 1
H	CTRL 2	prov 4 DIL 1	prov 8 DIL 1	prov 12 DIL 1	prov 16 DIL 1	prov 20 DIL 1	prov 24 DIL 1	prov 28 DIL 1	prov 32 DIL 1	prov 36 DIL 1	prov 40 DIL 1	prov 44 DIL 1

### Resultat

1. Både intern programvara och programvara på internet kan användas för att beräkna koncentrationerna. Använd icke-linjär regressionsanalys för kurvanpassning. En logistisk regressionsanalys med fyra parametrar (4PL) rekommenderas, men logistisk regression med fem parametrar (5PL) eller kurvanpassning med tredjegradspolynom kan också användas. En generell metod för beräkning för hand ges.
2. Skriv ned absorbansen vid 450 nm för varje brunn som innehåller kalibrator.
3. Plotta absorbansen på Y-axeln på en linjär skala och plotta koncentrationen av infliximab i kalibratorprovet på X-axeln på en logaritmisk skala. Rita sedan den bäst anpassade kurvan.
4. Skriv ned absorbansen vid 450 nm för varje brunn som innehåller ett specifikt prov.
5. Lokalisera nettomedelvärdet för absorbans för varje prov längs den vertikala axeln och följ en horisontell linje som skär kalibreringskurvan.
6. Rita en vertikal linje från skärningspunkten på kalibreringskurvan mot X-axeln.
7. Vid den punkt där linjen skär X-axeln läser du av infliximabkoncentrationen på den horisontella axeln.
8. Multiplicera den erhållna infliximabkoncentrationen med provets spädningfaktor så får du den faktiska koncentrationen av infliximab i provet. För kontroll 1 och kontroll 2 måste en spädningfaktor på 1:1500 användas.

9. Beräkna medelvärdet av provets dubblettvärden när provet har analyserats dubbelt.

Exempel på standardkurva efter 10 minuters färgbildning:.



### Tolkning

Den optimala terapeutiska koncentrationen av infliximab beror på sjukdomen i kombination med patientens specifika egenskaper. När du utför koncentrationstestet för diagnostiska ändamål och/eller för att fastställa patientens behandlingsprotokoll kan den koncentration 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 kliniska parametrarna beaktas tillsammans med läkemedelskoncentrationen av infliximab. För patienter med en låg koncentration av infliximab måste dessutom anti-infliximab-antikroppar mätas och adderas till resultaten av immunogenicitetstestet och de kliniska parametrarna under beslutsprocessen.

Indikation på terapeutiska nivåer för patienter som behandlas med infliximab*	
Friska donatorer och patienter som inte behandlas med infliximab	negativa
Nivåer av infliximab under terapeutisk nivå	< 3,0 µg/mL
Nivåer av infliximab på normal terapeutisk nivå	3-7 µg/mL**
Förhöjda nivåer av infliximab	> 7,0 µg/mL

\*De angivna terapeutiska värdena är endast indikationer, varje laboratorium måste definiera sina egna brytpunktsvärden för diagnostiska ändamål.

\*\*Den normala terapeutiska nivån är den koncentration vid vilken det finns en större sannolikhet för en god till måttlig klinisk respons hos en patient. Den normala terapeutiska nivån är inte nödvändigtvis lika med den optimala terapeutiska nivån. Den optimala terapeutiska nivån är relaterad till sjukdomen och patientens individuella parametrar.

### Specifikationer

De värden som anges för specifika prestandaegenskaper hos testet är typiska resultat och får inte betraktas som specifikationer för den här satsen. Det informationsblad som medföljer satsen innehåller information om satsens specifika analysvärden samt om infliximabkoncentrationen i kalibratorerna.

Återhämtning	: 94% at 2 µg/mL (1:1500)	
Kvantifieringsgräns	: 0,08 µg/mL (1:200)	
lägre	: 0,08 µg/mL (1:200)	
högre (antigenöverskott)	: inget antigenöverskott observerat (47 µg/mL vid 1:2000)	
Precision	Total precision	precision mellan omgångar
0,30 µg/mL (1:200)	: 11,0%	9,5%
2,14 µg/mL (1:1500)	: 8,8%	5,8%
17,3 µg/mL (1:2000)	: 7,4%	6,5%
Linjärt intervall	: 0,22-39,7 µg/mL	
Ingen korsreaktivitet med	: TNF-hämmarna adalimumab, etanercept och golimumab	
Interferensfaktorer	: interferens < 20% med:	
	hemoglobin	- 5 och 40 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	- 60 och 80 mg/mL
	reumafaktor (RA)	- 1 600 U/mL
Metodjämförelse	: 70 patientprover jämfördes mot Sanquin Diagnostic Services internt validerade metod	
assay	: Passing and Bablock: $y = 0,91x + 0,04$	
analys	: Spearman correlation: 0,99	

### Begränsningar

- Satsen är endast avsedd för professionellt bruk. Användaren måste ha genomgått utbildning och vara väl förtrogen med ELISA-testutföranden.
- För att ELISA ska uppnå bästa möjliga prestanda måste du se till att alla pipetter och system har kontrollerats och genomgått fullständig underhållsservice i enlighet med tillverkarnas föreskrivna procedurer.
- Endast manuell testning av denna sats, enligt beskrivningen i denna bruksanvisning, valideras av Sanquin. Alla krav i denna bruksanvisning valideras med det manuella testförandet. 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.

- När kontrollerna inte ligger inom det angivna intervallet är resultaten inte giltiga och testet måste göras om.
- Eftersom kontrollerna är förutspädda kan de inte användas för att kontrollera användarens prov- och reagensberedning.
- Prover med OD450 nm utanför kalibratorkurvan är inte giltiga och kan inte användas för beräkningar; extrapolering av resultaten är inte acceptabelt. Dessa prover måste mätas i lägre eller högre spädningar.
- Falskt positiva eller negativa resultat kan erhållas när proverna används med interferensfaktorer som är högre än vad som indikeras i specifikationerna.
- Endast plattor, HRP-konjugat, kalibratorer och kontroller som medföljer kittet får användas. Använd inte dessa komponenter från olika batcher – de är inte utbytbara. HPE-provbufferten, TMB, Stop och Wash-bufferten får dock användas från andra MabTrack-kit förutsatt att materialens hållbarhetstid inte har löpt ut, materialen har förvarats i slutna flaskor vid 2–8 °C och inte har öppnats längre än 6 månader tidigare. Dessa komponenter kan blandas innan ELISA utförs, t.ex. för att kringgå problem med dödvolymer. Batchnummer och utgångsdatum står på varje etikett på de separata komponenterna.
- Reagens eller rester av reagens (t.ex. dödvolymer) kan inte blandas med innehållet i nyöppnade ampuller.
- Proppar och ampuller är inte utbytbara sinsemellan. Propparna måste sättas tillbaka i motsvarande ampuller.
- NaN<sub>3</sub> kan inte tillsättas till reagensen, detta påverkar testets prestanda.
- Använd inte aluminiumfolie under inkubationsstegen.
- 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. van den Bemt B.J.F.; Annals of the Rheumatic Diseases. 2008;67:1697-1701.
2. Aarden L.; Current Opinion in Immunology. 2008;20(4):431-435.
3. de Vries M.K.; Annals of the Rheumatic Diseases. 2007;66(9):1252-1254.
4. Wolbink G.J.; Arthritis & Rheumatology. 2006;54(3):711-715.
5. Van der Bemt B.J.F.; British Journal of Clinical Pharmacology. 2013;76(6):939-945.
6. Vande Casteele N.; Gastroenterology. 2015;148:1320-1329.

**Besök [www.sanquin.org/biologics](http://www.sanquin.org/biologics) för en lista över fler publikationer från Sanquin om infliximab.**

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