

# 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 (fr)

Réservé à l'usage professionnel

## ELISA pour la mesure semi-quantitative d'anticorps anti-infliximab

ADA	IFX	BUF	CONJ	HRP
Anticorps anti-médicaments	infliximab	Tampon	Conjugué	HRP

HUM	WELL	Level
Humain	Puits	Niveau

## Informations générales

MabTrack ADA infliximab ELISA est une méthode immuno-enzymatique (ELISA) permettant la détermination rapide, reproductible et semi-quantitative spécifique des concentrations d'anticorps anti-infliximab dans des échantillons de plasma et de sérum humains. Il est important de réaliser le test MabTrack ADA infliximab chez les patients bénéficiant d'un schéma thérapeutique ajusté individuellement, ainsi que de mesurer les concentrations en molécules d'infliximab. Les faibles concentrations en médicament indiquent bien souvent la formation d'anticorps anti-infliximab. Chez près de 8 à 43% des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde traités par infliximab, des anticorps se forment à l'encontre du domaine variable de l'infliximab. Cela peut affecter la fonction de l'inhibiteur du TNF et entraîner une diminution de la concentration plasmatique de l'inhibiteur du TNF.

Le fait de surveiller étroitement les concentrations en médicament et la formation d'anticorps associés à l'activité de la maladie, permettent au médecin de déterminer objectivement l'activité médicamenteuse chez un patient donné et de créer des schémas thérapeutiques spécifiques au patient. L'anticorps thérapeutique infliximab affecte le facteur de nécrose tumorale (TNF) et il est fréquemment administré aux patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, de troubles intestinaux, de maladies dermatologiques et de cancers. Le TNF joue un rôle essentiel dans l'inflammation : il peut causer douleurs, gonflement des articulations et raideur chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, et des ulcères chez les patients souffrant d'une maladie de l'intestin. Par conséquent, l'inhibition du TNF est censée atténuer certains de ces symptômes et ainsi améliorer la qualité de vie des patients. Si les concentrations plasmatiques et sériques des inhibiteurs du TNF sont extrêmement variables d'un patient à l'autre, elles sont cependant clairement en corrélation avec les symptômes cliniques que présentent les patients.

## Principe du test

Le test MabTrack ADA infliximab ELISA est une méthode immuno-enzymatique de type « sandwich ». L'infliximab est capturé sur les plaques microtitres dans des puits microtitres en polystyrène. Les anticorps libres anti-infliximab présents dans l'échantillon Patient, les Niveaux 1-2, les contrôles positif et négatif, se lient à l'infliximab sur la plaque microtitre. Les substances non liées sont ensuite éliminées par lavage. On ajoute ensuite de l'infliximab marqué à la peroxydase de raifort (HRP). L'infliximab marqué à l'HRP se lie au complexe infliximab/ anti-infliximab présent à la surface du puits microtitre. Après élimination du conjugué HRP non lié, par lavage, une solution de substrat est ajoutée dans les puits. Un produit coloré se forme proportionnellement à la quantité d'anticorps anti-infliximab présente dans l'échantillon et les contrôles. Une fois la réaction stoppée grâce à l'ajout d'une solution d'arrêt, l'absorption est mesurée dans un lecteur de plaque microtitre. En fonction de l'absorption des échantillons et de celles des niveaux, les échantillons peuvent être considérés comme négatifs (-), faiblement positifs (+), et fortement positifs (++) aux anticorps anti-infliximab.

## Contenu de l'emballage

Infliximab pre-coated microtiter plate	6 x 8 puits	-	REF M2961	prêt à l'emploi
Level 1	3 x 0,50 mL	bouchons transparents	REF M296201	prêt à l'emploi
Level 2	3 x 0,50 mL	bouchons transparents	REF M296202	prêt à l'emploi
Control +	3 x 0,50 mL	bouchons transparents	REF M296203	prêt à l'emploi
Control -	3 x 0,50 mL	bouchons transparents	REF M296204	prêt à l'emploi
Infliximab HRP-conjugate	3 x 3,5 mL	flacon brun	REF M2967	prêt à l'emploi
Wash buffer stock solution	1 x 50 mL	flacon blanc	REF M1805	à diluer à 1:20 dans de l'eau distillée
HPE dilution buffer	1 x 50 mL	flacon blanc	REF M2940	prêt à l'emploi
TMB substrate solution	1 x 12,5 mL	flacon brun	REF M1821	prêt à l'emploi
Stop solution 0,18 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 x 13,0 mL	flacon blanc	REF M1823	prêt à l'emploi
Plate seals	10 x	-	-	-

- La plaque microtitre à fond plat consiste en 6 bandes de 8 puits prêts à l'emploi. Tous les puits sont tapissés d'infliximab. La plaque microtitre est conditionnée sous vide dans un étui en plastique contenant un dessiccant. Polyvalent, le kit permet d'utiliser la plaque microtitre dans le cadre de 3 tests séparés. Déterminez le nombre de bandes requis pour tester le nombre souhaité d'échantillons,

plus les 4 puits nécessaires aux contrôles. Retirez du cadre de la plaquette microtitre les bandes qui ne seront pas utilisées, et remplacez-les dans l'étui en plastique contenant le dessiccatif.

- Une fois ouverts, les flacons de Niveau-1, de Niveau-2, de contrôle positif, de contrôle négatif et de conjugué HRP, doivent être jetés après utilisation.

#### Matériels et/ou équipements supplémentaires

- Eau distillée ou désionisée.
- Pipettes calibrées (5-1000  $\mu$ L).
- Pipette multicanaux (30-300  $\mu$ L).
- Bêchers, flacons, cylindres et conteneurs à liquides nécessaires à la préparation des réactifs.
- Lecteur de plaque microtitre (pour mesurer la DO à 450 nm).

#### Précautions d'emploi

Uniquement à usage de diagnostic in vitro. Les réactifs doivent être conservés entre 2–8 °C. Les flacons endommagés ou présentant une fuite doivent impérativement être écartés. Les flacons de réactifs (fermés ou ouverts) ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption imprimée sur l'étiquette du flacon. Les réactifs ne peuvent être garantis exempts d'agents infectieux. Il convient d'agir avec précaution lors de la manipulation et de l'élimination des conteneurs et de leur contenu. Au terme du test, l'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux directives de votre laboratoire.

#### Procédure de test

##### Recueil et préparation des spécimens

1. Des échantillons d'un volume minimal doivent être utilisés pour mesurer la concentration en anticorps anti-infliximab ; par conséquent, les échantillons doivent être prélevés dans les 24 heures qui PRÉCÉDENT l'injection du médicament pour s'assurer que les niveaux attendus indiqués reflètent le niveau minimal du patient.
2. Seuls du sérum et du plasma EDTA peuvent être utilisés dans le cadre du dosage.
3. Séparez le plasma ou le sérum des cellules sanguines au cours des 4 heures suivant le recueil, puis réalisez immédiatement les analyses. Si l'analyse des échantillons est reportée, ceux-ci peuvent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 24 heures. Si les échantillons ne sont pas analysés dans un délai de 24 heures, ils doivent être stockés au congélateur et peuvent être conservés à une température  $\leq$  -18 °C pendant 2 mois.
4. Aliquotez les échantillons pour éviter les cycles de congélation-décongélation.
5. Avant le dosage, les échantillons congelés doivent être décongelés à température ambiante. N'utilisez pas de bains-marie à 37 °C ou 56 °C pour les décongeler.
6. Mélangez les échantillons juste avant de préparer les dilutions.

##### Dilution des échantillons

1. Les déterminations singulières de prélèvements de patients peuvent être utilisées lorsque les mesures sont réalisées selon des protocoles validés sur les systèmes automatisés ELISA. En cas de test manuel, il est recommandé de procéder à des déterminations doubles pour chaque prélèvement.
2. Lors de ce dosage, vous pouvez utiliser une dilution à 1:10 pour mesurer les niveaux d'anticorps anti-infliximab chez les patients.

Dilution	Type d'échantillon	Volume de tampon de dilution HPE
1:10	20 $\mu$ L d'échantillon Patient non dilué	180 $\mu$ L

##### Préparation de la solution de tampon de lavage à la concentration adéquate

Préparez une solution à la concentration adéquate en ajoutant 50 mL de solution mère de tampon de lavage (soit le volume total d'un flacon) à 950 mL d'eau distillée. La solution à la concentration adéquate peut être conservée à une température comprise entre 2 et 8 °C pour une durée maximale de 2 mois.

##### Préparation pour la procédure de test ELISA

1. Laissez tous les réactifs atteindre la température ambiante (18-25 °C).
2. L'ensemble du dosage doit être réalisé à température ambiante (18-25 °C), sans agitation.
3. Ne laissez pas les puits découverts ou à sec pendant une période prolongée entre les étapes d'incubation.
4. Avant l'incubation, retirez avec précaution toutes les bulles d'air présentes dans les puits.
5. Pour éviter toute contamination croisée, utilisez des embouts de pipette jetables pour chaque transfert, et de nouveaux joints pour plaque à chaque étape d'incubation/de fixation de l'expérience ELISA.
6. Mélangez soigneusement mais délicatement tous les réactifs avant utilisation (sans créer de mousse).

##### Exécution de la procédure de test ELISA

1. Sortez de l'étui la plaque microtitre contenant le nombre requis de bandes de plaques microtitres. Les bandes inutilisées peuvent être conservées dans l'étui en plastique, avec le dessiccatif.
2. Préparez le tampon de lavage et les échantillons conformément au protocole.
3. Ajoutez 100  $\mu$ L par puits de contrôles ou échantillons Patient dilués, en fonction de la conformation de la plaque microtitre proposée ou de votre propre conformation.
4. Recouvrez la plaque microtitre de joint adhésif et laissez-la incuber pendant 1 heure.
5. Aspirez les surnageants présents dans les puits et remplissez chaque puits à l'aide de 250  $\mu$ L de tampon de lavage dilué. Laissez le tampon de lavage dans chaque puits pendant 30 à 60 secondes par cycle de lavage, puis videz les puits. Après le lavage (manuel et en automate), éliminez tout le liquide présent dans la plaque microtitre en retournant celle-ci sur du papier absorbant (ouvertures vers le bas) et en la tapotant pour retirer tout résidu de tampon de lavage. Répétez cette opération quatre fois. À l'issue du dernier lavage, les puits doivent être secs!
6. Ajoutez 100  $\mu$ L de conjugué HRP infliximab dans chaque puits.
7. Recouvrez la plaque microtitre de joint adhésif et laissez-la incuber pendant 1 heure.
8. Aspirez les surnageants présents dans les puits et remplissez chaque puits à l'aide de 250  $\mu$ L de tampon de lavage dilué. Laissez le tampon de lavage dans chaque puits pendant 30 à 60 secondes par cycle de lavage, puis videz les puits. Après le lavage (manuel et en automate), éliminez tout le liquide présent dans la plaque microtitre en retournant celle-ci sur du papier absorbant (ouvertures vers le bas) et en la tapotant pour retirer tout résidu de tampon de lavage. Répétez cette opération quatre fois. À l'issue du dernier lavage, les puits doivent être secs!

9. Ajoutez 100 µL de solution de substrat TMB dans chaque puits.
10. Faites incuber la plaque microtitre dans l'obscurité, sans l'agiter. Contrôlez la formation d'une couleur toutes les 5 minutes. Quand la couleur bleue est apparue dans les puits positifs (contrôle positif et Niveaux 1 et 2) et que le contrôle négatif est toujours incolore, la réaction doit être arrêtée. L'incubation dure en moyenne 10 ± 1 minutes.
11. Arrêtez la réaction en ajoutant 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits.
12. Mesurez la plaque microtitre à l'aide d'un lecteur ELISA à 450 nm. Lisez la plaque dans un délai de 30 minutes après l'ajout de la solution d'arrêt. Pendant la mesure, une seconde longueur d'onde de référence, comprise entre 540 et 620 nm, peut être utilisée.

**Proposition de conformation de la plaque microtitre**

Les contrôles doivent être inclus pour chaque série d'analyse semi-quantitative. Les réactifs fournis permettent à l'utilisateur d'utiliser la plaque microtitre pour une à trois séries maximum. Nous vous proposons une conformation de la plaque microtitre en vue d'une utilisation lors d'une seule série.

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

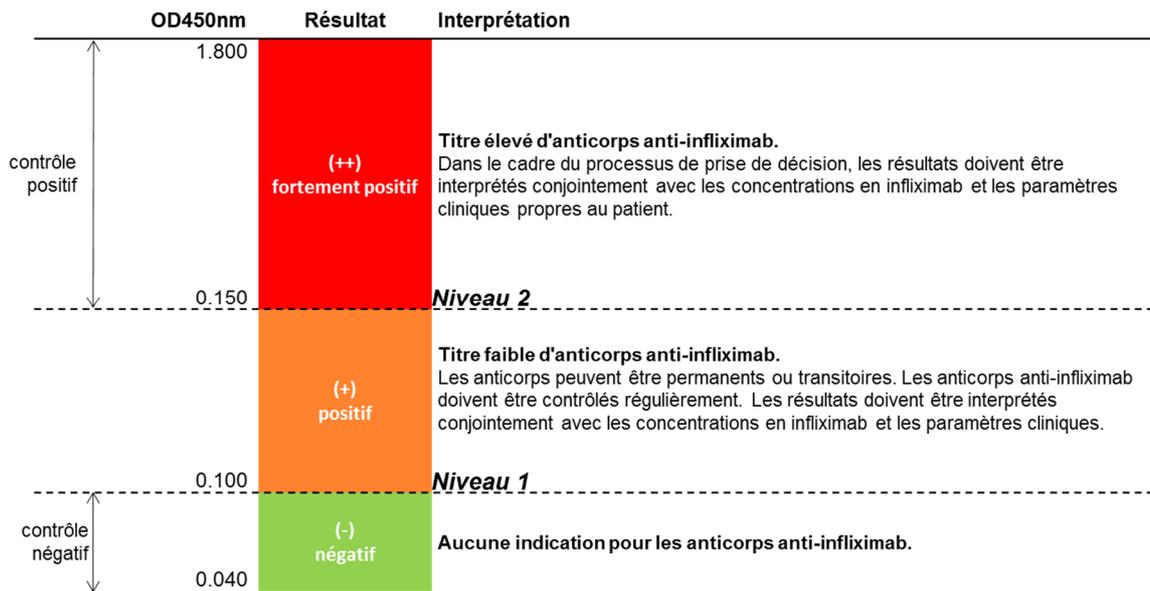
**Résultats**

1. Enregistrez l'absorption à 450 nm pour chaque puits contenant des contrôles.
2. Enregistrez l'absorption à 450 nm pour chaque puits contenant un échantillon spécifique.
3. Calculez la moyenne des valeurs dupliquées de l'échantillon.
4. Comparez le résultat des échantillons avec les contrôles.

**Interprétation**

Le dosage ELISA anti-infliximab propose 2 fourchettes semi-quantitatives pour la présence d'anticorps anti-infliximab, par ex. : négatif (-) et positif (+ et ++), indiquée par le Niveau 1. Le Niveau 2 est un seuil secondaire et arbitraire que l'on peut utiliser pour classer les patients en deux catégories concernant la présence d'anticorps anti-infliximab : (faiblement) positif (+) et fortement positif (++) . Ce seuil arbitraire est basé sur des études réalisées par Sanquin Diagnostic Services. Le Niveau 2 peut être utilisé uniquement en tant qu'indication de la quantité d'anticorps ; il ne peut en aucun cas être utilisé en tant que seuil diagnostique officiel. Les niveaux 1&2 contiennent des concentrations fixes d'anticorps anti-médicament. Celles-ci ont été mesurées en interne dans le département Sanquin Diagnostic Services, par dosage radio-immunologique. Le niveau 1 contenait 25 AU/mL (SD 3, n = 8) et le niveau 2 59 AU/mL (SD 3, n = 8). L'interprétation des résultats doit être réalisée en comparant la DO à 450 nm des échantillons et la DO à 450 nm des seuils, comme décrit dans l'illustration ci-dessous (les résultats de la DO à 450 nm figurant dans l'illustration sont des résultats typiques donnés à titre indicatif). L'interprétation des résultats est valide uniquement quand la DO à 450 nm du contrôle positif est > Niveau 2 et que la DO à 450 nm du contrôle négatif est < Niveau 1.

L'analyse de la fourchette semi-quantitative d'anticorps anti-infliximab d'un patient dépend fortement de la sous-classe des IgG des anticorps et de la concentration en infliximab chez le patient. Les anticorps IgG4 anti-infliximab ne peuvent pas être détectés ; on ne peut donc pas exclure la présence d'anticorps anti-infliximab de la sous-classe IgG4 si les résultats de ce test sont négatifs. En outre, les anticorps anti-infliximab ne peuvent pas être détectés de façon fiable quand la concentration en infliximab est > 0,5 µg/mL. Lors de la réalisation du test anti-infliximab à des fins diagnostiques et/ou pour déterminer le protocole thérapeutique adapté au patient, la fourchette semi-quantitative ne peut jamais permettre de poser un diagnostic définitif, mais elle doit être considérée comme une indication de la situation clinique susceptible d'impliquer d'autres examens diagnostiques. Dans le cadre du processus de prise de décision, les caractéristiques spécifiques du patient et les paramètres cliniques doivent être utilisés conjointement avec la concentration en infliximab et la fourchette d'anti-infliximab.



### Caractéristiques

Précision	: Des échantillons contenant une quantité élevée (seuil + 30%) et faible (seuil - 30%) de sérum et de plasma EDTA ont été mesurés en double lors de 20 séries. Tous les résultats ont été correctement mesurés pour 19 résultats sur 20.
Facteurs d'interférence	: Les échantillons de sérum et de plasma EDTA ont été enrichis à 30% en-dessous et au-dessus du seuil (Niveau 1). On n'a obtenu aucun résultat faux positif ou faux négatif avec <ul style="list-style-type: none"> <li>hémoglobine - 1 et 50 mg/mL</li> <li>bilirubine conjuguée - 0,02 et 0,5 mg/mL</li> <li>bilirubine non conjuguée - 0,1 et 1,5 mg/mL</li> <li>triglycérides - 15 et 50 mg/mL</li> <li>albumine sérique humaine - 80 mg/mL</li> <li>facteur rhumatoïde (RA) - 1600 U/mL</li> <li>infliximab - 0,1 µg/mL</li> </ul>
Seuil	Des échantillons de plasma EDTA issus de dons de donneurs sains (n = 50), exempts d'anticorps anti-infliximab ou d'infliximab, ont été mesurés. Le seuil Niveau 1 est égal à la moyenne + cinq fois l'écart type.
Comparaison des méthodes	Concordance de 94 % avec le Theradiag ADA-IFX kit, testé à l'aide de 50 échantillons positifs (DO à 450 nm ≥ Niveau 1) et de 40 échantillons négatifs (DO à 450 nm < Niveau 1). Kappa = 0,88 ; la cohérence est considérée comme « très bonne ».

### Limites

- Le kit a été conçu pour un usage strictement professionnel. L'utilisateur doit être formé au et familiarisé avec les procédures de test ELISA.
- Afin que les performances du test ELISA soient optimales, veillez à ce que l'ensemble des pipettes et des systèmes soient contrôlés et bénéficient d'une maintenance complète conformément aux procédures décrites par les fabricants.
- Seule l'analyse manuelle de ce test, telle que décrite dans le présent Mode d'emploi, est validée par Sanquin. Toutes les affirmations énoncées dans le présent Mode d'emploi sont validées grâce à la procédure d'analyse manuelle. Lors de l'utilisation du kit sur un automate ELISA, le test doit être validé par l'utilisateur avant utilisation. Les affirmations énoncées dans le présent Mode d'emploi ne concernent pas les performances de ce test s'il est réalisé sur une machine ELISA.
- Seuls les réactifs fournis avec le kit doivent être utilisés. N'utilisez pas des réactifs provenant de lots différents ou de lots de kits différents car ils ne sont pas interchangeables. Toutefois, les tampons HPE, TMB, de butée et de lavage d'autres kits Sanquin peuvent être utilisés pour des produits biologiques, à condition que les matériaux ne soient pas expirés et que ces derniers aient été conservés dans des flacons fermés et entre 2 et 8 °C.
- Les réactifs ou restes de réactifs (par ex. : volume mort) ne peuvent pas être mélangés au contenu de fioles fraîchement ouvertes.
- Les bouchons et fioles ne sont pas interchangeables : les bouchons doivent être remis en place sur les fioles correspondantes.
- Vous ne pouvez pas ajouter de NaN<sub>3</sub> aux réactifs car cela affecterait les performances du test.
- N'utilisez pas de feuilles d'aluminium pendant les étapes d'incubation.
- Mesurez des niveaux minimum d'infliximab à l'aide du test MabTrack level infliximab ELISA (M2920) avant de déterminer l'anti-infliximab. L'interprétation des résultats peut être réalisée uniquement quand les concentrations en infliximab et en anticorps sont prises en compte.
- Le test MabTrack ADA infliximab ELISA est sensible au médicament. Les concentrations en infliximab ≥ 0,5 µg/mL sont susceptibles d'interférer avec les résultats et d'entraîner des résultats négatifs. Cependant, ce seuil de 0,5 µg/mL est purement indicatif ; la quantité d'interférences dépend de l'affinité entre l'anticorps anti-infliximab et le médicament. Le seuil a été déterminé à l'aide du test MabTrack level infliximab ELISA (M2920) avec un anticorps monoclonal anti-infliximab à haute affinité.

- Le test MabTrack ADA infliximab est un équivalent d'ELISA. Les anticorps anti-infliximab de la sous-classe des IgG4 ne peuvent pas être détectés avec ce type d'ELISA car, au sein des IgG4, les fragments f(ab') d'une molécule reconnaissent différents épitopes et sont donc incapables de « faire le lien » entre deux molécules d'infliximab.
- Les contrôles étant pré-dilués, l'utilisateur ne peut s'en servir pour contrôler la préparation de l'échantillon et du réactif.
- Il est possible d'aboutir à des résultats faux positif ou faux négatifs si les échantillons sont utilisés avec des facteurs d'interférence supérieurs à ceux indiqués dans les caractéristiques techniques.
- Le tampon concentré peut contenir des cristaux de sel. Avant de préparer le tampon de travail, chauffer la solution concentrée BRIÈVEMENT à 37 °C afin de dissoudre les cristaux.

#### **Références**

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.; JImmunolMeth 2011;372:196-203

**Pour prendre connaissance de la bibliographie complète publiée par Sanquin concernant l'infliximab, rendez-vous sur [www.sanquin.org/biologics](http://www.sanquin.org/biologics)**

*Nous garantissons que les produits Sanquin produiront les résultats décrits dans le mode d'emploi du fabricant original. Il est essentiel de respecter rigoureusement les procédures et les schémas d'essai et d'utiliser les réactifs et le matériel recommandés. Sanquin n'acceptera aucune responsabilité relativement au non-respect de ces indications.*