



Quantum Blue[®] Infliximab

**Quantitative
Lateral Flow Assay**

LF-TLIF25 25 tests

Revision date: 2017-04-21

ENGLISH

INTENDED USE

Quantum Blue® Infiximab is an *in vitro* diagnostic lateral flow immunoassay for the quantitative determination of trough levels of infliximab in serum samples. The assay serves as an aid to therapeutic drug monitoring in patients with inflammatory bowel disease (IBD) under infliximab therapy in conjunction with other clinical and laboratory findings. Quantum Blue® Infiximab is combined with the Quantum Blue® Reader.

For laboratory use.

Europe: for professional use.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The test is designed for the selective measurement of infliximab by a sandwich immunoassay. Recombinant tumor necrosis factor alpha (TNF α) is conjugated to gold colloids. On the test cassette (TC) the conjugate is released from a pad into the reaction system as the sample is applied. Infliximab present in the sample will bind to the conjugate. A monoclonal antibody, highly specific for the analyte, is immobilized on the test membrane and will capture the conjugate/analyte complex, resulting in a coloring of the Test Line (T). The remaining free TNF α /gold conjugate will bind to the Control Line (C). The signal intensities of the Test Line (T) and the Control Line (C) are measured quantitatively by the Quantum Blue® Reader.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Comments
Test Cassette	25 pieces	B-LFTLIF-TC	vacuum-sealed in a foil bag pouch
Chase Buffer	1 bottle 10 mL	B-LFTLIF-CB	Ready to use
Controls Low* / High*	2 vials, 0.5 mL	B-LFTLIF- CONSET	Ready to use
RFID Chip Card	1 piece	B-LFTLIF-RCC	White plastic card
RFID Chip Card	1 piece	B-LFTLIF-RCC15	Green plastic card

Table 1

* The controls contain lot specific amounts of infliximab. Refer to the additional QC data sheet for actual concentrations.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

All kit components are stable at 2-8 °C until the expiration date printed on the labels.

PRECAUTIONS

Safety Precautions

- None of the reagents of this test contains components of human origin.
- Patient specimens should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with Good Laboratory Practice (GLP) using appropriate precautions.

- **Reagents:** Avoid contact of reagents with the skin, eyes, or mucous membranes. If contact does occur, immediately wash with generous amounts of water; otherwise, irritation can occur.
- Unused solution should be disposed according to local state and federal regulations.

Technical Precautions

Kit Components

- The test must be performed at room temperature (20-26 °C).
- All reagents and test samples must be equilibrated to room temperature (20-26 °C) before starting the assay.
- Before performing the test, remove the test cassette from the foil pouch and allow it to equilibrate at room temperature (20-26 °C).
- Mix well (e.g. vortex) the reagents before use.
- Components must not be used after the expiration date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Do not disassemble the test cassettes.
- Test cassettes cannot be re-used.
- Handle the test cassettes with care. Do not contaminate the sample loading port or read-out window via skin contact, other liquids, etc. (Fig. 1D).
- Ensure a flat, horizontal position of the test cassette while performing the assay.

Test Procedure

- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, handled or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- The Quantum Blue® Reader must be switched on and programmed for the Quantum Blue® Infiximab assay: Load the assay method using the RFID Chip Card (B-LFTLIF-RCC or B-LFTLIF-RCC15), before starting the assay (see Quantum Blue® Reader Manual).
- Use the RFID Chip Card in order to change lot-specific test parameters.
- Patient samples that are not properly handled may cause inaccurate results.
- Diluted samples should be used within several hours (store at 2-8 °C) and cannot be stored for a longer period.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Vortex mixer
- Timer (optional)
- Precision pipettes with disposable tips: 10-100 μ L and 100-1000 μ L
- Eppendorf tubes (or equivalent) for dilution of serum samples
- Quantum Blue® Reader available from BÜHLMANN (order code: BI-POCTR-ABS)
- Gloves and laboratory coat

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Collect blood into plain venipuncture tubes without any additives avoiding hemolysis and let the serum clot at room temperature for at least 20 and for up to 60 minutes. Centrifuge at room temperature at $\sim 2'000 \times g$ for 15 minutes. Decant the serum.

Serum samples can be stored refrigerated at 2-8 °C for up to 10 days. For longer storage, keep serum samples at ≤ -20 °C. These samples are stable for at least 6 months at ≤ -20 °C.

ASSAY PROCEDURE

For the assay use only reagents equilibrated to room temperature (20-26 °C). The test cassette must be removed from the foil pouch prior to assay start.

The assay procedure consists of two steps:

1. Dilution of Serum Samples with Chase Buffer

Prior to measurement dilute the serum sample 1:20 with Chase Buffer (B-LFTLIF-CB) (e.g. mix 10 μL serum sample with 190 μL Chase Buffer) in a test tube and mix it by vortexing, pipetting or shaking.

2. Lateral Flow Assay Procedure and Readout

Two alternative methods can be loaded from the respective RFID Chip Card: TLIF_0 or TLIF_15. Select one of the RFID Chip Cards before starting the experiments. Load the test method from the RFID Chip Card.

2.1. Method <TLIF_15> with internal timer

- Use the green plastic card.
- Insert the test cassette into the test cassette holder of the Quantum Blue® Reader.
- Add 80 μL of the diluted serum sample onto the sample loading port of the test cassette (Fig. 1D).
- Close the test cassette holder and start the measurement by pressing the start button.
- The scan starts automatically after 15 minutes (900 seconds).
- For Low / High Controls: Repeat step 2.1 using 80 μL of Control instead of diluted serum.

2.2. Method <TLIF_0> without internal timer

- Use the white plastic card.
- Add 80 μL of the diluted serum sample onto the sample loading port of the test cassette (Fig. 1D).
- Incubate for 15 ± 1 minutes (set a timer manually).
- Insert the test cassette into the test cassette holder of the Quantum Blue® Reader.
- Scan the test cassette with the Quantum Blue® Reader by pressing the start (<ENTER>) button immediately.
- For Low / High Controls: Repeat step 2.2 using 80 μL of Control instead of diluted serum.

Remark: Please refer to the Quantum Blue® Reader Manual to learn about the basic functions and how to initialize and operate the Quantum Blue® Reader, especially how to select test methods, and how to load lot specific parameters from the RFID Chip Card in order to get the samples measured. Ensure the correct insertion of the test cassette into the Quantum Blue® Reader, with the read-out window first (Fig. 1 D).

QUALITY CONTROL

- If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: *i*) pipetting, temperature controlling and timing devices *ii*) expiration dates of reagents and *iii*) storage and incubation conditions.
- Result of the self-test of the Quantum Blue® Reader performed at the startup of the instrument has to be valid.

VALIDATION OF RESULTS

- For a valid test result, the Control Line (C) must be visible in any case (see Fig. 1A and Fig. 1B). It is used as a functional test control only and cannot be used for the interpretation of the Test Line (T). If the Test Line (T) is not detectable after 15 minutes of incubation time (Fig. 1A), the concentration of infliximab present in the serum sample is below the detection limit. If a Test Line (T) is detectable after 15 minutes of incubation time (Fig. 1B), the infliximab concentration present in the serum sample is calculated by the Quantum Blue® Reader.
- If only the Test Line (T) is detectable after 15 minutes of incubation time (Fig. 1C), the test result is invalid and the infliximab assay has to be repeated using another test cassette.
- If neither the Control Line (C) nor the Test Line (T) are detectable after 15 minutes of incubation time (Fig. 1D), the test result is invalid and the infliximab assay has to be repeated using another test cassette.
- As the Quantum Blue® Reader allows a quantitative evaluation of the Test (T) and Control (C) Line, an additional validity check of the Control Line (C) is undertaken. If the signal intensity of the Control Line (C) is below a threshold after 15 minutes of incubation time, the test result is also invalid and the infliximab assay has to be repeated using another test cassette.

STANDARDIZATION

- Calibrator values of the standard curve are assigned according to a value transfer protocol (ref. 1). The standard curve parameters are indicated in the enclosed QC data sheet. The calibrator material comprises infliximab (Remicade®) in a human serum matrix and is standardized against internal reference material.
- The Quantum Blue® Reader uses a lot-specific calibration curve to calculate the infliximab concentration. The measuring range is between 0.4 and 20.0 $\mu\text{g/mL}$.

LIMITATIONS

- The reagents supplied with this kit are optimized to measure trough levels of infliximab in diluted serum samples.
- Therapy monitoring of IBD patients during infliximab therapy should be further supported by additional laboratory and clinical testing.

CHECK YOUR TEST KIT UPON ARRIVAL

BÜHLMANN products have been manufactured with the greatest of care and all possible efforts have been taken to ensure completeness of this test kit and its performance. Nevertheless, we advise you to verify your test kit for the condition of the test cassette and its pouch based on the following criteria:

- Expiration date
- The fault-free condition of the pouch (e.g. absence of any perforation that could be caused by improper handling).
- The fault-free condition of the test cassette (e.g. absence of scratches on the analytical membrane).

Should one of the test cassettes not fulfil the criteria mentioned above, please use another test cassette.

EXPECTED VALUES

The determination of infliximab trough levels in patient serum samples can support therapy monitoring of IBD patients. Generally, trough levels in serum that reach a value of 3 µg/mL and above correlate well with remission, endoscopic healing of the gut mucosa and low CRP values (ref. 2, 3), as well as prediction of sustained response to infliximab therapy (ref. 4).

Values below 3 µg/mL

Low infliximab levels in serum may be used to support the decision to alter the medication, by either dose increase or shortening of the infusion intervals, as well as considering a change of drug (ref. 5).

Values between 3-7 µg/mL

Trough level within the therapeutic window aid as an indication of effective drug treatment with infliximab, when patients are symptom free (ref. 2, 5).

Values above 7 µg/mL

It was shown that dose de-escalation to reach the optimal therapeutic window (3-7 µg/mL) has no effect on CRP values nor Harvey Bradshaw, or Mayo scores on Crohn's or ulcerative colitis patients respectively (ref. 5).

Optimal trough levels may be individual. A level between 3 to 7 µg/mL was found beneficial (ref. 5).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Repeatability: 16.3 - 25.0 % CV

Within-Laboratory Precision: 18.5 - 25.3 % CV

Repeatability and within-laboratory precision were established according to CLSI guideline EP05-A3. Serum samples spiked with infliximab to cover the measuring range of the assay were tested over 20 days, in two independent runs with two replicates per run. The results are summarized in Table 7.

Limit of Blank (LoB): <0.10 µg/mL infliximab. The LoB was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with four negative serum samples. The samples were measured over three days in five replicates each day to produce 60 blank values. The study was performed with two different test cassette lots. The LoB was calculated using non-parametric analysis.

Limit of Detection (LoD): <0.21 µg/mL infliximab. The LoD was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with four clinical or pooled samples with concentrations of 0.63, 0.40, 0.26, and 0.15 µg/mL infliximab. The samples were measured over three days in five replicates each day to produce 60 values. The study was performed with two different test cassette lots. The LoD was calculated using parametric analysis.

Limit of Quantification (LoQ): ≤0.32 µg/mL infliximab.

The LoQ was established according to the CLSI guideline EP17-A2. Calibrator material was diluted in negative serum to obtain samples with reference values of 0.50, 0.41, 0.30 and 0.20 µg/mL infliximab. The samples were measured over three days in five replicates each day to produce 60 values. The study was performed with two different test cassette lots. The LoQ was determined as the lowest reference value meeting the acceptance criterion of 30% relative total error, calculated using the RMS model from precision and bias estimates for each sample. Representative results obtained with one of the reagent lots are summarized in Table 8.

High Dose Hook Effect: A high dose hook effect was not observed for samples with infliximab concentrations of up to 1000 µg/mL.

Specificity (Cross-Reactivity): The Quantum Blue® Infliximab test specifically recognizes infliximab in serum. Spiked serum with TNFα blockers, such as adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®), golimumab (Simponi®), and certolizumab (Cimzia®) up to 100 µg/mL resulted in a read out below the limit of blank.

Linear Range: 0.14-20.37 µg/mL infliximab.

The linear range of the Quantum Blue® Infliximab test was determined according to the CLSI guideline EP06-A. Two sample pools, low and high, were blended to obtain at least 14 concentration levels covering and exceeding the expected measuring range. The blends were assayed in 10 replicates on two test cassette lots. The linear range was defined as the interval of concentration levels in which coefficients of the second and third order fits were determined as not significant. Results for one test cassette lot are shown in Fig. 2.

Method Comparison

Bias at 3 µg/mL: -2.4%

Bias at 7 µg/mL: -4.4%

The method comparison study was performed according to the CLSI guideline EP09-A3. One hundred and ten (110) clinical samples were measured according to the instruction for use with the Quantum Blue® Infliximab assay and with a commercially available infliximab ELISA test (ref. 6). Measurements were performed over three days using two Quantum Blue® Infliximab test cassette lots. The correlation data is illustrated in Fig.3.

Recovery: 83 - 100 %.

To six clinical samples including infliximab levels close to clinical decision points, 3.2 µg/mL infliximab in negative serum were added. "Base" samples were spiked with the corresponding amount of negative serum. "Base" and "base + spike" samples were measured in 10 replicates with one reagent lot. The results are summarized in Table 9.

INTERFERING SUBSTANCES

Within-Class Switch: No interference, tested for a minimum of two infliximab concentrations, was detected up to 10 µg/mL for adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®), golimumab (Simponi®), and up to 1.7 µg/mL of certolizumab (Cimzia®).

Serum Indices: No interference was detected with the following substances up to the listed concentrations: Triglycerides (Intralipid® 1320 mg/dL; equivalent to 37 mmol/L triglyceride), conjugated bilirubin (342 µmol/L; 29 mg/dL), unconjugated bilirubin (342 µmol/L; 20 mg/dL), haemoglobin (2 g/L (= 200 mg/dL), TNFα (2.6 ng/mL) and rheumatoid factors (497.3 IU/mL).

Immunosuppressive Co-Medication: No interference was detected with immunosuppressive co-medication such as azathioprine (60 µmol/L), 6-mercaptopurine (37 µmol/L), and methotrexate (1363 µmol/L).

All performance characteristics were done with infliximab (Remicade®, MSD).

ANWENDUNGSZWECK

Quantum Blue® Infliximab ist ein *in vitro* diagnostischer Lateral Flow Immunassay für die quantitative Bestimmung von Infliximab Medikamentenspiegel in Serumproben. Der Test dient als Hilfe zur therapeutischen Arzneimittelüberwachung bei Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung (CED) unter Infliximab-Therapie in Verbindung mit anderen klinischen und Laborbefunden. Quantum Blue® Infliximab wird mit dem Quantum Blue® Reader kombiniert.

Für Laborzwecke geeignet.

Europa: Für den professionellen Gebrauch.

PRINZIP DER METHODE

Der Test dient zur selektiven Messung von Infliximab mit einem Sandwich Immunoassay. Dafür wurde ein rekombinanter Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNFα) an Goldkolloide konjugiert. In der Testkassette (TC) wird das Konjugat beim Auftragen der Probe aus einem „Conjugate Release Pad“ in das Reaktionssystem freigesetzt. Das in der Probe vorhandene Infliximab bindet an das Konjugat. Ein monoklonaler Antikörper der den Analyten hochspezifisch bindet, wurde auf der Testmembran immobilisiert. Der monoklonale Antikörper bildet bei der Bindung von Infliximab den Konjugat-/Analyt-Komplex unter Färbung der Testlinie (T). Das verbleibende freie TNFα/Goldkonjugat wird an der Kontrolllinie (C) gebunden. Die Signalintensitäten der Testlinie (T) und der Kontrolllinie (C) werden mit dem Quantum Blue® Reader quantitativ gemessen.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge	Art-Nr.	Kommentar
Testkassette	25 Stück	B-LFTLIF-TC	In einem vakuumdichten Folienbeutel
Laufpuffer	1 Flasche 10 mL	B-LFTLIF-CB	Gebrauchsfertig
Kontrollen Tief* / Hoch*	2 Fläschchen, 0,5 mL	B-LFTLIF- CONSET	Gebrauchsfertig
RFID Chipkarte	1 Stück	B-LFTLIF-RCC	Weisse Kunststoffkarte
RFID Chipkarte	1 Stück	B-LFTLIF-RCC15	Grüne Kunststoffkarte

Tabelle 2

* Die Kontrollen enthalten lotspezifische Infliximab Konzentrationen. Die genauen Konzentrationen werden auf dem QC Datenblatt angegeben.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Sämtliche Kitkomponenten sind bei 2-8 °C bis zum angegebenen Ablaufdatum haltbar.

Sicherheitsmassnahmen

- Keiner der Kitbestandteile enthält Material menschlicher Herkunft.
- Alle Patientenproben sollten gemäß „Gute Laborpraxis“ (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen sollten getroffen werden.
- Reagenzien: Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten vermeiden. Im Falle eines Kontaktes sofort mit reichlich Wasser spülen, ansonsten kann eine Reizung auftreten.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäß den gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Technische Vorsichtsmaßnahme

Kitkomponenten

- Der Test muss bei Raumtemperatur (20-26 °C) durchgeführt werden.
- Alle Reagenzien und Testproben müssen vor dem Testbeginn auf Raumtemperatur (20-26 °C) gebracht werden.
- Bevor der Test durchgeführt wird, muss die Testkassette aus dem Folienbeutel entfernt werden, um sie auf Raumtemperatur zu bringen (20-26 °C).
- Die Reagenzien müssen vor Gebrauch gut gemischt werden (z.B. Vortexen).
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Unterschiedliche Reagenzien-Lots dürfen nicht gemischt werden.
- Die Testkassette darf nicht auseinander gebaut werden.
- Testkassetten können nicht erneut verwendet werden.
- Die Testkassetten müssen mit Vorsicht behandelt werden. Die Ladevorrichtung der Probe oder das Messfenster der Probe darf nicht verunreinigt werden durch Hautkontakt, andere Flüssigkeiten usw. (Fig. 1D).
- Die Testkassette muss bei der Durchführung des Tests eben und horizontal positioniert sein.

Testablauf

- Lesen Sie die Testanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig durch. Die Leistungsdaten können negativ beeinflusst werden, wenn Reagenzien nicht korrekt verdünnt, behandelt oder unter Bedingungen gelagert werden, die von denen in der Arbeitsanleitung beschriebenen abweichen.
- Vor Testbeginn muss der Quantum Blue® Reader eingeschaltet und für den Quantum Blue® Infliximab Test programmiert werden: Laden Sie die Testmethode mithilfe der RFID Chipkarte (B-LFTLIF-RCC oder B-LFTLIF-RCC15), bevor Sie den Test starten (siehe Quantum Blue® Reader Handbuch).
- Benutzen Sie die RFID Chipkarte, um die testspezifischen Parameter zu ändern.
- Unsachgemäße Handhabung der Patientenproben können zu unbrauchbaren Resultaten führen.

- Verdünnte Proben sollten innerhalb mehrerer Stunden verwendet werden (bei 2-8 °C aufbewahren) und können nicht über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortex Mischer
- Timer (optional)
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen: 10-100 µL und 100-1000 µL
- Eppendorf-Reaktionsgefäße (oder Gleichwertiges) zur Verdünnung der Serumproben
- Quantum Blue® Reader kann von BÜHLMANN bezogen werden (Bestellcode: BI-POCTR-ABS)
- Handschuhe und Labormantel

PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

Das Blut wird durch eine Venenpunktion entnommen und in die dafür vorgesehenen Standardröhrchen, ohne Additive zur Vermeidung der Hämolyse, gegeben. Das Blut wird bei Raumtemperatur mindestens 20 und bis zu 60 Minuten stehen gelassen, um zu koagulieren. Danach wird das Standardröhrchen bei ca. 2000 x g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Serum wird danach abgenommen.

Serumproben können gekühlt bei 2-8 °C für bis zu 10 Tage aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrung lagern Sie die Serumproben bei ≤-20 °C. Diese Proben sind bei ≤-20 °C mindestens 6 Monate stabil.

TESTDURCHFÜHRUNG

Für den Test sollten nur Reagenzien verwendet werden, die auf Raumtemperatur gebracht wurden (20-26 °C). Die Testkassette muss vor Testbeginn aus dem Folienbeutel genommen werden.

Der Arbeitsablauf gliedert sich in 2 Schritte:

1. Verdünnung der Serumproben mit Laufpuffer

Die Serumprobe wird vor der Messung mit Laufpuffer (B-LFTLIF-CB) in einem Teströhrchen 1:20 verdünnt (z.B. 10 µL Serumprobe mit 190 µL Laufpuffer mischen) und durch vortexen, pipettieren oder schütteln gemischt.

2. Lateral-Flow Testablauf und Quantifizierung

Von der jeweiligen RFID Chipkarte können zwei alternative Methoden geladen werden: TLIF_0 oder TLIF_15. Wählen Sie eine der RFID Chipkarten aus, bevor Sie das Experiment beginnen. Laden Sie die Testmethode von der RFID Chipkarte.

2.1. Methode <TLIF_15> mit integriertem Timer

- Verwenden Sie die grüne Kunststoffkarte.
- Die Testkassette in den Testkassettenhalter am Quantum Blue® Reader legen.
- 80 µL der verdünnten Serumprobe auf die Ladevorrichtung der Testkassette aufbringen (Fig. 1D).
- Den Testkassettenhalter schliessen und den Startknopf drücken (<ENTER>).

- Der Lesevorgang startet automatisch nach 15 Minuten (900 Sekunden).
- Für die Kontrollen Tief / Hoch: Wiederholen Sie den Schritt 2.1 mit 80 µL Kontrollen anstelle der verdünnten Serumprobe.

2.2. Methode <TLIF_0> ohne integrierten Timer

- Verwenden Sie die weiße Kunststoffkarte.
- 80 µL der verdünnten Serumprobe auf die Ladevorrichtung der Testkassette aufbringen (Fig. 1 D).
- Die Testkassette für 15 ± 1 Minuten inkubieren. (einen Wecker manuell einstellen).
- Die Testkassette in den Testkassettenhalter am Quantum Blue® Reader legen.
- Den Startknopf (<ENTER>) drücken und Lesevorgang der Testkassette mit dem Quantum Blue® Reader starten.
- Für die Kontrollen Tief / Hoch: Wiederholen Sie den Schritt 2.2 mit 80 µL Kontrollen anstelle der verdünnten Serumprobe.

Hinweis: Nehmen Sie das Quantum Blue® Reader Manual zu Hilfe, wenn Sie mehr über die Basisfunktionen (Inbetriebnahme und Bedienung) erfahren wollen, insbesondere wie Testmethoden ausgewählt werden und wie lotspezifische Parameter von der RFID Chipkarte geladen werden, um die Proben messen zu können. Vergewissern Sie sich, dass die Testkassette richtig in den Quantum Blue® Reader eingelegt wurde mit dem Lesefenster zuerst (Fig. 1D).

QUALITÄTSKONTROLLE

- Falls die Ergebnisse des Testes nicht innerhalb der erwarteten Bereiche liegen und wiederholte Messungen einen Durchführungsfehler ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipetten, Temperatur und Zeitmesser, ii) Verfallsdaten der Reagenzien, iii) Lagerung- und Inkubationsbedingungen.
- Der Selbsttest, der beim Einschalten des Quantum Blue® Readers durchgeführt wird, muss gültig sein.

VALIDIERUNG DER RESULTATE

- Damit das Testresultat als gültig bewertet wird, muss die Kontrollbande (C) klar ersichtlich sein (siehe Fig. 1A und Fig. 1B). Diese wird nur als Funktionskontrolle verwendet und kann nicht zur Interpretation der Testbande (T) benutzt werden. Falls die Testbande (T) nach 15 Minuten Inkubation nicht ersichtlich ist (Fig. 1A), bedeutet dies, dass Infliximab nicht nachweisbar ist. Falls die Testbande (T) nach der Inkubation ersichtlich ist, wird die Infliximab Konzentration in der Serumprobe durch den Quantum Blue® Reader berechnet.
- Falls nach der Inkubation von 15 Minuten nur die Testbande (T) sichtbar ist (Fig. 1C), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Falls weder die Kontrollbande (C) noch die Testbande (T) nach der Inkubation sichtbar sind (Fig. 1D), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.

- Da der Quantum Blue® Reader eine quantitative Bestimmung der Test- (T) und der Kontrollbande (C) erlaubt, wird eine zusätzliche Validitätsprüfung der Kontrollbande (C) durchgeführt. Falls die Signalintensität der Kontrollbande (C) nach der Inkubation von 15 Minuten einen bestimmten Wert unterschreitet, ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.

STANDARDISIERUNG

- Kalibratorwerte der Standardkurve werden gemäß einem Werteübertragungsprotokoll (Ref. 1) zugewiesen. Die Standardkurvenparameter sind im beiliegenden QC-Datenblatt angegeben. Das Kalibratormaterial beinhaltet Infliximab (Remicade®) in einer Matrix aus humanem Serum und wurde gegen ein internes Referenzmaterial standardisiert.
- Der Quantum Blue® Reader verwendet für die Berechnung der Infliximab Konzentration eine lot-spezifische Standardkurve. Der Messbereich liegt zwischen 0.4 und 20 µg/mL.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die in diesem Kit gelieferten Reagenzien sind für die Bestimmung des Infliximab Medikamentenspiegel in verdünnten Serumproben optimiert.
- Die Therapieüberwachung von CED Patienten während der Infliximabtherapie sollte durch weitere Labor- und klinische Tests unterstützt werden.

ÜBERPRÜFUNG DES TESTKITS BEI ERHALT

Die BÜHLMANN Produkte wurden mit größter Sorgfalt hergestellt und alle erdenklichen Anstrengungen wurden unternommen, um die Vollständigkeit dieses Kits und seine Leistung zu gewährleisten. Wir empfehlen Ihnen trotzdem, das Testkit hinsichtlich des Zustands der Testkassette und deren Verpackung auf den folgenden Kriterien zu überprüfen:

- Verfalldatum
- Der fehlerfreie Zustand der Verpackung (z.B. keine Perforation, die durch falsche Handhabung verursacht worden sein könnte).
- Der fehlerfreie Zustand der Testkassette (z.B. keine Kratzer auf der analytischen Membran).

Wenn eine der Testkassetten die oben genannten Kriterien nicht erfüllt, so verwenden Sie bitte eine andere Testkassette.

ERWARTETE WERTE

Die Bestimmung von Infliximab Medikamentenspiegel in Serumproben von Patienten kann die Therapieüberwachung von Patienten mit Entzündungen unterstützen. Im Allgemeinen korrelieren Medikamentenspiegel im Serum, die einen Wert von 3 µg/mL und mehr erreichen, mit einem Abklingen, einer endoskopischen Heilung der Darmschleimhaut und niedrigen CRP-Werten (Ref. 2, 3) sowie der Vorhersage einer nachhaltigen Reaktion der Infliximab-Therapie (Ref. 4).

Werte unter 3 µg/mL

Niedrige Infliximab Konzentrationen im Serum sollten zur Entscheidung einer Änderung der Medikamentengabe verwendet werden, entweder durch Erhöhung der Dosis oder durch Verkürzung der Infusionsintervalle, sowie durch Erwägen eines Medikamentenwechsels (Ref. 5).

Werte zwischen 3-7 µg/mL

Medikamentenspiegel innerhalb des therapeutischen Fensters können den Beweis einer wirksamen Arzneimittelbehandlung mit Infliximab unterstützen, wenn Patienten frei von Symptomen sind (Ref. 2, 5).

Werte oberhalb von 7 µg/mL

Es wurde gezeigt, dass eine Deeskalation der Dosis zum Erreichen des optimalen therapeutischen Fensters (3-7 µg/mL) keine Auswirkung auf CRP-Werte, Harvey Bradshaw oder eine Mayo-Bewertung bei Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa hat (Ref. 5).

Optimale Medikamentenspiegel können individuell verschieden sein. Eine Konzentration zwischen 3 und 7 µg/mL wurde als vorteilhaft befunden (Ref. 5).

LEISTUNGSMERKMALE

Wiederholbarkeit: 16.3 – 25.0 % CV

Präzision innerhalb des Labors (Within-laboratory precision): 18.5 – 25.3 % CV

Die Wiederholbarkeit und die Präzision innerhalb des Labors wurden gemäss der CLSI Richtlinie EP05-A3 durchgeführt. Serumproben, die mit Infliximab versetzt wurden, so dass der gesamte Messbereich abgedeckt ist, wurden über 20 Tage in zwei unabhängigen Messungen mit zwei Replikaten pro Messung durchgeführt. Die Resultate sind in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Limit of Blank (LoB): <0.10 µg/mL Infliximab. Der LoB-Wert wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP17-A2 mit vier negativen Serumproben durchgeführt. Um 60 Blankwerte zu erhalten, wurden die Serumproben über drei Tage in drei unabhängigen Messungen mit jeweils fünf Replikaten pro Tag gemessen. Die Studie wurde mit zwei Testkassetten-Lots durchgeführt. Mit Hilfe einer non-parametrischen Analyse wurde der LoB berechnet.

Limit of Detection (LoD): <0.21 µg/mL Infliximab. Der LoD wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP17-A2 mit vier klinischen oder gepoolten Proben mit Konzentrationen von 0.63, 0.40, 0.26, and 0.15 µg/mL Infliximab bestimmt. Um 60 Werte zu erhalten, wurden die Proben über drei Tage in drei unabhängigen Messungen mit jeweils fünf Replikaten pro Tag gemessen. Die Studie wurde mit zwei verschiedenen Testkassetten-Lots durchgeführt. Mit Hilfe einer parametrischen Analyse wurde der LoD berechnet.

Limit of Quantification (LoQ): $\leq 0.32 \mu\text{g/mL}$ Infliximab

Der LoQ wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP 17-A2 bestimmt. Um Proben mit Referenzwerten von 0.50, 0.41, 0.30 und 0.20 $\mu\text{g/mL}$ Infliximab zu erhalten, wurde Kalibratormaterial in negativem Serum verdünnt. Um 60 Werte zu erhalten, wurden die Proben über drei Tage in drei unabhängigen Messungen mit jeweils fünf Replikaten pro Tag gemessen. Die Studie wurde mit zwei verschiedenen Testkassetten-Lots durchgeführt. Unter Verwendung des RMS-Modells, das aus den Präzisions- und Abweichungsschätzungen für jede Probe hervorgeht, wurde der LoQ als der niedrigste Referenzwert ermittelt, der das Akzeptanzkriterium von 30% relativem Gesamtfehler noch erfüllt. Repräsentative Resultate, die mit einem Reagenz-Lot gemessen wurden, sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

“Hook Effect” bei hohen Dosen: Bis zu einer Konzentration von 1000 $\mu\text{g/mL}$ Infliximab wurde kein Hook-Effekt bei hohen Dosen beobachtet.

Spezifität (Kreuzreaktivität): Der Quantum Blue® Infliximab Test erkennt Infliximab spezifisch im Serum. Mit bis zu 100 $\mu\text{g/mL}$ TNF α Blockern, wie zum Beispiel Adalimumab (Humira®), Etanercept (Enbrel®), Golimumab (Simponi®), und Certolizumab (Cimzia®) versetztes Serum ergab einen Messwert unterhalb des Limit of Blanks.

Linearer Bereich: 0.14 – 20.37 $\mu\text{g/mL}$ Infliximab

Der lineare Bereich des Quantum Blue® Infliximab Tests wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP06-A durchgeführt. Um mindestens 14 Konzentrationsstufen zu erhalten, die den erwarteten Messbereich abdecken und höher sind, wurden zwei Probenpools, niedrig und hoch, vermengt. Die Vermengungen wurden mit jeweils zehn Replikaten auf zwei Testkassetten-Lots evaluiert. Der lineare Bereich wurde als das Intervall der Konzentrationslevels definiert, in denen Koeffizienten der zweiten und dritten Ordnung als nicht signifikant bestimmt wurden. Resultate für ein Testkassetten-Lot sind in Fig. 2 abgebildet.

Methodenvergleich:

Bias bei 3 $\mu\text{g/mL}$: -2.4 %

Bias bei 7 $\mu\text{g/mL}$: -4.4 %

Die Methodenvergleichsstudie wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP09-A3 durchgeführt. Einhundertzehn (110) klinische Proben wurden mit dem Quantum Blue® Infliximab Test gemäss der Gebrauchsanweisung und mit einem kommerziell erhältlichen Infliximab ELISA Test (Ref. 6) evaluiert. Messungen wurden über drei Tage auf zwei verschiedenen Quantum Blue® Infliximab Testkassetten-Lots durchgeführt. Die Korrelationsdaten sind in der Fig. 3 illustriert.

Recovery: 83 - 100 %

Zu sechs klinischen Proben, einschliesslich solchen mit Infliximab Levels, die nahe an den klinischen Entscheidungspunkten des Tests liegen, wurden 3,2 $\mu\text{g/mL}$ Infliximab in negativem Serum zugegeben. „Basis“ Proben wurden mit der korrespondierenden Menge negativen Serums gespiked. „Basis“ und „Basis + Spike“ Proben wurden in zehn Replikaten mit einem Reagenz-Lot evaluiert. Die Resultate zu dieser Studie sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.

WECHSELWIRDENDE SUBSTANZEN

Within-Class Switch: Bei der Prüfung von mindestens zwei Infliximab Konzentrationen wurden bei Konzentrationen von bis zu 10 $\mu\text{g/mL}$ für Adalimumab (Humira®), Etanercept (Enbrel®), Golimumab (Simponi®) und bis zu 1,7 $\mu\text{g/mL}$ Certolizumab (Cimzia®) keine Wechselwirkung beobachtet.

Serum-Index: Mit den folgenden Stoffen wurden bis zu den angegebenen Konzentrationen keine Wechselwirkung festgestellt: Triglycerid (Intralipid® 1320 mg/dL; entspricht 37 mmol/L Triglycerid), konjugiertes Bilirubin (342 $\mu\text{mol/L}$; 29 mg/dL), unkonjugiertes Bilirubin (342 $\mu\text{mol/L}$; 20 mg/dL), Hämoglobin (2 g/L (= 200 mg/dL), TNF α (2,6 ng/mL) und Rheumafaktoren (497,3 IE/mL).

Immunsuppressiva / Begleitmedikation:

Mit Immunsuppressiva / Begleitmedikationen wie zum Beispiel Azathioprin (60 $\mu\text{mol/L}$), 6-Mercaptopurin (37 $\mu\text{mol/L}$) und Methotrexat (1363 $\mu\text{mol/L}$) wurden keine Wechselwirkung nachgewiesen.

Alle Leistungseigenschaften wurden mit Infliximab (Remicad®, MSD) durchgeführt.

UTILISATION PREVUE

Le test Quantum Blue® Infiximab est un test diagnostique *in vitro* immunochromatographique à flux latéral. Il est destiné au dosage quantitatif des taux résiduels d'infiximab dans des échantillons de sérum. Associé à d'autres informations cliniques et résultats obtenus en laboratoire, il contribue au suivi thérapeutique pharmacologique des patients souffrant d'une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI) et traités par infiximab. Le Quantum Blue® Infiximab s'utilise en association avec le Quantum Blue® Reader.

Pour utilisation en laboratoire uniquement.
Europe: pour utilisation professionnelle.

PRINCIPE DU TEST

Le test permet la mesure sélective de l'infiximab par un dosage immunologique de type sandwich. Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) recombinant est couplé à de l'or colloïdal. Sur la cassette test (TC), le conjugué TNF α marqué, présent sur la bande de libération, est libéré dans le système lorsque l'échantillon est appliqué. L'infiximab présent dans l'échantillon se lie au conjugué. Un anticorps monoclonal hautement spécifique de l'analyte, est immobilisé sur la membrane d'analyse et capture le conjugué / complexe d'analyte, ce qui entraîne une coloration de la ligne test (T). Le restant du TNF α libre / conjugué d'or se lie à la ligne Contrôle (C). Les intensités du signal de la ligne test (T) et de la ligne Contrôle (C) sont mesurées quantitativement à l'aide du Quantum Blue® Reader.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Commentaires
Cassette test	25 pièces	B-LFTLIF-TC	Scellée sous vide dans un sachet
Tampon de dilution	1 flacon 10 mL	B-LFTLIF-CB	Prêt à l'emploi
Contrôles Bas*/Elevé*	2 flacons, 0,5 mL	B-LFTLIF- CONSET	Prêts à l'emploi
Carte à puce RFID	1 pièce	B-LFTLIF-RCC	Carte en plastique blanche
Carte à puce RFID	1 pièce	B-LFTLIF-RCC15	Carte en plastique verte

Tableau 3

* Les Concentrations en infiximab des contrôles varient en fonction des lots. Vous référer à la fiche de contrôle qualité pour les concentrations effectives.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION DES REACTIFS

Tous les composants du kit sont stables à 2-8 °C jusqu'à la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.

Précautions de sécurité

- Aucun des réactifs de ce test ne contient de composants d'origine humaine.
- Les échantillons des patients doivent être manipulés en respectant les bonnes pratiques de laboratoire et avec les précautions requises, comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des infections.
- **Réactifs** : Éviter le contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, laver immédiatement et abondamment à l'eau afin d'éviter toute irritation.
- Toute solution non utilisée doit être éliminée conformément aux réglementations locales et nationales en vigueur.

Précautions techniques**Composants du kit**

- Le test doit être réalisé à température ambiante (20-26°C).
- Tous les réactifs et les échantillons doivent être équilibrés à température ambiante (20-26°C) avant de commencer le test.
- Avant de procéder au test, sortir la cassette test de son sachet en aluminium et la laisser s'équilibrer à température ambiante (20-26°C).
- Bien mélanger les réactifs (vortex) avant utilisation.
- Les composants ne doivent pas être utilisés après la date de péremption indiquée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Ne pas démonter la cassette test.
- Les cassettes test sont à usage unique.
- Manipuler les cassettes test avec soin. Ne pas contaminer l'orifice de chargement de l'échantillon ou la fenêtre de lecture par contact avec la peau, d'autres liquides, etc. (Fig. 1D).
- Assurer une position horizontale plane de la cassette test durant l'analyse.

Procédure de test

- Lire attentivement les instructions avant d'effectuer le test. La performance d'analyse sera affectée si les réactifs sont dilués de manière incorrecte, manipulés ou entreposés dans des conditions autres que celles détaillées dans la présente notice d'utilisation.
- Le Quantum Blue® Reader doit être allumé et programmé pour le dosage Quantum Blue® Infiximab: chargez la méthode de dosage au moyen de la carte à puce RFID (B-LFTLIF-RCC ou B-LFTLIF-RCC15), avant de commencer le dosage (cf. Manuel du Quantum Blue® Reader).
- Utiliser la carte à puce RFID afin de changer les paramètres d'analyse spécifiques du lot.
- Les échantillons de patients qui ne sont pas correctement traités peuvent entraîner des résultats inexacts.

- Les échantillons dilués doivent être utilisés dans un délai de quelques heures (conservés à 2-8 °C) et ne peuvent pas être stockés pendant une période plus longue.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Vortex
- Minuteur (facultatif)
- Pipettes de précision avec embouts jetables : 10-100 µL et 100-1000 µL
- Tubes Eppendorf (ou équivalent) pour diluer les échantillons de sérum
- Quantum Blue® Reader disponible chez BÜHLMANN (code de commande : BI-POCTR-ABS)
- Gants et blouse de laboratoire

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Prélever le sang dans des tubes de ponction veineuse sans additif et évitant l'hémolyse, et laisser le caillot sanguin se former à température ambiante pendant au moins 20 min et jusqu'à 60 min. Centrifuger à ~2'000 x g, 15 minutes à température ambiante. Décanter le sérum.

Les échantillons de sérum peuvent être réfrigérés à 2-8 °C jusqu'à 10 jours. Pour un stockage prolongé, conserver des échantillons de sérum à ≤ -20 °C. Ces échantillons sont stables pendant au moins 6 mois à ≤ -20 °C.

PROCEDURE DE DOSAGE

N'utiliser pour le test que des réactifs équilibrés à température ambiante (20-26 °C). La cassette test doit être retirée de son sachet en aluminium avant le démarrage du test.

La procédure de dosage se déroule en 2 étapes:

1. Dilution des échantillons de sérum dans le tampon de dilution

Avant la mesure, diluer l'échantillon de sérum au 1:20 avec le tampon de dilution (B-LFTLIF-CB) (par exemple, mélanger 10 µL d'échantillon de sérum avec 190 µL de tampon) dans un tube à essai et mélanger au vortex, à la pipette ou par agitation.

2. Procédure et lecture du dosage

Deux méthodes alternatives peuvent être chargées à partir des cartes à puce RFID respectives: TLIF_0 ou TLIF_15. Sélectionner l'une des cartes à puce RFID avant de commencer les expériences. Charger la méthode d'analyse à partir de la carte à puce RFID.

2.1. Méthode <TLIF_15> avec minuteur interne

- Utiliser la carte en plastique verte.
- Insérer la cassette test dans le tiroir du Quantum Blue® Reader.
- Ajouter 80 µL de l'échantillon de sérum dilué dans l'orifice de chargement d'échantillon de la cassette test (Fig. 1D).
- Fermer le tiroir du Quantum Blue® Reader et lancer la mesure en appuyant sur le bouton de démarrage.

- Le scanner démarre automatiquement au bout de 15 minutes (900 secondes).
- Pour les Contrôles Bas / Haut : Répéter l'étape 2.1 en utilisant 80 µL de contrôle à la place de l'échantillon de sérum dilué.

2.2. Méthode <TLIF_0> sans minuteur interne

- Utiliser la carte en plastique blanche.
- Ajouter 80 µL de l'échantillon de sérum dilué dans l'orifice de chargement d'échantillon de la cassette test (Fig. 1D).
- Incuber pendant 15 ±1 minutes (Régler un minuteur manuellement).
- Insérer la cassette test dans le tiroir du Quantum Blue® Reader.
- Scanner la cassette test avec le Quantum Blue® Reader en appuyant immédiatement sur le bouton de démarrage (<ENTER>).
- Pour les Contrôles Bas / Haut : Répéter l'étape 2.2 en utilisant 80 µL de contrôle à la place de l'échantillon de sérum dilué.

Remarque : consulter le mode d'emploi du Quantum Blue® Reader pour plus de détails concernant les fonctions de base, l'initialisation et l'utilisation du Quantum Blue® Reader, en particulier comment choisir la méthode de test et charger les paramètres de lot de la carte à puce RFID en vue de la mesure des échantillons. Vérifier la bonne insertion de la cassette test dans le Quantum Blue® Reader, à savoir, la fenêtre de lecture en premier (Fig. 1D).

CONTROLE DE QUALITE

- Si la précision du dosage n'est pas corrélée avec les limites établies et que la répétition exclut toute erreur technique, on vérifiera les paramètres suivants : i) pipetage, dispositifs de contrôle de la température et du temps, ii) date d'expiration des réactifs et iii) conditions de conservation et d'incubation.
- L'auto-vérification effectuée lors de la mise en marche du Quantum Blue® Reader doit être valide.

VALIDATION DES RESULTATS

- Pour valider un résultat de test, la ligne de contrôle (C) doit toujours être visible (voir Fig. 1A et Fig. 1B). Cette ligne est uniquement utilisée comme contrôle fonctionnel du test et ne peut servir à l'interprétation de la ligne de test (T). Si la ligne de test (T) n'est pas détectable au bout de 15 minutes de temps d'incubation (Fig. 1A), cela signifie qu'aucune quantité détectable d'inflximab n'est présente dans l'échantillon de sérum. Si une ligne de test (T) est détectable au bout de 15 minutes de temps d'incubation (Fig. 1B), la quantité d'inflximab présente dans l'échantillon de sérum est calculée par le Quantum Blue® Reader.
- Si seule la ligne de test (T) est détectable après 15 minutes de temps d'incubation (Fig. 1C), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de l'inflximab doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.

- Dans le cas où ni la ligne de contrôle (C) ni la ligne de test (T) ne sont détectables au bout de 15 minutes de temps d'incubation (Fig. 1D), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de l'infliximab doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.
- Étant donné que le Quantum Blue® Reader permet une évaluation quantitative des lignes de test (T) et de contrôle (C), une vérification supplémentaire de la validité de la ligne de contrôle (C) est effectuée. Si l'intensité du signal de la ligne de contrôle (C) est en dessous d'un seuil au bout de 15 minutes de temps d'incubation, le résultat du test est également non valide et le dosage de l'infliximab doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.

STANDARDISATION

- Les valeurs de calibrateurs de la courbe de calibration sont définies selon un protocole de transfert de valeur (réf. 1). Les paramètres de la courbe de calibration sont indiquées dans la fiche de contrôle qualité ci-jointe. Les calibrateurs contiennent Infliximab (Remicade®) dans une matrice de sérum humaine et sont standardisés par rapport à une matrice de référence en interne.
- Le Quantum Blue® Reader utilise une courbe d'étalonnage spécifique du lot pour calculer la concentration d'infliximab. La gamme de dosage est comprise entre 0.4 et 20 µg/mL.

LIMITES

- Les réactifs fournis dans cette trousse sont optimisés pour mesurer des taux résiduels d'infliximab dans des échantillons de sérum dilués.
- Le suivi thérapeutique des patients atteints d'une MICI, au cours d'un traitement par infliximab, devrait être également étayé par des investigations supplémentaires, cliniques et biologiques.

CONTROLLER LA TROUSSE À RECEPTION

Les produits BÜHLMANN ont été fabriqués avec le plus grand soin et tous les efforts possibles ont été mis en œuvre pour assurer l'intégrité et la performance de ce kit. Néanmoins, nous vous conseillons de vérifier l'état de la cassette et de son emballage sur la base des critères suivants :

- la validité de la date de péremption.
- l'état sans défaut de l'emballage (par exemple, absence de perforation quelconque qui pourrait être causée par de mauvaises manipulations).
- l'état sans défaut de la cassette test (par exemple, absence de rayures sur la membrane analytique).

Si l'une des cassettes test ne répondait pas aux critères mentionnés ci-dessus, veuillez utiliser une autre cassette test.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Déterminer des concentrations minimales d'infliximab dans des échantillons de sérum de patients peut soutenir le suivi thérapeutique de patients souffrant d'inflammation. En général, les concentrations résiduelles sériques atteignant au moins 3 µg/mL montrent une bonne corrélation avec une rémission, une guérison endoscopique de la muqueuse intestinale et de faibles valeurs de CRP (réf. 2, 3), et prédisent une réponse thérapeutique durable à l'infliximab (réf. 4).

Valeurs inférieures à 3 µg/mL

De faibles niveaux sériques d'infliximab peuvent orienter la décision vers une modification du traitement, soit en augmentant la dose soit en raccourcissant les intervalles de perfusion, ou bien vers un changement de médicament (réf. 5).

Valeurs entre 3 et 7 µg/mL

Un taux résiduel compris dans la fenêtre thérapeutique, lorsque les patients ne présentent pas de symptômes (réf. 2, 5), est indicateur d'un traitement médicamenteux efficace à l'infliximab.

Valeurs supérieures à 7 µg/mL

Il a été démontré qu'une désescalade de la dose pour atteindre la fenêtre thérapeutique optimale (3-7 µg/mL) n'a pas d'effet sur les valeurs de CRP ni sur les scores d'Harvey Bradshaw ou Mayo pour les patients souffrant respectivement de la maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique (réf. 5).

Les concentrations résiduelles optimales peuvent être différentes selon les individus. Un niveau compris entre 3 et 7 µg/mL a été trouvé bénéfique (réf. 5).

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Répétabilité : CV entre 16.3 % et 25.0 %

Précision intra-laboratoire : CV entre 18.5 % et 25.3 %

La répétabilité et la précision intra-laboratoire ont été établies selon la ligne directrice CLSI EP05-A3. Les échantillons de sérum ont été enrichis avec de l'infliximab de manière à couvrir l'intervalle de mesure du test ont été testés quotidiennement pendant 20 jours, dans deux dosages indépendants, à raison de deux répétitions par dosage. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Limite de blanc (LoB): <0,10 µg/mL d'infliximab. La LoB a été établi selon la ligne directrice CLSI EP17-A2 sur quatre échantillons de sérum négatifs. Les échantillons ont été mesurés pendant trois jours à raison de cinq réplicas chaque jour permettant d'obtenir 60 valeurs de blanc. L'étude a été réalisée avec deux lots différents de cassettes tests. La LoB a été calculée avec un test non paramétrique.

Limite de détection (LoD) : <0.21 µg/mL d'infliximab. La LoD a été établie selon la ligne directrice CLSI EP17-A2 sur quatre échantillons cliniques ou « poolés » à des concentrations de 0.63, 0.40, 0.26 et 0.15 µg/mL d'infliximab. Les échantillons ont été mesurés pendant trois jours à raison de cinq réplicas chaque jour permettant d'obtenir 60 valeurs. L'étude a été réalisée avec deux lots différents de cassettes tests. La LoD a été calculée avec un test paramétrique.

Limite de quantification (LoQ) : ≤0,32 µg/mL d'infliximab. La LoQ a été établie selon la ligne directrice CLSI EP17-A2. Le matériel de calibration a été dilué dans du sérum négatif afin d'obtenir des échantillons avec les valeurs de référence 0.50, 0.41, 0.30 et 0.20 µg/mL d'infliximab. Les échantillons ont été mesurés pendant trois jours à raison de cinq réplicas chaque jour permettant d'obtenir 60 valeurs. L'étude a été réalisée avec deux lots différents de cassettes tests. La LoQ a été déterminée comme la valeur de référence la plus faible répondant aux critères d'acceptabilité de 30% d'erreur relative totale, calculée selon le modèle RMS à partir de la précision et du biais estimés pour chaque échantillon. Les résultats obtenus avec un des lots de réactifs sont représentés dans le tableau 8.

Effet crochet à forte dose : Aucun effet crochet à haute dose n'a été observé pour les échantillons dont les concentrations d'infliximab allaient jusqu'à 1000 µg/mL.

Spécificité (Réactivité croisée) : Le test Quantum Blue® Infliximab reconnaît spécifiquement l'infliximab dans le sérum. Du sérum enrichi de bloquants du TNFα, tels que l'adalimumab (Humira®), l'etanercept (Enbrel®), le golimumab (Simponi®) et le certolizumab (Cimzia®) jusqu'à 100 µg/mL a entraîné une lecture sous la limite du blanc.

Plage de linéarité : 0.14 – 20.37 µg/mL d'infliximab

La plage de linéarité du test Quantum Blue® Infliximab a été déterminée selon la ligne directrice CLSI EP06-A. Deux pools de sérum, de niveaux haut et bas, ont été regroupés de manière à obtenir au moins 14 niveaux de concentration couvrant et excédant la gamme de mesure attendue. Les mélanges ont été testés sous forme de 10 répétitions d'échantillons, avec deux lots de cassettes test. La plage de linéarité a été définie comme l'intervalle des concentrations auxquelles les coefficients des ajustements de courbe des deuxième et troisième ordres ne sont pas déterminés comme étant significatifs. Les résultats obtenus avec un lot de cassettes test sont présentés sur la Fig. 2.

Comparaison de méthodes :

Biais à 3 µg/mL : -2.4 %

Biais à 7 µg/mL : -4.4 %

La comparaison de méthodes a été déterminée selon la ligne directrice CLSI EP09-A3. Cent dix (110) échantillons cliniques ont été mesurés conformément aux instructions d'utilisation au moyen du test Quantum Blue® Infliximab et d'un test ELISA de l'infliximab disponible dans le commerce (réf. 6). Les mesures ont été réalisées pendant trois jours avec deux lots de cassettes test du Quantum Blue® Infliximab. Les données de corrélation sont illustrées sur la Fig. 3.

Recouvrement : 83 – 100 %

À six échantillons cliniques avec des taux d'infliximab proches des points clé de décision clinique du test, 3,2 µg/mL d'infliximab dans du sérum négatif ont été ajoutés. Les échantillons de "base" ont été enrichis avec la quantité correspondante de sérum négatif. Les échantillons de "base" et ceux de "base enrichis" ont été mesurés à raison de 10 réplicas avec un lot de cassettes test. Les résultats sont résumés dans le Tableau 9.

INTERFÉRENCES ENTRE SUBSTANCES

Commutation de classe : aucune interférence, testée pour au moins deux concentrations d'infliximab, n'a été détectée jusqu'à 10 µg/mL pour l'adalimumab (Humira®), l'etanercept (Enbrel®), le golimumab (Simponi®) et jusqu'à 1,7 pg/mL pour le certolizumab (Cimzia®).

Indices de sérum : aucune interférence n'a été détectée avec les substances suivantes jusqu'aux concentrations mentionnées : Triglycérides (Intralipid® 1320 mg/dL ; équivalent à 37 mmol/L de triglycérides), bilirubine conjuguée (342 µmol/L; 29 mg/dL), bilirubine non conjuguée (342 µmol/L; 20 mg/dL), hémoglobine (2 g/L (=200 mg/dL), TNFα (2,6 ng/mL) et facteurs rhumatoïdes (497,3 UI/mL).

Immuno-suppresseurs/co-médication : aucune interférence n'a été détectée avec des immuno-suppresseurs/co-médicaments tels que l'azathioprine (60 µmol/L), la 6-mercaptopurine (37 µmol/L) et le méthotrexate (1363 µmol/L).

Toutes les caractéristiques de performance ont été réalisées avec l'infliximab (Remicade® MSD).

USO PREVISTO

Quantum Blue® Infliximab è un immunodosaggio a flusso laterale diagnostico *in vitro* per l'analisi quantitativa dei livelli minimi del farmaco infliximab in campioni di siero. Il saggio serve come ausilio per il monitoraggio terapeutico dei farmaci in pazienti con malattia infiammatoria intestinale (IBD) in terapia con infliximab assieme ad altre evidenze cliniche e di laboratorio. Quantum Blue® Infliximab è combinato con Quantum Blue® Reader.

Per l'uso in laboratorio.
Europa: per uso professionale.

PRINCIPIO DEL TEST

Il test è progettato per la misurazione selettiva dell'Infliximab mediante un immunodosaggio a sandwich. Il fattore di necrosi tumorale alfa ricombinante (TNFα) è coniugato a oro colloidale. Il coniugato è rilasciato da un pad nel sistema di reazione sulla cassetta di test (TC), quando viene applicato il campione. L'Infliximab presente nel campione si legherà al coniugato. Un anticorpo monoclonale, altamente specifico per l'analita, è immobilizzato sulla membrana di test e catturerà il complesso coniugato/analita, risultando in una colorazione della linea di test (T). Il rimanente coniugato TNFα libero /oro si legherà alla linea di controllo (C). Le intensità dei segnali della linea di rilevazione (T) e della linea di controllo (C) sono misurate quantitativamente mediante lo strumento Quantum Blue® Reader.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Reagent	Quantità	Codice	Commenti
Card di rilevazione	25 unità	B-LFTLIF-TC	Sigillata a vuoto in busta laminata
Tampone di diluizione	1 fialone 10 mL	B-LFTLIF-CB	Pronto per l'uso
Controlli Alto* / Basso*	2 fialoni, 0.5 mL	B-LFTLIF- CONSET	Pronto per l'uso
Carta chip RFID	1 unità	B-LFTLIF-RCC	Carta RFID bianca
Carta chip RFID	1 unità	B-LFTLIF-RCC15	Carta RFID verde

Tabella 4

* I controlli contengono quantità lotto specifiche dell'Infliximab. Per le concentrazioni effettive far riferimento al foglio aggiuntivo QC.

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

Tutti i componenti del kit sono stabili a 2-8 °C fino alla data di scadenza riportata sulle etichette.

PRECAUZIONI

Precauzioni di sicurezza

- Nessuno dei reagenti di questo test contiene componenti di origine umana.
- I campioni dei pazienti vanno gestiti adottando le precauzioni appropriate come se fossero potenzialmente infetti e in conformità alle Buone Prassi di Laboratorio (BPL).

- **Reagenti:** Evitare il contatto dei reagenti con pelle, occhi o mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua; altrimenti potrebbero verificarsi irritazioni.
- La soluzione inutilizzata deve essere smaltita nel rispetto delle disposizioni locali, regionali e nazionali in materia.

Precauzioni tecniche

Componenti del kit

- Il test deve essere eseguito a temperatura ambiente (20-26 °C).
- Tutti i reagenti e i campioni devono essere equilibrati a temperatura ambiente (20-26°C) prima di iniziare l'analisi.
- Prima di eseguire il test, rimuovere la cassetta di test dalla busta metallizzata e lasciarla equilibrare a temperatura ambiente (20-26°C).
- Miscelare bene (vortexare) i reagenti prima dell'uso.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non mescolare lotti diversi di reagenti.
- Non disassemblate le cassette di test.
- I cassette di test non vanno riutilizzate.
- Manipolare i cassette di test con attenzione. Non contaminare il piano di appoggio del campione o la finestra di lettura mediante contatto cutaneo, altri liquidi, etc. (Fig. 1D).
- Assicurarsi di una posizione piana e orizzontale della cassetta di test durante l'esecuzione del test.

Procedura del test

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, manipolati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- Il Quantum Blue® Reader deve essere acceso e programmato per il test Quantum Blue® Infliximab. Caricare il metodo di dosaggio impiegando il RFID Chip Card (B-LFTLIF-RCC o B-LFTLIF-RCC15), prima che il dosaggio abbia inizio (vedere il manuale del Quantum Blue® Reader).
- Utilizzare la carta chip RFID per modificare i parametri di test specifici per il lotto.
- I campioni manipolati in modo scorretto possono dare origine a risultati inaccurati.
- I campioni diluiti devono essere utilizzati entro alcune ore (conservate a 2-8 °C) e non possono essere conservati più a lungo.

MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI

- Miscelatore vortex
- Timer (opzionale)
- Pipette di precisioni con puntuali monouso: 10-100 µL e 100-1000 µL
- Provette Eppendorf (o equivalente) per la diluizione dei campioni di siero
- Quantum Blue® Reader, disponibile dalla BÜHLMANN (codice per ordinazioni: BI-POCTR-ABS)
- Guanti e camice da laboratorio

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Prelevare il sangue in provette semplici per prelievo venoso senza alcun additivo, evitando l'emolisi, e lasciare coagulare il siero a temperatura ambiente per almeno 20 minuti fino a 60 minuti. Centrifugare per 15 minuti a ~2'000 x g a temperatura ambiente. Decantare il siero.

I campioni di siero possono essere conservati refrigerati a 2-8 °C fino a 10 giorni. Per tempi di conservazione più lunghi, tenere i campioni a ≤ -20 °C. I campioni sono stabili per almeno 6 mesi ≤ -20 °C.

PROCEDURA DEL TEST

Per il dosaggio utilizzare solo reagenti equilibrati a temperatura ambiente (20-26 °C). La cassetta di test deve essere rimossa dalla busta metallizzata prima dell'inizio del dosaggio.

La procedura per il dosaggio consiste in due fasi:

1. Diluizione dei campioni di siero con tampone di diluizione

Diluire i campioni di siero 1:20 con tampone di diluizione (B-LFTLIF-CB) prima di usarli per l'analisi (*ad es.* miscelare 10 µL del campione di siero con 190 µL di tampone di diluizione) e miscelarlo mediante vortex, pipettando o agitando.

2. Esecuzione del test e lettura

Due metodi alternativi possono essere caricati dalle rispettive carte chip RFID: TLIF_0 o TLIF_15. Selezionare una delle carte chip RFID prima di iniziare gli esperimenti. Caricare il metodo di test dalla carta chip RFID.

2.1. Metodo <TLIF_15> con timer interno

- Acquisire i parametri lotto specifici utilizzando la Carta RFID verde.
- Inserire la cassetta di test nell'apposito vano a scorrere per cassetta del Quantum Blue® Reader.
- Aggiungere 80 µL di campione di siero diluito nel punto di dispensazione della cassetta (Fig. 1D).
- Chiudere il vano per cassetta e iniziare la misurazione premendo il pulsante di avvio.
- La scansione inizia automaticamente dopo 15 minuti (900 secondi).
- Per i Controlli Basso / Alto: Ripetere il punto 2.1 utilizzando 80µL di controllo invece del campione di siero diluito.

2.2. Metodo<TLIF_0> senza timer interno

- Acquisire i parametri lotto specifici utilizzando la Carta RFID bianca.
- Aggiungere 80 µL di campione di siero diluito nel punto di dispensazione della cassetta. (Fig. 1D).
- Incubare per 15 ± 1 minuti (impostare un timer manuale).
- Caricare la cassetta nell'apposito vano a scorrere per cassetta del Quantum Blue® Reader.
- Scansionare la cassetta test con il Quantum Blue® Reader premendo immediatamente il pulsante (<ENTER>).
- Per i Controlli Basso / Alto: Ripetere il punto 2.2 utilizzando 80 µL di controllo, invece del campione di siero diluito.

Importante: Si prega di consultare il manuale del Quantum Blue® Reader per informazioni sulle funzioni di base e su come avviare e mettere in funzione lo strumento, in particolare per informazioni sulla selezione dei metodi di analisi e su come caricare i parametri specifici del lotto della carta chip RFID in modo da poter quantificare I campioni. Assicurarsi il corretto inserimento della cassetta di test nello strumento, con la finestra di lettura per prima (Fig. 1D).

CONTROLLO DI QUALITÀ

- Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione del test esclude errori tecnici, si controllino gli aspetti seguenti: *i)* dispositivi di pipettaggio, controllo della temperatura e timer *ii)* data di scadenza dei reagenti e *iii)* condizioni di conservazione e incubazione.
- I risultati del self-test, che viene eseguito quando si accende il Quantum Blue® Reader, deve essere valido.

VALIDAZIONE DEI RISULTATI

- Per un risultato valido, la linea di controllo (C) deve in essere visibile ogni caso (vedere Fig. 1A e Fig. 1B). Tale linea rappresenta unicamente un controllo funzionale del test e non può essere utilizzata per interpretare la linea di rilevazione (T). Se la linea di rilevazione (T) non è rilevabile dopo 15 minuti di incubazione (Fig. 1A), la concentrazione dell'Infliximab presente nel campione è al di sotto del limite di rilevazione. Se la linea di rilevazione (T) è rilevabile dopo 15 minuti di incubazione (Fig. 1B), la concentrazione dell'Infliximab presente nel campione viene misurata tramite il Quantum Blue® Reader.
- Se è rilevabile solo la linea di rilevazione (T) dopo 15 minuti di incubazione (Fig. 1C), il risultato non è valido e il dosaggio dell'Infliximab deve essere ripetuto con una nuova cassetta.
- Se né la linea di controllo (C), né la linea di rilevazione (T) sono rilevabili dopo 15 minuti di incubazione (Fig. 1D), il risultato non è valido e il dosaggio dell'Infliximab deve essere ripetuto con una nuova cassetta.

- Dal momento che il Quantum Blue® Reader effettua una valutazione quantitativa sia delle linee di rilevazione (T) che di controllo (C), lo strumento effettua una ulteriore verifica della linea di controllo (C). Se l'intensità di segnale della linea di controllo (C) è inferiore ad una soglia specifica dopo 15 minuti di incubazione, il risultato non è valido e il dosaggio dell'Infliximab deve essere ripetuto con una nuova cassetta.

STANDARDIZZAZIONE

- I valori del calibratore della curva standard sono assegnati secondo il valore sul protocollo di trasferimento (rif. 1). I parametri della curva standard sono indicati nella scheda dati-QC allegata. Il materiale del calibratore contiene Infliximab (Remicade®) in una matrice di siero umano ed è stato standardizzato contro materiali di riferimento interni.
- Il Quantum Blue® Reader utilizza una curva standard lotto-specifica per calcolare la concentrazione d'infliximab. L'intervallo del dosaggio è compreso tra 0.4 e 20 µg/mL.

LIMITAZIONI

- I reagenti forniti con questo kit sono ottimizzati per la misura dei livelli minimi di infliximab in campioni di siero diluiti.
- Il monitoraggio della terapia di pazienti affetti da patologia infiammatoria intestinale durante la terapia con infliximab va ulteriormente supportato da ulteriori test clinici e di laboratorio.

VERIFICARE IL TEST KIT ALL'ARRIVO

I prodotti BÜHLMANN sono stati fabbricati con la massima attenzione e tutti gli sforzi possibili sono stati presi per assicurare la completezza di questo test kit e delle sue prestazioni. Tuttavia, si consiglia di verificare il test kit per la condizione delle cassette di test e il sacchetto, secondo i seguenti criteri:

- La validità della data di scadenza.
- Assenza di difetti del sacchetto (*per esempio*; assenza di perforazioni che potrebbero essere state causate da una manipolazione impropria)
- Assenza di difetti delle cassette di test (*per esempio*; assenza di graffi sulla membrana analitica).

Dovesse una delle cassette di test non soddisfare i criteri menzionati sopra, si prega di usare un'altra cassetta di test.

VALORI ATTESI

La determinazione dei livelli minimi di infliximab nei campioni del siero dei pazienti può supportare il monitoraggio della terapia nei pazienti con infiammazione. Generalmente, i livelli minimi nel siero che raggiungono o superano il valore di 3 µg/mL correlano bene con una fase di remissione, di guarigione endoscopica della mucosa dell'intestino e bassi valori di CRP (rif. 2, 3) così come sono predittivi di una risposta sostenuta alla terapia con infliximab (rif. 4).

Valore inferiore 3 µg/mL

Bassi livelli di infliximab nel siero dovrebbero essere usati quali supporto nella decisione di modificare la terapia con il farmaco, o attraverso l'incremento della dose o diminuendo il tempo degli intervalli di infusione, oltre a considerare un cambiamento del farmaco (rif. 5).

Valori tra 3-7 µg/mL

Livelli minimi del farmaco all'interno della finestra terapeutica supportano l'evidenza dell'efficacia del trattamento farmacologico con infliximab, quando i pazienti sono asintomatici (rif. 2, 5).

Valori superiori 7 µg/mL

E' stato mostrato che la diminuzione della dose per raggiungere la finestra terapeutica ottimale (3-7 µg/mL) non ha effetti sui valori di CRP, nè sugli score Harvey Bradshaw o Mayo per quanto riguarda rispettivamente pazienti affetti da Crohn o colite ulcerativa (rif. 5).

I livelli minimi del farmaco ottimali possono essere individuali. Un livello compreso tra 3 e 7 µg/mL è stato dimostrato vantaggioso (rif. 5).

CARATTERISTICA DELLE PRESTAZIONI

Riproducibilità: 16.3 – 25.0 % CV

Precisione intra-laboratorio: 18.5 – 25.3 % CV

La riproducibilità e la precisione intra-laboratorio sono state stabilite in conformità alla linea guida CLSI EP05-A2. Campioni di siero, arricchiti con infliximab per coprire l'intervallo di misurazione del saggio, sono stati testati in un periodo di 20 giorni, in due sessioni indipendenti con due replicati per sessione. I risultati sono riassunti nella Table 7.

Limite del Bianco (LoB): <0.10 µg/mL Infliximab. Il valore di LoB è stato stabilito in accordo alla linea guida CLSI EP17-A2 con quattro campioni negativi di siero. I campioni sono stati misurati in tre giorni in cinque replicati ogni giorno in modo da produrre 60 valori di bianco. Lo studio è stato eseguito con due lotti diversi di cassette di test. Il valore del LoB è stato calcolato usando una analisi non parametrica.

Limite di rilevabilità (LoD): <0.21 µg/mL infliximab. Il valore di LoD è stato stabilito in accordo alla linea guida CLSI EP17-A2 con quattro campioni clinici o pool con concentrazioni di infliximab di 0.63, 0.40, 0.26 e 0.15 µg/mL. I campioni sono stati misurati in tre giorni in cinque replicati ogni giorno in modo da produrre 60 valori. Lo studio è stato eseguito con due lotti diversi di cassette di test. Il valore di LoD è stato calcolato usando una analisi parametrica.

Limite di Quantificazione (LoQ): $\leq 0.32 \mu\text{g/mL}$ infliximab.

Il valore di LoQ è stato stabilito in accordo alla linea guida CLSI EP17-A2. Il materiale calibratore è stato diluito in siero negativo in modo da ottenere campioni con valori di riferimento di infliximab di 0.50, 0.41, 0.30 e 0.20 $\mu\text{g/mL}$. I campioni sono stati misurati in tre giorni in cinque replicati ogni giorno in modo da produrre 60 valori. Lo studio è stato eseguito con due lotti diversi di cassette di test. Il valore di LoQ è stato determinato quale il più basso valore di riferimento che soddisfi il criterio di accettazione del 30% di errore relativo totale, calcolato con un modello RMS dalla stima della precisione e dell'errore di ogni campione. In tabella 8 sono riportati risultati rappresentativi ottenuti con un lotto di reagenti.

Effetto gancio da dosi alte: Non è stato osservato un effetto gancio da dosi alte per campioni con concentrazioni di infliximab fino a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Specificità (reattività crociata): Il test Quantum Blue® Infliximab riconosce infliximab nel siero in maniera specifica. Campioni sierici addizionati di TNF α bloccanti, come adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®), golimumab (Simponi®), e certolizumab (Cimzia®) fino a 100 $\mu\text{g/mL}$ sono risultati in una lettura al di sotto del limite di bianco.

Intervallo di linearità: 0.14 – 20.37 $\mu\text{g/mL}$ di infliximab

L'intervallo di linearità del dosaggio Quantum Blue® Infliximab è stato determinato in base alla linea guida CLSI EP06-A. Due pool di campioni, basso e alto, sono stati miscelati in modo da ottenere almeno 14 livelli di concentrazione, che coprissero e eccedessero l'intervallo di misurazione atteso. Le miscele sono state dosate in 10 replicati con due lotti di cassette di test. L'intervallo di linearità è stato definito come l'intervallo dei livelli di concentrazione in cui i coefficienti delle regressioni di secondo e terzo ordine sono stati determinati come non significativi. I risultati per unlotto di cassette di test sono mostrati in Fig. 2.

Confronto tra metodi

Differenza a 3 $\mu\text{g/mL}$: -2.4 %

Differenza a 7 $\mu\text{g/mL}$: -4.4 %

Lo studio del confronto tra metodi è stato effettuato in accordo alla linea guida CLSI EP09-A3. Centodieci (110) campioni clinici sono stati misurati in base alle istruzioni per l'uso con il saggio Quantum Blue® Infliximab e con un test ELISA infliximab disponibile in commercio (rif. 6). Le misurazioni sono state effettuate in tre giorni usando due lotti di cassette di test Quantum Blue® Infliximab. I dati di correlazione sono illustrati in Fig. 3.

Recupero: 83-100 %

A sei campioni clinici con livelli di infliximab vicini ai punti di decisione clinica del saggio, sono stati addizionati con 3,2 $\mu\text{g/mL}$ infliximab in siero negativo. Campioni 'basale' sono stati addizionati con una corrispettiva quantità di siero negativo. I campioni 'basale' e 'basale + addizionato' sono stati misurati in 10 replicati con un lotto di reagenti. I risultati sono riassunti in tabella 9.

Inteferenza con farmaci della stessa classe: Nessuna interferenza, testata per un minimo di due concentrazioni di infliximab, è stata rilevata fino a 10 $\mu\text{g/mL}$ per adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®), golimumab (Simponi®), e fino a 1,7 $\mu\text{g/mL}$ di certolizumab (Cimzia®).

Parametri sierici: Nessuna interferenza è stata riscontrata per le seguenti sostanze fino alle concentrazioni elencate: Trigliceridi (Intralipid® 1320 mg/dL; equivalente a 37 mmol/L di trigliceridi), bilirubina coniugata (342 $\mu\text{mol/L}$; 29 mg/dL), bilirubina libera (342 $\mu\text{mol/L}$; 20 mg/dL), emoglobina (2 g/L (=200 mg/dL), TNF α (2,6 ng/mL) e fattori reumatoidi (497,3 IU/mL).

Co-somministrazione di immunosoppressori: Nessuna interferenza è stata riscontrata per la co-somministrazione di immunosoppressori come la azatioprina (60 $\mu\text{mol/L}$), 6-mercaptopurina (37 $\mu\text{mol/L}$), e metotressato (1363 $\mu\text{mol/L}$).

Tutte le caratteristiche di prestazioni sono state effettuate con infliximab (Remicade®, MSD).

INDICACIONES DE USO

Quantum Blue® Infiximab es un inmunoensayo diagnóstico *in vitro* de flujo lateral para la determinación cuantitativa de las concentraciones mínimas de infiximab en muestras de suero. El ensayo sirve como ayuda, junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio, para monitorizar fármacos terapéuticos en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que reciben un tratamiento con infiximab. Quantum Blue® Infiximab se utiliza en combinación con el Quantum Blue® Reader.

Para uso en laboratorio.
Europa: para uso profesional.

PRINCIPIO DEL TEST

La prueba ha sido diseñada para la determinación selectiva de infiximab mediante un inmunoensayo de tipo sándwich. El factor de necrosis tumoral recombinante alfa (TNFα) se conjuga con coloides de oro. En el cartucho de prueba, el conjugado se libera desde una almohadilla en el sistema de reacción cuando se aplica la muestra. El infiximab presente en la muestra se unirá al conjugado. En la membrana de análisis está inmovilizado un anticuerpo monoclonal, altamente específico del analito, que servirá para capturar el complejo conjugado/analito dando lugar a una coloración en la línea de test (T). El resto del conjugado TNFα/oro libre se unirá a la línea de control (C). Las intensidades de señal de la línea de test (T) y la línea de control (C) se miden cuantitativamente con el Quantum Blue® Reader.

REACTIVOS SUMINISTRADOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Comentarios
Cartucho de prueba	25 unidades	B-LFTLIF-TC	Sellado al vacío en una bolsa de aluminio
Tampón de incubación	1 frasco 10 mL	B-LFTLIF-CB	Listo para usar
Controles Alto* / Bajo*	2 viales, 0.5 mL	B-LFTLIF- CONSET	Listo para usar
Tarjeta chip RFID	1 unidad	B-LFTLIF-RCC	Tarjeta de plástica blanca
Tarjeta chip RFID	1 unidad	B-LFTLIF-RCC15	Tarjeta de plástica verde

Tabla 5

* Los controles contienen cantidades específicas de lote de infiximab. Véase la hoja de datos de QC adicional para las concentraciones reales.

CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes del equipo permanecen estables a una temperatura entre 2 y 8 °C, hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.

Precauciones de seguridad

- Ninguno de los reactivos de esta prueba tiene componentes de origen humano.
- Las muestras de pacientes se deben manejar como si pudieran transmitir infecciones, manipulándose conforme a buenas prácticas de laboratorio tomando las precauciones apropiadas.
- **Reactivos:** Evite que los reactivos entren en contacto con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona con agua abundante; de lo contrario, podría producirse irritación.
- La solución no utilizada se debe desechar conforme a las normativas locales, estatales y federales.

Precauciones técnicas

Componentes del kit

- El análisis se debe realizar a temperatura ambiente (20-26 °C).
- Todos los reactivos y las muestras para análisis deben equilibrarse a temperatura ambiente (entre 20 y 26 °C) antes de iniciar el ensayo.
- Antes de realizar el análisis, saque el cartucho de prueba de la bolsa de aluminio y deje que su temperatura se equilibre con la temperatura ambiente (20-26 °C).
- Mezclar bien (*p.ej.* mediante vórtex) los reactivos antes de usarlos.
- Los componentes no se deben utilizar más allá de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No se deben mezclar reactivos de lotes diferentes.
- No se debe desmontar el cartucho de prueba.
- Los cartuchos de prueba no pueden ser reutilizados.
- Los cartuchos de prueba se debe manipular con cuidado. No se debe contaminar el puerto de carga de muestra ni la ventana de lectura de resultados mediante contacto con la piel, otros líquidos, etc. (Fig. 1D).
- El cartucho de prueba se debe mantener en posición horizontal, plana, mientras se realiza el ensayo.

Procedimiento de análisis

- Lea atentamente las instrucciones antes de llevar a cabo el análisis. El rendimiento de la prueba se verá adversamente afectado si los reactivos se diluyen o se manipulan de manera incorrecta o se conservan en condiciones distintas de las indicadas en estas instrucciones de uso.
- El Quantum Blue® Reader debe ponerse en funcionamiento y programarse para el ensayo de flujo lateral Quantum Blue® Infiximab: Cargue el método de prueba utilizando la tarjeta chip RFID (B-LFTLIF-RCC o B-LFTLIF-RCC15), antes de iniciar el ensayo (véase el manual del Quantum Blue® Reader).
- Utilice la tarjeta chip RFID para cambiar parámetros de la prueba específicos del lote.
- Una manipulación incorrecta de las muestras de pacientes puede dar lugar a la obtención de resultados inexactos.

- Las muestras diluidas deberán utilizarse en un plazo de varias horas (conservadas a entre 2 y 8 °C) y no pueden conservarse durante un tiempo más prolongado.

MATERIALES NECESARIOS PERONO PROVISTO

- Vórtex
- Cronómetro (opcional)
- Pipetas de precisión con puntas desechables: 10-100 µL y 100-1000 µL
- Tubos de Eppendorf (o equivalentes) para la dilución de las muestras de suero
- Quantum Blue® Reader obtenible de BÜHLMANN (código para pedidos: BI-POCTR-ABS)
- Guantes y bata de laboratorio

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recoja la sangre en tubos para venopunción normales sin ningún aditivo, evitando la hemólisis, y espere un mínimo de 20 y un máximo de 60 minutos para que el suero coagule a temperatura ambiente. Centrifugue los tubos a temperatura ambiente a ~2'000 x g durante 15 minutos. Decante el suero. Las muestras de suero se pueden conservar refrigeradas a entre 2 y 8 °C durante un máximo de 10 días. Para períodos de conservación más largos, mantenga las muestras de suero a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Estas muestras son estables durante por lo menos 6 meses a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

Utilice para el ensayo únicamente reactivos cuya temperatura se haya equilibrado con la temperatura ambiente (20-26 °C). El cartucho de prueba se debe sacar de la bolsa de aluminio antes de iniciar el ensayo.

El procedimiento de ensayo consta de dos pasos:

1. Dilución de las muestras de suero con tampón de incubación

Antes de proceder a la medición, diluya la muestra de suero en proporción 1:20 con tampón de incubación (B-LFTLIF-CB) (p.ej. mezcle 10 µL de la muestra de suero con 190 µL de tampón de incubación) en un tubo de ensayo y mézclela bien mediante vórtex, pipeteo o agitación.

2. Procedimiento de ensayo y lectura de los resultados

Es posible cargar dos métodos alternativos a partir de sus respectivas tarjetas chip RFID: TLIF_0 o TLIF_15. Seleccione una de las tarjetas chip RFID antes de iniciar los experimentos. Cargue el método de prueba desde la tarjeta chip RFID.

2.1. Método <TLIF_15> con cronómetro interno

- Utilice la tarjeta de plástico verde.
- Inserte el cartucho de prueba en el portacasetes de prueba del Quantum Blue® Reader.
- Añada 80 µL de muestra de suero diluida en el puerto de carga de muestra del cartucho de prueba (Fig. 1D).
- Cierre el portacasetes e inicie la medición pulsando el botón de inicio.
- La lectura se inicia automáticamente pasados 15 minutos (900 segundos).

- Para Controles Bajos / Altos: repita el paso 2.1 utilizando 80 µL de control en lugar de suero diluido.

2.2. Método <TLIF_0> sin cronómetro interno

- Utilice la tarjeta de plástico blanca.
- Añada 80 µL de muestra de suero diluida en el puerto de carga de muestra del cartucho de prueba (Fig. 1D).
- Incube la muestra durante 15 ± 1 minutos. (arranque un cronómetro manualmente).
- Inserte el cartucho de prueba en el portacasetes de prueba del Quantum Blue® Reader.
- Inicie la lectura del cartucho de prueba con el Quantum Blue® Reader pulsando el botón de inicio (<INTRO>) inmediatamente.
- Para Controles Bajos / Altos: repita el paso 2.2 utilizando 80 µL de control en lugar de suero diluido.

Observación: Consulte el manual del Quantum Blue® Reader para conocer sus funciones básicas y saber cómo ponerlo en marcha y manejarlo, especialmente cómo seleccionar métodos de prueba y cómo cargar parámetros específicos del lote desde la tarjeta chip RFID para llevar a cabo análisis de las muestras. Asegúrese de que el cartucho de prueba se inserta correctamente en el Quantum Blue® Reader, es decir con la ventana de lectura de resultados por delante (Fig. 1D).

CONTROL DE CALIDAD

- Si la precisión del análisis no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye los errores en la técnica, compruebe los siguientes puntos: i) pipeteado, control de la temperatura y tiempo; ii) fechas de caducidad de los reactivos, y iii) condiciones de conservación e incubación.
- La autocomprobación (calibration check) del dispositivo Quantum Blue® que se realiza tras encender el Quantum Blue® Reader tiene que ser válida.

VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Para la obtención de un resultado válido de la prueba, la línea control (C) debe ser visible en cualquier caso (véanse las Fig. 1A y 1B). Se usa sólo como control funcional de la prueba y no puede usarse para la interpretación de la línea de test (T). Si la línea de test (T) no es detectable después de 15 minutos de incubación (Fig. 1A), no hay cantidades detectables de infliximab presentes en la muestra de suero. Si la línea de test (T) es detectable después de 15 minutos de incubación (Fig. 1B), la cantidad de infliximab presente en la muestra de suero se calcula mediante el Quantum Blue® Reader Quantum Blue®.
- Si sólo la línea de test (T) es detectable después de 15 minutos de tiempo de incubación (Fig. 1C), el resultado de la prueba no es válido y el análisis de infliximab debe repetirse con un cartucho de prueba nuevo.
- Si ni la línea control (C) ni la línea de test (T) se detectan después de 15 minutos de tiempo de incubación (Fig. 1D), el resultado de la prueba no es válido y el análisis de infliximab debe repetirse con un cartucho de prueba nuevo.

- Como el Quantum Blue® Reader permite la evaluación cuantitativa de las líneas de test (T) y control (C), se realiza una validación adicional de la validez de la línea control (C). Si la intensidad de la línea control (C) es inferior a un umbral después de 15 minutos de tiempo de incubación, el resultado de la prueba no es válido y el análisis de infliximab debe repetirse con un cartucho de prueba nuevo.

ESTANDARIZACIÓN

- Los valores de calibradores de la curva estándar se asignan siguiendo un protocolo de transferencia de valores (ref. 1). Los parámetros de la curva estándar se indican en la ficha de datos de CC adjunta. El material calibrador comprende Infliximab (Remicade®) en una matriz de suero humano y está estandarizado con respecto a un material de referencia interno.
- El Quantum Blue® Reader utiliza una curva de calibración específica del lote para calcular la concentración de infliximab. El rango de ensayo es entre 0.4 y 20 µg/mL.

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con este kit se han optimizado para medir concentraciones mínimas de infliximab en muestras de suero diluidas.
- La monitorización terapéutica de los pacientes con EI que están recibiendo un tratamiento con infliximab debe respaldarse con pruebas clínicas y de laboratorio adicionales.

REVISE SU KIT DE PRUEBA A LA LLEGADA

Los productos BÜHLMANN se fabrican con el máximo cuidado y realizando todos los esfuerzos posibles para asegurar que el kit de análisis está completo y su rendimiento es el esperado. No obstante, recomendamos que compruebe por sí mismo el kit de análisis y en particular el estado del cartucho de prueba y su bolsa conforme a los criterios siguientes:

- la validez de la fecha de caducidad.
- el estado libre de defectos de la bolsa (*p.ej.* la ausencia de cualquier perforación que pudiera haber sido provocada por manejo inadecuado).
- el estado libre de defectos del cartucho de prueba (*p.ej.* la ausencia de rayaduras en la membrana analítica).

Si alguno de los cartuchos de prueba no cumpliera los criterios anteriormente mencionados, utilice otro cartucho distinto.

VALORES ESPERADOS

La determinación de los niveles valle de infliximab en muestras de suero de pacientes puede ayudar a controlar el tratamiento de los pacientes con inflamación. En general, los niveles valle en suero que alcanzan un valor de 3 µg/mL o superior se correlacionan bien con la remisión, la curación endoscópica de la mucosa intestinal y valores bajos de proteína C reactiva (ref. 2, 3), así como la predicción de una respuesta sostenida al tratamiento con infliximab (ref. 4).

Valores por debajo de 3 µg/mL

Los niveles bajos de infliximab en suero deberían utilizarse como contribución a la decisión de alterar la medicación, bien aumentando la dosis o reduciendo los intervalos entre infusiones, así como plantearse un cambio de fármaco (ref. 5).

Valores entre 3 y 7 µg/mL

Un nivel valle dentro de la ventana terapéutica puede respaldar la evidencia de efectividad del tratamiento farmacológico con infliximab cuando los pacientes no presentan síntomas (ref. 2, 3).

Valores por encima de 7 µg/mL

Se ha visto que la disminución escalonada de la dosis hasta alcanzar la ventana terapéutica óptima (3-7 µg/mL) no tiene ningún efecto en los valores de proteína C reactiva ni en las puntuaciones de Harvey Bradshaw o Mayo de pacientes con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa respectivamente (ref. 5).

Los niveles valle óptimos pueden variar de una persona a otra. Se ha encontrado que un nivel de entre 3 y 7 µg/mL resulta beneficioso (ref. 5).

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Repetibilidad: 16.3 – 25.0 % de CV

Precisión en laboratorio: 18.5 – 25.3 % de CV

La repetibilidad y la precisión en laboratorio se han determinado de conformidad con la directriz CLSI EP05-A3. Se ensayaron muestras de suero con infliximab para cubrir todo el rango de medición del ensayo, diariamente durante 20 días, en dos tandas de lecturas independientes con dos réplicas por tanda. Los resultados se resumen en la tabla 7.

Límite de blanco (LoB): <0.10 µg/mL de infliximab. El LoB se estableció con cuatro muestras de suero negativas conforme a la norma EP17-A2 del CLSI. Se analizaron cinco copias de cada muestra cada día durante un período de tres días, por un total de 60 blancos. El estudio se realizó con dos lotes distintos de cartuchos de prueba. El LoB se calculó mediante un análisis no paramétrico.

Límite de detección (LoD): <0.21 µg/mL de infliximab. El LoD se determinó con cuatro muestras de suero clínicas o mezclas de muestras con concentraciones de 0.63, 0.40, 0.26 y 0.15 µg/mL de infliximab, conforme a la norma EP17-A2 del CLSI. Se analizaron cinco copias de cada muestra cada día durante un período de tres días, por un total de 60 valores. El estudio se realizó con dos lotes distintos de cartuchos de prueba. El LoD se calculó mediante un análisis paramétrico.

Límite de cuantificación (LoQ): $\leq 0.32 \mu\text{g/mL}$ de infliximab. El LoQ se determinó conforme a la norma EP17-A2 del CLSI. Se diluyó material de calibración en suero negativo para obtener muestras con valores de referencia de 0.50, 0.41, 0.30 y 0.20 $\mu\text{g/mL}$ de infliximab. Se analizaron cinco copias de cada muestra cada día durante un período de tres días, por un total de 60 valores. El estudio se realizó con dos lotes distintos de cartuchos de prueba. Se determinó el LoQ como el valor de referencia más bajo que cumpliera con el criterio de aceptación de un error total relativo del 30 %, calculado mediante el modelo de RMS a partir de estimaciones del sesgo y la precisión de cada muestra. En la Tabla 8 se muestran unos resultados representativos, obtenidos con uno de los lotes de reactivo.

Efecto gancho de dosis altas: No se ha observado un efecto gancho de dosis altas para muestras con concentraciones de infliximab de hasta 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Especificidad (reactividad cruzada): El ensayo de Quantum Blue® Infliximab reconoce específicamente el infliximab presente en el suero. La adición del suero con bloqueadores del TNF α , como adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®), golimumab (Simponi®) y certolizumab (Cimzia®) en concentraciones de hasta 100 $\mu\text{g/mL}$ dio lugar a lecturas de resultados por debajo del límite para el blanco.

Intervalo de linealidad: 0.14 – 20.37 $\mu\text{g/mL}$ de infliximab
El intervalo de linealidad del ensayo Quantum Blue® Infliximab se determinó conforme a la norma EP06-A. Dos mezclas de muestra, con concentración alta y baja respectivamente, se mezclaron hasta obtener al menos 14 distintos valores de concentración que abarcaran un intervalo más amplio que el intervalo esperado. Se analizaron diez copias de las mezclas en dos lotes de cartuchos de prueba. El intervalo de linealidad se definió como el intervalo de valores de concentración en el cual los coeficientes de los ajustes de segundo y tercer orden resultan despreciables. En la Figura 2 se muestran los resultados para uno de los cartuchos de prueba.

Comparação de métodos

Desvío a 3 $\mu\text{g/mL}$: -2.4 %

Desvío a 7 $\mu\text{g/mL}$: -4.4 %

El estudio del método de comparación se realizó conforme a la norma EP09-A3 del CLSI. Se midieron ciento diez (110) muestras clínicas conforme a las instrucciones de uso con el ensayo Quantum Blue® Infliximab y con un ELISA comercial (ref. 6). Se realizaron mediciones durante un período de tres días con dos lotes de cartuchos de prueba de Quantum Blue® Infliximab. En la Figura 3 se muestran los datos de correlación.

Recuperación: 83 – 100 %

Para seis muestras clínicas con concentraciones de infliximab próximas a los puntos de decisión clínica del ensayo, se añadieron 3,2 $\mu\text{g/mL}$ infliximab en suero negativo. Se añadió la misma cantidad de suero negativo a unas muestras de referencia. Con un lote de reactivo, se analizaron 10 copias de las muestras de referencia y de las muestras con el producto añadido. En la Tabla 9 se resumen los resultados.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Dentro de la misma clase: En la comprobación efectuada para como mínimo dos concentraciones de infliximab, no se detectó ninguna interferencia hasta 10 $\mu\text{g/mL}$ para adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®) y golimumab (Simponi®), y hasta 1,7 $\mu\text{g/mL}$ para certolizumab (Cimzia®).

Índices séricos: No se detectó ninguna interferencia con las siguientes sustancias hasta las concentraciones indicadas: triglicéridos (Intralipid® 1320 mg/dL ; equivalente a 37 mmol/L de triglicéridos), bilirrubina conjugada (342 $\mu\text{mol/L}$; 29 mg/dL), bilirrubina no conjugada (342 $\mu\text{mol/L}$; 20 mg/dL), hemoglobina (2 g/L = 200 mg/dL), TNF α (2,6 ng/mL) y factores reumatoides (497,3 UI/mL).

Medicación concomitante/inmunosupresora: No se detectó ninguna interferencia con medicación concomitante /inmunosupresora tal como azatioprina (60 $\mu\text{mol/L}$), 6-mercaptopurina (37 $\mu\text{mol/L}$) y metotrexato (1363 $\mu\text{mol/L}$).

Todas las características del rendimiento se determinaron con infliximab (Remicade®, MSD).

PORTUGUÊS

APLICAÇÃO DO TESTE

O Quantum Blue® Infiximab é um imunoensaio de fluxo lateral de diagnóstico in vitro para determinação quantitativa dos níveis de valor de infiximabe em amostras de soro. O teste serve como auxiliar na monitorização da terapêutica medicamentosa em pacientes com doenças intestinais inflamatórias (DII) recebendo terapia com infiximabe, em conjunto com outros resultados clínicos e laboratoriais. O Quantum Blue® Infiximab é combinado ao Quantum Blue® Reader.

Somente para uso laboratorial.

Europa: para uso profissional.

PRINCÍPIO DO TESTE

O teste foi concebido para a determinação seletiva de infiximabe por um imunoensaio tipo sanduíche. O tumor de necrose tumoral alfa (TNF α) é conjugado com colóides de ouro. Na cassete de teste (CT), o conjugado é libertado de uma placa para o sistema de reação quando se adiciona a amostra. O infiximabe presente na amostra liga-se ao conjugado. Na membrana de teste, encontra-se imobilizado um anticorpo monoclonal altamente específico para o analito que captura o complexo conjugado/analito, resultando na coloração da linha do teste (T). O que resta do conjugado TNF α /ouro liga-se à linha de controlo (C). A intensidade dos sinais da linha de teste (T) e da linha de controlo (C) é medida quantitativamente pelo Quantum Blue® Reader.

REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

Reagentes	Quantidade	Código	Observações
Cassete de teste	25 unidades	B-LFTLIF-TC	Embalagem selada a vácuo
Tampão de diluição	1 frasco 10 mL	B-LFTLIF-CB	Pronto para uso
Controles Baixo*/ Alto*	2 frascos, 0,5 mL	B-LFTLIF- CONSET	Pronto para uso
Cartão Chip RFID	1 unidade	B-LFTLIF-RCC	Cartão de plástico branco
Cartão Chip RFID	1 unidade	B-LFTLIF- RCC15	Cartão de plástico verde

Table 6

* Os controles contêm quantidades específicas de infiximabe no lote. Veja a folha de dados adicional QC para as concentrações reais.

ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES

Todos os componentes do kit são estáveis a 2-8 °C até à data de expiração impressa nos rótulos.

PRECAUÇÕES

Precauções de segurança

- Nenhum reagente deste kit contém componentes de origem humana.
- Amostras dos doentes devem ser manuseadas como transmissoras de doenças infecciosas e de acordo com as boas práticas laboratoriais.

- **Reagentes:** Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente com água em abundância, caso contrário, poderá ocorrer irritação.
- As soluções não utilizadas devem ser eliminadas de acordo com a Regulamentação das Entidades Governamentais Locais.

Precauções técnicas

Componentes do kit

- O teste deve ser realizado à temperatura ambiente (20 - 26 °C).
- Todos os reagentes e amostras de teste devem ser equilibrados à temperatura ambiente (20-26 °C) antes do início do ensaio.
- Antes de realizar o teste, remova o cassete de teste da embalagem metalizada e deixe que atinja o equilíbrio à temperatura ambiente (20-26 °C).
- Misture bem (p. ex., no vórtex) os reagentes antes de usar.
- Os componentes não podem ser utilizados após a data de validade impressa nos rótulos.
- Não misture lotes de reagentes diferentes.
- Não desmonte a cassete de teste.
- Os cassetes de teste não podem ser reutilizados.
- Manuseie os cassetes de teste com cuidado. Não contamine a zona de introdução da amostra ou a janela de leitura por contato com a pele, outros líquidos, etc. (Fig. 1D).
- Assegure-se de que mantém o cassete de teste na horizontal enquanto realiza o teste.

Procedimento do teste

- Leia cuidadosamente as instruções antes de realizar o teste. O desempenho do teste é afetado negativamente se os reagentes forem incorretamente diluídos, manuseados ou conservados em condições que não as indicadas nestas instruções de utilização.
- O Quantum Blue® Reader tem de ser ligado e programado para o ensaio de Quantum Blue® Infiximab: Antes de iniciar o ensaio, carregue o método do ensaio usando o cartão com chip RFID (B-LFTLIF-RCC ou B-LFTLIF-RCC15) (ver Manual do Quantum Blue® Reader).
- Utilize o cartão com chip RFID para alterar parâmetros do teste específicos de cada lote.
- As amostras dos doentes que não sejam corretamente manuseadas podem causar resultados inexatos.
- As amostras diluídas devem ser usadas no prazo de algumas horas (mantidas a 2-8 °C) e não podem ser conservadas durante mais tempo.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECEDOS

- Vórtex
- Cronômetro (opcional)
- Pipetas de precisão com pontas descartáveis: 10-100 µL e 100-1000 µL
- Tubos Eppendorf (ou equivalentes) para diluição das amostras de soro
- Quantum Blue® Reader disponível na BÜHLMANN (código de encomenda: BI-POCTR-ABS)
- Luvas e avental de laboratório

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Colha sangue para tubos de punção venosa simples, sem quaisquer aditivos e evitando a hemólise, e deixe o coágulo de soro à temperatura ambiente durante 20 a 60 minutos. Centrifugue à temperatura ambiente, a ~2'000 x g, durante 15 minutos. Decante o soro.

As amostras de soro podem ser conservadas refrigeradas a 2-8 °C durante até 10 dias. Para uma conservação mais prolongada, mantenha as amostras a ≤-20 °C. Estas amostras são estáveis durante pelo menos 6 meses a ≤-20 °C.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Para o teste, use somente reagentes equilibrados à temperatura ambiente (20 - 26 °C). O cassete de teste deve ser removido da embalagem metalizada antes do começo do teste.

O procedimento do ensaio consiste em dois passos:

1. Diluição das amostras de soro com tampão de diluição

Antes da determinação, dilua a amostra de soro de 1:20 com tampão de diluição (B-LFTLIF-CB) (p. ex., misture 10 µL de amostra de soro com 190 µL de tampão de diluição) em um tubo de ensaio e misture bem no vórtex ou com a pipeta ou por agitação.

2. Procedimento e leitura do ensaio

É possível carregar dois métodos alternativos do respetivo cartão com chip RFID: TLIF_0 ou TLIF_15. Selecione um dos cartões com chip RFID antes de iniciar as experiências. Carregue o método de teste do cartão com chip RFID.

2.1. Método <TLIF_15> com cronômetro interno

- Utilize o cartão plástico verde.
- Introduza o cassete de teste no suporte para ele existente no Quantum Blue® Reader.
- Adicione 80 µL da amostra de soro diluído na zona de introdução da amostra da cassete de teste (Fig. 1D).
- Feche o suporte do cassete e inicie a determinação apertando o botão de início.
- A leitura inicia-se automaticamente após 15 minutos (900 segundos).
- Para Controles Baixo / Alto: repita a etapa 2.1 usando 80 µL do controle em vez da amostra de soro diluída.

2.2. Método <TLIF_0> sem cronômetro interno

- Utilize o cartão plástico branco.
- Adicione 80 µL da amostra de soro diluída na zona de introdução da amostra do cassete de teste (Fig. 1D).
- Incube durante 15 ± 1 minutos (programe manualmente um cronômetro).
- Introduza o cassete de teste no suporte para ele existente no Quantum Blue® Reader.
- Leia o cassete de teste com o Quantum Blue® Reader apertando imediatamente o botão de início (<ENTER>).
- Para Controles Baixo / Alto: repita a etapa 2.2 usando 80 µL do controle em vez da amostra de soro diluída.

Observação: Consulte o Manual do Quantum Blue® Reader para aprender as funções básicas e saber como iniciar e trabalhar com o Quantum Blue® Reader, sobretudo como selecionar os métodos de teste e como carregar parâmetros específicos de cada lote a partir do cartão com chip RFID para medir as amostras. Assegure-se de que a CT está devidamente introduzida no Quantum Blue® Reader com a janela de leitura em primeiro (Fig. 1D).

CONTROLE DE QUALIDADE

- Se a precisão do teste não se correlacionar com os limites estabelecidos e as repetições excluírem erros técnicos, verifique o seguinte: i) pipetagem, temperatura e tempos dos diferentes passos, ii) data validade dos reagentes e iii) condições armazenamento e incubação.
- A autocalibração do Quantum Blue® Reader (calibration check) quando é iniciado tem que ser válida.

VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

- Em um resultado válido, a Linha de Controle (C) tem que ser sempre visível (ver Fig. 1A e Fig. 1B). É um teste de controle/validação que não pode ser usado para interpretar a linha de teste (T). Se a linha de teste (T) não for detectável após os 15 min de incubação (Fig. 1A), a concentração de infliximabe presente na amostra é inferior ao limite de detecção. Se a linha de teste (T) for detectável após os 15 min de incubação (Fig. 1B), a concentração da infliximabe presente é calculada pelo Quantum Blue® Reader.
- Se apenas a linha de teste (T) for detectável após os 15 min de incubação (Fig. 1C), o resultado do teste é inválido e o teste de infliximabe tem que ser repetido com outro cassete.
- Se nem a linha de controle (C) nem a linha de teste (T) forem detectáveis após 15 min de incubação (Fig. 1D), o resultado do teste é inválido e o teste tem que ser repetido com outro cassete.
- Como o Quantum Blue® Reader permite a avaliação quantitativa das linhas de teste (T) e de controle (C), há uma validação adicional da linha de controle (C). Se a intensidade do sinal da linha de controle (C) for inferior à determinada para esse lote após os 15 min de incubação, o resultado do teste é inválido e o teste de infliximabe tem que ser repetido com outro cassete.

ESTANDARDIZAÇÃO

- O imunoensaio de fluxo lateral é calibrado com infliximabe usando um ensaio de imunoglobulina G com marca CE para a quantificação.
- O Quantum Blue® Reader da BÜHLMANN utiliza uma curva de calibração específica de cada lote para calcular a concentração de infliximab. O intervalo de detecção do ensaio é de 0.4 a 20 µg/mL.

LIMITAÇÕES

- Os valores dos calibradores da curva padrão são atribuídos de acordo com um protocolo de transferência de valores (ref. 1). Os parâmetros da curva padrão são indicados na folha de dados de CQ inclusa. O material dos calibradores consiste em calprotectina Infliximab (Remicade®) em uma matriz de soro humano e é padronizado em relação a um material de referência interno.
- A monitorização terapêutica de pacientes de DII durante a terapia com infliximabe deve ser corroborada por testes laboratoriais e clínicos adicionais.

CONFIRA SEU KIT NA CHEGADA

Os produtos BÜHLMANN foram fabricados com o máximo cuidado e foram envidados todos os esforços para assegurar a integralidade deste kit de teste e o seu desempenho. Não obstante, aconselhamos a verificar as condições do cassete de teste e da sua respectiva embalagem no kit com base nos seguintes critérios:

- data de validade.
- ausência de danos na embalagem (*p. ex.*, inexistência de perfurações que possam ser causadas por manipulação impróprio).
- ausência de danos no cassete de teste (*p. ex.*, ausência de riscos na membrana analítica).

Caso alguma das cassetes de teste não cumpra os critérios acima indicados, substitua-a por outra.

VALORES ESPERADOS

A determinação dos níveis mínimos de infliximabe em amostras de soro dos doentes pode dar apoio à terapêutica dos doentes com problemas inflamatórios. No geral, os níveis mínimos no soro que atinjam valores iguais ou superiores a 3 µg/mL estão bem correlacionados com a remissão, a cicatrização endoscópica da mucosa intestinal e baixos valores de PCR (re. 2, 3), bem como com a predição da manutenção da resposta à terapêutica com infliximabe (ref. 4).

Valores inferiores a 3 µg/mL

Os níveis baixos de infliximabe no soro devem ser utilizados para ajudar a decidir a alterar a medicação, quer pelo aumento da dose, quer pelo encurtamento dos intervalos de Infusão, ou ainda considerando a mudança de fármaco (ref. 5).

Valores entre 3 e 7 µg/mL

Níveis mínimos dentro da janela terapêutica podem contribuir para confirmar a eficácia do tratamento medicamentoso com infliximabe quando os doentes não apresentam sintomas (ref. 2, 5).

Valores superiores a 7 µg/mL

Demonstrou-se que a diminuição da dose para atingir a janela terapêutica ideal (3-7 µg/mL) não tem efeito nos valores da PCR nem nas pontuações de Harvey Bradshaw das pessoas com Doença de Crohn, nem nas pontuações Mayo das pessoas com colite ulcerosa (ref. 5).

Os níveis mínimos ideais podem ser individuais. Verificou-se que os níveis entre 3 e 7 µg/mL eram benéficos (ref. 5).

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Repetibilidade: 16.3 – 25.0 % do CV

Precisão intralaboratorial: 18.5 – 25.3 % do CV

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz CLSI EP05-A3. Os amostras de soro fortificadas com infliximabe para abranger a faixa de medição do teste foram testadas por 20 dias, em duas corridas independentes com duas replicações de corrida. Os resultados estão resumidos na Table 7.

Limite do Branco (LoB): <0.10 µg/mL de infliximabe.

O LoB foi estabelecido de acordo com a diretriz CLSI EP17-A2 com quatro amostras de soro negativas. As amostras foram medidas ao longo de três dias em cinco repetições por dia, para produzir 60 valores em branco. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes. O LoB foi calculado utilizando análise não paramétrica.

Limite de Detecção (LoD): <0.21 µg/mL de infliximabe.

O LoD foi estabelecido de acordo com a diretriz CLSI EP17-A2 com quatro amostras clínicas ou agrupadas com concentrações de 0.63, 0.40, 0.26 e 0.15 µg/mL de infliximabe. As amostras foram medidas ao longo de três dias, em cinco repetições por dia, para produzir 60 valores. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes. O LoD foi calculado por análise paramétrica.

Limite de Quantificação (LoQ): ≤0.32 µg/mL infliximabe.

O LoQ foi estabelecido de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI. O material do calibrador foi diluído em soro negativo para obter amostras com valores de referência de 0.50, 0.41, 0.30 e 0.20 µg/mL de infliximabe. As amostras foram medidas ao longo de três dias, em cinco repetições por dia, para produzir 60 valores. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes. O LoQ foi determinado como o valor de referência mais baixo de acordo com o critério de aceitação de erro total relativo de 30%, calculado utilizando o modelo RMS a partir de estimativas de precisão e viés para cada amostra. Os resultados representativos obtidos com um dos lotes de reagentes estão resumidos na Tabela 8.

Efeito gancho com doses elevadas: Não foi observado efeito gancho com dose elevada para amostras com concentrações de infliximabe até 1000 µg/mL.

Especificidade (Reatividade cruzada): O ensaio de Quantum Blue® Infiximab reconhece especificamente o infliximabe no soro. Soros a que se acrescentaram bloqueadores do TNF α , tais como adalimumabe (Humira®), etanercepte (Enbrel®), golimumabe (Simponi®) e certolizumabe (Cimzia®) até 100 μ g/mL resultaram em leituras abaixo do limite do branco.

Faixa Linear: 0.14 – 20.37 μ g /mL de infliximab

A faixa linear do ensaio de Infiximab Quantum Blue® foi determinada de acordo com a diretriz de CLSI EP06-A. Dois pools de amostra, baixa e alta, foram misturadas para obter pelo menos 14 níveis de concentração cobrindo e excedendo a faixa de medição esperada. As misturas foram ensaiadas em 10 repetições em dois lotes de cassetes de teste. A faixa linear foi definida como o intervalo de concentrações nos quais os coeficientes dos ajustamentos de segunda e terceira ordem foram determinados como não significativos. Os resultados para um lote de cassetes de teste são mostrados na Fig. 2.

Comparação de métodos

Desvio a 3 μ g/mL: -2.4 %

Desvio a 7 μ g/mL: -4.4 %

O estudo de comparação de métodos foi realizado de acordo com a diretriz CLSI EP09-A3. Cento e dez (110) amostras clínicas foram medidas de acordo com a instrução para utilização do ensaio Quantum Blue® Infiximabe e com um teste de ELISA de infliximabe comercialmente disponível (ref. 6). As medições foram realizadas ao longo de três dias utilizando dois lotes de cassetes de teste de Infiximabe Quantum Blue®. Os dados de correlação estão ilustrados na Fig. 3.

Recuperação: 83 – 100 %

A seis amostras clínicas incluindo níveis de infliximabe perto dos pontos de decisão clínica do ensaio, foram adicionados com infliximabe de 3,2 μ g/mL em soro negativo. Amostras de "Base" foram adicionadas com a quantidade correspondente de soro negativo. As amostras "Base" e "base + spike" foram medidas em 10 repetições com um lote de reagente. Os resultados estão resumidos na Tabela 9.

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

Interferência dentro da mesma classe: Não foi detectada qualquer interferência, analisada num mínimo de duas concentrações de infliximabe, com até 10 μ g/mL de adalimumabe (Humira®), etanercepte (Enbrel®), golimumabe (Simponi®) e até 1,7 μ g/mL de certolizumabe (Cimzia®).

Índices Séricos: Não foi detectada qualquer interferência com as seguintes substâncias até às concentrações indicadas: Triglicéridos (Intralipid® 1320 mg/dL; equivalente a 37 mmol/L triglicéridos), bilirrubina conjugada (342 μ mol/L; 29 mg/dL), bilirrubina não conjugada (342 μ mol/L; 20 mg/dL), hemoglobina (2 g/L (= 200 mg/dL), TNF α (2,6 ng/mL) e fatores reumatóides (497,3 UI/mL)

Imunossupressivos/co-medicação: Não foi detectada qualquer interferência com imunossupressivos/co-medicação como azatioprina (60 μ mol/L), 6-mercaptopurina (37 μ mol/L) e metotrexato (1363 μ mol/L).

Todas as características de desempenho foram determinadas com infliximabe (Remicade®, MSD).

TABLES AND FIGURES/ TABELLEN UND ABBILDUNGEN/ TABLES ET FIGURES/ TABELLE E FIGURE/ TABLAS E FIGURAS

Test Results

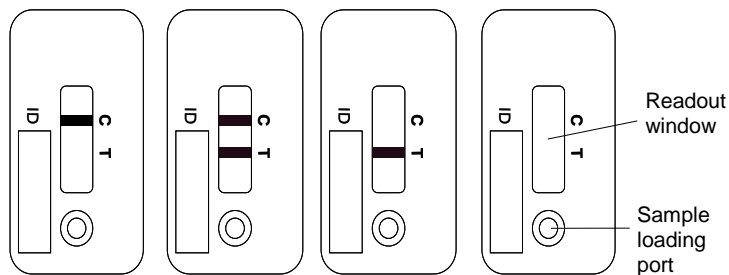


Fig. 1A Fig. 1B Fig. 1C Fig. 1D

Repeatability / Within-Laboratory Precision

Mean IFX Conc. [µg/mL]	Repeatability CV [%]	Between-run Precision CV [%]	Between-day Precision CV [%]	Within-lab Precision CV [%]
0.42	16.3	3.7	7.9	18.5
1.44	25.0	0.0	3.6	25.2
3.02	20.3	5.1	5.1	21.5
4.78	21.0	0.0	0.0	21.0
7.26	17.0	7.5	4.5	19.2
9.37	20.4	0.0	2.7	20.6
11.71	23.5	9.5	0.0	25.3

Table 7

Limit of Quantification

Sample	1	2	3	4
Reference value [µg/mL]	0.20	0.30	0.41	0.50
Bias [µg/mL] (Mean value obtained - reference value)	-0.01	-0.05	-0.05	-0.10
Precision [% CV]	24	20	18	16
% Total Error	24	27	22	30

Table 8

Recovery

Sample	Base [µg/mL]	Spike [µg/mL]	Expected Base + Spike [µg/mL]	Observed Base + Spike [µg/mL]	Recovery [%]
S1	1.5	3.2	4.7	3.9	83
S2	2.0	3.2	5.3	5.1	98
S3	2.9	3.2	6.1	6.1	100
S4	4.3	3.2	7.6	7.2	95
S5	6.5	3.2	9.7	9.3	96
S6	9.9	3.2	13.2	11.8	89

Table 9

Linearity Plot

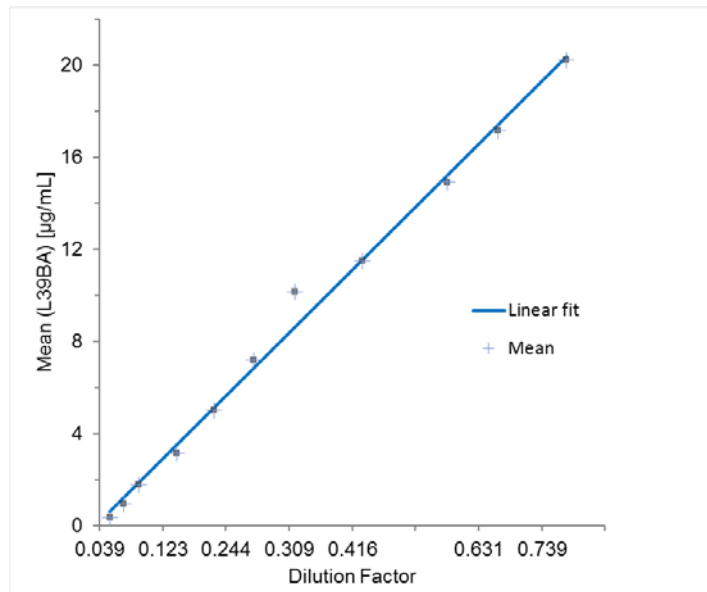


Fig. 2

Method Comparison

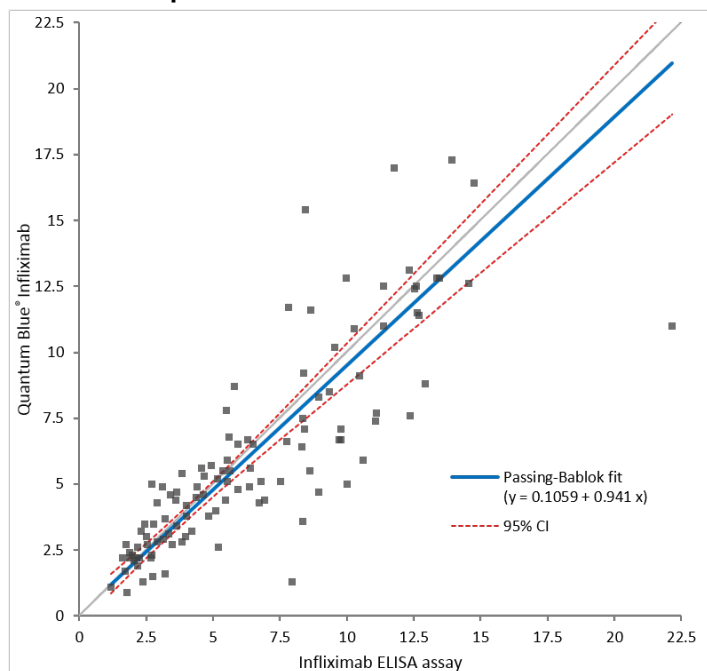






Fig. 3

REFERENCES/ REFERENZEN/ RÉFÉRENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS/ REFERÊNCIAS

1. Blirup-Jensen et al.: *Protein standardization V: value transfer. A practical protocol for the assignment of serum protein values from a Reference Material to a Target Material*. Clin Chem Lab Med; **46**, 1470 – 9 (2008)
2. Imadea, H. et al.: *Clinical utility of newly developed immunoassays for serum concentrations of adalimumab and anti-adalimumab antibodies in patients with Crohn's disease*. Journal of Gastroenterology, **49(1)**, 100–109 (2014)
3. Maser, E.A. et al.: *Association of Trough Serum Infliximab to Clinical Outcome After Scheduled Maintenance Treatment for Crohn's Disease*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, **4(10)**, 1248–1254 (2006)
4. Cornillie, F. et al.: *Postinduction serum infliximab trough level and decrease of C-reactive protein level are associated with durable sustained response to infliximab: a retrospective analysis of the ACCENT I trial*. Gut, **63(11)**, 1721–1727 (2014)
5. Vande Casteele, N.: *Trough Concentration of Infliximab Guide Dosing for Patients With Inflammatory Bowel Disease*. Journal of Gastroenterology, **148**, 1320–1329 (2015)
6. Vande Casteele, N. et al.: *Detection of infliximab levels and anti-infliximab antibodies: a comparison of three different assays*. Aliment Pharmacol Ther, **36**, 765-771 (2012)

SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad Data de expiração
REF	Catalogue number Bestellnummer Code Codice Código Código
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Código de lote Código lote
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für <n> Ansätze Contenu suffisant pour <n> tests Contenuto sufficiente per <n> saggi Contenido suficiente para <n> ensayos Contenido suficiente para <n> tests
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> Producto sánitaro para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso Leia cuidadosamente as instruções

Symbol	Explanation
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura Limite de temperatura
TC	Test Cassette Testkassette Cassette test Cartuccia di rilevazione Cartucho de prueba Cassete de teste
BUFCHASE	Chase Buffer Laufpuffer Tampon de dilution Tampone di diluzione Tampón de incubación Tampão de diluição
CONTROL L	Control Low Kontrolle Tief Contrôle Bas Controllo Basso Control Bajo Controlle Baixo
CONTROL H	Control High Kontrolle Hoch Contrôle Élevé Controllo Alto Control Alto Controlle Alto
RCC	RFID Chip Card RFID Chipkarte Carte à puce RFID Carta chip RFID Tarjeta chip RFID Cartão Chip RFID