



# Quantum Blue<sup>®</sup>

## Infliximab

### Quantitative Lateral Flow Assay

LF-TLIF25 25 tests

LF-TLIF10 10 tests

Release date: 2018-08-15  
Version A1



## ENGLISH

### INTENDED USE

Quantum Blue® Infiximab is an *in vitro* diagnostic lateral flow immunoassay for the quantitative determination of trough levels of infliximab (Remicade®) and the infliximab biosimilars, CT-P13 (Remsima™; Inflectra™) and SB2 (FLIXABI®), 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 (TNFα) is conjugated to gold colloids. On the test cassette the gold conjugate is released from a pad into the reaction system as the sample is applied. Infliximab present in the sample will bind to the gold conjugate. A monoclonal antibody, highly specific for the analyte, is immobilized on the test membrane and will capture the complex of gold conjugate and the infliximab analyte, resulting in a coloring of the Test Line (T). The remaining free TNFα/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
	LF-TLIF25	LF-TLIF10		
Test Cassette	25 pieces	10 pieces	B-LFTLIF-TC	Vacuum-sealed in a foil bag pouch
Chase Buffer	1 bottle 10 mL	1 bottle 10 mL	B-LFTLIF-CB	Ready to use
Controls Low* / High*	2 vials, 0.5 mL	2 vials, 0.5 mL	B-LFTLIF-CONSET	Ready to use
RFID Chip Card	1 piece	1 piece	B-LFTLIF-RCC	White plastic card
RFID Chip Card	1 piece	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.

### CHECK YOUR TEST KIT

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.

### STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened reagents	
Store at 2-8 °C. Do not use the reagents beyond the expiration date printed on the labels.	
Opened reagents	
Test Cassette	Test cassettes removed from the foil pouch must be used within 4 hours.
Chase Buffer	Store for up to 6 months at 2-8 °C after opening.
Controls Low / High	Store for up to 6 months at 2-8 °C after opening.

Table 2

### MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

### 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. Allow the test cassette to equilibrate in the laboratory environment (20-26 °C) for at least 2 minutes. Test cassettes removed from the foil pouch must be used within 4 hours.
- 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. (figure 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 detailed in this instruction for use.
- The Quantum Blue® Reader must be switched on and programmed for the Quantum Blue® Infliximab 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 stored at 2-8 °C and measured within 24 hours. The diluted samples cannot be stored for a longer period.
- Samples above 20 µg/mL (up to 183.6 µg/mL) may be additionally diluted 1:10 in chase buffer (1:200, in total) to obtain results within the measuring range of the test.

### 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 ~2000 x 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 21 months at ≤-20 °C.

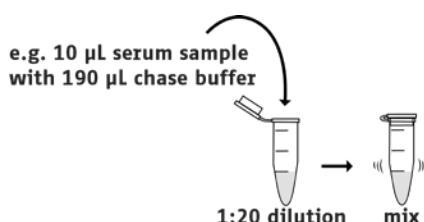
### ASSAY PROCEDURE

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:

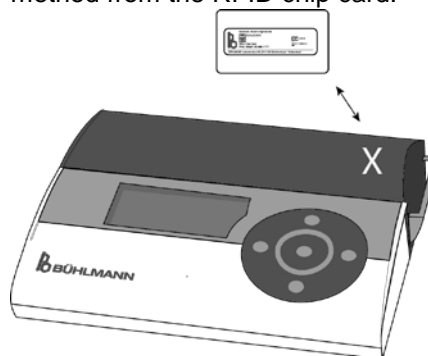
#### 1. Dilution of serum samples with chase buffer

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.



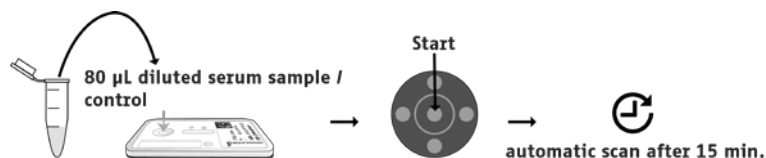
#### 2. Lateral flow assay procedure and readout

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.



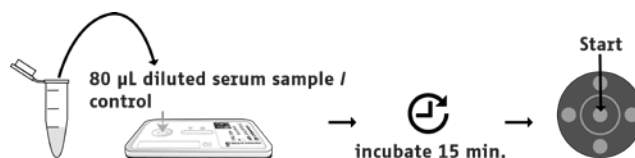
##### 2.1. Method <TLIF\_15> with internal timer

- 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 (figure 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 (figure 1D).
- Incubate for 15 ± 1 minute (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 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 (figure 1D).

---

## QUALITY CONTROL

- If the performance 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 *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.

---

## 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 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 µg/mL.

---

## VALIDATION OF RESULTS

- For a valid test result, the Control Line (C) must be visible in any case (see figure 1A and figure 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 (figure 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 (figure 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 (figure 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 (figure 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.

---

## LIMITATIONS

- The reagents supplied with this kit are optimized to measure trough levels of infliximab in diluted serum samples.
- Samples from patients switching from certolizumab (Cimzia®) therapy should not be tested directly with Quantum Blue® Infliximab, as cross-reactivity may occur. Allow certolizumab (Cimzia®) trough levels to fall at least below 1.7 µg/mL.
- Quantum Blue® Infliximab test results should be interpreted in conjunction with other clinical and laboratory findings. These may include the determination of IBD disease activity, presence of anti-drug antibodies, as well as information on patient's adherence to therapy (ref. 2).
- Infliximab trough levels between 3 and 7 µg/mL are considered the consensus therapeutic window for best treatment efficacy (ref. 2, 6). Optimal trough levels, however, may be individual and may differ depending on the treatment target as well as the disease phenotype (ref. 2).

---

## 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. 3, 4), as well as prediction of sustained response to infliximab therapy (ref. 5).

### Values below 3 µg/mL

Sub-therapeutic infliximab levels in serum suggest pharmacokinetic failure. Therapy adjustment, taking into account available clinical and laboratory findings, should be considered (ref. 2, 6).

### Values between 3-7 µg/mL

Therapeutic infliximab trough levels may serve as an indication for continuing therapy with the current dosage, in patients in IBD disease remission (ref 2, 3, 6).

### Values above 7 µg/mL

Supra-therapeutic infliximab trough levels may serve as an indication for dose reduction in conjunction with the clinical picture, in patients in IBD disease remission (ref 2). It was shown that dose de-escalation to reach the optimal therapeutic window (3-7 µg/mL) has no effect on CRP values nor on Harvey Bradshaw or Mayo scores in Crohn's or ulcerative colitis patients, respectively (ref. 6).

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Clinical performance

One hundred and ten (110) ulcerative colitis (UC) patients, ages 18 and above (55 % female), under infliximab maintenance therapy, were recruited at ten different university and community hospitals by the Portuguese IBD Study Group (GEDII) (ref. 7). A determination of infliximab trough levels, together with a clinical, endoscopic, and calprotectin level evaluation, was performed for each of the patients. In this study infliximab trough levels above 3 µg/mL were defined as a negative result. A negative predictive value (NPV) indicated the percentage of patients with infliximab trough levels above the cut-off, with a positive clinical outcome, who would not benefit from drug adjustment. A positive clinical outcome was defined as clinical remission (Mayo global score ≤2, with no individual score above 1), endoscopic remission (for not deep remission, Mayo endoscopic subscore ≤1) and/or fecal calprotectin levels below 250 µg/g. The NPV values obtained for the Quantum Blue® Infliximab test and a commercially available ELISA kit are shown in table 3.

Clinical outcome	Clinical remission	Endoscopic remission	Fecal calprotectin ≤250 µg/g
Quantum Blue® Infliximab	74 %	88 %	88 %
ELISA	74 %	83 %	86 %

Table 3

### Method comparison

**Bias at 3 µg/mL: -0.7 % (95% CI: -6.9 % – 3.1 %)**

**Bias at 7 µg/mL: -3.8 % (95% CI: -8.3 % – -0.7 %)**

The method comparison study was performed according to the CLSI guideline EP09-A3. One hundred and ten (110) clinical samples were measured in triplicate with the Quantum Blue® Infliximab test, resulting in 330 values, and with a commercially available infliximab ELISA test (ref. 8). Measurements were performed over three days using two Quantum Blue® Infliximab test cassette lots. The results are summarized in figure 2.

### Recovery: 83-100 %

Six clinical specimens including infliximab levels close to clinical decision points were spiked with 3.24 µg/mL infliximab in serum-based calibrator material. “Base” samples were spiked with the corresponding amount of filtered, pooled normal human serum. “Base” and “base + spike” samples were measured in ten replicates with one reagent lot. The results are shown in table 4.

### Repeatability: 16.3-25.0 % CV

### Within-laboratory precision: 18.5-25.3 % CV

Repeatability and within-laboratory precision were established according to the CLSI guideline EP05-A3. Seven, pooled, patient serum samples with infliximab concentrations covering the measuring range of the assay and clinical decision points were tested over 20 days, in two independent runs with two replicates per run. The results are summarized in table 5.

### Reproducibility: 22.6-29.3 % CV

Reproducibility was established according to the CLSI guideline EP05-A3 by performing measurements on three different Quantum Blue® Reader instruments with three different test cassette lots. Seven, pooled, patient serum samples with infliximab concentrations covering the measuring range of the assay and clinical decision points were tested over five days, in one independent run with five replicates per run. Each Quantum Blue® Reader was operated by a different operator using a different test cassette lot. The results are summarized in table 6.

### 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 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.

### Lower Limit of Quantitation (LLoQ): 0.32 µg/mL

### Upper Limit of Quantitation (ULoQ): 22.7 µg/mL

The LLoQ was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with four samples generated by diluting calibrator material in negative serum to concentrations of 0.5, 0.4, 0.3, and 0.2 µg/mL; the ULoQ with diluted calibrator material with concentrations of 29.9, 24.9, 20.5, and 15.0 µg/mL. The samples were measured over three days, in five replicates each day to produce 60 values. Relative total error (TE) was calculated using the RMS model from bias and precision estimates for each sample and log transformed. A total error profile was generated with the results and the LoQ was determined as the intersection of the profile with an acceptance criterion corresponding to 30 % TE.

### **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 produce samples covering and exceeding the expected measuring range. The blends were assayed in ten 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 figure 3.

Samples with elevated infliximab levels (up to 183.6 µg/mL) may be additionally diluted 1:10 in chase buffer (1:200, in total) to obtain linear results within the measuring range of the assay. A series of samples with infliximab concentrations in the range of 2.4 to 379 µg/mL was generated by blending a high, contrived sample with negative serum. The samples were diluted 1:10 and then 1:20 in chase buffer and measured in five replicates with the Quantum Blue® Infliximab test. A linear range was determined for infliximab levels between 2.6 and 183.6 µg/mL.

### **High dose hook effect**

A high dose hook effect was not observed for samples with infliximab concentrations of up to 379 µg/mL.

### **Specificity / cross-reactivity**

The Quantum Blue® Infliximab test specifically recognizes the infliximab originator drug (Remicade®) as well as the infliximab biosimilars, CT-P13 (Remsima™; Inflectra™) (ref. 9) and SB2 (FLIXABI®), in serum. For FLIXABI®, results of a recovery study performed at the Departamento de Biomedicina - Unidade de Farmacologia e Terapêutica, Porto met the acceptance criterion of ±30 % recovery from the expected concentration of the base sample + FLIXABI® spike. In contrast, 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.

---

## **INTERFERING SUBSTANCES**

The susceptibility of the Quantum Blue® Infliximab test to interfering substances was assessed according to the CLSI-approved guideline EP7-A2. Interfering substances were tested at concentrations three-fold higher than those reported or expected in clinical samples or at concentration levels recommended by the CLSI guideline EP07-A2. Bias exceeding 30 % was considered interference.

### **Within-class switch**

TNFα blockers were tested at concentrations exceeding the lowest, recommended drug trough levels by three-fold. No interference was detected up to 10 µg/mL for adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®) and golimumab (Simponi®). Interference was detected with certolizumab (Cimzia®) with bias criteria not exceeded at a concentration of 1.7 µg/mL. Samples from patients switching from certolizumab (Cimzia®) should not be directly tested using the Quantum Blue® Infliximab test. Allow certolizumab (Cimzia®) trough levels to fall at least below 1.7 µg/mL.

### **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, unless otherwise indicated, were assessed with infliximab (Remicade®, MSD).

# DEUTSCH

## ANWENDUNGSZWECK

Der Quantum Blue® Infiximab ist ein *in vitro* diagnostischer Lateral Flow Immunassay zur quantitativen Bestimmung von Infiximab Medikamentenspiegel (Remicade®) und Infiximab Biosimilars, CT-P13 (Remsima™; Inflectra™) und SB2 (FLIXABI®), in Serumproben. Der Test dient als Hilfe zur therapeutischen Arzneimittelüberwachung bei Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung (CED) unter Infiximab-Therapie in Verbindung mit anderen klinischen und Laborbefunden. Quantum Blue® Infiximab 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 Infiximab mittels „Sandwich-Immunassay“. Goldkolloide wurden für diesen Zweck an rekombinanten Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF $\alpha$ ) konjugiert. Beim Auftragen der Probe wird auf der Testkassette das Goldkonjugat von einem „Pad“ in das Reaktionssystem freigesetzt. Das in der Probe vorhandene Infiximab bindet an das Goldkonjugat.

Ein monoklonaler Antikörper, der den Analyten hochspezifisch bindet, wurde auf der analytischen Membran immobilisiert. Die Bindung des monoklonalen Antikörpers an den Konjugat-/Analyt-Komplex resultiert in der Verfärbung der Testlinie (T). Das verbleibende freie TNF $\alpha$ /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
	LF-TLIF25	LF-TLIF10		
Testkassette	25 Stück	10 Stück	B-LFTLIF-TC	In einem vakuumdichten Folienbeutel
Laufpuffer	1 Flasche 10 mL	1 Flasche 10 mL	B-LFTLIF-CB	Gebrauchsfertig
Kontrollen Tief* / Hoch*	2 Fläschchen, 0,5 mL	2 Fläschchen, 0,5 mL	B-LFTLIF-CONSET	Gebrauchsfertig
RFID Chipkarte	1 Stück	1 Stück	B-LFTLIF-RCC	Weisse Kunststoffkarte
RFID Chipkarte	1 Stück	1 Stück	B-LFTLIF-RCC15	Grüne Kunststoffkarte

Tabelle 1

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

## ÜBERPRÜFUNG DES TESTKITS

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:

- Verfallsdatum
- 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.

## LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Bei 2-8 °C aufbewahren. Die Reagenzien nicht über das Verfallsdatum hinaus, das auf den Etiketten aufgedruckt ist, verwenden.	
Geöffnete Reagenzien	
Testkassette	Aus dem Folienbeutel entnommene Testkassetten müssen innerhalb von 4 Stunden verwendet werden.
Laufpuffer	Kann nach dem Öffnen bis zu 6 Monate lang bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
Kontrollen Tief / Hoch	Kann nach dem Öffnen bis zu 6 Monate lang bei 2-8 °C aufbewahrt werden.

Tabelle 2

## ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

## VORSICHTSMASSNAHMEN

### 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.



- Entnehmen Sie die Testkassette aus dem Folienbeutel, bevor Sie den Test durchführen. Lassen Sie die Testkassette mindestens 2 Minuten lang in der Laborumgebung equilibrieren (20-26 °C). Vom Folienbeutel entnommene Testkassetten müssen innerhalb von 4 Stunden verwendet werden.
- 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. (Abbildung 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 bei 2-8 °C aufbewahrt und innerhalb von 24 Stunden gemessen werden. Die verdünnten Proben können nicht für einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden.
- Proben über 20 µg/mL (bis 183,6 µg/mL) können zusätzlich 1:10 in Laufpuffer verdünnt werden (insgesamt 1:200), um Ergebnisse im Messbereich des Tests zu erhalten.

### 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 21 Monate stabil.

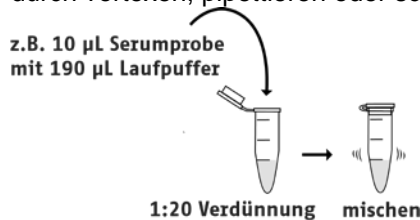
### TESTDURCHFÜHRUNG

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:

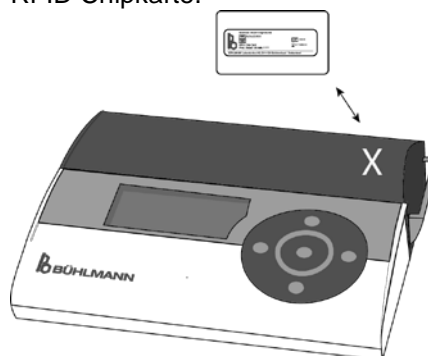
#### 1. Verdünnung der Serumproben mit Laufpuffer

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.



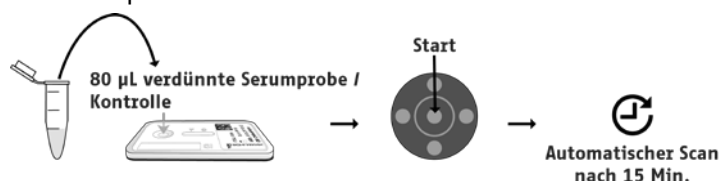
#### 2. Lateral-Flow Testablauf und Quantifizierung

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.



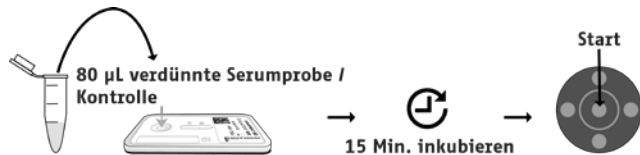
##### 2.1. Methode <TLIF\_15> mit integriertem Timer

- Verwenden Sie die grüne Kunststoffkarte.
- Die Testkassette in den Testkassettenhalter am Quantum Blue® Reader legen.
- 80 µL der verdünnten Serumprobe auf die runde Probenauftragsstelle der Testkassette aufbringen (Abbildung 1D).
- Den Testkassettenhalter schliessen und den Startknopf drücken.
- 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 runde Probenauftragsstelle der Testkassette aufbringen (Abbildung 1D).
- Die Testkassette für 15 ±1 Minuten inkubieren. (einen Wecker manuell einstellen).
- Die Testkassette in den Testkassettenhalter am Quantum Blue® Reader legen.
- Den Startknopf 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 (Abbildung 1D).

## QUALITÄTSKONTROLLE

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

## STANDARDISIERUNG

- Kalibratorwerte der Standardkurve werden gemäss einem Werteübertragungsprotokoll (Ref. 1) zugewiesen. Die Standardkurvenparameter sind im beiliegenden QC-Datenblatt angegeben. Das Kalibratormaterial beinhaltet Infliximab 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 lotspezifische Standardkurve. Der Messbereich liegt zwischen 0,4 und 20 µg/mL.

## VALIDIERUNG DER RESULTATE

- Damit das Testresultat als gültig bewertet wird, muss die Kontrollbande (C) klar ersichtlich sein (siehe Abbildung 1A und Abbildung 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 (Abbildung 1A), bedeutet dies, dass Infliximab nicht nachweisbar ist. Falls die Testbande (T) nach 15 Minuten Inkubation ersichtlich ist (Abbildung 1B), 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 (Abbildung 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 (Abbildung 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.

## EINSCHRÄNKUNGEN

- Die in diesem Kit gelieferten Reagenzien sind für die Bestimmung des Infliximab Medikamentenspiegel in verdünnten Serumproben optimiert.
- Proben von Patienten, die von einer Certolizumab (Cimzia®)-Therapie umgestellt werden, sollten nicht direkt mit dem Quantum Blue® Infliximab Test untersucht werden, da eine Kreuzreaktivität auftreten kann. Lassen Sie den Medikamentenspiegel von Certolizumab (Cimzia®) mindestens auf unter 1,7 µg/mL fallen.
- Die Ergebnisse des Quantum Blue® Infliximab Tests sollten zusammen mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden interpretiert werden. Diese können u. U. die Bestimmung der CED-Krankheitsaktivität, das Vorhandensein von Anti-Medikamenten-Antikörpern sowie Informationen bezüglich der Therapieeinhaltung des Patienten umfassen (Ref. 2).
- Medikamentenspiegel von Infliximab zwischen 3 und 7 µg/mL gelten allgemein als das therapeutische Fenster für eine optimale Therapiewirksamkeit (Ref. 2, 6). Optimale Medikamentenspiegel können jedoch je nach dem Behandlungsziel und dem Krankheitsphänotyp individuell verschieden sein (Ref. 2).

## ERWARTETE WERTE

Die Bestimmung von Infliximab Medikamentenspiegel in Patienten Serumproben kann die Therapieüberwachung von CED-Patienten 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. 3, 4) sowie der Vorhersage einer nachhaltigen Reaktion der Infliximabtherapie (Ref. 5).

### Werte unterhalb 3 µg/mL

Subtherapeutische Infliximab Medikamentenspiegel in Serum deuten auf ein pharmakokinetisches Versagen hin. Eine Therapieanpassung unter Berücksichtigung der verfügbaren klinischen Befunde und Laborbefunde sollte in Erwägung gezogen werden. (Ref. 2, 6).

### Werte zwischen 3-7 µg/mL

Therapeutische Infliximab Medikamentenspiegel können ein Indiz dafür sein, die Therapie mit der derzeitigen Dosierung bei CED-Patienten in Krankheitsremission fortzusetzen (Ref. 2, 3, 6).

### Werte über 7 µg/mL

Supratherapeutische Infliximab Medikamentenspiegel können ein Indiz dafür sein, die Dosis unter Berücksichtigung des Krankheitsbilds bei CED-Patienten in Krankheitsremission zu reduzieren (Ref. 2). 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 einen „Mayo-Score“ bei Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa hat (Ref. 6).

## LEISTUNGSMERKMALE

### Klinische Leistung

Einhundertzehn (110) Patienten mit Colitis ulcerosa (UC) im Alter von mindestens 18 Jahren (55 % weiblich) unter einer Infliximab-Erhaltungstherapie wurden an zehn unterschiedlichen Universitäts- und Gemeindekrankenhäusern durch die portugiesische IBD-Studiengruppe (GEDII) (Ref. 7) rekrutiert.

An jedem Patienten wurde eine Bestimmung des Infliximab Medikamentenspiegels zusammen mit einer klinischen, endoskopischen und Calprotectinspiegel Bewertung vorgenommen. In dieser Studie wurden Infliximab Medikamentenspiegel oberhalb von 3 µg/mL als ein negatives Ergebnis definiert. Ein negativer Vorhersagewert (NPV; „Negative Predictive Value“) zeigte den Prozentsatz der Patienten mit Infliximab Medikamentenspiegel oberhalb des Grenzwerts mit einem positiven klinischen Ergebnis an, die von einer Anpassung des Arzneimittels keinen Nutzen ziehen würden. Ein positives klinische Ergebnis wurde als klinische Remission definiert (globaler „Mayo-Score“ ≤2, ohne einen einzelnen Score oberhalb von 1), endoskopische Remission (für keine tiefe Remission, endoskopischer „Mayo-Subscore“ ≤1) und/oder fäkale Calprotectinkonzentrationen unter 250 µg/g. Die für den Quantum Blue® Infliximab Test sowie ein handelsübliches ELISA Kit erhaltenen NPV-Werte werden in Tabelle 3 angegeben.

Klinisches Ergebnis	Klinische Remission	Endoskopische Remission	Fäkales Calprotectin ≤250 µg/g
Quantum Blue® Infliximab	74 %	88 %	88 %
ELISA	74 %	83 %	86 %

Tabelle 3

### Methodenvergleich

**Bias bei 3 µg/mL: -0,7 % (95 % CI: -6,9 % – 3,1 %)**

**Bias bei 7 µg/mL: -3,8 % (95 % CI: -8,3 % – -0,7 %)**

Die Methodenvergleichsstudie wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP09-A3 durchgeführt. Einhundertzehn (110) klinische Proben wurden in Triplikaten mit dem Quantum Blue® Infliximab Test (ergab 330 Werte) und einem handelsüblichen Infliximab ELISA Test (ref. 8) gemessen. Die Messungen wurden über einen Zeitraum von drei Tagen mit zwei Quantum Blue® Infliximab Testkassettenlots durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

**Recovery: 83-100 %**

Sechs klinische Proben mit Infliximabspiegel nahe klinischer Entscheidungspunkte wurden mit 3,24 µg/mL Infliximab in Kalibratormaterial auf Serumbasis gespiked. Die „Basisproben“ wurden mit der entsprechenden Menge an filtriertem, gepooltem normalen Humanserum gespiked. „Basisproben“ und „Basis + Spikeproben“ wurden in zehn Replikaten mit einer Reagenzienlot gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 angegeben.

**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 CLSI Richtlinie EP05-A3 ermittelt. Vier gepoolte Patientenserumproben mit Infliximabkonzentrationen, die den Messbereich des Tests sowie die klinischen Entscheidungspunkte umfassen, wurden über einen Zeitraum von 20 Tagen in zwei unabhängigen Läufen mit zwei Replikaten pro Lauf untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Reproduzierbarkeit: 22,6-29,3 % CV**

Die Reproduzierbarkeit wurde gemäss CLSI Richtlinie EP05-A3 mit Messungen auf drei verschiedenen Quantum Blue® Reader-Geräten mit drei verschiedenen Testkassettenlots ermittelt. Sieben gepoolte Patientenserumproben mit Infliximabkonzentrationen, die den Messbereich des Assays sowie die klinischen Entscheidungspunkte umfassen, wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen in einem unabhängigen Lauf mit fünf Replikaten pro Lauf untersucht. Jeder Quantum Blue® Reader wurde von einem anderen Anwender, mit jeweils einem anderen Testkassettenlot betrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 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.

### **Lower Limit of Quantitation (LLoQ): 0,32 µg/mL**

### **Upper Limit of Quantitation (ULoQ): 22,7 µg/mL**

Der untere LoQ (LLoQ) wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP17-A2 mit vier Proben ermittelt, die durch Verdünnen des Kalibratormaterials in negativem Serum auf Konzentrationen von 0,5, 0,4, 0,3 und 0,2 µg/mL hergestellt wurden; der obere LoQ (ULoQ) mit verdünntem Kalibratormaterial mit Konzentrationen von 29,9, 24,9, 20,5 und 15,0 µg/mL. Die Proben wurden über drei Tage, in jeweils fünf Replikaten pro Tag gemessen, um 60 Werte zu erzeugen. Der relative „Total Error“ (TE) wurde für jede Probe mithilfe des RMS-Modells anhand von Bias- und Präzisionsschätzungen berechnet und in den Logarithmus konvertiert. Mit den Ergebnissen wurde ein Profil des „Total Errors“ erstellt und der LoQ wurde als Schnittpunkt des Profils mit einem Akzeptanzkriterium entsprechend 30 % TE bestimmt.

### **Linearer Bereich: 0,14-20,37 µg/mL Infliximab.**

Der lineare Bereich des Quantum Blue® Infliximab Tests wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP06-A bestimmt.

Zwei Probenpools mit niedriger und hoher Konzentration wurden gemischt, um Proben zu generieren, die den erwarteten Messbereich abdecken und überschreiten.

Die Mischungen wurden in zehn Replikaten auf zwei Testkassettenlots getestet. Der lineare Bereich wurde als das Intervall der Konzentrationslevels definiert, in denen Koeffizienten der nichtlinearen Anpassungen der zweiten und dritten Ordnung als nicht signifikant bestimmt wurden. In Abbildung 3 sind die Ergebnisse für einen Testkassettenlot dargestellt.

Proben mit erhöhten Infliximabspiegeln (bis zu 183,6 µg/mL) können zusätzlich 1:10 in Laufpuffer verdünnt werden (insgesamt 1:200), um lineare Ergebnisse innerhalb des Messbereichs des Tests zu erhalten. Eine Reihe von Proben mit Infliximabkonzentrationen im Bereich von 2,4 bis 379 µg/mL wurde durch Mischen einer hochkonzentrierten künstlich hergestellten Probe mit negativem Serum hergestellt. Die Proben wurden 1:10 und dann 1:20 in Laufpuffer verdünnt und in fünf Replikaten mit dem Quantum Blue® Infliximab Test gemessen. Ein linearer Bereich für Infliximabspiegel zwischen 2,6 und 183,6 µg/mL wurde bestimmt.

### **High-Dose-Hook Effekt**

Bis zu einer Konzentration von 379 µg/mL Infliximab wurde kein Hook-Effekt bei hohen Dosen beobachtet.

### **Spezifität / Kreuzreaktivität**

Der Quantum Blue® Infliximab Test erkennt spezifisch das Infliximab-Originalpräparat (Remicade®) sowie die Infliximab Biosimilars CT-P13 (Remsima™; Inflectra™) (ref. 9) und SB2 (FLIXABI®), in Serum. Für FLIXABI®, erfüllten die Ergebnisse einer am Departamento de Biomedicina (Unidade de Farmacologia e Terapêutica, Porto) durchgeführten Recovery Studie das Akzeptanzkriterium von ±30 % Recovery bei der erwarteten Konzentration der Basisprobe + FLIXABI® Spike. Im Gegensatz hierzu ergab mit TNFα Blocker wie Adalimumab (Humira®), Etnanercept (Enbrel®), Golimumab (Simponi®) und Certolizumab (Cimzia®) gespiketes Serum bis zu 100 µg/mL ein Messergebnis unterhalb des Limit of Blanks.

---

## **WECHSELWIRKENDE SUBSTANZEN**

Die Empfindlichkeit des Quantum Blue® Infliximab Tests gegenüber wechselwirkenden Substanzen wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP7-A2 gemessen. Die wechselwirkenden Substanzen wurden entweder bei Konzentrationen untersucht, die dreifach höher lagen als die angegebenen oder zu erwartenden Konzentrationen in klinischen Proben, oder bei Konzentrationslevels, die von der CLSI Richtlinie EP07-A2 empfohlen wurden. Ein Bias über 30 % wurde als Wechselwirkung erachtet.

### **Within-Class Switch**

TNFα Blocker wurden in Konzentrationen getestet, die den niedrigsten empfohlenen Medikamentenspiegel um das Dreifache überschritten. Bei Werten bis zu 10 µg/mL wurden für Adalimumab (Humira®), Etnanercept (Enbrel®) und Golimumab (Simponi®) keine Wechselwirkungen nachgewiesen. Mit Certolizumab (Cimzia®) wurde eine Wechselwirkung nachgewiesen, wobei Biaskriterien bei einer Konzentration von 1,7 µg/mL nicht überschritten wurden. Proben von Patienten, die von Certolizumab (Cimzia®) umgestellt wurden, sollten mit dem Quantum Blue® Infliximab Test nicht direkt geprüft werden. Die Medikamentenspiegel von Certolizumab (Cimzia®) sollten zuvor mindestens unter 1.7 µg/mL fallen.

### **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 µmol/L; 29 mg/dL), unkonjugiertes Bilirubin (342 µmol/L; 20 mg/dL), Hämoglobin (2 g/L (= 200 mg/dL), TNFα (2,6 ng/mL) und Rheumafaktoren (497,3 IE/mL).

### **Immunsuppressiva / Begleitmedikation**

Mit Immunsuppressiva / Begleitmedikationen wie zum Beispiel Azathioprin (60 µmol/L), 6-Mercaptopurin (37 µmol/L) und Methotrexat (1363 µmol/L) wurden keine Wechselwirkung nachgewiesen.

Alle Leistungseigenschaften, sofern nicht anderweitig darauf hingewiesen, wurden mit Infliximab (Remicade®, MSD) beurteilt.

# FRANÇAIS

## UTILISATION PREVUE

Le Quantum Blue® Infiximab est un test diagnostique *in vitro* immunochromatographique à flux latéral. Il est destiné au dosage quantitatif des taux résiduels d'infiximab (Remicade®) et des médicaments biosimilaires de l'infiximab, le CT-P13 (Remsima™ ; Inflectra™) et le SB2 (FLIXABI®), dans des échantillons de sérum. Associé à d'autres informations cliniques et résultats obtenus en laboratoire, le test sert d'aide à la surveillance 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 $\alpha$ ) recombinant est couplé à de l'or colloïdal. Sur la cassette test (TC), le conjugué TNF $\alpha$  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 de test (T). Le restant du TNF $\alpha$  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
	LF-TLIF25	LF-TLIF10		
Cassette test	25 pièces	10 pièces	B-LFTLIF-TC	Scellée sous vide dans un sachet
Tampon de dilution	1 flacon 10 mL	1 flacon 10 mL	B-LFTLIF-CB	Prêt à l'emploi
Contrôles Bas*/Elevé*	2 flacons, 0,5 mL	2 flacons, 0,5 mL	B-LFTLIF-CONSET	Prêts à l'emploi
Carte à puce RFID	1 pièce	1 pièce	B-LFTLIF-RCC	Carte en plastique blanche
Carte à puce RFID	1 pièce	1 pièce	B-LFTLIF-RCC15	Carte en plastique verte

Tableau 1

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

## CONTROLLER LA TROUSSE

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.

## STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts	
Conservé à 2-8 °C. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption indiquée sur les étiquettes.	
Réactifs ouverts	
Cassette test	Les cassettes test sorties de leur sachet en aluminium doivent être utilisées dans les 4 heures.
Tampon de dilution	Conservé jusqu'à 6 mois à 2-8 °C après ouverture.
Contrôles Bas / Elevé	Conservé jusqu'à 6 mois à 2-8 °C après ouverture.

Tableau 2

## MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Vortex
- Minuteur (facultatif)
- Pipettes de précision avec embouts jetables : 10-100  $\mu$ L et 100-1000  $\mu$ L
- 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

## PRECAUTIONS

### 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 (BPL) 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) pendant au moins 2 minutes. Les cassettes test sorties de leur sachet en aluminium doivent être utilisées dans les 4 heures.
- 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. (figure 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® Infliximab : charger 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 stockés à 2-8 °C et mesurés dans les 24 heures. Les échantillons dilués ne peuvent pas être conservés au-delà de ce laps de temps.
- Les échantillons dont la concentration dépasse 20 µg/mL (jusqu'à 183,6 µg/mL), peuvent être dilués encore au 1:10 dans du tampon de dilution (1:200 au final), afin d'obtenir un résultat compris dans la gamme de mesure du test.

### 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 ~2000 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 21 mois à ≤ -20 °C.

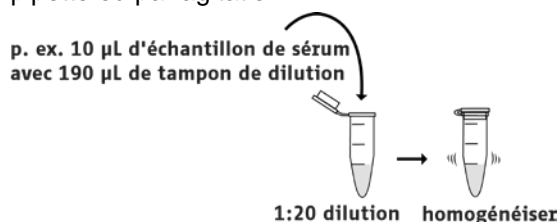
### PROCEDURE DE DOSAGE

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 :

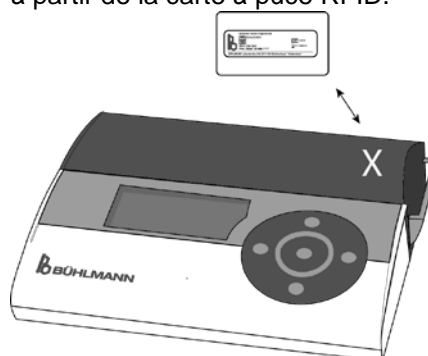
#### 1. Dilution des échantillons de sérum dans le tampon de dilution

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.



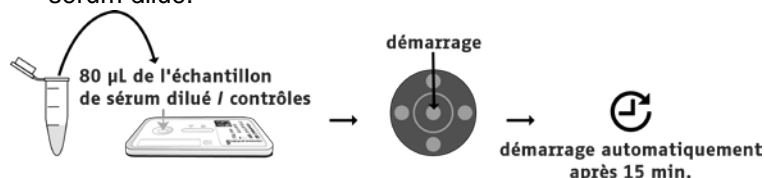
#### 2. Procédure et lecture du dosage

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.



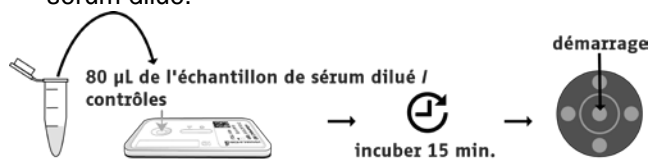
##### 2.1. Méthode <TLIF\_15> avec minuteur interne

- 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 (figure 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 (figure 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.
- 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 (figure 1D).

## CONTROLE DE QUALITE

- Si la performance 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.

## 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 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.

## VALIDATION DES RESULTATS

- Pour valider un résultat de test, la ligne de contrôle (C) doit toujours être visible (voir figure 1A et figure 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 (figure 1A), cela signifie qu'aucune quantité détectable d'infliximab 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 (figure 1B), la quantité d'infliximab 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 (figure 1C), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de l'infliximab 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 (figure 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.

## LIMITES

- Les réactifs fournis dans cette trousse sont optimisés pour mesurer des taux résiduels d'infliximab dans des échantillons de sérum dilués.
- En raison d'un risque de réaction croisée, ne pas soumettre les échantillons de patients auparavant traités par certolizumab (Cimzia®) directement au test Quantum Blue® Infliximab. Attendre que les taux résiduels de certolizumab (Cimzia®) descendent au moins en dessous de 1,7 µg/mL.
- Les résultats du test Quantum Blue® Infliximab devraient être interprétés en association avec ceux d'autres investigations cliniques et de laboratoire. Ces dernières peuvent comprendre la détermination de l'activité de la maladie inflammatoire de l'intestin (MICI), la présence d'anticorps anti-médicament ainsi que des informations sur l'observance du patient quant à sa thérapie (réf. 2).
- Des taux résiduels d'infliximab compris entre 3 et 7 µg/mL sont considérés de manière consensuelle comme la meilleure fenêtre thérapeutique en termes d'efficacité de traitement (ref. 2, 6). Cependant, les taux résiduels optimaux peuvent varier en fonction des individus, de la cible du traitement ou du phénotype de la maladie (réf. 2).

## VALEURS ATTENDUES

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. 3, 4) et prédisent une réponse thérapeutique durable à l'infliximab (réf. 5).

### Valeurs inférieures à 3 µg/mL

Des taux sériques sous-thérapeutiques d'infliximab suggèrent un échec pharmacocinétique. Un ajustement thérapeutique, tenant compte des observations cliniques et résultats de laboratoire disponibles, devrait être envisagé. (réf. 2, 6).

### Valeurs comprises entre 3-7 µg/mL

Des taux résiduels thérapeutiques d'infliximab peuvent servir d'indication à poursuivre la thérapie avec la dose en cours, chez les patients en rémission de MICI (réf. 2, 3, 6).

### Valeurs supérieures à 7 µg/mL

Des taux résiduels supra-thérapeutiques d'infliximab peuvent servir d'indication à diminuer la dose, conjointement avec le tableau clinique, chez les patients en rémission de MICI (réf. 2). 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. 6).

## CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

### Performances cliniques

Le groupe d'étude portugais des maladies inflammatoires chroniques intestinales (GEDII) a recruté au sein de dix hôpitaux universitaires et communautaires différents cent dix (110) patients âgés de 18 ans et plus (dont 55 % de femmes), souffrant de rectocolite hémorragique (RCH) et sous thérapie d'entretien à l'infliximab (réf. 7). Chacun des patients a fait l'objet d'une détermination des taux résiduels d'infliximab, accompagnée d'évaluations clinique et endoscopique et d'un dosage de calprotectine fécale. Dans cette étude, des taux résiduels d'infliximab supérieurs à 3 µg/mL ont été considérés comme un résultat négatif et une valeur prédictive négative (VPN) a indiqué le pourcentage de patients dont les taux résiduels d'infliximab (TRI) excédaient la valeur-seuil, avec une issue clinique positive et qui n'auraient pas bénéficié d'un ajustement posologique. Une issue clinique positive a été définie par une rémission clinique (score Mayo global ≤ 2, sans aucun score individuel supérieur à 1), une rémission endoscopique (pour les rémissions non profondes, sous-score endoscopique Mayo ≤ 1) et/ou un taux de calprotectine fécale inférieur à 250 µg/g. Les valeurs VPN obtenues à l'aide du test Quantum Blue® Infliximab et d'un test ELISA disponible dans le commerce sont présentées dans le Tableau 3.

Issue clinique	Rémission clinique	Rémission endoscopique	Calprotectine fécale ≤ 250 µg/g
Quantum Blue® Infliximab	74 %	88 %	88 %
ELISA	74 %	83 %	86 %

Tableau 3

### Comparaison des méthodes

**Biais à 3 µg/mL : -0,7 % (IC à 95 % : -6,9 % – 3,1 %)**

**Biais à 7 µg/mL : -3,8 % (IC à 95 % : -8,3 % – -0,7 %)**

La comparaison de méthodes a été déterminée selon la ligne directrice CLSI EP09-A3. Cent dix (110) échantillons cliniques ont été mesurés trois fois au moyen du test Quantum Blue® Infliximab, ce qui a permis de constituer 330 valeurs, et au moyen d'un test ELISA de l'infliximab disponible dans le commerce (réf. 8). Les mesures ont été réalisées sur trois jours avec deux lots de cassettes test Quantum Blue® Infliximab. Les données de corrélation sont illustrées sur la figure 2.

### Recouvrement : 83-100 %

A six échantillons cliniques contenant des taux d'infliximab proches des points de décision clinique, une solution à 3,24 µg/mL d'infliximab dans du sérum négatif a été ajoutée. Les échantillons « base » ont été enrichis avec la quantité correspondante de mélange de sérums négatifs. Les échantillons « base » et ceux « base enrichis » ont été mesurés en dix réplicats avec un lot de réactifs. Les résultats apparaissent dans le Tableau 4.

### Répétabilité : 16,3 - 25,0 % CV

### Précision intra-laboratoire : 18,5 - 25,3 % CV

La répétabilité et la précision intra-laboratoire ont été établies selon la ligne directrice CLSI EP05-A3. Sept échantillons regroupés de sérum de patients dont les concentrations d'infliximab couvraient l'intervalle de mesure du test et des points de décision clinique 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 5.

### Reproductibilité : 22,6 - 29,3 % CV

La reproductibilité a été établie selon la ligne directrice CLSI EP05-A3. Pour ce faire, des mesures ont été réalisées sur trois lecteurs Quantum Blue® différents à l'aide de trois lots de cassettes test différents. Sept échantillons regroupés de sérum de patients dont les concentrations d'infliximab couvraient l'intervalle de mesure du test et des points de décision clinique ont été testés quotidiennement pendant cinq jours, au moyen d'un dosage indépendant répété cinq fois par cycle. Chacun des lecteurs Quantum Blue® a été utilisé par un opérateur différent utilisant un lot de cassettes test différent. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 6.

### 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 réplicats 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 calculé 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 inférieure de quantification (LoQ inf) : 0,32 µg/mL****Limite supérieure de quantification (LoQ sup) : 22,7 µg/mL**

La LoQ inf a été établie selon la ligne directrice CLSI EP17-A2 à partir de quatre échantillons préparés par dilution de matériel d'étalonnage dans du sérum négatif à des concentrations de 0,5, 0,4, 0,3 et 0,2 µg/mL ; la LoQ sup l'a été à partir de matériel d'étalonnage à des concentrations de 29,9, 24,9, 20,5 et 15,0 µg/mL. Les échantillons ont été mesurés pendant trois jours, à raison de cinq réplicas quotidiens, permettant d'obtenir 60 valeurs. L'erreur relative totale (ET) a été calculée selon le modèle de la moyenne quadratique (MMC) à partir d'estimations du biais et de la fidélité pour chaque échantillon et transformée en log. Un profil d'erreur totale a été établi pour les échantillons et la LoQ déterminée comme l'intersection du profil avec le critère d'acceptation correspondant à 30% d'ET.

**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 des valeurs couvrant 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 auquel les coefficients des ajustements de courbe des deuxième et troisième ordres étaient déterminés non significatifs. Les résultats obtenus avec un lot de cassettes test sont présentés sur la figure 3. Il est possible de diluer encore au 1:10 dans du tampon de dilution (1:200 au final) les échantillons à haute concentration d'infliximab (jusqu'à 183,6 µg/mL) de manière à obtenir des résultats linéaires compris dans la plage de mesure du test. Une série d'échantillons dont les concentrations d'infliximab s'étendaient de 2,4 à 379 µg/mL a été produite par mélange d'un échantillon fortement modifié (artificiellement) avec du sérum négatif. Les échantillons ont été dilués au 1:10 puis au 1:20 dans du tampon de dilution et mesurés en cinq réplicas au moyen du test Quantum Blue® Infliximab. Un intervalle de linéarité a été déterminé pour les concentrations d'infliximab comprises entre 2,6 et 183,6 µg/mL.

**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 379 µg/mL.

**Spécificité/Réactivité croisée**

Le test Quantum Blue® Infliximab reconnaît spécifiquement le médicament infliximab princeps (Remicade®) ainsi que ses biosimilaires, le CT-P13 (Remsima™ ; Inflectra™) (réf. 9) et le SB2 (FLIXABI®), dans le sérum. Dans le cas du FLIXABI® les résultats de l'étude de récupération effectuée dans le Departamento de Biomedicina - Unidade de Farmacologia e Terapêutica, Porto ont satisfait au critère d'acceptation d'un taux de récupération de ± 30 % à partir de la concentration attendue de l'échantillon de base + enrichi de FLIXABI®. En revanche, les sérums enrichis à l'aide d'agents bloquants du TNFα, tels que l'adalimumab (Humira®), l'étanercept (Enbrel®), le golimumab (Simponi®) et le certolizumab (Cimzia®) jusqu'à 100 µg/mL ont donné une valeur sous la limite de blanc.

---

**INTERFERENCES ENTRE SUBSTANCES**

La sensibilité du test Quantum Blue® Infliximab aux substances interférentes a été évaluée selon la ligne directrice CLSI EP7-A2. Des substances interférentes ont été testées à des concentrations trois fois supérieures aux concentrations décrites ou attendues dans les échantillons cliniques, ou aux concentrations recommandées par la ligne directrice CLSI EP07-A2. Une erreur de biais de plus de 30 % a été considérée comme une interférence.

**Commutation de classe / agents bloquants du TNFα**

Des agents bloquants du TNFα ont été testés à des concentrations trois fois supérieures aux plus faibles taux résiduels de médicament recommandés. Aucune interférence n'a été détectée jusqu'à 10 µg/mL pour l'adalimumab (Humira®), l'étanercept (Enbrel®) et le golimumab (Simponi®). Une interférence a été détectée avec le certolizumab (Cimzia®), le critère de biais n'étant pas dépassé à une concentration de 1,7 µg/mL. Les échantillons de patients traités auparavant par certolizumab (Cimzia®) ne doivent pas être soumis directement au test Quantum Blue® Infliximab. Attendre pour ce faire que les taux résiduels de certolizumab (Cimzia®) tombent au moins en dessous de 1,7 µg/mL.

**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, sauf indication contraire, ont été évaluées avec l'infliximab (Remicade®, MSD).

**USO PREVISTO**

Quantum Blue® Infliximab è un sistema di immunodosaggio diagnostico a flusso laterale *in vitro* per la determinazione quantitativa dei livelli minimi di infliximab (Remicade®) e farmaci biosimilari, CT-P13 (Remsima™; Inflectra™) e SB2 (FLIXABI®), 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 di infliximab mediante un immunodosaggio a sandwich. Il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF $\alpha$ ) ricombinante è coniugato a oro colloidale. Questo coniugato di oro viene rilasciato da un pad in un sistema di reazione su una cassetta di rilevazione (TC) quando viene applicato il campione. L'infliximab presente nel campione si lega al coniugato di oro. Un anticorpo monoclonale, altamente specifico per l'infliximab, è immobilizzato sulla membrana analitica e cattura il complesso coniugato di oro e analita infliximab, determinando una colorazione di una linea di test (T). Il coniugato TNF $\alpha$ /oro libero rimanente si lega ad una linea di controllo (C). Le intensità dei segnali della linea di test (T) e della linea di controllo (C) sono misurate quantitativamente con il Quantum Blue® Reader.

**REAGENTI E MATERIALI FORNITI**

Reagente	Quantità		Codice	Commenti
	LF-TLIF25	LF-TLIF10		
Cassette di rilevazione	25 unità	10 unità	B-LFTLIF-TC	Sigillata a vuoto in busta di alluminio
Tampone di diluizione	1 fialone 10 mL	1 fialone 10 mL	B-LFTLIF-CB	Pronto per l'uso
Controlli Alto* / Basso*	2 fialoni, 0,5 mL	2 fialoni, 0,5 mL	B-LFTLIF-CONSET	Pronto per l'uso
Carta chip RFID	1 unità	1 unità	B-LFTLIF-RCC	Carta RFID bianca
Carta chip RFID	1 unità	1 unità	B-LFTLIF-RCC15	Carta RFID verde

Tabella 1

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

**VERIFICARE IL TEST KIT**

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

- La validità della data di scadenza.

- Assenza di difetti dell'imballaggio (*per esempio*; assenza di perforazioni che potrebbero essere state causate da una manipolazione impropria).
- Assenza di difetti delle cassette di rilevazione (*per esempio*; assenza di graffi sulla membrane analitica).

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

**CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI**

Reagenti non aperti	
Conservare a 2-8 °C. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sulle etichette.	
Reagenti aperti	
Cassette di rilevazione	Le cassette di rilevazione estratte dalla busta di alluminio devono essere usate entro 4 ore.
Tampone di diluizione	Conservare per un massimo di 6 mesi a 2-8 °C dopo l'apertura.
Controlli Alto / Basso	Conservare per un massimo di 6 mesi a 2-8 °C dopo l'apertura.

Tabella 2

**MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI**

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

**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 potrebbe 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 temperature ambiente (20-26°C) prima di iniziare l'analisi.
- Prima di eseguire il test, estrarre la cassetta di rilevazione dalla busta di alluminio. Lasciare equilibrare la cassetta nell'ambiente del laboratorio (20-26°C) per

almeno 2 minuti. Le cassette di rilevazione estratte dal loro imballaggio devono essere usate entro 4 ore.

- 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 disassemblare le cassette do test.
- Le cassette di rilevazione non possono essere riutilizzate.
- Manipolare le cassette di rilevazione con attenzione. Non contaminare la porta di caricamento del campione o la finestra di lettura mediante contatto con le pelle, altri liquidi, etc. (figura 1D).
- Assicurarasi di una posizione piana e orizzontale della cassetta di rilevazione durante l'esecuzione del saggio.

### 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 la carta chip RFID (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 lotto specifici.
- I campioni manipolati in modo non appropriato possono dare origine a risultati inaccurati.
- I campioni diluiti devono essere conservati a 2-8 °C e analizzati entro 24 ore. I campioni diluiti non possono essere conservati per periodi maggiori.
- I campioni con concentrazioni superiori a 20 µg/mL (fino a 183,6 µg/mL) possono essere ulteriormente diluiti 1:10 in tampone di diluizione (1:200, in totale) per ottenere risultati che rientrino nell'intervallo di misurazione del test.

### 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 21 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 dall'imballaggio metallizzato prima dell'inizio del dosaggio.

La procedura per il dosaggio consiste in due fasi:

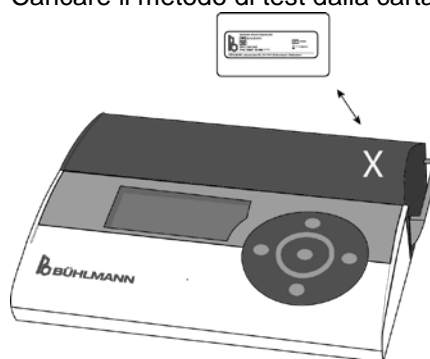
### 1. Diluizione dei campioni di siero con tampone di diluizione

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 agitandolo.



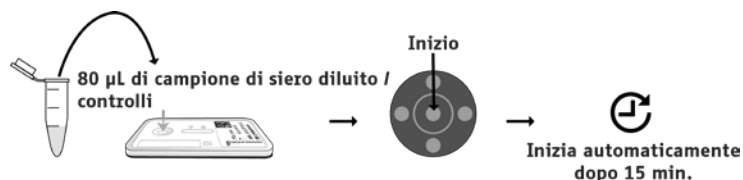
### 2. Esecuzione del test e lettura

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.



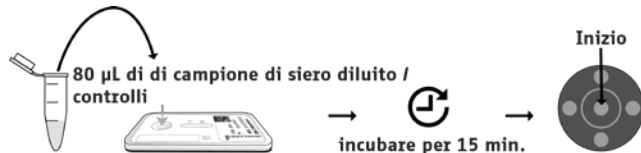
#### 2.1. Metodo <TLIF\_15> con timer interno

- Acquisire i parametri lotto specifici utilizzando la carta RFID verde.
- Inserire la cassetta di rilevazione 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 (figura 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 (figura 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 di rilevazione con il Quantum Blue® Reader premendo immediatamente il pulsante.
- 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 rilevazione nello strumento, con la finestra di lettura per prima (figura 1D).

## CONTROLLO DI QUALITÀ

- Se la prestazione 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 tempo di incubazione *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.

## 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 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.

## VALIDAZIONE DEI RISULTATI

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

## LIMITAZIONI

- I reagenti forniti con questo kit sono ottimizzati per la misura dei livelli minimi di infliximab in campioni di siero diluiti.
- I campioni dei pazienti precedentemente in terapia con certolizumab (Cimzia®) non devono essere analizzati direttamente con il test Quantum Blue® Infliximab, perché si può verificare reattività crociata. Attendere che i livelli minimi di certolizumab (Cimzia®) scendano a valori quantomeno inferiori a 1,7 µg/mL.
- I risultati del test Quantum Blue® Infliximab devono essere interpretati unitamente ad altri risultati clinici e di laboratorio, che possono includere la determinazione dell'attività di malattia dell'IBD, la presenza di anticorpi anti-farmaco, nonché informazioni sull'aderenza del paziente alla terapia (rif. 2).
- I livelli residui di infliximab tra 3 e 7 µg/mL sono considerati come la finestra terapeutica per la migliore efficacia del trattamento. I livelli minimi ottimali, tuttavia, possono essere individuali e possono differire a seconda del obiettivo del trattamento, nonché del fenotipo della malattia (rif. 2).

## VALORI ATTESI

La determinazione delle concentrazioni minime di infliximab nei campioni del siero dei pazienti può supportare il monitoraggio terapeutico nei pazienti con IBD. Generalmente, le concentrazioni minime 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. 3, 4) così come sono predittivi di una risposta sostenuta alla terapia con infliximab (rif. 5).

### Valore inferiore 3 µg/mL

Livelli sierici di infliximab subterapeutici suggeriscono un fallimento farmacocinetico. Si deve valutare un aggiustamento della terapia, tenendo conto dei risultati clinici e di laboratorio disponibili (rif. 2, 6).

### Valori compresi nell'intervallo 3-7 µg/mL

Livelli minimi terapeutici di infliximab possono servire da indicatore per la continuazione della terapia alla dose attuale in pazienti con remissione dell'IBD (rif. 2, 3, 6).

### Valori superiori a 7 µg/mL

Livelli minimi sovraterapeutici di infliximab possono servire da indicatore per una riduzione della dose, unitamente al quadro clinico, in pazienti con remissione dell'IBD (rif. 2). È 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. 6).

## CARATTERISTICA DELLE PRESTAZIONI

### Prestazioni cliniche

Centodieci (110) pazienti affetti da colite ulcerativa (UC), di età 18 anni e oltre (55% donne), in terapia di mantenimento con infliximab sono stati reclutati presso 10 diversi ospedali universitari e pubblici dal gruppo di studio portoghese IBD (GEDII) (rif. 7). Per ciascuno dei pazienti è stata eseguita una determinazione dei livelli minimi di infliximab, oltre a una valutazione clinica, endoscopica e una misurazione del livello di calprotectina. In questo studio sono stati definiti come risultato negativo livelli minimi di infliximab superiori a 3 µg/mL. Un valore predittivo negativo (NPV) indicava la percentuale di pazienti con livelli minimi di infliximab al di sopra del valore di soglia con esito clinico positivo, i quali non avrebbero tratto vantaggio da una regolazione del dosaggio farmaceutico. È stato definito un esito clinico positivo la remissione clinica (punteggio Mayo globale ≤ 2, senza alcun punteggio individuale superiore a 1), remissione endoscopica (per remissione non profonda, sottopunteggio endoscopico Mayo ≤ 1) e/o livelli di calprotectina fecale inferiori a 250 µg/g. In tabella 3 sono elencati i valori NPV ottenuti per il test Quantum Blue® Infliximab e un kit ELISA commerciale.

Esito clinico:	Remissione clinica	Remissione endoscopica	Calprotectina fecale ≤250 µg/g
Quantum Blue® Infliximab	74 %	88 %	88 %
ELISA	74 %	83 %	86 %

Tabella 3

## Confronto metodi

**Scostamento a 3 µg/mL: -0,7 % (95% CI: -6,9 % – 3,1 %)**

**Scostamento a 7 µg/mL: -3,8 % (95% CI: -8,3 % – -0,7 %)**

Lo studio sul confronto metodi è stato condotto secondo le linee guida CLSI EP09-A3. Centodieci (110) campioni clinici sono stati misurati in tre ripetizioni con il test Quantum Blue® Infliximab, raccogliendo un totale di 330 valori, e con un test ELISA infliximab commerciale (rif. 8). Le misure sono state eseguite nell'arco di tre giorni usando cassette di rilevazione Quantum Blue® Infliximab provenienti da due lotti. I risultati sono riepilogati in figura 2.

### Recupero: 83-100 %

Sei campioni clinici, inclusi campioni con livelli di infliximab prossimi a valori decisionali clinici, sono stati addizionati con una concentrazione di infliximab pari a 3.24 µg/mL in materiale calibratore a base di siero. I campioni di "base" sono stati addizionati con una quantità adeguata di normale siero umano raggruppato e filtrato. I campioni di "base" e "base + addizionato" sono stati misurati in dieci ripetizioni con reagenti provenienti dallo stesso lotto. I risultati sono illustrati nella tabella 4.

### Ripetibilità: 16,3-25,0 % CV

### Precisione intra-laboratorio: 18,5-25,3 % CV

Ripetibilità e precisione intra-laboratorio sono state determinate in conformità con la linea guida CLSI EP05-A3. Sette campioni di pool di sieri di pazienti contenenti concentrazioni di infliximab tali da coprire l'intervallo di misurazione del dosaggio e i punti di decisione clinica sono stati analizzati nel corso di 20 giorni, in due sessioni indipendenti con due replicati per sessione. I risultati sono riepilogati in tabella 5.

### Riproducibilità: 22,6-29,3 % CV

La riproducibilità è stata determinata in conformità con la linea guida CLSI EP05-A3 effettuando le misurazioni su tre strumenti Quantum Blue® Reader diversi con tre lotti di cassette di rilevazione diversi. Sette campioni di pool di sieri di pazienti contenenti concentrazioni di infliximab tali da coprire l'intervallo di misurazione del dosaggio e i punti di decisione clinica sono stati analizzati nel corso di cinque giorni, in una sessione indipendente con cinque replicati per sessione. Ogni lettore Quantum Blue® Reader è stato utilizzato da un operatore diverso, usando un set di cassette di rilevazione di un lotto diverso. I risultati sono riepilogati in tabella 6.

### 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 rilevazione. 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 rilevazione. Il valore di LoD è stato calcolato usando una analisi parametrica.

**Limite di determinazione quantitativa inferiore (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) 0,32 µg/mL**

**Limite di determinazione quantitativa superiore (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) 22,7 µg/mL**

Il LLoQ è stato stabilito secondo le linee guida CLSI EP17-A2, con quattro campioni generati diluendo materiale di calibrazione in siero negativo alle concentrazioni di 0,5, 0,4, 0,3 e 0,2 µg/mL; il ULoQ è stato stabilito con materiale di calibrazione diluito alle concentrazioni di 29,9, 24,9, 20,5 e 15,0 µg/mL. I campioni sono stati misurati nell'arco di tre giorni con cinque ripetizioni al giorno, in modo da ottenere 60 valori. L'errore totale relativo (total error, TE) è stato calcolato usando il modello RMS da dalle stime di precisione e scostamento di ciascun campione, poi trasformato in logaritmo. Dai risultati è stato generato un profilo dell'errore totale e il LoQ è stato determinato come l'intersezione del profilo con un criterio di accettazione corrispondente al 30% del TE.

**Intervallo di linearità: 0,14-20,37 µg/mL infliximab.**

L'intervallo di linearità del test Quantum Blue® Infliximab è stato determinato secondo le linee guida CLSI EP06-A. Due pool di campioni, basso e alto, sono stati miscelati al fine di coprire ed eccedere l'intervallo di misura previsto. Le miscele sono state testate in 10 replicati con due lotti di cassette di rilevazione. L'intervallo di linearità è stato definito come l'intervallo dei livelli di concentrazione entro cui la i coefficienti dell'interpolazione di secondo e terzo ordine sono non significativi. In figura 3 sono illustrati i risultati per un lotto di cassette di rilevazione.

Campioni con livelli elevati di infliximab (fino a 183,6 µg/mL) possono essere ulteriormente diluiti 1:10 con il tampone di diluizione (1:200 in totale), in modo da ottenere risultati lineari all'interno dell'intervallo di misura del dosaggio. Una serie di campioni con concentrazioni di infliximab nell'intervallo tra 2,4 e 379 µg/mL è stata generata miscelando un campione artificiale di livello elevato con siero negativo. I campioni sono stati diluiti 1:10 e poi 1:20 con tampone di diluizione e misurati in cinque ripetizioni con il test Quantum Blue® Infliximab. È stato determinato un intervallo di linearità compreso tra livelli di infliximab pari a 2,6 e 183,6 µg/mL.

**Effetto gancio da dosi alte**

Non è stato osservato un effetto gancio da dosi alte per campioni con concentrazioni di infliximab fino a 379 µg/mL.

**Specificità/reattività crociata**

Il test Quantum Blue® Infliximab rileva specificamente il farmaco originatore (Remicade®) e i biosimilari di infliximab, CT-P13 (Remsima™; Inflectra™) (rif. 9) e SB2 (FLIXABI®) in siero. Per FLIXABI® i risultati di uno studio di recupero condotto presso il Dipartimento de Biomedicina - Unidade de Farmacologia e Terapêutica, Porto, hanno soddisfatto il criterio di accettazione di recupero a  $\pm 30\%$  dalla concentrazione prevista del campione base addizionato con FLIXABI®. Al contrario, i test condotti su siero addizionato con bloccanti del TNF $\alpha$ , quali adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®), golimumab (Simponi®) e certolizumab (Cimzia®) fino a 100 µg/mL hanno prodotto letture inferiori al limite del bianco.

## SOSTANZE INTERFERENTI

La suscettibilità del test Quantum Blue® Infliximab a sostanze interferenti è stata valutata secondo la linea guida EP7-A2 approvata dal CLSI. Le sostanze interferenti sono state esaminate a concentrazioni tre volte maggiori rispetto a quelle riportate o attese nei campioni clinici o ai livelli di concentrazione raccomandanti dalla linea guida CLSI EP07-A2. Una errore superiore al 30% è stata ritenuta un'interferenza.

**Cambio farmacologico intra-classe**

Bloccanti del TNF $\alpha$  sono stati testati a concentrazioni tre volte superiori rispetto ai livelli minimi farmacologici raccomandati. Non è stata rilevata alcuna interferenza fino a 10 µg/mL per adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®) e golimumab (Simponi®). Sono state rilevate interferenze con certolizumab (Cimzia®) con criteri di scostamento non superati ad una concentrazione di 1,7 µg/mL. Campioni di pazienti provenienti da somministrazione di certolizumab (Cimzia®) non devono essere direttamente testati usando il dosaggio Quantum Blue® Infliximab. Lasciare che i livelli minimi di certolizumab (Cimzia®) si riducano almeno al di sotto di 1,7 µg/mL.

**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 µmol/L; 29 mg/dL), bilirubina libera (342 µmol/L; 20 mg/dL), emoglobina (2 g/L (=200 mg/dL), TNF $\alpha$  (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 µmol/L), 6-mercaptopurina (37 µmol/L), e metotressato (1363 µmol/L).

Ad eccezione dei casi esplicitamente indicati, tutte le caratteristiche di prestazione sono state valutate usando infliximab (Remicade®, MSD).

**INDICACIONES DE USO**

Quantum Blue® Infiximab es un inmunoensayo diagnóstico *in vitro* de flujo lateral para la determinación cuantitativa de niveles valle de infiximab (Remicade®) y los biosimilares de infiximab, CT-P13 (Remsima™; Inflectra™) y SB2 (FLIXABI®), 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 (FNTα) se conjuga con coloides de oro. En el casete de prueba, el conjugado de oro 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 de oro. En la membrana analítica está inmovilizado un anticuerpo monoclonal, altamente específico de infiximab, que servirá para capturar el complejo del conjugado de oro y el analito infiximab dando lugar a una coloración en la línea de test (T). El conjugado oro-FNTα libre restante 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 mediante el Quantum Blue® Reader.

**REACTIVOS SUMINISTRADOS Y PREPARACIÓN**

Reactivos	Cantidad		Código	Comentarios
	LF-TLIF25	LF-TLIF10		
<b>Cartucho de prueba</b>	25 unidades	10 unidades	B-LFTLIF-TC	Sellado al vacío en una bolsa de aluminio
<b>Tampón de incubación</b>	1 frasco 10 mL	1 frasco 10 mL	B-LFTLIF-CB	Listo para usar
<b>Controles Alto* / Bajo*</b>	2 viales, 0,5 mL	2 viales, 0,5 mL	B-LFTLIF-CONSET	Listo para usar
<b>Tarjeta chip RFID</b>	1 unidad	1 unidad	B-LFTLIF-RCC	Tarjeta de plástica <b>blanca</b>
<b>Tarjeta chip RFID</b>	1 unidad	1 unidad	B-LFTLIF-RCC15	Tarjeta de plástica <b>verde</b>

Tabla 1

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

**REVISE SU KIT DE PRUEBA**

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.

**CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS**

Reactivos antes de abrir	
Conservar a entre 2 y 8 °C. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.	
Reactivos abiertos	
Casete de prueba	Los casetes de prueba extraídos de la bolsa de aluminio deben utilizarse en un plazo de 4 horas.
Tampón de incubación	Conservar durante un máximo de 6 meses a entre 2 y 8 °C tras su apertura.
Controles Alto / Bajo	Conservar durante un máximo de 6 meses a entre 2 y 8 °C tras su apertura.

Tabla 2

**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

**PRECAUCIONES**

**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 casete de prueba de la bolsa de aluminio. Deje que el casete de prueba se equilibre en el ambiente del laboratorio (20-26 °C) durante como mínimo 2 minutos. Los casetes de prueba extraídos de la bolsa de aluminio deben utilizarse en un plazo de 4 horas.
- 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. (figura 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® Infliximab: 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 conservarse a entre 2 y 8 °C y medirse en un plazo de 24 horas. Las muestras diluidas no pueden conservarse durante un tiempo más prolongado.
- Las muestras con concentración superior a 20 µg/mL (hasta 183,6 µg/mL) se pueden diluir adicionalmente en proporción 1:10 con tampón de incubación (dilución total 1:200) para obtener resultados dentro del rango de medición de la prueba.

### 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 ≤ -20°C. Estas muestras son estables durante por lo menos 21 meses a ≤ -20°C.

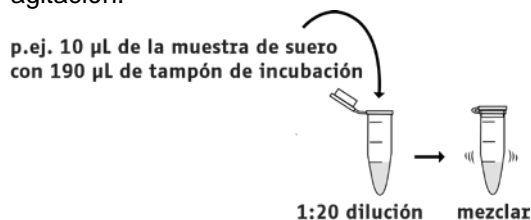
### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

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:

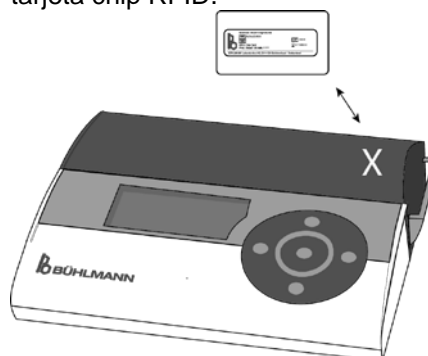
#### 1. Dilución de las muestras de suero con tampón de incubación

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.



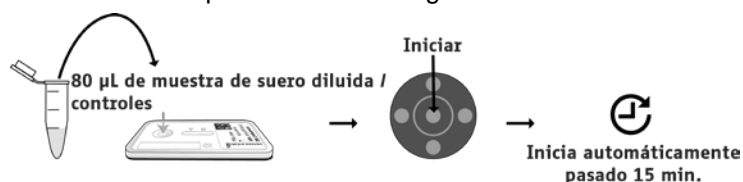
#### 2. Procedimiento de ensayo y lectura de los resultados

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

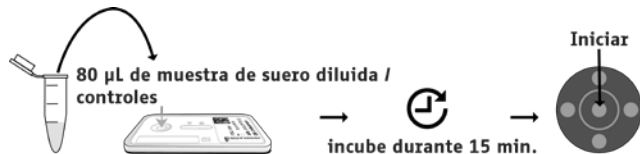
- Utilice la tarjeta de plástico verde.
- Inserte el cartucho de prueba en el portacasetes de prueba del Quantum Blue® Reader.
- Añada 80 µL de muestra de suero diluida en el puerto de carga de muestra del cartucho de prueba (figura 1D)
- Cierre el portacasetes e inicie la medición pulsando el botón 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 (figura 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 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 (figura 1D).

## CONTROL DE CALIDAD

- Si el rendimiento 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.

## 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 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.

## 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 figura 1A y figura 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 (figura 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 (figura 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 (figura 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 (figura 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.

## LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con este kit se han optimizado para medir concentraciones mínimas de infliximab en muestras de suero diluidas.
- Las muestras de pacientes previamente en tratamiento con certolizumab (Cimzia®) no se deben analizar directamente con la prueba Quantum Blue® Infliximab, ya que podría producirse una reactividad cruzada. Hay que esperar hasta que los niveles valle de certolizumab (Cimzia®) hayan descendido como mínimo por debajo de 1,7 µg/mL.
- Los resultados de la prueba Quantum Blue® Infliximab se deben interpretar conjuntamente con otros hallazgos clínicos y de laboratorio. Estos podrían incluir la determinación de la actividad de la enfermedad inflamatoria intestinal, EII, la presencia de anticuerpos frente al fármaco, y la información sobre el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente (ref. 2).
- Niveles valle de infliximab de entre 3 y 7 µg/mL se consideran la ventana terapéutica de consenso para la mejor eficacia del tratamiento (ref. 2, 6). Los niveles valle óptimos, no obstante, pueden ser individuales y variar en función del objetivo del tratamiento y el fenotipo de la enfermedad (ref. 2).

## 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. 3, 4), así como la predicción de una respuesta sostenida al tratamiento con infliximab (ref. 5).

### Valores por debajo de 3 µg/mL

Los niveles subterapéuticos de infliximab en suero sugieren un fracaso farmacocinético. Se debe contemplar un ajuste del tratamiento, tomando en consideración los hallazgos clínicos y de laboratorio disponibles (ref. 2, 6).

### Valores entre 3-7 µg/mL

Los niveles valle terapéuticos de infliximab pueden servir como indicación para proseguir el tratamiento con la dosis actual en pacientes con remisión de la EII (ref. 2, 3, 6).

### Valores por encima de 7 µg/mL

Los niveles valle supraterapéuticos de infliximab puedan servir como indicación para reducir la dosis, conjuntamente con el cuadro clínico, en pacientes con remisión de la EII (ref. 2). 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. 6).

## CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

### Rendimiento clínico

El grupo de estudio de la EII portugués (GEDII) (ref. 7) reclutó ciento diez (110) pacientes con colitis ulcerosa (CU) de 18 años y arriba (un 55 % de ellos mujeres) en tratamiento de mantenimiento con infliximab en 10 hospitales universitarios y comunitarios diferentes. Se realizó una determinación de los niveles valle de infliximab, junto con una evaluación clínica, endoscópica y de niveles de calprotectina, para cada uno de los pacientes. En este estudio, los niveles valle de infliximab superiores a 3 µg/mL se definieron como resultado negativo, y un valor predictivo negativo (VPN) indicaba el porcentaje de pacientes con niveles valle de infliximab por encima del punto de corte con un resultado clínico positivo, que no se beneficiarían de un ajuste de la dosis. Un resultado clínico positivo se definió como la remisión clínica (puntuación global de Mayo ≤ 2, sin ninguna puntuación individual por encima de 1), la remisión endoscópica (para ausencia de remisión profunda, subpuntuación endoscópica de Mayo ≤ 1) y/o niveles de calprotectina fecal por debajo de 250 µg/g. Los valores de VPN obtenidos para la prueba Quantum Blue® Infliximab y un kit ELISA disponible comercialmente se muestran en la tabla 3.

Resultado clínico:	Remisión clínica	Remisión endoscópica	Calprotectina fecal ≤250 µg/g
Quantum Blue® Infliximab	74 %	88 %	88 %
ELISA	74 %	83 %	86 %

Tabla 3

### Comparación de métodos

**Sesgo a 3 µg/mL: -0,7 % (IC 95%: -6,9 % – 3,1 %)**

**Sesgo a 7 µg/mL: -3,8 % (IC 95%: -8,3 % – -0,7 %)**

El estudio de comparación de métodos se ha realizado de conformidad con la directriz CLSI EP09-A3. Se midieron ciento diez (110) muestras clínicas por triplicado con la prueba Quantum Blue® Infliximab, obteniéndose 330 valores, y con una prueba ELISA para infliximab disponible comercialmente (ref. 8). Las determinaciones se realizaron a lo largo de tres días utilizando dos lotes de cartucho de prueba Quantum Blue® Infliximab. Los resultados se resumen en la figura 2.

### Recuperación: 83-100 %

Se adicionaron con 3,24 µg/mL de infliximab en material calibrador de origen sérico seis muestras clínicas con niveles de infliximab próximos a puntos de decisión clínica. Las muestras de "base" se adicionaron con la cantidad correspondiente de un combinado de suero humano normal filtrado. Las muestras de "base" y "base + adición" se midieron en diez réplicas con un lote de reactivo. Los resultados se muestran en la tabla 4.

### Repetibilidad: 16,3-25,0 % CV

### Precisión intralaboratorio: 18,5-25,3 % CV

La repetibilidad y la precisión intralaboratorio se han establecido de conformidad con la directriz CLSI EP05-A3. Se analizaron a lo largo de 20 días, en dos tandas independientes con dos réplicas por tanda, siete muestras de combinado de suero de paciente con concentraciones de infliximab que cubrían el rango de medición del ensayo y los puntos de decisión clínica. Los resultados se resumen en la tabla 5.

### Reproducibilidad: 22,6-29,3 % CV

La reproducibilidad se ha establecido de conformidad con la directriz CLSI EP05-A3 realizando las determinaciones en tres instrumentos Quantum Blue® Reader diferentes con tres lotes de casete de prueba diferentes. Se analizaron a lo largo de cinco días, en una tanda independiente con cinco réplicas por tanda, siete muestras de combinado de suero de paciente con concentraciones de infliximab que cubrían el rango de medición del ensayo y los puntos de decisión clínica. Cada lector Quantum Blue® Reader lo hizo funcionar un operador diferente utilizando un lote de casete de prueba diferente. Los resultados se resumen en la tabla 6.

**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 inferior de determinación cuantitativa (LLoQ): 0,32 µg/mL****Límite superior de determinación cuantitativa (ULoQ): 22,7 µg/mL**

El LLoQ se estableció de conformidad con la directriz CLSI EP17-A2 con cuatro muestras generadas diluyendo material calibrador en suero negativo hasta concentraciones de 0,5; 0,4; 0,3 y 0,2 µg/mL; el ULoQ con material calibrador diluido con concentraciones de 29,9; 24,9; 20,5 y 15,0 µg/mL. Las muestras se midieron a lo largo de tres días con cinco réplicas al día para obtener 60 valores. El error total (ET) relativo se calculó utilizando el modelo RMS a partir de estimaciones de sesgo y precisión correspondientes a cada muestra y se transformó logarítmicamente. Con los resultados se generó un perfil de error total y se determinó el LoQ como la intersección del perfil con un criterio de aceptación correspondiente al 30% de ET.

**Rango lineal: 0,14-20,37 µg/mL de infliximab**

El rango lineal de la prueba Quantum Blue® Infliximab se ha determinado de conformidad con la directriz CLSI EP06-A. Se mezclaron dos combinados de muestras, con niveles bajo y alto, para cubrir y exceder el rango de medición esperado. Las mezclas se ensayaron en 10 réplicas con dos lotes de cartucho de prueba. El rango lineal se definió como el intervalo de niveles de concentración en el que los coeficientes de los ajustes de segundo y tercer orden se determinaron como no significativos. Los resultados correspondientes a un lote de cartucho de prueba se muestran en la figura 3.

Las muestras con niveles elevados de infliximab (hasta 183,6 µg/mL) se pueden diluir adicionalmente en proporción 1:10 con tampón de detección (dilución total 1:200) para obtener resultados lineales dentro del rango de medición del ensayo. Se generó una serie de muestras con concentraciones de infliximab en el rango de entre 2,4 y 379 µg/mL mezclando una muestra artificial de nivel alto con suero negativo. Las muestras se diluyeron en proporción 1:10 y seguidamente en proporción 1:20 con tampón de detección y se midieron en cinco réplicas con la prueba Quantum Blue® Infliximab. Se determinó un rango lineal para niveles de infliximab entre 2,6 y 183,6 µg/mL.

**Efecto gancho de dosis altas**

No se ha observado un efecto gancho de dosis altas para muestras con concentraciones de infliximab de hasta 379 µg/mL.

**Especificidad/Reactividad cruzada**

La prueba Quantum Blue® Infliximab reconoce específicamente el fármaco original infliximab (Remicade®) así como los biosimilares de infliximab, CT-P13 (Remsima™; Inflectra™) (ref. 9) y SB2 (FLIXABI®), en suero. Para FLIXABI®, los resultados de un estudio de recuperación realizado en el Departamento de Biomedicina - Unidad de Farmacología e Terapêutica de Oporto cumplieron el criterio de aceptación de  $\pm 30\%$  de recuperación con respecto a la concentración esperada de la muestra de base + la adición de FLIXABI®. En contraste, la adición del suero con bloqueadores del FNT $\alpha$ , como adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®), golilumab (Simponi®) y certolizumab (Cimzia®) en concentraciones de hasta 100 µg/mL dio lugar a lecturas de resultados por debajo del límite para el blanco.

**SUSTANCIAS INTERFERENTES**

La susceptibilidad de la prueba Quantum Blue® Infliximab a sustancias interferentes se ha evaluado de conformidad con la directriz aprobada por el CLSI EP7-A2. Las sustancias interferentes se ensayaron en concentraciones tres veces más altas que las comunicadas o esperadas en muestras clínicas o a los niveles de concentración recomendados en la directriz CLSI EP07-A2. Se consideró como interferencia un sesgo superior al 30 %.

**Dentro de la misma clase**

Los bloqueantes del FNT $\alpha$  se ensayaron en concentraciones que superaban en tres veces los niveles valle de fármaco más bajos recomendados. En la comprobación efectuada no se detectó ninguna interferencia hasta 10 µg/mL para adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®) y golilumab (Simponi®). Se detectó interferencia con certolizumab (Cimzia®) sin excederse el criterio de sesgo a una concentración de 1,7 µg/mL. Las muestras de pacientes previamente en tratamiento con certolizumab (Cimzia®) no se deben analizar directamente con la prueba Quantum Blue® Infliximab. Hay que esperar hasta que los niveles valle de certolizumab (Cimzia®) hayan descendido como mínimo por debajo de 1,7 µg/mL.

**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 µmol/L; 29 mg/dL), bilirrubina no conjugada (342 µmol/L; 20 mg/dL), hemoglobina (2 g/L = 200 mg/dL), TNF $\alpha$  (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 µmol/L), 6-mercaptopurina (37 µmol/L) y metotrexato (1363 µmol/L).

Todas las características del rendimiento, salvo que se indique otra cosa, se evaluaron con infliximab (Remicade®, MSD).

## APLICAÇÃO DO TESTE

O Quantum Blue® Infiximab é um imunoenensaio de fluxo lateral de diagnóstico *in vitro* para determinação quantitativa dos níveis de infiximabe (Remicade®) e biossimilares do infiximabe, CT-P13 (Remsima™, Inflectra™) e SB2 (FLIXABI®) 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 se destina à medição seletiva do infiximabe por imunoenensaio tipo sanduíche. O fator de necrose tumoral alfa recombinante (TNF $\alpha$ ) é conjugado a coloides de ouro. No cassete de teste, o conjugado de ouro é liberado de uma almofada para o sistema de reação conforme a amostra é aplicada. O infiximabe presente na amostra se liga ao conjugado de ouro. Um anticorpo monoclonal, altamente específico para o infiximabe, é imobilizado na membrana analítica e captura o complexo do conjugado de ouro e o analíto infiximabe, resultando na coloração da linha de teste (T). O conjugado de TNF $\alpha$ -ouro remanescente se liga à linha de controle (C). As intensidades dos sinais da linha de teste (T) e da linha de controle (C) são medidas quantitativamente pelo Quantum Blue®.

## REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

Reagentes	Quantidade		Código	Observações
	LF-TLIF25	LF-TLIF10		
<b>Cassete de teste</b>	25 unidades	10 unidades	B-LFTLIF-TC	Embalagem selada a vácuo
<b>Tampão de diluição</b>	1 frasco 10 mL	1 frasco 10 mL	B-LFTLIF-CB	Pronto para uso
<b>Controles Baixo*/ Alto*</b>	2 frascos, 0,5 mL	2 frascos, 0,5 mL	B-LFTLIF-CONSET	Pronto para uso
<b>Cartão Chip RFID</b>	1 unidade	1 unidade	B-LFTLIF-RCC	Cartão de plástico <b>branco</b>
<b>Cartão Chip RFID</b>	1 unidade	1 unidade	B-LFTLIF-RCC15	Cartão de plástico <b>verde</b>

Tabela 1

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

## CONFIRA SEU KIT

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.

## ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES

Reagentes não abertos	
Guarde a uma temperatura na faixa de 2 - 8 °C. Não use os reagentes depois da data de validade impressa nas etiquetas.	
Reagentes abertos	
Cassete de teste	Os cassetes de teste removidos da embalagem aluminizada devem ser usados dentro de 4 horas.
Tampão de diluição	Depois de abrir, guarde por até 6 meses a uma temperatura na faixa de 2 - 8 °C.
Controles Baixo / Alto	Depois de abrir, guarde por até 6 meses a uma temperatura na faixa de 2 - 8 °C.

Tabela 2

## MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Vórtex
- Cronômetro (opcional)
- Pipetas de precisão com pontas descartáveis: 10-100  $\mu$ L e 100-1000  $\mu$ L
- 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

## 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 aluminizada. Aguarde até pelo menos 2 minutos para que o cassete de teste atinja o equilíbrio com a temperatura ambiente do laboratório (20-26 °C). Os cassetes de teste removidos da embalagem aluminizada devem ser usados dentro de 4 horas.
- 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 reutilizadas.
- 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. (figura 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® Infliximab: 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 armazenadas a uma temperatura na faixa de 2-8 °C e medidas dentro de 24 horas. As amostras diluídas não podem ser armazenadas por períodos de tempo prolongados.
- Amostras a uma concentração acima de 20 µg/mL (até 183,6 µg/mL) podem ser adicionalmente diluídas a 1:10 no tampão de detecção (1:200, no total) para se obter resultados dentro da faixa de medição do teste.

### 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 ~2000 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 21 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:

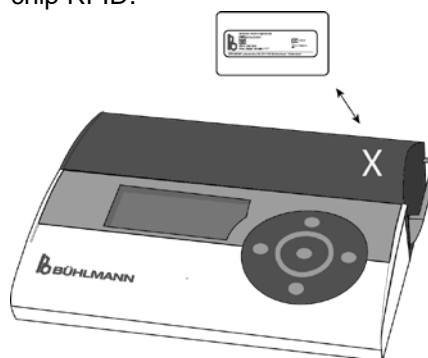
#### 1. Diluição das amostras de soro com tampão de diluição

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.



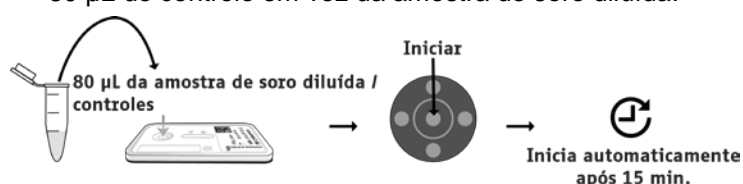
#### 2. Procedimento e leitura do ensaio

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.



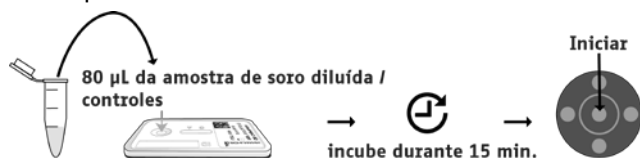
##### 2.1. Método <TLIF\_15> com cronômetro interno

- 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 (figura 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 (figura 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.
- 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 (figura 1D).

## CONTROLE DE QUALIDADE

- Se o desempenho 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.

## ESTANDARDIZAÇÃO

- Os valores do calibrador 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 do CQ incluída. O material do calibrador compreende infliximab em uma matriz de soro humano e é padronizado contra material de referência interno.
- O Quantum Blue® Reader da BÜHLMANN utiliza uma curva de calibração específica de cada lote para calcular a concentração de infliximabe. O intervalo de detecção do ensaio é de 0,4 a 20 µg/mL.

## VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

- Em um resultado válido, a Linha de Controle (C) tem que ser sempre visível (ver figura 1A e figura 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 (figura 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

(figura 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 (figura 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 (figura 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.

## 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 Infliximabe em uma matriz de soro humano e é padronizado em relação a um material de referência interno.
- As amostras de pacientes que estão passando da terapia com certolizumabe (Cimzia®) para o infliximabe não devem ser testadas diretamente com o Quantum Blue® Infliximab, uma vez que pode ocorrer reatividade cruzada. Aguarde até que os níveis do certolizumabe (Cimzia®) caiam para pelo menos 1,7 µg/mL.
- Os resultados dos testes com o Quantum Blue® Infliximab devem ser interpretados em combinação a outros resultados clínicos e laboratoriais. Isto inclui a determinação da atividade de doenças inflamatórias intestinais (DII), a presença de anticorpos contra medicamentos, bem como informações sobre a adesão do paciente à terapia (ref. 2).
- Níveis medidos de infliximabe entre 3 e 7 µg/mL são considerados como janela terapêutica consensual para a melhor eficácia do tratamento. Os níveis de valor ótimos, porém, podem ser individuais e diferir de acordo com a meta de tratamento, assim como com o fenótipo da doença (ref. 2).

## 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 (ref. 3, 4), bem como com a predição da manutenção da resposta à terapêutica com infliximabe (ref. 5).

### Valores inferiores a 3 µg/mL

Níveis subterapêuticos de infliximabe no soro sugerem falha farmacocinética. Deve-se considerar o ajuste da terapia, levando em conta os resultados clínicos e laboratoriais disponíveis (ref. 2,6).

### Valores entre 3-7 µg/mL

Níveis terapêuticos do infliximabe podem servir como indicação para a continuidade da terapia com a dose atual em pacientes em remissão de DIIs (ref. 2, 3, 6).

### Valores acima de 7 µg/mL

Níveis supratrapêuticos do infliximabe podem servir como indicação para a redução da dose em conjunção com o quadro clínico, em pacientes em remissão de DIIs (ref. 2). 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. 6).

## CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

### Desempenho clínico

Cento e dez (110) pacientes com colite ulcerativa (CU) e 18 anos de idade ou mais (55% mulheres) sob terapia de manutenção com infliximabe foram recrutados em 10 hospitais universitários e comunitários diferentes pelo Grupo de Estudos da Doença Inflamatória Intestinal (GEDII) de Portugal (ref. 7). Uma determinação dos níveis de infliximabe, juntamente com uma avaliação clínica, endoscópica e dos níveis de calprotectina, foi realizada para cada um dos pacientes. Neste estudo, os níveis de infliximabe acima de 3 µg/mL foram definidos como um resultado negativo e um valor preditivo negativo (VPN) indicou a porcentagem dos pacientes com níveis de infliximabe acima do valor de corte com um desfecho clínico positivo, que não se beneficiariam com um ajuste de medicamentos. Um desfecho clínico positivo foi definido como uma remissão clínica (pontuação global Mayo  $\leq$  2, sem pontuação individual maior que 1), remissão endoscópica (para remissão não profunda, uma subpontuação endoscópica Mayo  $\leq$  1) e/ou níveis de calprotectina fecal abaixo de 250 µg/g. Os valores VPN obtidos para o teste Quantum Blue® Infliximab e um kit ELISA comercialmente disponível estão apresentados na tabela 3.

Desfecho clínico:	Remissão clínica	Remissão endoscópica	Calprotectina fecal $\leq$ 250 µg/g
Quantum Blue® Infliximab	74%	88%	88%
ELISA	74%	83%	86%

Tabela 3

### Comparação de métodos

**Desvio a 3 µg/mL: -0,7% (IC de 95%: -6,9 a 3,1%)**

**Desvio a 7 µg/mL: -3,8% (IC de 95%: -8,3 a -0,7%)**

O estudo de comparação de métodos foi realizado de acordo com a diretriz EP09-A3 do CLSI. Cento e dez (110) amostras clínicas foram medidas em triplicata com o teste Quantum Blue® Infliximab, resultando em 330 valores, e com um teste ELISA para infliximabe comercialmente disponível (ref. 8). As medições foram realizadas por três dias usando-se dois lotes de cassetes de teste Quantum Blue® Infliximab. Os resultados estão resumidos na figura 2.

### Recuperação: 83 - 100%

Seis amostras clínicas, incluindo níveis de infliximabe próximos aos pontos de decisão clínica, foram fortificadas com 3,24 µg/mL de infliximabe em material de calibrador à base de soro. As amostras de "base" foram fortificadas com a quantidade correspondente de soro humano normal filtrado e agrupado. As amostras de "base" e de "base + reforço" foram medidas em dez replicações com um único lote de reagentes. Os resultados podem ser vistos na tabela 4.

**Repetibilidade: 16,3-25,0 % CV**

**Precisão intralaboratorial: 18,5-25,3 % CV**

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI. Sete amostras séricas agrupadas de pacientes, com concentrações de infliximabe abrangendo a faixa de medição do teste e pontos de decisão clínica, foram testadas por 20 dias, em duas corridas independentes, com duas replicações por corrida. Os resultados estão resumidos na tabela 5.

**Reprodutibilidade: 22,6-29,3 % CV**

A reprodutibilidade foi determinada de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, através de medições executadas em três leitores Quantum Blue® diferentes, com três lotes de cassetes de teste diferentes. Sete amostras séricas agrupadas de pacientes, com concentrações de infliximabe abrangendo a faixa de medição do teste e pontos de decisão clínica, foram testadas por 5 dias em uma corrida independente, com cinco replicações por corrida. Cada um dos leitores Quantum Blue® foi operado por um operador diferente usando um lote diferente de cassetes de teste. Os resultados estão resumidos na tabela 6.

**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 inferior de quantificação (LIQ): 0,32 µg/mL**

**Limite superior de quantificação (LSQ): 22,7 µg/mL**

O LIQ foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, usando-se quatro amostras geradas pela diluição de material de calibrador em soro negativo até concentrações de 0,5, 0,4, 0,3 e 0,2 µg/mL; o LSQ, com material de calibrador diluído até concentrações de 29,9, 24,9, 20,5 e 15,0 µg/mL. As amostras foram medidas por três dias em cinco replicações por dia para produzir 60 valores. O erro relativo total (ERT) foi calculado usando-se o modelo RMS a partir de estimativas de desvio e precisão para cada amostra e transformado em escala logarítmica. Um perfil de erro total foi gerado com os resultados e o LQ foi determinado como a intersecção do perfil com o critério de aceitação de 30% do ERT.

**Faixa linear: 0,14 - 20,37 µg/mL de infliximabe.**

A faixa linear do teste Quantum Blue® Infliximab foi determinada de acordo com a diretriz EP06-A do CLSI. Dois pools de amostras, alto e baixo, foram misturados para abranger e ultrapassar a faixa de medição esperada. As misturas foram testadas em 10 replicações com dois lotes de cassetes de teste. A faixa linear foi definida como o intervalo de níveis de concentração nos quais os coeficientes de ajuste de segunda e terceira ordens não foram considerados significativos. Os resultados para um lote de cassete de teste estão mostrados na figura 3.

Amostras com níveis elevados de infliximabe (até 183,6 µg/mL) podem ser adicionalmente diluídas a 1:10 no tampão de detecção (1:200, no total) para se obter resultados lineares dentro da faixa de medição do teste. Uma série de amostras com concentrações de infliximabe na faixa de 2,4 a 379 µg/mL foi gerada por meio da mistura de uma amostra artificial alta com um soro negativo. As amostras foram diluídas a 1:10 e em seguida a 1:20 no tampão de detecção e medidas em cinco replicações com o teste Quantum Blue® Infliximab. Uma faixa linear foi determinada para níveis de infliximabe entre 2,6 e 183,6 µg/mL.

**Efeito gancho com doses elevadas**

Não foi observado efeito gancho com dose elevada para amostras com concentrações de infliximabe até 379 µg/mL.

**Especificidade/Reatividade cruzada**

O teste Quantum Blue® Infliximab reconhece especificamente o medicamento original do infliximabe (Remicade®), bem como os biossimilares do infliximabe, CT-P13 (Remsima™; Inflectra™) (ref. 9) e SB2 (FLIXABI®) no soro. Para o FLIXABI®, os resultados de um estudo de recuperação realizado no Departamento de Biomedicina - Unidade de Farmacologia e Terapêutica, Porto, atendeu ao critério de aceitação de ± 30% de recuperação a partir da concentração esperada da amostra de base + reforço de FLIXABI®. Em contraste, soro fortificado com bloqueadores do TNFα, tais como adalimumabe (Humira®), etanercepte (Enbrel®), golimumabe (Simponi®) e certolizumabe (Cimzia®) até 100 µg/mL, resultou em uma leitura abaixo do limite de branco.

## SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

A suscetibilidade do teste Quantum Blue® Infliximab a substâncias interferentes foi avaliada de acordo com a diretriz EP7-A2, aprovada pelo CLSI. Substâncias interferentes foram testadas a concentrações três vezes maiores que aquelas reportadas ou esperadas em amostras clínicas, ou em níveis de concentração recomendados pela diretriz EP07-A2 do CLSI. Desvios superiores a 30 % foram considerados como interferências.

**Comutação de classe**

Os bloqueadores de TNFα foram testados a concentrações três vezes acima dos níveis mais baixos recomendados para o medicamento. Nenhuma interferência foi detectada até 10 µg/mL para o adalimumabe (Humira®), etanercepte (Enbrel®) e golimumabe (Simponi®). Detectou-se interferência com certolizumabe (Cimzia®) com critério de desvio não ultrapassado a uma concentração de 1,7 µg/mL. As amostras de pacientes que estão mudando da terapia com certolizumabe (Cimzia®) não devem ser testadas diretamente com o teste Quantum Blue® Infliximab. Aguarde até que os níveis do certolizumabe (Cimzia®) cheguem pelo menos abaixo de 1,7 µg/mL.

**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 µmol/L; 29 mg/dL), bilirrubina não conjugada (342 µmol/L; 20 mg/dL), hemoglobina (2 g/L (= 200 mg/dL), TNFα (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 µmol/L), 6-mercaptopurina (37 µmol/L) e metotrexato (1363 µmol/L).

Todas as características de desempenho, exceto se indicado de outra forma, foram avaliadas com infliximabe (Remicade®, MSD).



APPENDIX I

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

Test results

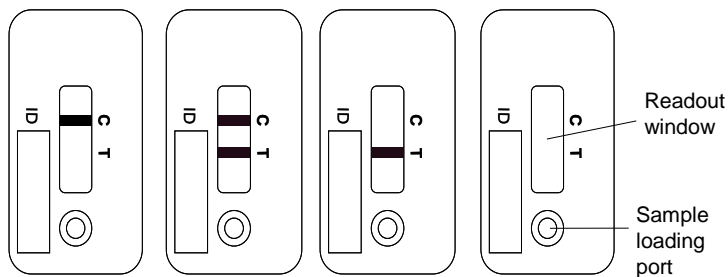


Figure 1A Figure 1B Figure 1C Figure 1D

Method comparison

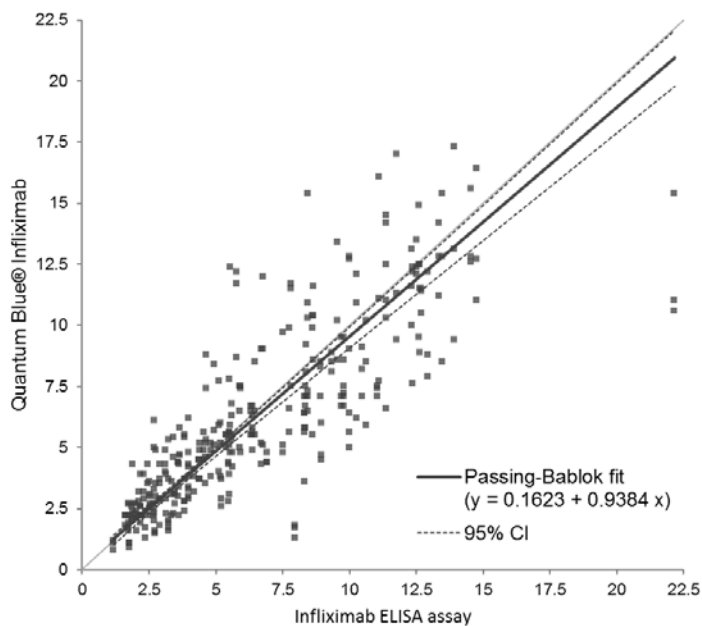


Figure 2

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 4

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 5

Reproducibility

Mean IFX Conc. [µg/mL]	Within-run CV [%]	Between-day precision CV [%]	Between-lot / instrument / operator precision CV [%]	Within-lab precision CV [%]
0.42	21.1	3.0	15.4	26.3
1.43	21.7	5.5	15.9	27.4
2.86	21.9	16.4	10.5	29.3
4.73	24.5	10.1	4.2	26.8
7.13	25.0	9.8	10.1	28.7
9.71	18.5	9.7	8.9	22.6
12.33	27.5	0.0	5.1	28.0

Table 6

Linearity plot

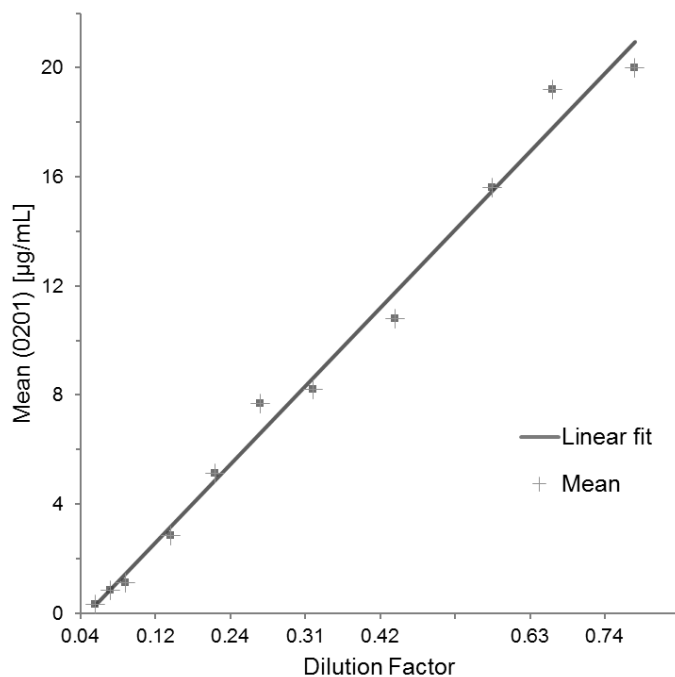


Figure 3

---

## APPENDIX II

### 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. Mitrev N et al. : *Review article : consensus statements on therapeutic drug monitoring of anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther. 46(11-12):1037-1053 (2017)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. Vande Castele, N.: *Trough Concentration of Infliximab Guide Dosing for Patients With Inflammatory Bowel Disease*. Journal of Gastroenterology, 148, 1320–1329 (2015)
7. Magro F. et al. : *Clinical performance of an infliximab rapid quantification assay*. Therap Adv Gastroenterol. 10(9):651-660 (2017)
8. Vande Castele N. et al.: *Detection of infliximab levels and anti-infliximab antibodies: a comparison of three different assays*. Aliment Pharmacol Ther. 36, 765-771 (2012)
9. Afonso J. et al.; *Therapeutic drug monitoring of CT-P13: a comparison of four different immunoassays*. Therap Adv Gastroenterol. 10(9):661-671 (2017)




---


**APPENDIX III**

**NOTES / NOTIZEN / NOTES / NOTE / NOTAS**

APPENDIX IV

SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad Data de expiração
<b>REF</b>	Catalogue number Bestellnummer Code Codice Código Código
<b>LOT</b>	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
<b>IVD</b>	<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
<b>TC</b>	Test Cassette Testkassette Cassette test Cartuccia di rilevazione Cartucho de prueba Cassete de teste
<b>BUFCHASE</b>	Chase Buffer Laufpuffer Tampon de dilution Tampone di diluzione Tampón de incubación Tampão de diluição
<b>CONTROL L</b>	Control Low Kontrolle Tief Contrôle Bas Controllo Basso Control Bajo Controle Baixo
<b>CONTROL H</b>	Control High Kontrolle Hoch Contrôle Élevé Controllo Alto Control Alto Controle Alto
<b>RCC</b>	RFID Chip Card RFID Chipkarte Carte à puce RFID Carta chip RFID Tarjeta chip RFID Cartão Chip RFID

