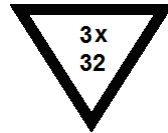



# LISA-TRACKER Premium Infliximab


**REF**    **LT1001**

**26 déterminations**
**Français**

## DEFINITION

Le coffret **LISA-TRACKER Premium Infliximab** () permet le dosage par méthode ELISA du TNF $\alpha$  humain, de l'Infliximab (anti-TNF $\alpha$ ) ainsi que des anticorps anti-Infliximab, dans le sérum. Ces tests sont quantitatifs et peuvent s'effectuer de manière individuelle ou de manière simultanée grâce à un protocole de dosage uniformisé.

## VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les anti-TNF $\alpha$  sont des agents thérapeutiques largement utilisés pour traiter des patients atteints par diverses maladies inflammatoires. L'Infliximab est l'un des anti-TNF $\alpha$  préconisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, la spondylarthrite ankylosante, etc. C'est un anticorps monoclonal chimérique capable de se fixer au TNF $\alpha$ . Il permet ainsi de bloquer l'action du TNF $\alpha$  responsable de l'état inflammatoire. Cependant, au cours du traitement, certains patients peuvent développer des anticorps dirigés contre l'Infliximab. Il en résulte une diminution du taux plasmatique de l'anti-TNF $\alpha$  ainsi qu'une réapparition ou une augmentation des symptômes de la maladie.

Le coffret **LISA-TRACKER Premium Infliximab** () permet le dosage de 3 paramètres : TNF $\alpha$ , Infliximab et anticorps anti-Infliximab. Ce coffret permet aux praticiens de suivre au cours du temps l'évolution du taux plasmatique de ces 3 paramètres chez un patient.

## ECHANTILLONS

- Les dosages peuvent être effectués sur plasma ou sérum.
- Eviter d'utiliser des sérums lipémiques, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus de 1 fois.
- Le TNF $\alpha$  étant labile en solution, il est impératif d'utiliser les échantillons immédiatement après prélèvement, ou de les congeler pour une utilisation ultérieure.
- Afin de limiter toutes fixations non spécifiques, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

## PRINCIPE DES TESTS

### A) Dosage du TNF $\alpha$

Un anticorps monoclonal de capture anti-TNF $\alpha$  est adsorbé sur un support solide constitué de 4 barrettes de 8 micropuits (microplaque).

- Dans un premier temps, l'échantillon dilué est distribué dans un puits de la microplaque. S'il contient du TNF $\alpha$ , celui-ci va se fixer à l'anticorps de capture. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non-fixés.
- On ajoute ensuite un anticorps anti-TNF $\alpha$  biotinylé. Après incubation, un deuxième lavage permet d'éliminer l'excès d'anticorps.
- Ensuite, la streptavidine conjuguée à la peroxydase de Raifort est ajoutée. Elle se fixe au complexe « anticorps de capture / TNF $\alpha$  / anticorps anti-TNF $\alpha$  biotinylé » précédemment formé. Après incubation, un troisième lavage permet d'éliminer l'excès de conjugué.
- L'étape de chromogénèse est réalisée en déposant le substrat de l'enzyme : TMB (3,3',5,5' tétraméthylbenzidine). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité de TNF $\alpha$  présente dans l'échantillon.
- L'addition de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25 M) permet de bloquer la réaction enzymatique.
- La lecture des densités optiques à 450 nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.
- Une gamme étalon permet de définir la quantité de TNF $\alpha$  (pg/ml) présente dans l'échantillon.

### B) Dosage de l'Infliximab

L'antigène TNF $\alpha$  humain est adsorbé sur un support solide constitué de 4 barrettes de 8 micropuits (microplaque).

- Dans un premier temps, l'échantillon dilué est distribué dans un puits de la microplaque. S'il contient de l'Infliximab, celui-ci va se fixer au TNF $\alpha$  adsorbé. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non-fixés.
- On ajoute ensuite un anticorps anti-IgG humaines biotinylé. Après incubation, un deuxième lavage permet d'éliminer l'excès d'anticorps.
- Ensuite, la streptavidine conjuguée à la peroxydase de Raifort est ajoutée. Elle se fixe au complexe « TNF $\alpha$  / Infliximab / anti-IgG biotinylé » précédemment formé. Après incubation, un troisième lavage permet d'éliminer l'excès de conjugué.
- L'étape de chromogénèse est réalisée en déposant le substrat de l'enzyme: TMB (3,3',5,5' tétraméthylbenzidine). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité d'Infliximab présente dans l'échantillon.
- L'addition de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25 M) permet de bloquer la réaction enzymatique.
- La lecture des densités optiques à 450 nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.
- Une gamme étalon permet de définir la quantité d'Infliximab ( $\mu$ g/ml) présente dans l'échantillon.

### C) Dosage des anticorps anti-Infliximab

L'Infliximab est adsorbé sur un support solide constitué de 4 barrettes de 8 micropuits (microplaque).

- Dans un premier temps, l'échantillon dilué est distribué dans un puits de la microplaque. S'il contient des anticorps anti-Infliximab, ceux-ci vont se fixer à l'Infliximab adsorbé. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non-fixés.
- On ajoute ensuite de l'Infliximab biotinylé. Après incubation, un deuxième lavage permet d'éliminer l'excès d'anticorps.
- Ensuite, la streptavidine conjuguée à la peroxydase de Raifort est ajoutée. Elle se fixe au complexe « Infliximab adsorbé / anticorps anti-Infliximab / Infliximab biotinylé » précédemment formé. Après incubation, un troisième lavage permet d'éliminer l'excès de conjugué.
- L'étape de chromogénèse est réalisée en déposant le substrat de l'enzyme : TMB (3,3',5,5' tétraméthylbenzidine). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-Infliximab présente dans l'échantillon.
- L'addition de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25 M) permet de bloquer la réaction enzymatique.
- La lecture des densités optiques à 450 nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.
- Une gamme étalon permet de définir la quantité d'anticorps anti-Infliximab (ng/ml) présente dans l'échantillon.

### COMPOSITION DU COFFRET

Le coffret est composé de 4 familles de réactifs :

Couleur	Réactifs « dosage TNFα »	Réactifs « dosage Infliximab »	Réactifs « dosage anticorps anti-Infliximab »	Réactifs « communs »
bouchons des flacons de réactifs	Rouge	Bleu	Jaune	Vert, Blanc, Noir ou Violet
micropuits	Rouge	Bleu	Jaune	-

#### A) Réactifs spécifiques au dosage du TNFα

Une microplaque de 4 barrettes rouges amovibles, sensibilisée par un anticorps monoclonal anti-TNFα.	4 barrettes
Flacons « Etalon - TNF » lyophilisés, (pg/ml), à reconstituer en tampon de reprise. A diluer. Un seul flacon est à utiliser par série de tests. Ne pas réutiliser.	4 x 500µl
La quantité de TNFα est indiquée sur le flacon. Bouchons rouges « 1 ».	

Flacons de « contrôle positif - TNF » (pg/ml), lyophilisés, à reconstituer à l'aide du tampon de reprise. A diluer.	4 x 500µl
Un seul flacon est à utiliser par série de tests. Ne pas réutiliser.	
Les valeurs attendues (pg/ml) sont indiquées sur le flacon.	
Bouchons rouges.	
TNF CONTROL +	
Flacon d'anticorps biotinylé.	1 x 6ml
Prêt à l'emploi.	
Bouchon rouge.	
TNF Ab BIOT	
Flacon « Tampon de dilution des Etalons - TNFα ».	1 x 8ml
Prêt à l'emploi.	
Bouchon rouge.	
DIL CAL	
Flacon « Tampon de reprise ».	1 x 6ml
Prêt à l'emploi.	
Bouchon rouge.	
BUF A	

**Note :** Les titres des étalons et du contrôle positif pour le TNFα ont été standardisés par rapport à l'étalon international WHO: 88/786.

#### B) Réactifs spécifiques au dosage de l'Infliximab

Une microplaque de 4 barrettes bleues amovibles, sensibilisée par du TNFα humain.	4 barrettes
MP	
Cinq flacons « Etalon - Infliximab », (µg/ml). Prêts à l'emploi. Ils peuvent être utilisés plusieurs fois.	5 x 1,5ml
La quantité d'Infliximab est indiquée sur le flacon.	
Bouchons bleus.	
INF CAL n	
Flacon « contrôle positif - Infliximab », (µg/ml).	1 x 250µl
A diluer.	
Il peut être utilisé plusieurs fois.	
Les valeurs attendues (µg/ml) sont indiquées sur le flacon.	
Bouchon bleu.	
INF CONTROL +	
Flacon d'anticorps biotinylé.	1 x 6ml
Prêt à l'emploi.	
Bouchon bleu.	
INF Ab BIOT	

### C) Réactifs spécifiques au dosage des anticorps anti-Infliximab

Une microplaque de 4 barrettes jaunes amovibles, sensibilisée par de l'Infliximab. <b>MP</b>	4 barrettes
Cinq flacons « Etalon - anti-Infliximab », (ng/ml). <u>Prêts à l'emploi.</u> <u>Ils peuvent être utilisés plusieurs fois.</u> <b>La quantité en anticorps anti-Infliximab est indiquée sur le flacon.</b> <b>Bouchons jaunes.</b> <b>A-INF</b> <b>CAL</b> <b>n</b>	5 x 1,5ml
Flacon « contrôle positif – anti-Infliximab », (ng/ml). <u>A diluer.</u> <u>Il peut être utilisé plusieurs fois.</u> <b>Les valeurs attendues (ng/ml) sont indiquées sur le flacon.</b> <b>Bouchon jaune.</b> <b>A-INF</b> <b>CONTROL</b> <b>+</b>	1 x 1ml
Flacon d'anticorps biotinylé <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>Bouchon jaune.</b> <b>A-INF</b> <b>Ab</b> <b>BIOT</b>	1 x 6ml

### D) Réactifs communs aux trois dosages

Flacon de streptavidine conjuguée à la peroxydase. <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>Bouchon vert.</b> <b>CONJ</b> <b>HRP</b>	1 x 12ml
Flacon de Tampon Phosphate-Tween pH 7,2 (concentré 10x) - <u>A reconstituer en eau distillée.</u> <b>Bouchon blanc.</b> <b>BUF</b> <b>WASH</b> <b>10x</b>	1 x 100ml
Flacon de Substrat (TMB). <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>Bouchon noir.</b> <b>SUBS</b> <b>TMB</b>	1 x 12ml
Flacon de solution d'arrêt H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.25 M). <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>Bouchon violet.</b> <b>SOLN</b> <b>STOP</b>	1 x 15ml

#### MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Eau distillée
- Pipettes de précision
- Lecteur muni d'un filtre 450 nm
- Peigne de lavage 8 canaux.

#### STABILITE ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Tous les réactifs et les barrettes de puits sensibilisées doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas utiliser un coffret dont les dates de péremption sont dépassées.
- Après la première ouverture, conserver les barrettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence

du sachet déshydratant et les remettre immédiatement entre +2°C et +8°C.

- **Les étalons et le contrôle positif pour le dosage du TNF $\alpha$  doivent être utilisés de manière extemporanée. Ils doivent être utilisés dans l'heure qui suit leur reconstitution en « tampon de reprise ». Ils sont à usage unique et doivent donc être jetés après utilisation.**

#### PREPARATION DES REACTIFS

A l'exception du TDL, qui peut être préparé à l'avance, les réactifs doivent être préparés de manière extemporanée.

##### 1. Tampon de dilution et de lavage (TDL)

- Diluer le Tampon Phosphate-Tween concentré au 1/10 en eau distillée. **BUF** **WASH** **10x**

- Durée de conservation : 3 mois entre +2°C et +8°C (ne plus utiliser si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent)

*Remarque : en présence de cristaux dans la solution concentrée, placer le flacon 15 min. à +37°C avant utilisation.*

##### 2. Préparation des échantillons et des contrôles positifs

###### a) Echantillons

- **Dosage du TNF $\alpha$  et dosage des anticorps anti-Infliximab** : les diluer au 1/2 en tampon TDL (exemple : 130 $\mu$ l + 130 $\mu$ l de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

- **Dosage de l'Infliximab** : les diluer au 1/101 en tampon TDL (exemple : 10 $\mu$ l + 1ml de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

###### b) Contrôles positifs

- **Dosage du TNF $\alpha$**  : dans un premier temps, le contrôle positif lyophilisé doit être reconstitué en ajoutant 500 $\mu$ l de « tampon de reprise » [BUF-A] . Attendre 5 minutes, puis agiter vigoureusement. A nouveau, attendre 5 minutes et agiter vigoureusement.

- Dans un second temps, le contrôle positif « reconstitué » doit être dilué au 1/2 en tampon TDL (130 $\mu$ l + 130 $\mu$ l de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

- **Dosage de l'Infliximab** : le diluer au 1/101 en tampon TDL (exemple : 10 $\mu$ l + 1ml de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

- **Dosage des anticorps anti-Infliximab** : le diluer au 1/2 en tampon TDL (exemple : 130 $\mu$ l + 130 $\mu$ l de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

##### 3. Préparation de la gamme étalon pour le dosage du TNF.

Etant donné la labilité du TNF $\alpha$  en phase liquide il est nécessaire de préparer la gamme étalon de manière extemporanée à partir de l'étalon 1 lyophilisé [CAL].

- **Reconstituer l'étalon 1 TNF $\alpha$  lyophilisé, [CAL], avec 500 $\mu$ l de tampon de reprise [BUF-A].** Attendre 5 minutes, puis agiter vigoureusement. A nouveau, attendre 5 minutes et agiter vigoureusement.

- Diluer l'étalon initial reconstitué de ¼ en ¼ (en cascade) en tampon de dilution de l'étalon TNF $\alpha$ , [DIL-CAL], afin d'obtenir les 4 étalons de la gamme. Le tampon de dilution de l'étalon TNF $\alpha$ , [DIL-CAL], est utilisé comme « Etalon 6 ». Le schéma de dilution est présenté dans le tableau ci-dessous :

Etalon 1 « reconstitué »	Etalon 2	Etalon 3	Etalon 4	Etalon 5	Etalon 6
4000 pg/ml	1000 pg/ml	250 pg/ml	62,5 pg/ml	15,6 pg/ml	0 pg/ml
=	=	=	=	=	=
Etalon 1 lyophilisé [TNF-CAL]	100 $\mu$ l Etalon 1 « reconstitué »	100 $\mu$ l Etalon 2	100 $\mu$ l Etalon 3	100 $\mu$ l Etalon 4	[DIL-CAL]
+	+	+	+	+	
500 $\mu$ l de Tampon de reprise [BUF-A]	300 $\mu$ l de [DIL-CAL]	300 $\mu$ l de [DIL-CAL]	300 $\mu$ l de [DIL-CAL]	300 $\mu$ l de [DIL-CAL]	

- Les étalons 2 à 6 doivent être déposés dans la microplaque. L'étalon 1 « reconstitué » ne doit pas être déposé sur la microplaque.

#### 4. Utilisation des anticorps biotinylés - prêts à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et les transférer dans un tube à partir duquel se fera le dépôt.

#### 5. Utilisation du conjugué (streptavidine-HRP) - prêt à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et le transférer dans un tube à partir duquel se fera le dépôt.

#### 6. Utilisation du substrat - prêt à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et le transférer dans un tube opaque à partir duquel se fera le dépôt.

### PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Retirer tous les réactifs hors de leur logement de conditionnement et les ramener impérativement à température ambiante (+18°C / +25°C) au minimum une demi-heure avant de commencer le dosage.

- La température des réactifs peut influencer le résultat final.
- S'assurer que les plaques soient bien égouttées après chaque lavage.
- Ne pas utiliser les réactifs si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent.

Les étalons, les contrôles et le tampon de dilution des Etalons-TNF, sont d'origine humaine. Pour chacun, les recherches d'anticorps anti-HIV 1 et 2, anti-HCV et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. S'agissant de produits potentiellement infectieux, il est toutefois nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.

- Les étalons et le contrôle positif pour le dosage du TNF $\alpha$  doivent être utilisés de manière extemporanée. Ils doivent être utilisés dans l'heure qui suit leur

reconstitution en « tampon de reprise ». Ils sont à usage unique et doivent donc être jetés après utilisation.

- Les réactifs en solution (excepté la solution d'arrêt) contiennent comme agent de conservation, de l'azide de sodium à une concentration <0.1% (w/v) ou du ProClin® 300 à 0.02% (w/v). Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. L'azide de sodium peut former des mélanges explosifs lors de son élimination dans les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.

- Le coffret **LISA-TRACKER Premium Infliximab** (Theradiag) a été élaboré dans le respect des directives européennes 67/548/CEE et 1999/45/CE en ce qui concerne la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses.

- **LISA-TRACKER Premium Infliximab** (Theradiag) a été optimisé pour les conditions opératoires précisées dans cette notice. Le non-respect des dilutions, de la préparation des réactifs, du protocole ou la substitution d'un réactif par un autre produit peuvent affecter les performances finales du test.

### MODE OPERATOIRE

#### 1. Préparation du test

Utiliser la feuille de travail contenue dans le coffret pour noter la localisation des échantillons.

Pour chaque essai, et pour chaque spécificité de dosage, prévoir :

- 5 puits « étalon » (gamme de calibration)
- 1 puits « contrôle positif »
- 1 puits par échantillon

Dans le cas d'un dosage « simultané » placer les barrettes correspondantes à chaque spécificité sur un support de plaque.

#### Remarque :

Dans le cadre de l'utilisation d'un automate de dilution/répartition, placer les barrettes dans l'ordre suivant : dosage de l'Infliximab, dosage des anti-Infliximab puis dosage du TNF $\alpha$ .

#### 2. Incubation des étalons, des contrôles positifs et des échantillons

Déposer 100 $\mu$ l par puits pour chaque étalon.

Déposer 100 $\mu$ l par puits de chaque contrôle dilué.

Déposer 100 $\mu$ l d'échantillons dilués dans les puits correspondant aux spécificités recherchées.

Laisser incuber 60 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de dilution et de lavage (TDL) (300 $\mu$ l/puits).

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

#### 3. Incubation de l'anticorps biotinylé

Déposer 100 $\mu$ l d'anticorps biotinylé spécifique, prêt à l'emploi, dans tous les puits respectifs.

Incuber 60 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de dilution et de lavage (TDL) (300 $\mu$ l/puits).



Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

#### 4. Incubation du Conjugué

Déposer 100µl de conjugué prêt à l'emploi dans tous les puits.

Incuber 30 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de dilution et de lavage (TDL) (300µl/puits).

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

#### 5. Incubation du Substrat

Déposer 100µl de substrat dans tous les puits.

Incuber 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

#### 6. Arrêt de la réaction

Ajouter 100µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25 M) dans tous les puits.

#### 7. Lecture

Lire la densité optique de chaque puits avec un lecteur de microplaques muni d'un filtre 450nm au cours des 30 minutes suivant l'arrêt de la réaction.

### RESULTATS ET INTERPRETATION

#### A) Dosage du TNFα

- La densité optique (DO) de l'étalon 2 doit être au moins égale à 0.8.
- La valeur (pg/ml) du contrôle positif doit être comprise dans la fourchette d'acceptation inscrite sur le flacon.
- Tracer la courbe d'étalonnage (polynomiale) en portant en abscisse (axe des X) la quantité de TNFα (pg/ml) de chaque étalon et, en ordonnée (axe des Y), la DO correspondante.
- La quantité de TNFα de l'échantillon dosée peut être lue directement sur la courbe.
- Tout échantillon possédant une DO supérieure à celle de l'étalon 2 est considéré « hors-gamme ». Il peut être redilué afin d'estimer précisément la quantité de TNFα. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution.

#### B) Dosage de l'Infliximab

- La densité optique (DO) de l'étalon 1 doit être au moins égale à 0.8.
- La valeur (µg/ml) du contrôle positif doit être comprise dans la fourchette d'acceptation inscrite sur le flacon.
- Tracer la courbe d'étalonnage (polynomiale) en portant en abscisse (axe des X) la quantité d'Infliximab (µg/ml) de chaque étalon et, en ordonnée (axe des Y), la DO correspondante.
- La quantité d'Infliximab de l'échantillon dosée peut être lue directement sur la courbe.
- Tout échantillon possédant une DO supérieure à celle de l'étalon 1 est considéré « hors-gamme ». Il peut être redilué afin d'estimer précisément la quantité d'Infliximab. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution.

#### C) Dosage des anticorps anti-Infliximab

- La densité optique (DO) de l'étalon 1 doit être au moins égale à 0.8.
- La valeur (ng/ml) du contrôle positif doit être comprise dans la fourchette d'acceptation inscrite sur le flacon.
- Tracer la courbe d'étalonnage (polynomiale) en portant en abscisse (axe des X) la quantité d'anticorps anti-Infliximab (ng/ml) de chaque étalon et, en ordonnée (axe des Y), la DO correspondante.
- La quantité d'anticorps anti-Infliximab de l'échantillon dosée peut être lue directement sur la courbe.
- Tout échantillon possédant une DO supérieure à celle de l'étalon 1 est considéré « hors-gamme ». Il peut être redilué afin d'estimer précisément la quantité d'anticorps anti-Infliximab. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution.

### CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES DES DOSAGES

#### Limite de détection


Estimé à partir des 146 échantillons issus d'une population « individus sains ».

Limite de détection TNFα	Limite de détection Infliximab	Limite de détection Anti-Infliximab
10 pg/ml	0,1 µg/ml	10 ng/ml
Au 99 <sup>ème</sup> percentile	Au 95 <sup>ème</sup> percentile	Au 95 <sup>ème</sup> percentile

#### Plage de mesure

TNFα	Infliximab	Anti-Infliximab
10 pg/ml - 1000 pg/ml	0,1 µg/ml - 5 µg/ml	10 ng/ml - 200 ng/ml

#### Etude des substances interférentes

LISA-TRACKER Premium Infliximab () a été évalué sur une population de sérums contenant des substances potentiellement interférentes (cryoglobulines, facteurs rhumatoïdes, anticorps hétérophiles, taux élevés de triglycérides, de bilirubine, d'IgG et/ou d'IgM, de protéine C1q) et sur une population de sérums de patients présentant des maladies autoimmunes. Aucune interférence n'a été détectée.

#### Précision

Paramètres	Intra-essai (4 tests dans le même essai)		Inter-essais (4 tests dans 4 essais différents)	
	Valeur moyenne	CV (%)	Valeur moyenne	CV (%)
TNFα (pg/ml)	87	4.0	95	8.8
	110	3.0	128	10.2
	441	1.5	496	8.4
Infliximab (µg/ml)	0.13	1.6	0.14	7.3
	0.43	2.1	0.45	8.2
	1.90	1.6	1.92	3.5
Anti-Infliximab (ng/ml)	42	3.2	40	6.5
	67	1.8	67	8.6
	158	7.6	165	8.0

## Justesse

Le standard international WHO 88/786 pour le TNF $\alpha$  a été dilué à 1000pg/ml et testé en parallèle des essais de précision.

TNF $\alpha$ (pg/ml)	Intra-essai (4 tests dans le même essai)		Inter-essais (4 tests dans 4 essais différents)	
	Valeur moyenne	CV (%)	Valeur moyenne	CV (%)
Standard International WHO 88/786 dilué à 1000pg/ml	1000	3.5	1000	2.5

## LIMITES

Le dosage de l'Infliximab montre une réaction croisée vis-à-vis des sérums de patients traités par de l'Adalimumab et de l'Etanercept, qui sont 2 autres anti-TNF $\alpha$  couramment utilisés.

## BIBLIOGRAPHIE

**Ainsworth MA et al.** Tumor necrosis factor-alpha binding capacity and anti-infliximab antibodies measured by fluidphase radioimmunoassays as predictors of clinical efficacy of infliximab in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2008 Apr;103(4):944-8.

**Afif W et al.** Clinical Utility of Measuring Infliximab and Human Anti-Chimeric Antibody Concentrations in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:1133–1139.

**Arends S et al.** The formation of autoantibodies and antibodies to TNF- $\alpha$  blocking agents in relation to clinical response in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010 Sep-Oct;28(5):661-8.

**Baert F et al.** Influence of Immunogenicity on the Long-Term Efficacy of Infliximab in Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2003;348:601-8.

**Bartelds GM et al.** Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA.* 2011 Apr 13;305(14):1460-8.

**Bendtsen K.** Is There a Need for Immunopharmacologic Guidance of Anti-Tumor Necrosis Factor Therapies. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 63, No. 4, April 2011, pp 867–870.

**Candon S et al.** Clinical and biological consequences of immunization to infliximab in pediatric Crohn's disease. *Clin Immunol.* 2006 Jan;118(1):11-9.

**Choy et al.** Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis : a phase II double-blinded, randomized, dose escalating trial. *Rheumatology* 2002;41:1133-1137.

**Desroches M et al.** Treatment failure with antagonists of TNF- $\alpha$ : mechanisms and implications for the care of patients. *Eur. Cytokine Netw.,* Vol. 21 n° 4, December 2010, 226-31.

**DeVries et al.** Inefficacy of infliximab in ankylosing spondylitis is correlated with antibody formation. *Ann Rheum Dis.* 2007 Jan;66(1):133-4.

**Edrees et al.** Anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis: correlation of TNF-alpha serumlevel with clinical response and benefit from changing dose or frequency of infliximab infusions. *Clin Exp Rheumatol.* 2005 Jul-Aug;23(4):469-74.

**Jaminitski et al.** The presence or absence of antibodies to infliximab or adalimumab determines the outcome of switching to etanercept. *Rheum Dis.* 2011 Feb;70(2):284-8.

**Koren et al.** Recommendation on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products. *Journal of Immunological Methods,* 333 (2008) 1-9.

**Korswagen LA et al.** Venous and Arterial Thromboembolic Events in Adalimumab-Treated Patients With Anti-adalimumab Antibodies. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 63, No. 4, April 2011, pp 877–883.

**Krzsiesiek R et al.** Circulating Concentration of Infliximab and Response to Treatment in Ankylosing Spondylitis: Results From a Randomized Control Study. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)* Vol. 61, No. 5, May 15, 2009, pp 569–57.

**Marotte et al.** Circulating tumour necrosis factor-alpha bioactivity in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab: link to clinical response. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):R149-55.

**Mire-Sluis et al.** Recommendation for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of Immunological Methods,* 289 (2004) 1-16.

**Radstake TRDJ et al.** Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1739–1745.

**Ram Raj Singh, et al.** TNF $\alpha$  blockade in human diseases : mechanisms and future. *Clin.Immunol.,* 2008 February ; 126(2):121-136.

**Seow CH et al.** Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis. *Gut.* 2010 Jan;59(1):49-54.

**Sparado A et al.** Switching from infliximab or etanercept to adalimumab in resistant or intolerant patients with spondyloarthritis: a 4-year study. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Jun;49(6):1107-11.

**Steenholdt C, et al.** Cut-off levels and diagnostic accuracy of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology,* March 2011, Vol. 46, N°3, Pages 310-318.

**Takeuchi et al.** Baseline tumour necrosis factor alpha levels predict the necessity for dose escalation of infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Jul;70(7):1208-15.

**Ternant D et al.** An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of Infliximab. *Ther Drug Monit.,* 2006 April ; 28(2):169-174.

**Van den Bemt BJF et al.** Anti-infliximab antibodies are already detectable in most patients with rheumatoid arthritis halfway through an infusion cycle: an open-label pharmacokinetic cohort study. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2011.

**Vetterlein et al.** No antibodies to PEG detected in patients treated with certolizumab pegol. *Ann Rheum Dis* 2008;67(Suppl II):236.

**Wolbink GJ et al.** Development of Anti-infliximab Antibodies and Relationship to Clinical Response in Patients With Rheumatoid Arthritis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 54, No. 3, March 2006, pp711–715.

**SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE**

**A) Dilution des échantillons :**

Dosage du TNF $\alpha$	Dosage de l'Infliximab	Dosage des anticorps anti-Infliximab
au 1/2	au 1/101	au 1/2

**B) Dilution des contrôles positifs :**

Dosage du TNF $\alpha$	Dosage de l'Infliximab	Dosage des anticorps anti-Infliximab
au 1/2 *	au 1/101	au 1/2

\* le contrôle positif lyophilisé est à reconstituer avec 500 $\mu$ l de « tampon de reprise », puis à diluer au 1/2 en TDL.

**C) Préparation de la gamme étalon TNF $\alpha$  :**

Remarque : la gamme étalon TNF $\alpha$  doit être fabriquée à partir de l'étalon 1 TNF $\alpha$  et utilisée dans l'heure.

Etalon 1 « reconstitué »	Etalon 2	Etalon 3	Etalon 4	Etalon 5	Etalon 6
4000 pg/ml	1000 pg/ml	250 pg/ml	62,5 pg/ml	15,6 pg/ml	0 pg/ml
=	=	=	=	=	=
Etalon 1 lyophilisé [TNF-CAL]	100 $\mu$ l Etalon 1 « reconstitué »	100 $\mu$ l Etalon 2	100 $\mu$ l Etalon 3	100 $\mu$ l Etalon 4	[DIL-CAL]
+	+	+	+	+	
500 $\mu$ l de Tampon de reprise [BUF-A]	300 $\mu$ l de [DIL-CAL]	300 $\mu$ l de [DIL-CAL]	300 $\mu$ l de [DIL-CAL]	300 $\mu$ l de [DIL-CAL]	

**D) Mode opératoire :**

Réactifs	Mode opératoire
Etalons*	100 $\mu$ l / puits
Contrôles positifs dilués	
Echantillons dilués	
Incubation	1 h à température ambiante
Lavage**	Laver 3 fois en tampon de dilution/lavage (TDL) : 3 x 300 $\mu$ l / puits
Anticorps secondaires biotinylés	100 $\mu$ l / puits ( <b>réactifs spécifiques</b> )
Incubation	1 h à température ambiante
Lavage**	Laver 3 fois en tampon de dilution/lavage (TDL) : 3 x 300 $\mu$ l / puits
Streptavidine-HRP	100 $\mu$ l / puits
Incubation	30 minutes à température ambiante
Lavage**	Laver 3 fois en tampon de dilution/lavage (TDL) : 3 x 300 $\mu$ l / puits
Substrat (TMB)	100 $\mu$ l / puits
Incubation	15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière
Solution « stop »	100 $\mu$ l / puits

\* Les étalons pour le dosage du TNF $\alpha$  doivent être fabriqués de manière extemporanée. En revanche, les étalons pour le dosage de l'Infliximab et des anticorps anti-Infliximab sont prêts à l'emploi.

\*\* Eliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

E) Exemples de configuration de dosage :

a) 26 sérums à doser en Infliximab, anti-Infliximab et TNF $\alpha$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>Etalon 5</b>	Sérum 3	Sérum 11	Sérum 19	<b>Etalon 5</b>	Sérum 3	Sérum 11	Sérum 19	<b>Etalon 6</b>	Sérum 3	Sérum 11	Sérum 19
<b>B</b>	<b>Etalon 4</b>	Sérum 4	Sérum 12	Sérum 20	<b>Etalon 4</b>	Sérum 4	Sérum 12	Sérum 20	<b>Etalon 5</b>	Sérum 4	Sérum 12	Sérum 20
<b>C</b>	<b>Etalon 3</b>	Sérum 5	Sérum 13	Sérum 21	<b>Etalon 3</b>	Sérum 5	Sérum 13	Sérum 21	<b>Etalon 4</b>	Sérum 5	Sérum 13	Sérum 21
<b>D</b>	<b>Etalon 2</b>	Sérum 6	Sérum 14	Sérum 22	<b>Etalon 2</b>	Sérum 6	Sérum 14	Sérum 22	<b>Etalon 3</b>	Sérum 6	Sérum 14	Sérum 22
<b>E</b>	<b>Etalon 1</b>	Sérum 7	Sérum 15	Sérum 23	<b>Etalon 1</b>	Sérum 7	Sérum 15	Sérum 23	<b>Etalon 2</b>	Sérum 7	Sérum 15	Sérum 23
<b>F</b>	<b>C+</b>	Sérum 8	Sérum 16	Sérum 24	<b>C+</b>	Sérum 8	Sérum 16	Sérum 24	<b>C+</b>	Sérum 8	Sérum 16	Sérum 24
<b>G</b>	Sérum 1	Sérum 9	Sérum 17	Sérum 25	Sérum 1	Sérum 9	Sérum 17	Sérum 25	Sérum 1	Sérum 9	Sérum 17	Sérum 25
<b>H</b>	Sérum 2	Sérum 10	Sérum 18	Sérum 26	Sérum 2	Sérum 10	Sérum 18	Sérum 26	Sérum 2	Sérum 10	Sérum 18	Sérum 26

Dosage  
Infliximab

Dosage anti-  
Infliximab

Dosage  
TNF $\alpha$

b) 2 patients à doser en Infliximab, anti-Infliximab et TNF $\alpha$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>Etalon 5</b>	<b>Etalon 5</b>	<b>Etalon 6</b>									
<b>B</b>	<b>Etalon 4</b>	<b>Etalon 4</b>	<b>Etalon 5</b>									
<b>C</b>	<b>Etalon 3</b>	<b>Etalon 3</b>	<b>Etalon 4</b>									
<b>D</b>	<b>Etalon 2</b>	<b>Etalon 2</b>	<b>Etalon 3</b>									
<b>E</b>	<b>Etalon 1</b>	<b>Etalon 1</b>	<b>Etalon 2</b>									
<b>F</b>	<b>C+</b>	<b>C+</b>	<b>C+</b>									
<b>G</b>	Sérum 1	Sérum 1	Sérum 1									
<b>H</b>	Sérum 2	Sérum 2	Sérum 2									

Dosage  
Infliximab

Dosage anti-  
Infliximab

Dosage  
TNF $\alpha$















c) 26 sérums à doser en anti-Infliximab

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>Etalon 5</b>	Sérum 3	Sérum 11	Sérum 19								
<b>B</b>	<b>Etalon 4</b>	Sérum 4	Sérum 12	Sérum 20								
<b>C</b>	<b>Etalon 3</b>	Sérum 5	Sérum 13	Sérum 21								
<b>D</b>	<b>Etalon 2</b>	Sérum 6	Sérum 14	Sérum 22								
<b>E</b>	<b>Etalon 1</b>	Sérum 7	Sérum 15	Sérum 23								
<b>F</b>	<b>C+</b>	Sérum 8	Sérum 16	Sérum 24								
<b>G</b>	Sérum 1	Sérum 9	Sérum 17	Sérum 25								
<b>H</b>	Sérum 2	Sérum 10	Sérum 18	Sérum 26								

Dosage anti-Infliximab

INDEX DES SYMBOLES

	Déclaration de conformité CE		Nombre de tests
	Test ELISA		Consulter les instructions d'utilisation
	Référence produit		Limites de température
	Numéro de Lot		Risque biologique
	Date d'expiration		Contient de l'azide de sodium
	Dispositif de Diagnostic <i>In Vitro</i>		A reconstituer



**Siège social**

4-6 bld de Beaubourg,  
Actipôle Bat 25, Croissy Beaubourg  
77435 Marne la Vallée Cx2  
France

Tél : 01 64 62 10 12  
Fax : 01 64 62 09 66

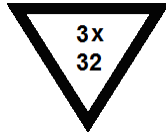
E-mail : [support@theradiag.com](mailto:support@theradiag.com)  
Internet : [www.theradiag.com](http://www.theradiag.com)






# LISA-TRACKER Premium Infliximab

REF


**LT1001**

**English**

## DEFINITION

**LISA-TRACKER Premium Infliximab** () is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for the quantitative determination of human TNF $\alpha$ , Infliximab (anti-TNF $\alpha$ ) and anti-Infliximab antibodies in human serum samples. These tests can be separately or simultaneously done by following the standardized assay protocols.

## DIAGNOSTIC VALUE

Anti-TNF $\alpha$  are therapeutic agents widely used to treat patients with various inflammatory diseases. Infliximab is one of the anti-TNF $\alpha$  recommended for the treatment of the rheumatoid arthritis, Crohn's disease, ankylosing spondylitis, etc. This chimeric monoclonal antibody is able to bind TNF $\alpha$ . It blocks the action of TNF $\alpha$  responsible for the inflammatory state. However, during the treatment, some patients can develop antibodies against Infliximab. Consequently, the plasmatic level of anti-TNF $\alpha$  decreases and simultaneous the disease symptoms reappear or increase.

**LISA-TRACKER Premium Infliximab** () allows the detection of 3 parameters: TNF $\alpha$ , Infliximab and anti-Infliximab antibodies. This kit allows the physician to monitor the level of these 3 parameters in patient sera.

## SAMPLES COLLECTION AND HANDLING

- The test should be performed on serum or on plasma.
- Lipemic sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- The TNF $\alpha$  being unstable in solution, it is imperative to use samples immediately after blood taking. If determination is not performed immediately, samples should be frozen.
- To avoid any non-specific binding, samples which have been frozen for more than 6 months or which are cloudy, should be centrifuged and filtered.

## ASSAY PRINCIPLE

### A. Dosage of TNF $\alpha$

A monoclonal anti-TNF $\alpha$  antibody is coated onto a polystyrene microtiter plate (4 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the antibody coated well, which allows to bind. After incubation, unbound proteins are removed by washing.
- Anti-TNF $\alpha$  biotinylated antibodies is added. After incubation, unbound antibodies are removed by washing.

### 26 determinations

- Then horseradish peroxidase labelled streptavidin is added. The streptavidin binds to the complex formed with biotinylated anti-TNF $\alpha$  antibodies. After incubation, the wells are washed again to eliminate any excess of conjugate.
- The bound enzyme is revealed by addition of substrate TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine). The colour intensity is proportional to the amount of TNF $\alpha$ .
- Adding H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25M) allows to stop the enzymatic reaction.
- After stopping the reaction by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25M), the optical density is read by a spectrophotometer at 450nm.

A range of calibration allows to define the quantity of TNF $\alpha$  of each patient samples expressed in pg/mL.

### B. Dosage of Infliximab

The TNF $\alpha$  is coated onto a polystyrene microtiter plate (4 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the antibody coated well, which allows to bind. After incubation, unbound proteins are removed by washing.
- Anti-human IgG biotinylated antibodies is added. After incubation, unbound antibodies are removed by washing
- Then horseradish peroxidase labelled streptavidin is added. The streptavidin binds to the complex formed with biotinylated anti-IgG antibodies. After incubation, the wells are washed again to eliminate any excess of conjugate.
- The bound enzyme is revealed by addition of substrate TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine). The colour intensity is proportional to the amount of Infliximab.
- Adding H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25M) allows to stop the enzymatic reaction.
- After stopping the reaction by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25M), the optical density is read by a spectrophotometer at 450nm.

A range of calibration allows to define the quantity of Infliximab of each patient samples expressed in  $\mu$ g/mL.

### C. Dosage of anti-Infliximab

The Infliximab is coated onto a polystyrene microtiter plate (4 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the antibody coated well, which allows to bind. After incubation, unbound proteins are removed by washing.
- Biotinylated infliximab is added. After incubation, unbound antibodies are removed by washing
- Then horseradish peroxidase labelled streptavidin is added. The streptavidin binds to the complex formed with biotinylated Infliximab. After incubation, the wells are washed again to eliminate any excess of conjugate.
- The bound enzyme is revealed by addition of substrate TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine). The colour intensity is proportional to the amount of anti-Infliximab antibodies.

- Adding H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25M) allows to stop the enzymatic reaction.
- After stopping the reaction by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25M), the optical density is read by a spectrophotometer at 450nm.

A range of calibration allows to define the quantity of anti-Infliximab antibodies of each patient samples expressed in ng/mL.

## REAGENTS

4 reagent families :

Color	TNF $\alpha$ reagents	Infliximab reagents	anti-Infliximab antibodies reagents	Common reagents
cap of vials	Red	Blue	Yellow	Green, White, Black or Purple
microwells	Red	Blue	Yellow	-

### A) Specific reagents for the TNF $\alpha$ determination

4 strips of individual breakaway red wells coated with a monoclonal anti-TNF $\alpha$ antibodies. <b>MP</b>	4 strips
« Standard - TNF $\alpha$ » lyophilized vial (pg/ml), To reconstitute with Buffer A. To dilute. <u>A single vial is to be used for each serie of tests. Do not reuse.</u> <b>The quantity of TNF <math>\alpha</math> is indicated on the vial label.</b> <b>Red cap « 1 »</b> <b>TNF CAL</b>	4 x 500 $\mu$ L
« Positive control - TNF $\alpha$ » (pg/mL), lyophilized vial. To reconstitute with Buffer A. To dilute. <u>A single vial is to be used for each serie of tests. Do not reuse.</u> <b>The quantity of TNF <math>\alpha</math> is indicated on the vial label.</b> <b>Red cap</b> <b>TNF CONTROL +</b>	4 x 500 $\mu$ L
Biotinylated antibody vial. Ready to use. <b>Red cap</b> <b>TNF Ab BIOT</b>	1 x 6mL
« Standard dilution buffer - TNF $\alpha$ » vial. Ready to use. <b>Red cap</b> <b>DIL CAL</b>	1 x 8mL
Buffer A vial. Ready to use. <b>Red cap</b> <b>BUF A</b>	1 x 6mL

**Note : Standards and positive control for TNF $\alpha$  titer are standardized against the WHO reference: 88/786.**

### B) Specific reagents for the Infliximab determination

4 strips of individual breakaway blue wells coated with human TNF $\alpha$ . <b>MP</b>	4 strips
5 vials of « Infliximab » Standards, ( $\mu$ g/mL). Ready to use. The vials can be reused several times. <b>The quantity of Infliximab is indicated on the vial label.</b> <b>Blue cap</b>	5 x 1,5mL
« Positive control - Infliximab », ( $\mu$ g/mL). To dilute. The vials can be reused several times. <b>The quantity of Infliximab is indicated on the vial label.</b> <b>Blue cap</b> <b>INF CONTROL +</b>	1 x 250 $\mu$ L
Biotinylated antibody vial. Ready to use. <b>Blue cap</b> <b>INF Ab BIOT</b>	1 x 6mL

### C) Specific reagents for the anti-Infliximab antibodies determination

4 strips of individual breakaway yellow wells coated with Infliximab. <b>MP</b>	4 strips
5 vials of « anti-Infliximab » Standards, (ng/mL). Ready to use. The vials can be reused several times. <b>The quantity of anti-Infliximab is indicated on the vial label.</b> <b>Yellow cap</b> <b>A-INF CAL n</b>	5 x 1,5mL
« Positive control - anti-infliximab », (ng/mL). To dilute. The vial can be reused several times. <b>The quantity of anti-Infliximab is indicated on the vial label.</b> <b>Yellow cap</b> <b>A-INF CONTROL +</b>	1 x 1mL
Biotinylated antibody vial. Ready to use. <b>Yellow cap</b> <b>A-INF Ab BIOT</b>	1 x 6mL

## D) Common reagents

HRP labelled Streptavidin. <u>Ready to use.</u> <b>Green cap</b>	<b>CONJ</b>   <b>HRP</b>	1 x 12mL
Phosphate-Tween Buffer pH 7,2 (10x) – <u>To reconstitute with distilled water.</u> <b>White cap</b>	<b>BUF</b>   <b>WASH</b>   <b>10x</b>	1 x 100mL
Substrate (TMB). <u>Ready to use.</u> <b>Black cap</b>	<b>SUBS</b>   <b>TMB</b>	1 x 12mL
Stop solution - H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.25 M). <u>Ready to use.</u> <b>Purple cap</b>	<b>SOLN</b>   <b>STOP</b>	1 x 15mL

### MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- distilled water
- precision pipettes
- microplate spectrophotometer with 450 nm filter
- 8 channel pipettes

### STABILITY AND STORAGE

- Store reagents and micro-wells at +2°C/+8°C in their own package.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- Store unused strips into their plastic bag with the desiccant.
- Store all components immediately after use again at +2°C/+8°C.
- **The standard and the positive control for the dosage of the TNF $\alpha$  must be used in an extemporaneous way. They must be used within the hour after their reconstitution in buffer A. They are single-used and must be discarded after use.**

### SETUP

Except the TDL, which can be prepared in advance, all reagents must be prepared extemporaneously.

#### 1. Dilution and Wash buffer (TDL)

- Dilute concentrated Phosphate-Tween Buffer 1/10 in distilled water.

<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>10x</b>
------------	-------------	------------

- Shelf life : 3 month at +2°C/+8°C (avoid to use if signs of contamination or other visible changes occur).

*NB. If there are crystals in the concentrated solution, warm the bottle up to +37°C for 15 minutes before use.*

#### 2. Preparation of samples and positive controls

##### a. Samples

##### - TNF $\alpha$ and anti-Infliximab determination

- Dilute to 1/2 in TDL

Ex : 130 $\mu$ L sample + 130 $\mu$ L TDL

- Vortex vigorously.

##### - Infliximab determination

- Dilute to 1/101 in TDL

Ex : 10 $\mu$ L sample + 1mL TDL

- Vortex vigorously.

## b. Positive controls

### - TNF $\alpha$ determination

- The lyophilized control should be reconstituted with 500 $\mu$ L of buffer A, [BUF-A]. Wait 5 minutes, then mix vigorously. Repeat this agitation step.

- Then, dilute the reconstituted positive control to 1/2 in TDL.

Ex : 130 $\mu$ L positive control + 130 $\mu$ L TDL

Vortex vigorously.

### - Infliximab determination

- Dilute to 1/101 in TDL

Ex : 10 $\mu$ L positive control + 1mL TDL

- Vortex vigorously.

### - anti-Infliximab determination

- Dilute to 1/2 in TDL

Ex : 130 $\mu$ L positive control + 130 $\mu$ L TDL

- Vortex vigorously.

### 3. Preparation of the calibration range for the TNF

Considering the TNF $\alpha$  lability in solution, the calibration range should be prepared just before performed the test.

- The lyophilized TNF $\alpha$  standard, [TNF-CAL], must be reconstituted with 500 $\mu$ L of buffer A, [BUF-A]. Wait 5 minutes, then mix vigorously. Repeat this agitation step.

- Then proceed to the serial dilution to 1/4 of the standard into the standard buffer, [DIL-CAL]. The standard buffer, [DIL-CAL], will be used as standard 6. The dilution protocol is presented in the table below.

« reconstituted » Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Standard 6
4000 pg/mL	1000 pg/mL	250 pg/mL	62,5 pg/mL	15,6 pg/mL	0 pg/mL
=	=	=	=	=	=
Standard 1 lyophilized [TNF-CAL]	100 $\mu$ L « reconstituted » Standard 1	100 $\mu$ L Standard 2	100 $\mu$ L Standard 3	100 $\mu$ L Standard 4	[DIL-CAL]
+	+	+	+	+	
500 $\mu$ L Buffer A [BUF-A]	300 $\mu$ L [DIL-CAL]	300 $\mu$ L [DIL-CAL]	300 $\mu$ L [DIL-CAL]	300 $\mu$ L [DIL-CAL]	

**Note : only standards 2 to 6 should be used for the calibration curves.**

#### 4. Use of ready-to-use biotinylated antibody.

- Estimate the amount required for handling and transfer to a tube.

#### 5. Use of ready-to-use HRP Streptavidin conjugate.

- Estimate the amount required for handling and transfer to a tube.

#### 6. Use of ready-to-use substrate.

- Estimate the amount required for handling and transfer to a dark tube.

## PRECAUTIONS

---

Unpack all reagents in order to let them warm at room temperature (+18°C/+25°C) at least half an hour before starting the test.

⚠ The temperature of the reagents can impact the final result.

Check that all plates are well drained after each wash.

Avoid to use reagents if signs of contamination or other visible changes occur.

*Human sources for the preparation of standards, controls and the standard dilution buffer-TNF, have been tested and found negative for antibody to HIV 1 and 2, antibody to hepatitis C virus and hepatitis B virus antigen. Nevertheless, no test can offer complete assurance that HIV, hepatitis B virus or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled as potentially infective materials.*

**The standard and the positive control for the dosage of the TNF $\alpha$  must be used extemporaneously. They must be used within the hour after their reconstitution in buffer A. They are single-use and must be discarded after use.**

Reagents in solution (except for substrate buffer and stop solution) contain less of 0.1% (w/v) sodium azide and 0.02% (w/v) of Proclin® 300. Do not eat and avoid contact with skin and eyes. Azide can form explosive mixtures in copper or lead piping. Rinse thoroughly after flushing.

**LISA-TRACKER Premium Infliximab** (Theradiag) has been developed according CE directives 67/548/EEC and 1999/45/EC relating to the classification, packaging and labeling of dangerous preparations.

**LISA-TRACKER Premium Infliximab** (Theradiag) has been optimized for the use as describe in this procedure. Do not substitute other manufacturer's reagents. Dilution or adulteration of these reagents may also affect the performance of the test. Close adherence to the test procedure will assure optimal performance.

## METHOD

---

### 1. Preparing the test

Use the work sheet to note the sample locations.

Set out:

- 5 "standard" wells
- 1 well for positive control
- 1 well for each sample

For a simultaneous testing of the 3 parameters, detach the exact number of wells needed. Return unused wells to plastic pouch provided in the kit, with the desiccant bag.

#### Remark :

If a dispensing/diluting device is used, place the specific wells in the following order : dosage of Infliximab, dosage of anti-Infliximab then dosage of TNF $\alpha$ .

### 2. Samples, positive controls and standards incubation

Add 100  $\mu$ L of standards, diluted controls or samples.

Incubate for 60 minutes at room temperature (+18°C/+25°C).

*Wash step:*

Remove the content of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300 $\mu$ L of TDL buffer.

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess of liquid.

### 3. Incubation of biotinylated antibodies

Add 100 $\mu$ L of specific biotinylated antibodies in identified wells.

Incubate for 60 minutes at room temperature (+18°C/+25°C).

*Wash step:*

Remove the content of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300 $\mu$ L of dilution and washing buffer.

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess of liquid.

### 4. Incubation of Conjugate

Add 100 $\mu$ L of conjugate.

Incubate for 30 minutes at room temperature (+18°C/+25°C).

*Wash step:*

Remove the content of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300 $\mu$ L of dilution and washing buffer.

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess of liquid.

### 5. Incubation of Substrate

Add 100 $\mu$ L substrate into each well.

Incubate for 15 minutes at room temperature (+18°C/+25°C), in the dark.

### 6. Stop of the reaction

Add 100 $\mu$ L of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25M) to each well.

### 7. Reading

Read the optical density of each well at 450nm within 30 minutes after stopping reaction.

## RESULTS AND INTERPRETATION

---

### A. Dosage of TNF $\alpha$

- The OD of the standard 2 should be at least 0.8.
- The positive control value should be comprised into the range indicated on the vial label.
- Trace the standard curve (polynomial curve), plotting the units of the 5 standard points (pg/mL) along the abscissa (X axis) and the corresponding OD values along the ordinate (Y axis).
- The TNF $\alpha$  value can be directly read on the curve.
- Samples with values greater than that of standard 2 may be diluted to obtain a more precise result. The number of units should be multiplied by the selected dilution.

### B. Dosage of Infliximab

- The OD of the standard 1 should be at least 0.8.
- The positive control value should be comprised into the range indicated on the vial label.
- Trace the standard curve (polynomial curve), plotting the units of the 5 standard points ( $\mu$ g/mL) along the abscissa (X axis) and the corresponding OD values along the ordinate (Y axis).
- The Infliximab value can be directly read on the curve.
- Samples with values greater than that of standard 1 may be diluted to obtain a more precise result. The number of units should be multiplied by the selected dilution.



### C. Dosage of anti-Infliximab

- The OD of the standard 1 should be at least 0.8.
- The positive control value should be comprised into the range indicated on the vial label.
- Trace the standard curve (polynomial curve), plotting the units of the 5 standard points (ng/mL) along the abscissa (X axis) and the corresponding OD values along the ordinate (Y axis).
- The anti-Infliximab value can be directly read on the curve.
- Samples with values greater than that of standard 1 may be diluted to obtain a more precise result. The number of units should be multiplied by the selected dilution.

### CHARACTERISTICS AND PERFORMANCE OF THE TEST

#### Limits of detection / threshold values

Estimated on 146 healthy patient samples.

Limit of detection TNF $\alpha$	Limit of detection Infliximab	Limit of detection Anti-Infliximab
10 pg/mL 99 <sup>th</sup> percentile	0.1 $\mu$ g/mL 95 <sup>th</sup> percentile	10 ng/mL 95 <sup>th</sup> percentile

#### Assay range

TNF $\alpha$	Infliximab	Anti-Infliximab
10 pg/mL - 1000 pg/mL	0,1 $\mu$ g/mL - 5 $\mu$ g/mL	10 ng/mL - 200 ng/mL

#### Interfering Substances Study

LISA-TRACKER Premium Infliximab (Theradiag) was evaluated to assess potential cross reactivity to other antibodies and interference from serum components (cryoglobulins, rheumatoid factors, heterophilic antibodies, high levels of triglycerides, bilirubin, IgG and/or IgM, and C1q proteins, autoantibodies). No interference was detected.

#### Precision

Parameters	Intra-run (4 tests in a same assay)		Inter-runs (4 tests 4 different assays)	
	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)
TNF $\alpha$ (pg/ml)	87	4.0	95	8.8
	110	3.0	128	10.2
	441	1.5	496	8.4
Infliximab ( $\mu$ g/ml)	0.13	1.6	0.14	7.3
	0.43	2.1	0.45	8.2
	1.90	1.6	1.92	3.5
Anti- Infliximab (ng/ml)	42	3.2	40	6.5
	67	1.8	67	8.6
	158	7.6	165	8.0

### Reference material precision

The WHO 88/786 International standard for TNF $\alpha$  was diluted at 1000pg/mL and tested during the precision tests.

TNF $\alpha$ (pg/ml)	Intra-run (4 tests in a same assay)		Inter-runs (4 tests 4 different assays)	
	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)
International Standard WHO 88/786 at 1000pg/mL	1000	3.5	1000	2.5

### LIMITS

Sera of patient treated with Adalimumab or Etanercept, 2 others anti-TNF $\alpha$ , may cross-reacted with Infliximab test.

## REFERENCES

---

- Ainsworth MA et al.** Tumor necrosis factor-alpha binding capacity and anti-infliximab antibodies measured by fluidphase radioimmunoassays as predictors of clinical efficacy of infliximab in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2008 Apr;103(4):944-8.
- Afif W et al.** Clinical Utility of Measuring Infliximab and Human Anti-Chimeric Antibody Concentrations in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:1133–1139.
- Arends S et al.** The formation of autoantibodies and antibodies to TNF- $\alpha$  blocking agents in relation to clinical response in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010 Sep-Oct;28(5):661-8.
- Baert F et al.** Influence of Immunogenicity on the Long-Term Efficacy of Infliximab in Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2003;348:601-8.
- Bartelds GM et al.** Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA.* 2011 Apr 13;305(14):1460-8.
- Bendtsen K.** Is There a Need for Immunopharmacologic Guidance of Anti-Tumor Necrosis Factor Therapies. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 63, No. 4, April 2011, pp 867–870.
- Candon S et al.** Clinical and biological consequences of immunization to infliximab in pediatric Crohn's disease. *Clin Immunol.* 2006 Jan;118(1):11-9.
- Choy et al.** Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis : a phase II double-blinded, randomized, dose escalating trial. *Rheumatology* 2002;41:1133-1137.
- Desroches M et al.** Treatment failure with antagonists of TNF- $\alpha$ : mechanisms and implications for the care of patients. *Eur. Cytokine Netw.,* Vol. 21 n° 4, December 2010, 226-31.
- DeVries et al.** Inefficacy of infliximab in ankylosing spondylitis is correlated with antibody formation. *Ann Rheum Dis.* 2007 Jan;66(1):133-4.
- Edrees et al.** Anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis: correlation of TNF-alpha serumlevel with clinical response and benefit from changing dose or frequency of infliximab infusions. *Clin Exp Rheumatol.* 2005 Jul-Aug;23(4):469-74.
- Jaminitski et al.** The presence or absence of antibodies to infliximab or adalimumab determines the outcome of switching to etanercept. *Rheum Dis.* 2011 Feb;70(2):284-8.
- Koren et al.** Recommendation on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products. *Journal of Immunological Methods,* 333 (2008) 1-9.
- Korswagen LA et al.** Venous and Arterial Thromboembolic Events in Adalimumab-Treated Patients With Anti-adalimumab Antibodies. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 63, No. 4, April 2011, pp 877–883.
- Krzysiek R et al.** Circulating Concentration of Infliximab and Response to Treatment in Ankylosing Spondylitis: Results From a Randomized Control Study. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)* Vol. 61, No. 5, May 15, 2009, pp 569–57.
- Marotte et al.** Circulating tumour necrosis factor-alpha bioactivity in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab: link to clinical response. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):R149-55.
- Mire-Sluis et al.** Recommendation for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of Immunological Methods,* 289 (2004) 1-16.
- Radstake TRDJ et al.** Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1739–1745.
- Ram Raj Singh, et al.** TNF $\alpha$  blockade in human diseases : mechanisms and future. *Clin.Immunol.,* 2008 February ; 126(2):121-136.
- Seow CH et al.** Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis. *Gut.* 2010 Jan;59(1):49-54.
- Sparado A et al.** Switching from infliximab or etanercept to adalimumab in resistant or intolerant patients with spondyloarthritis: a 4-year study. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Jun;49(6):1107-11.
- Steenholdt C, et al.** Cut-off levels and diagnostic accuracy of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology,* March 2011, Vol. 46, N°3, Pages 310-318.
- Takeuchi et al.** Baseline tumour necrosis factor alpha levels predict the necessity for dose escalation of infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Jul;70(7):1208-15.
- Ternant D et al.** An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of Infliximab. *Ther Drug Monit.,* 2006 April ; 28(2):169-174.
- Van den Bemt BJF et al.** Anti-infliximab antibodies are already detectable in most patients with rheumatoid arthritis halfway through an infusion cycle: an open-label pharmacokinetic cohort study. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2011.
- Vetterlein et al.** No antibodies to PEG detected in patients treated with certolizumab pegol. *Ann Rheum Dis* 2008;67(Suppl II):236.
- Wolbink GJ et al.** Development of Anti-infliximab Antibodies and Relationship to Clinical Response in Patients With Rheumatoid Arthritis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 54, No. 3, March 2006, pp711–715.

## SUMMARY OF METHOD

### A. Sample Dilution

TNF $\alpha$	Infliximab	Anti-Infliximab
1/2	1/101	1/2

### B. Positive Control Dilution

TNF $\alpha$	Infliximab	Anti-Infliximab
1/2 *	1/101	1/2

- The lyophilized positive control should be reconstituted with 500 $\mu$ L of Buffer A then the solution should be diluted with TDL (1/2).

### C. TNF $\alpha$ calibration range

Rk : the TNF $\alpha$  calibration range should be elaborate with the standard 1 and must be used within the hour after reconstitution.

« reconstituted » Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Standard 6
4000 pg/mL	1000 pg/mL	250 pg/mL	62,5 pg/mL	15,6 pg/mL	0 pg/mL
=	=	=	=	=	=
Standard 1 lyophilized [TNF-CAL]	100 $\mu$ L « reconstituted » Standard 1	100 $\mu$ L Standard 2	100 $\mu$ L Standard 3	100 $\mu$ L Standard 4	[DIL-CAL]
+	+	+	+	+	
500 $\mu$ L Buffer A [BUF-A]	300 $\mu$ L [DIL-CAL]	300 $\mu$ L [DIL-CAL]	300 $\mu$ L [DIL-CAL]	300 $\mu$ L [DIL-CAL]	

### D. Procedure

Reagents	Procedure
Standards*	100 $\mu$ L / wells
Diluted positive controls	
Diluted samples	
Incubation	1 h at room temperature
Washing**	Wash 3 times with TDL buffer : 3 x 300 $\mu$ L / wells
Biotinylated antibodies	100 $\mu$ L / wells ( <b>specific reagents</b> )
Incubation	1 h at room temperature
Washing**	Wash 3 times with TDL buffer : 3 x 300 $\mu$ L / wells
HRP-Streptavidin	100 $\mu$ L / wells
Incubation	30 minutes at room temperature
Washing**	Wash 3 times with TDL buffer : 3 x 300 $\mu$ L / wells
Substrate (TMB)	100 $\mu$ L / wells
Incubation	15 minutes at room temperature. Protect from light.
Stop solution	100 $\mu$ L / wells

\* Standards for the TNF $\alpha$  determination should be prepared extemporaneously.

Standards for Infliximab and anti-Infliximab determination are ready to use.

\*\* Dry the microplate by tapping it gently on a towel to eliminate the excess of liquid.

## E. Configuration of the assays

### a. 26 sera for Infliximab, anti-Infliximab and TNF assay

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19	Standard 6	Sera 3	Sera 11	Sera 19
<b>B</b>	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20	Standard 5	Sera 4	Sera 12	Sera 20
<b>C</b>	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21	Standard 4	Sera 5	Sera 13	Sera 21
<b>D</b>	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22	Standard 3	Sera 6	Sera 14	Sera 22
<b>E</b>	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23	Standard 2	Sera 7	Sera 15	Sera 23
<b>F</b>	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24
<b>G</b>	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25
<b>H</b>	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26

Infliximab assay

anti-Infliximab assay

TNF $\alpha$  assay

### b. 2 sera for Infliximab, anti-Infliximab and TNF assay

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Standard 5	Standard 5	Standard 6									
<b>B</b>	Standard 4	Standard 4	Standard 5									
<b>C</b>	Standard 3	Standard 3	Standard 4									
<b>D</b>	Standard 2	Standard 2	Standard 3									
<b>E</b>	Standard 1	Standard 1	Standard 2									
<b>F</b>	C+	C+	C+									
<b>G</b>	Sera 1	Sera 1	Sera 1									
<b>H</b>	Sera 2	Sera 2	Sera 2									

Infliximab assay

anti-Infliximab assay








TNF $\alpha$  assay

**c. 26 sera for anti-Infliximab determination**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19								
<b>B</b>	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20								
<b>C</b>	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21								
<b>D</b>	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22								
<b>E</b>	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23								
<b>F</b>	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24								
<b>G</b>	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25								
<b>H</b>	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26								

anti-Infliximab assay

**SYMBOLS USED**

- |   |                                   |   |                        |
|---|-----------------------------------|---|------------------------|
|  | EC Declaration of conformity      |  | Number of test         |
|  | ELISA Test                        |  | Consult Instructions   |
| <b>REF</b>  | Catalogue number                  |  | Temperature limitation |
| <b>LOT</b>  | Lot Number                        |  | Biological hazard      |
|  | Expiry Date                       | <b>CONT</b> <b>NaN<sub>3</sub></b>  | Contains sodium azide  |
| <b>IVD</b>  | <i>In Vitro</i> Diagnostic Device | <b>RCNS</b>   | Reconstitute with      |



**Office**  
 4-6 bld de Beaubourg,  
 Actipôle Bat 25, Croissy Beaubourg  
 77435 Marne la Vallée Cx2  
 France

Tél : 33 1 64 62 10 12  
 Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : [support@theradiag.com](mailto:support@theradiag.com)  
 Internet : [www.theradiag.com](http://www.theradiag.com)

