



Quantum Blue[®] Adalimumab

Quantitative
Lateral Flow Assay

For In Vitro Diagnostic Use.

LF-TLAD25 25 tests

LF-TLAD10 10 tests

Release Date: 2022-04-05
Version A3

INTENDED USE

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

For laboratory use.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The test is designed for the selective measurement of adalimumab 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. Adalimumab present in the sample will bind to the gold conjugate. A monoclonal antibody, highly specific for adalimumab, is immobilized on the analytical membrane and will capture the complex of gold conjugate and the adalimumab 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-TLAD25	LF-TLAD10		
Test Cassette	25 pieces	10 pieces	B-LFTLAD-TC	vacuum-sealed in a foil bag pouch
Chase Buffer	1 bottle 10 mL	1 bottle 10 mL	B-LFTLAD-CB	Ready to use
Controls Low* / High*	2 vials 0.5 mL	2 vials 0.5 mL	B-LFTLAD-CONSET	Ready to use
RFID Chip Card	1 piece	1 piece	B-LFTLAD-RCC	White plastic card
RFID Chip Card	1 piece	1 piece	B-LFTLAD-RCC15	Green plastic card
Barcode Card	1 piece	1 piece	B-LFTLAD-BCC	2D Barcode plastic card

Table 1

* The controls contain lot specific amounts of adalimumab. 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 contain 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 (16-28 °C).
- All reagents, including test cassettes in foil pouches, and test samples must be equilibrated to room temperature 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 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 the instructions carefully prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, handled or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- Please note that there are two generations of readers: The Quantum Blue® Reader 2nd Generation with serial numbers between 1000 and 3000 (QB2) and Quantum Blue® Reader 3rd Generation with serial numbers above 3000 (QB3G).
- The QB2 must be switched on and programmed for the Quantum Blue® Adalimumab assay. Load the assay method using the RFID chip card (B-LFTLAD-RCC or B-LFTLAD-RCC15) before starting the assay (see Quantum Blue® Reader manual).
- The QB3G must be switched on and programmed for the Quantum Blue® Adalimumab assay either by using the barcode card (B-LFTLAD-BCC) or by selecting from the test menu (Fast Track Mode only). For more information please refer to the Quantum Blue® Reader manual.
- Use the RFID chip card (QB2) / barcode card (QB3G) 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 35 µg/mL (up to 500 µg/mL) may be additionally diluted 1:20 in chase buffer (1:400, 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.

Undiluted serum samples can be stored refrigerated at 2-8 °C for up to 14 days. For longer storage, keep undiluted serum samples at ≤-20 °C. These samples are stable for at least 3 months at ≤-20 °C.

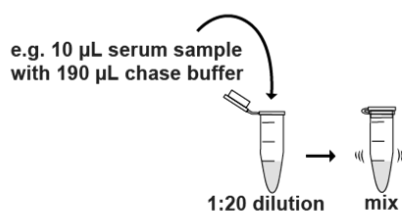
ASSAY PROCEDURE

For the assay use only reagents equilibrated to room temperature (16-28 °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

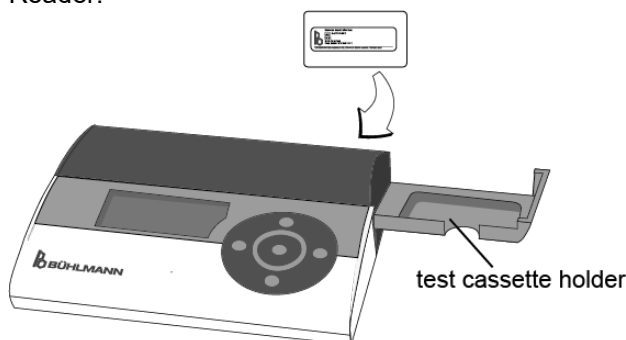
Prior to measurement dilute the serum sample 1:20 with chase buffer (B-LFTLAD-CB) (e.g. mix 10 µL serum sample with 190 µL chase buffer) in a test tube and mix it by vortexing, pipetting or shaking.



2. Lateral flow assay procedure and readout

QB2

Two alternative methods can be loaded from the respective RFID chip card: B-LFTLAD-RCC15 (with internal timer) or B-LFTLAD-RCC (without internal timer). Select one of the RFID chip cards before starting the experiments. Load the test method from the RFID chip card on the Quantum Blue® Reader.



QB3G

Two different modes of operation are available from BÜHLMANN to measure samples with the QB3G: Fast Track Mode or Fail Safe Mode. Before starting the assay, please inform yourself in which operation mode your reader is working.

The test method can be loaded from the barcode card (Fast Track and Fail Safe Mode) or, if previously used, selected from the test menu (Fast Track Mode only). Measurements can be performed with or without an internal timer in the Fast Track Mode. Measurements in the Fail Safe Mode can be performed with internal timer only.

Follow the instructions provided on the screen of the QB3G. You may also refer to the QB3G Quick Guides for the Fast Track and Fail Safe Mode.



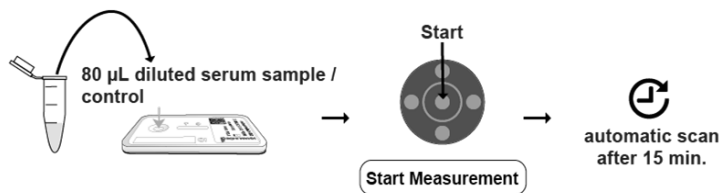
2.1. Method with internal timer

QB2: use the green RFID chip card B-LFTLAD-RCC15

QB3G (Fast Track Mode): when prompted by the QB3G to skip the incubation time, select “NO”

QB3G (Fail Safe Mode): default setting

- Unpack the test cassette. Allow the test cassette to equilibrate in the laboratory environment for at least 2 minutes
- Add 80 µL of the diluted serum sample onto the sample loading port of the test cassette (figure 1D).
- Insert the test cassette into the test cassette holder of the Quantum Blue® Reader.
- Close the test cassette holder and start the measurement by pressing the start button on the QB2 or the “Start Measurement” option on the QB3G.
- The scan starts automatically after 15 minutes.
- For low / high controls: Repeat step 2.1 using 80 µL of control instead of diluted serum.



2.2. Method without internal timer

QB2: Use the white RFID chip card B-LFTLAD-RCC

QB3G (Fast Track Mode): when prompted by the QB3G to skip the incubation time, select “YES”

QB3G (Fail Safe Mode): option not available

- Unpack the test cassette. Allow the test cassette to equilibrate in the laboratory environment for at least 2 minutes.
- Add 80 µL of the diluted serum sample onto the sample loading port of the test cassette (figure 1D).
- Incubate for 15 ± 1 minutes (set a timer manually).
- Insert the test cassette into the test cassette holder of the Quantum Blue® Reader.
- Scan the test cassette with the Quantum Blue® Reader immediately by pressing the start button on the QB2 or the “Start Measurement” option on the QB3G.
- For low / high controls: Repeat step 2.2 using 80 µL of control instead of diluted serum.



Remark: Please refer to your Quantum Blue® Reader manual to learn about the basic functions and how to initialize and operate the Quantum Blue® Readers, especially how to select test methods and how to load lot-specific parameters from the RFID chip card (QB2) / barcode card (QB3G) on the Quantum Blue® Reader. 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

- Quantum Blue® Adalimumab is standardized against the WHO International Standard for Adalimumab (NIBSC code: 17/236). The value of the reference material is transferred to product calibrators allowing generation of test results traceable to the standard. The 95% confidence interval of the combined uncertainty of the product calibrators is lower than 20.0%, the combined uncertainty of the controls lower than 25.0%.
- The Quantum Blue® Reader uses a lot-specific calibration curve to calculate the adalimumab concentration. The measuring range is between 1.3 and 35.0 µg/mL.

VALIDATION OF RESULTS

- For a valid test result, the control line (C) must be visible in all cases (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 adalimumab 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 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 Quantum Blue® Adalimumab 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 Quantum Blue® Adalimumab 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 specific preconfigured threshold after 15 minutes of incubation time, the test result is invalid and the Quantum Blue® Adalimumab assay has to be repeated using another test cassette.

LIMITATIONS

- The reagents supplied with this kit are optimized to measure trough levels of adalimumab in diluted serum samples.
- Samples from patients switching from certolizumab (Cimzia®) therapy should not be tested directly with Quantum Blue® Adalimumab, as cross-reactivity may occur. Allow certolizumab (Cimzia®) trough levels to fall at least below 2.9 µg/mL.

- Quantum Blue® Adalimumab 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. 1).
- Adalimumab trough levels between 5 and 12 µg/mL are considered the consensus therapeutic window for best treatment efficacy. Optimal trough levels, however, may be individual and may differ depending on the treatment target as well as the disease phenotype (ref. 1).

RESULT INTERPRETATION

The determination of adalimumab trough levels in patient serum samples can support therapy monitoring of IBD patients. Generally, trough levels in serum that reach a value of 5 µg/mL and above, during therapy maintenance, correlate well with clinical remission (ref. 2, 3), low CRP values, as well as endoscopic healing of the gut mucosa (ref. 4, 5). A plateau for endoscopic remission was demonstrated for adalimumab trough levels above 12 µg/mL (ref. 5).

Values below 5 µg/mL

Sub-therapeutic adalimumab levels in serum suggest pharmacokinetic failure. Therapy adjustment, taking into account available clinical and laboratory findings, should be considered (ref. 1).

Values between 5-12 µg/mL

Therapeutic adalimumab trough levels may serve as an indication for continuing therapy with the current dosage, in patients in IBD disease remission (ref. 1).

Values above 12 µg/mL

Supra-therapeutic adalimumab trough levels may serve as an indication for dose reduction in conjunction with the clinical picture, in patients in IBD disease remission (ref. 1).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The following performance characteristics have been established with the Quantum Blue® Reader 2nd Generation and were verified on the Quantum Blue® Reader 3rd Generation.

Indicated performance characteristics apply for both Reader generations.

Method comparison

Bias at 5 µg/mL: 0.3% (95% CI: -8.1-6.8%)

Bias at 12 µg/mL: 13.8% (95% CI: 7.9-21.7%)

The method comparison study was performed according to the CLSI guideline EP09-A3. One hundred and thirty (130) clinical and contrived (3.1% of total) samples were measured in triplicate with the Quantum Blue® Adalimumab test, resulting in 390 values, and with a commercially available adalimumab ELISA test (ref. 6). Measurements were performed over four days using two Quantum Blue® Adalimumab test cassette lots. The results are summarized in figure 2.

Recovery: 80-90%

Six patient specimens including adalimumab levels close to clinical decision points were spiked with 5.44 µg/mL adalimumab 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 3.

Repeatability: 16.6-28.6% CV

Within-laboratory precision: 19.1-29.9%CV

Repeatability and within-laboratory precision were established according to the CLSI guideline EP05-A3. Four, pooled, patient serum samples with adalimumab 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 4.

Reproducibility: 25.6-26.1% 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. Four, pooled, patient serum samples with adalimumab 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 5.

Limit of Blank (LoB): 0.2 µg/mL

The LoB was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with four, negative, patient 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): 0.8 µg/mL

The LoD was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with four adalimumab patient samples with concentrations of 0.3, 0.4, 0.5 and 0.9 µg/mL adalimumab. The samples were measured over three days in five replicates each day to produce 60 values. The study was performed with two test cassette lots. The LoD was calculated using parametric analysis.

Lower Limit of Quantitation (LLoQ): 1.3 µg/mL

Upper Limit of Quantitation (ULoQ): 35.0 µg/mL

The LLoQ was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with six clinical samples; the ULoQ with three clinical and two contrived samples. The samples were measured over at least three days, in five replicates each day to produce 90 (LLoQ) and 75 (ULoQ) values. The study was performed with two test cassette lots. A precision profile was generated for the samples and the LoQ was determined as the intersection of the profile with the <30% CV acceptance criterion.

Linear range: 1.0-35.0 µg/mL

The linear range of the Quantum Blue® Adalimumab test was determined according to the CLSI guideline EP06-A. Two sample pools, low and high, were blended to obtain a total of 15 concentration levels 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 concentration interval in which coefficients of the second and third order non-linear fits were determined as not significant. The results are summarized in figure 3.

Samples with elevated adalimumab levels (up to 500 µg/mL) may be additionally diluted 1:20 in chase buffer (1:400, in

total) to obtain linear results within the measuring range of the assay. A series of samples with adalimumab concentrations in the range of 7 to 800 µg/mL was generated by blending a high, contrived sample with negative serum. The samples were diluted twice 1:20 in chase buffer and measured in five replicates with the Quantum Blue® Adalimumab test. A linear range was determined for adalimumab levels between 7 and 502 µg/mL.

High dose hook effect

No high dose hook effect was observed for samples with adalimumab concentrations of up to 787 µg/mL. The presence of a high dose hook effect was tested on three independent test cassette lots.

INTERFERING SUBSTANCES

The susceptibility of the Quantum Blue® Adalimumab 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 blocker

TNFα blockers were tested at concentrations exceeding lowest, recommended drug trough levels by three-fold. No interference was detected with the following substances at the listed concentrations: infliximab (Remicade®, 10 µg/mL), and golimumab (Simponi®, 10 µg/mL). Interference was detected with etanercept (Enbrel®) with the 95% confidence interval of the interference trend exceeding acceptable bias at 2.7 µg/mL. Samples from patients switching from certolizumab (Cimzia®) should not be directly tested using the Quantum Blue® Adalimumab test. Allow certolizumab (Cimzia®) trough levels to fall at least below 2.9 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), hemoglobin (200 mg/dL), TNFα (5.0 ng/mL) and rheumatoid factors (823 IU/mL).

Immunosuppressive co-medication

No interference was detected with the following substances, up to the listed concentrations: azathioprine (60 µmol/L, 3 µg/mL), 6-mercaptopurine (37 µmol/L, 2 µg/mL), and methotrexate (1363 µmol/L, 68 µg/mL).

ANWENDUNGSZWECK

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

Für Laborzwecke geeignet.

PRINZIP DER METHODE

Der Test dient zur selektiven Messung von Adalimumab mittels „Sandwich-Immunassay“. Goldkolloide wurden für diesen Zweck an rekombinanten Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNFα) konjugiert. Beim Auftragen der Probe wird das Goldkonjugat auf der Testkassette vom „Conjugate Release Pad“ in das Reaktionssystem freigesetzt. Das in der Probe vorhandene Adalimumab bindet an das Konjugat.

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 TNFα/Goldkonjugat wird an der Kontrolllinie (C) gebunden. Die Signalintensitäten der Testlinie (T) und der Kontrolllinie (C) werden mit dem Quantum Blue® Reader quantitativ gemessen.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge		Art-Nr.	Kommentar
	LF-TLAD25	LF-TLAD10		
Test-kassette	25 Stück	10 Stück	B-LFTLAD-TC	In einem vakuumdichten Folienbeutel
Laufpuffer	1 Flasche 10 mL	1 Flasche 10 mL	B-LFTLAD-CB	Gebrauchsfertig
Kontrollen Tief* / Hoch*	2 Fläschchen 0.5 mL	2 Fläschchen 0.5 mL	B-LFTLAD-CONSET	Gebrauchsfertig
RFID Chipkarte	1 Stück	1 Stück	B-LFTLAD-RCC	Weisse Kunststoffkarte
RFID Chipkarte	1 Stück	1 Stück	B-LFTLAD-RCC15	Grüne Kunststoffkarte
Barcode-karte	1 Stück	1 Stück	B-LFTLAD-BCC	2D-Barcode-plastikkarte

Tabelle 1

* Die Kontrollen enthalten lotspezifische Adalimumabkonzentrationen. 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 basierend auf den nachfolgenden Kriterien das Testkit hinsichtlich dem Zustand der Testkassette und deren Verpackung zu überprüfen:

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

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

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 µL und 100-1000 µL
- Eppendorf-Reaktionsgefässe (oder Gleichwertiges) zur Verdünnung der Serumproben
- Quantum Blue® Reader bei BÜHLMANN erhältlich (Art.-Nr.: BI-POCTR-ABS)
- Handschuhe und Labormantel

VORSICHTSMASSNAHMEN

Sicherheitsmassnahmen

- Keiner der Kitbestandteile enthält Material menschlicher Herkunft.
- Alle Patientenproben sollten gemäss „Guter 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 (16-28 °C) durchgeführt werden.
- Die Reagenzien einschliesslich der Testkassetten in den Folienbeuteln und der Testproben müssen vor dem Beginn des Tests auf Raumtemperatur 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. 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 runde Probenauftragsstelle oder das Messfenster der Probe darf nicht verunreinigt werden durch Hautkontakt, andere Flüssigkeiten usw. (Abbildung 1D).
- Die Testkassette muss bei der Durchführung des Tests 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.
- Bitte beachten Sie, dass es zwei Generationen von Readern gibt: Den Quantum Blue® Reader der 2. Generation mit Seriennummern zwischen 1000 und 3000 (QB2) und den Quantum Blue® Reader der 3. Generation mit Seriennummern über 3000 (QB3G).
- Der QB2 muss vor Beginn des Tests eingeschaltet und für den Quantum Blue® Adalimumab Test programmiert werden. Laden Sie die Testmethode mithilfe der RFID Chipkarte (B-LFTLAD-RCC oder B-LFTLAD-RCC15) bevor Sie den Test starten (siehe Handbuch des Quantum Blue® Readers).
- Der QB3G muss eingeschaltet und für den Quantum Blue® Adalimumab Test programmiert werden, indem entweder die Barcodekarte (B-LFTLAD-BCC) verwendet oder aus dem Testmenü (nur Fast Track Mode) ausgewählt wird. Weitere Informationen sind im Handbuch des Quantum Blue® Readers aufgeführt.
- Benutzen Sie die RFID Chipkarte (QB2) / Barcodekarte (QB3G), 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 35 µg/mL (bis 500 µg/mL) können zusätzlich 1:20 in Laufpuffer verdünnt werden (insgesamt 1:400), 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.

Unverdünnte Serumproben können gekühlt bei 2-8 °C für bis zu 14 Tage aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrung lagern Sie die unverdünnten Serumproben bei ≤-20 °C. Diese Proben sind bei ≤-20 °C mindestens 3 Monate stabil.

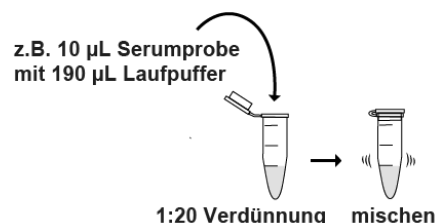
TESTDURCHFÜHRUNG

Für den Test sollten nur Reagenzien verwendet werden, die auf Raumtemperatur gebracht wurden (16-28 °C). Die Testkassette muss vor Testbeginn aus dem Folienbeutel genommen werden.

Der Arbeitsablauf gliedert sich in 2 Schritte:

1. Verdünnung der Serumproben mit Laufpuffer

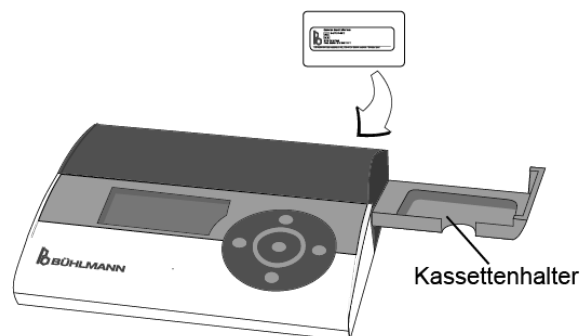
Die Serumprobe wird vor der Messung mit Laufpuffer (B-LFTLAD-CB) in einem Teströhrchen 1:20 verdünnt (z.B. 10 µL Serumprobe mit 190 µL Laufpuffer mischen) und durch vortexen, pipettieren oder schütteln gemischt.



2. Lateral-Flow Testablauf und Quantifizierung

QB2

Von der jeweiligen RFID Chipkarte können zwei alternative Methoden geladen werden: B-LFTLAD-RCC15 (mit integriertem Timer) oder B-LFTLAD-RCC (ohne integrierten Timer). Wählen Sie eine der RFID Chipkarten aus, bevor Sie das Experiment beginnen. Laden Sie die Testmethode von der RFID Chipkarte auf den Quantum Blue® Reader.



QB3G

Zur Probenmessung mit dem QB3G sind zwei verschiedene Betriebsmodi von BÜHLMANN verfügbar: Fast Track Mode oder Fail Safe Mode. Bitte informieren Sie sich vor Beginn des Tests darüber, in welchem Betriebsmodus Ihr Lesegerät arbeitet.

Die Testmethode kann von der Barcodekarte geladen (Fast Track und Fail Safe Mode) bzw., falls zuvor verwendet, aus dem Testmenü ausgewählt werden (nur Fast Track Mode). Im Fast Track Mode können die Messungen mit oder ohne internen Zeitmesser durchgeführt werden. Im Fail Safe Mode können die Messungen nur mit einem internen Zeitmesser durchgeführt werden.

Folgen Sie den Anweisungen, die auf der Anzeige des QB3G angezeigt sind. Weitere Informationen zum Fast Track und Fail Safe Mode finden Sie in den Kurzanleitungen des QB3G.



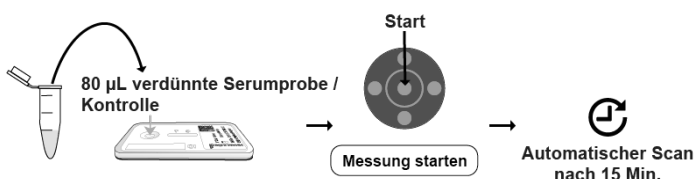
2.1. Methode mit integriertem Timer

QB2: Verwenden Sie die grüne RFID Chipkarte B-LFTLAD-RCC15.

QB3G (Fast Track Mode): Bei Aufforderung des QB3G die Inkubationszeit zu überspringen, „NEIN“ auswählen.

QB3G (Fail Safe Mode): Standardeinstellung

- Packen Sie die Testkassette aus. Lassen Sie die Testkassette mindestens 2 Minuten lang in der Laborumgebung equilibrieren.
- Tragen sie 80 µL der verdünnten Serumprobe auf die runde Probenauftragsstelle der Testkassette auf (Abbildung 1D).
- Die Testkassette in den Testkassettenhalter des Quantum Blue® Readers legen.
- Den Testkassettenhalter schliessen und die Messung durch Drücken der Starttaste am QB2 oder der Option „Messung starten“ am QB3G starten.
- Der Lesevorgang startet automatisch nach 15 Minuten.
- Für die Kontrollen Tief / Hoch: Wiederholen Sie den Schritt 2.1 mit 80 µL Kontrollen anstelle der verdünnten Serumprobe.



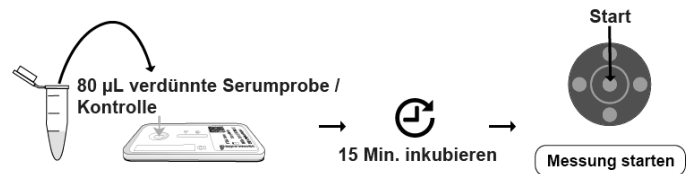
2.2. Methode ohne integrierten Timer

QB2: Verwenden Sie die weisse RFID Chipkarte B-LFTLAD-RCC.

QB3G (Fast Track Mode): Bei Aufforderung des QB3G die Inkubationszeit zu überspringen, „JA“ auswählen.

QB3G (Fail Safe Mode): Option nicht verfügbar

- Packen Sie die Testkassette aus. Lassen Sie die Testkassette mindestens 2 Minuten lang in der Laborumgebung equilibrieren.
- Tragen sie 80 µL der verdünnten Serumprobe auf die runde Probenauftragsstelle der Testkassette auf (Abbildung 1D).
- Die Testkassette für 15 ± 1 Minuten inkubieren. (einen Timer manuell einstellen).
- Die Testkassette in den Testkassettenhalter des Quantum Blue® Readers legen.
- Die Testkassette sofort mit dem Quantum Blue® Reader durch Drücken der Starttaste am QB2 oder der Option „Messung starten“ am QB3G scannen.
- Für die Kontrollen Tief / Hoch: Wiederholen Sie den Schritt 2.2 mit 80 µL Kontrollen anstelle der verdünnten Serumprobe.



Anmerkung: Informationen zu den Grundfunktionen sowie der Initialisierung und dem Betrieb der Quantum Blue® Reader, insbesondere zur Auswahl der Testmethoden und zum Laden chargenspezifischer Parameter von der RFID-Chipkarte (QB2) / Barcodekarte (QB3G) am Quantum Blue® Reader sind im Handbuch des Quantum Blue® Readers enthalten. Die Testkassette muss mit der richtigen Orientierung (mit dem Ablesefenster zuerst) in den Quantum Blue® Reader eingelegt werden (Abbildung 1D).

QUALITÄTSKONTROLLE

- Falls die Ergebnisse des Testes nicht innerhalb der erwarteten Leistungsmerkmale 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

- Quantum Blue® Adalimumab ist gegen den internationalen WHO-Standard für Adalimumab (NIBSC-Code: 17/236) standardisiert. Der Wert des Referenzmaterials wird auf Produktkalibratoren übertragen, wodurch auf den Standard rückführbare Testergebnisse erzeugt werden können. Der 95%-Konfidenzintervall der kombinierten Abweichung der Produktkalibratoren liegt unter 20,0% und die kombinierte Abweichung der Kontrollen unter 25,0%.
- Der Quantum Blue® Reader verwendet eine Lot-spezifische Standardkurve zur Berechnung der

Adalimumabkonzentration. Der Messbereich liegt zwischen 1,3 und 35,0 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 Adalimumab nicht nachweisbar ist. Falls die Testbande (T) nach der Inkubation ersichtlich ist wird die Adalimumabkonzentration 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 Quantum Blue® Adalimumab 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 Quantum Blue® Adalimumab 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 vorkonfigurierten Wert unterschreitet, ist das Resultat ungültig und der Quantum Blue® Adalimumab Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die in diesem Kit gelieferten Reagenzien sind für die Bestimmung des Adalimumab Medikamentenspiegel in verdünnten Serumproben optimiert.
- Proben von Patienten, die von einer Certolizumab (Cimzia®)-Therapie umgestellt werden, sollten nicht direkt mit dem Quantum Blue® Adalimumab Test untersucht werden, da eine Kreuzreaktivität auftreten kann. Lassen Sie den Medikamentenspiegel von Certolizumab (Cimzia®) mindestens auf unter 2,9 µg/mL fallen.
- Die Ergebnisse des Quantum Blue® Adalimumab-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. 1).
- Medikamentenspiegel von Adalimumab zwischen 5 und 12 µg/mL gelten allgemein als das therapeutische Fenster für eine optimale Therapiewirksamkeit. Optimale Medikamentenspiegel können jedoch je nach dem Behandlungsziel und dem Krankheitsphänotyp individuell verschieden sein (Ref. 1).

INTERPRETATION DER RESULTATE

Die Bestimmung der Medikamentenspiegel von Adalimumab in Serumproben von Patienten kann die Therapieüberwachung von CED-Patienten unterstützen. Im Allgemeinen korrelieren Medikamentenspiegel im Serum, die einen Wert von 5 µg/mL und mehr erreichen, gut mit der klinischen Remission (Ref. 2, 3), niedrigen CRP-Werten und der endoskopischen Heilung der Darmschleimhaut (Ref. 4, 5). Ein Plateau für die endoskopische Remission wurde bei Adalimumab Medikamentenspiegeln von über 12 µg/mL gefunden (Ref. 5).

Werte unterhalb 5 µg/mL

Subtherapeutische Adalimumab 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. 1).

Werte zwischen 5 und 12 µg/mL

Therapeutische Adalimumab Medikamentenspiegel können ein Indiz dafür sein, die Therapie mit der derzeitigen Dosierung bei CED-Patienten in Krankheitsremission fortzusetzen (Ref. 1).

Werte über 12 µg/mL

Supratherapeutische Adalimumab Medikamentenspiegel können ein Indiz dafür sein, die Dosis unter Berücksichtigung des Krankheitsbilds bei CED-Patienten in Krankheitsremission zu reduzieren (Ref. 1).

LEISTUNGSMERKMALE

Die folgenden Leistungsmerkmale wurden mit einem Quantum Blue® Reader der 2. Generation erstellt und mit einem Quantum Blue® Reader der 3. Generation verifiziert. Die Daten daher gelten für beide Readergenerationen.

Methodenvergleich

Verzerrung bei 5 µg/mL: 0,3% (95% CI: -8,1-6,8%)

Verzerrung bei 12 µg/mL: 13,8% (95% CI: 7,9-21,7%)

Die Methodenvergleichsstudie wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP09-A3 durchgeführt. Einhundertdreissig (130) klinische und künstlich hergestellte (3,1% der Gesamtzahl) Proben wurden in Triplikaten mit dem Quantum Blue® Adalimumab Test (ergab 390 Werte) und einem kommerziellen Adalimumab ELISA Test gemessen (Ref. 6). Die Messungen wurden über einen Zeitraum von vier Tagen mit zwei Quantum Blue® Adalimumab-Testkassettenlots durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

Recovery: 80-90%

Sechs Patientenproben mit Adalimumabspiegeln nahe klinischer Entscheidungspunkte, wurden mit 5,44 µg/mL Adalimumab in Kalibratormaterial auf Serumbasis gespiked. Die „Basisproben“ wurden mit der entsprechenden Menge an filtriertem und gepooltem normalen Humanserum gespiked. Die „Basisproben“ und „Basis- + Spikeproben“ wurden in zehn Replikaten mit einem Reagenzienlot gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Wiederholbarkeit: 16,6-28,6% CV

Präzision innerhalb des Labors (Within-laboratory precision): 19,1-29,9% CV

Die Wiederholbarkeit und die Präzision innerhalb des Labors wurden gemäss CLSI Richtlinie EP05-A3 ermittelt. Vier gepoolte Patientenserumproben mit Adalimumabkonzentrationen, die den Messbereich des Assays 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 4 zusammengefasst.

Reproduzierbarkeit: 25,6-26,1% CV

Die Reproduzierbarkeit wurde gemäss CLSI Richtlinie EP05-A3 mit Messungen auf drei verschiedenen Quantum Blue® Reader-Geräten mit drei verschiedenen Testkassettenlots ermittelt. Vier gepoolte Patientenserumproben mit Adalimumabkonzentrationen, 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 5 zusammengefasst.

Limit of Blank (LoB): 0,2 µg/mL

Der LoB wurde gemäss CLSI Richtlinie EP17-A2 mit vier negativen Patientenserumproben ermittelt. Die Proben wurden täglich über einen Zeitraum von drei Tagen in fünf Replikaten gemessen, um 60 Blankwerte zu erhalten. Die Studie wurde mit zwei Testkassettenlots durchgeführt. Der LoB wurde mittels nichtparametrischer Analyse berechnet.

Limit of Detection (LoD): 0,8 µg/mL

Der LoD wurde gemäss CLSI Richtlinie EP17-A2 mit vier Patientenproben mit Adalimumabkonzentrationen von 0,3; 0,4; 0,5 und 0,9 µg/mL ermittelt. Die Proben wurden täglich über einen Zeitraum von drei Tagen in fünf Replikaten gemessen, um 60 Werte zu erhalten. Die Studie wurde mit zwei Testkassettenlots durchgeführt. Der LoD wurde mittels parametrischer Analyse berechnet.

Limit of Quantification (LoQ)

Unterer LoQ: 1,3 µg/mL

Oberer LoQ: 35,0 µg/mL

Der untere LoQ wurde gemäss CLSI Richtlinie EP17-A2 mit sechs klinischen Proben; der obere LoQ mit drei klinischen und zwei künstlich hergestellten Proben ermittelt. Die Proben wurden täglich über einen Zeitraum von mindestens drei Tagen in fünf Replikaten gemessen, um 90 untere LoQ- und 75 obere LoQ-Werte zu erhalten. Die Studie wurde mit zwei Testkassettenlots durchgeführt. Es wurde ein Präzisionsprofil der Proben erstellt und der LoQ wurde als Schnittpunkt des Profils mit dem Akzeptanzkriterium von < 30% CV bestimmt.

Linearer Bereich: 1,0-35,0 µg/mL

Der lineare Bereich des Quantum Blue® Adalimumab Tests wurde gemäss CLSI Richtlinie EP06-A bestimmt. Zwei Probenpools mit niedriger und hoher Konzentration wurden vermengt, um insgesamt 15 Konzentrationsstufen zu erhalten, die den erwarteten Messbereich abdecken und überschreiten. Die Vermengungen wurden mit jeweils zehn Replikaten auf zwei Testkassettenlots evaluiert. Der lineare

Bereich wurde als das Intervall der Konzentrationslevels definiert, in denen die Koeffizienten der nichtlinearen Anpassungen zweiter und dritter Ordnung als nicht signifikant bestimmt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 zusammengefasst.

Proben mit erhöhten Adalimumabspiegeln (bis 500 µg/mL) können zusätzlich 1:20 in Laufpuffer verdünnt werden (insgesamt 1:400), um Ergebnisse im Messbereich des Tests zu erhalten. Eine Reihe von Proben mit Adalimumabkonzentrationen im Bereich zwischen 7 und 800 µg/mL wurde durch Vermengen einer hochkonzentrierten künstlich hergestellten Probe mit negativem Serum hergestellt. Die Proben wurden zweimal 1:20 in Laufpuffer verdünnt und in jeweils fünf Replikaten mit dem Quantum Blue® Adalimumab Test gemessen. Ein linearer Bereich für Adalimumabspiegel zwischen 7 und 502 µg/mL wurde bestimmt.

High-Dose-Hook Effekt

Es wurde kein High-Dose-Hook Effekt für Proben mit Adalimumabkonzentrationen von bis zu 787 µg/mL beobachtet. Das Vorhandensein eines High-Dose-Hook Effekts wurde mit drei unabhängigen Testkassettenlots getestet.

WECHSELWIRKENDE SUBSTANZEN

Die Empfindlichkeit des Quantum Blue® Adalimumab 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

TNFα-Blocker wurden bei Konzentrationen untersucht, die die niedrigsten empfohlenen Medikamentenspiegel des Medikaments um das Dreifache überstiegen. Mit den folgenden Substanzen wurde bei den aufgeführten Konzentrationen keine Wechselwirkung nachgewiesen: Infliximab (Remicade®, 10 µg/mL) und Golimumab (Simponi®, 10 µg/mL). Eine Wechselwirkung trat bei Etanercept (Enbrel®) auf, wobei das 95% Konfidenzintervall des Wechselwirkungstrend das Akzeptanzkriterium um 2,7 µg/mL überstieg. Proben von Patienten, die von einer Certolizumab (Cimzia®) Therapie umgestellt werden, sollten nicht direkt mit dem Quantum Blue® Adalimumab Test untersucht werden. Lassen Sie den Medikamentenspiegel von Certolizumab (Cimzia®) mindestens auf unter 2,9 µg/mL fallen.

Serum-Index

Mit den folgenden Substanzen wurde bis zu den aufgeführten Konzentrationen keine Wechselwirkung nachgewiesen: Triglyceride (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 (200 mg/dL), TNFα (5.0 ng/mL) und Rheumafaktoren (823 IE/mL).

Immunsuppressive Begleitmedikation

Mit den folgenden Substanzen wurde bis zu den aufgeführten Konzentrationen keine Wechselwirkung

nachgewiesen: Azathioprin (60 µmol/L, 3 µg/mL), 6-Mercaptopurin (37 µmol/L, 2 µg/mL) und Methotrexat (1363 µmol/L, 68 µg/mL).

UTILISATION PREVUE

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

Pour une utilisation en laboratoire uniquement.

PRINCIPE DU TEST

Le test permet la mesure sélective de l'adalimumab par un dosage immunologique de type sandwich. Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNFα) recombinant est couplé à de l'or colloïdal. Sur la cassette test (TC), le conjugué TNFα marqué, présent sur la bande de libération, est libéré dans le système lorsque l'échantillon est appliqué. L'adalimumab 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 TNFα 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-TLAD25	LF-TLAD10		
Cassette - test	25 pièces	10 pièces	B-LFTLAD-TC	Scellée sous vide dans un sachet
Tampon de dilution	1 flacon 10 mL	1 flacon 10 mL	B-LFTLAD-CB	Prêt à l'emploi
Contrôles Bas*/Elevé*	2 flacons 0,5 mL	2 flacons 0,5 mL	B-LFTLAD-CONSET	Prêts à l'emploi
Carte à puce RFID	1 pièce	1 pièce	B-LFTLAD-RCC	Carte en plastique blanche
Carte à puce RFID	1 pièce	1 pièce	B-LFTLAD-RCC15	Carte en plastique verte
Carte à code-barres	1 pièce	1 pièce	B-LFTLAD-BCC	Carte en plastique à code-barres 2D

Tableau 1

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

VERIFICATION DU COFFRET

Les produits BÜHLMANN ont été fabriqués avec le plus grand soin et tous les efforts ont été pris pour assurer la livraison d'une trousse complète et performante. Cependant, nous vous conseillons de vérifier les cassettes tests et leur emballage dans la trousse, à savoir :

- La date d'expiration
- L'état impeccable de l'emballage de la cassette (par exemple absence de toute perforation pouvant entraînant une manipulation incorrecte)
- L'état impeccable des cassettes lors de leur utilisation (par exemple absence de rayure sur la membrane d'analyse).

Dans le cas où l'une des cassettes tests ne répond pas aux critères décrits ci-dessus, utiliser une autre cassette test.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts	
Conserver 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	Conserver jusqu'à 6 mois à 2-8 °C après ouverture.
Contrôles Bas / Elevé	Conserver 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 µL et 100-1000 µL
- Tubes Eppendorf (ou équivalent) pour diluer les échantillons de sérum
- Quantum Blue® Reader disponible chez BÜHLMANN (code de commande : BI-POCTR-ABS)
- Gants et blouse de laboratoire

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 (16-28°C).
- Tous les réactifs, y compris les cassettes test dans leur sachet en aluminium, et les échantillons à tester doivent être équilibrés à température ambiante 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 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.
- Noter qu'il y a deux générations de lecteurs : Le Quantum Blue® Reader 2^{ème} génération avec des numéros de série entre 1000 et 3000 (QB2) et le Quantum Blue® Reader 3^{ème} génération avec des numéros de série supérieurs à 3000 (QB3G).
- Le QB2 doit être allumé et programmé pour le dosage Quantum Blue® Adalimumab. Charger la méthode de dosage au moyen de la carte à puce RFID (B-LFTLAD-RCC ou B-LFTLAD-RCC15) avant le démarrage du test (cf. manuel du Quantum Blue® Reader).
- Le QB3G doit être allumé et programmé pour le dosage Quantum Blue® Adalimumab, soit en utilisant la carte à code-barres (B-LFTLAD-BCC), soit par sélection dans le menu Test (mode Fast Track uniquement). Pour plus d'informations, consulter le manuel du Quantum Blue® Reader.
- Utiliser la carte à puce RFID (QB2) / la carte à code-barres (QB3G) 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 35 µg/mL (jusqu'à 500 µg/mL), peuvent être dilués encore au 1:20 dans du tampon de dilution (1:400 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 non dilués peuvent être réfrigérés à 2-8 °C jusqu'à 14 jours. Pour un stockage prolongé, conserver des échantillons de sérum non dilués à ≤ -20 °C. Ces échantillons sont stables pendant au moins 3 mois à ≤ -20 °C.

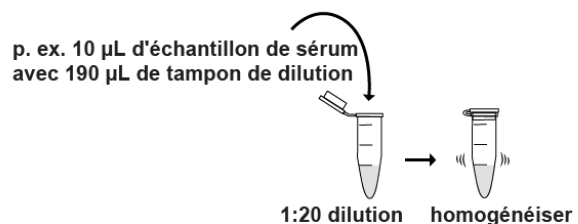
PROCEDURE DE DOSAGE

N'utiliser pour le test que des réactifs équilibrés à température ambiante (16-28 °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

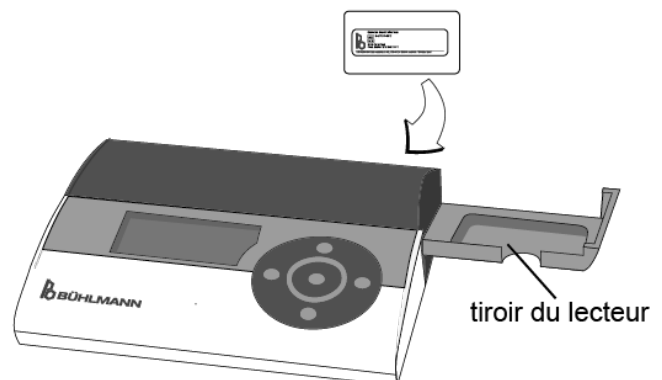
Avant la mesure, diluer l'échantillon de sérum au 1:20 avec le tampon de dilution (B-LFTLAD-CB) (par exemple, mélanger 10 µL d'échantillon de sérum avec 190 µL de tampon) dans un tube à essai et mélanger au vortex, à la pipette ou par agitation.



2. Procédure et lecture du dosage

QB2

Deux méthodes alternatives peuvent être chargées à partir des cartes à puce RFID respectives : B-LFTLAD-RCC15 (avec minuteur interne) ou B-LFTLAD-RCC (sans minuteur interne). 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 sur le Quantum Blue® Reader.



QB3G

Deux modes de fonctionnement différents sont proposés par BÜHLMANN pour mesurer les échantillons avec le QB3G : le mode Fast Track et le mode Fail Safe. Avant de démarrer

le dosage, vérifier le mode de fonctionnement pour lequel le lecteur est programmé.

La méthode de test peut être chargée à partir de la carte à code-barres (modes Fast Track et Fail Safe) ou, en cas d'utilisation antérieure, sélectionnée depuis le menu Test (mode Fast Track uniquement). Les mesures peuvent être effectuées avec ou sans minuteur interne dans le mode Fast Track. Les mesures en mode Fail Safe peuvent uniquement être effectuées avec un minuteur interne.

Suivre les instructions indiquées sur l'écran du QB3G. Consulter également les manuels de démarrage rapide du lecteur QB3G pour les modes Fast Track et Fail Safe.



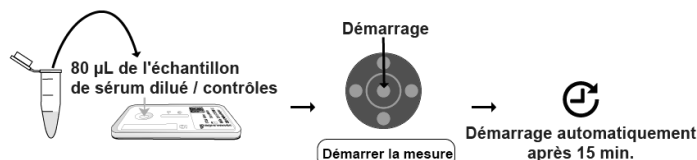
2.1. Méthode avec minuteur interne

QB2: utiliser la carte à puce RFID verte B-LFTLAD-RCC15

QB3G (mode Fast Track) : lorsque le lecteur QB3G propose d'ignorer la période d'incubation, sélectionner « NON »

QB3G (mode Fail Safe) : paramètre par défaut

- Déballez la cassette test et la laissez s'équilibrer à température ambiante pendant au moins 2 minutes.
- Ajouter 80 µL de l'échantillon de sérum dilué dans l'orifice de chargement d'échantillon de la cassette test (figure 1D).
- Insérer la cassette test dans le tiroir du Quantum Blue® Reader.
- Fermer le tiroir et démarrer l'analyse en appuyant sur le bouton de démarrage du lecteur QB2 ou en sélectionnant l'option «Démarrer la mesure» du lecteur QB3G.
- Le scanner démarre automatiquement au bout de 15 minutes.
- 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.



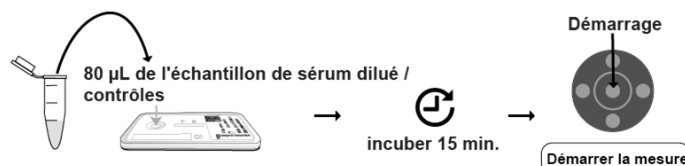
2.2. Méthode sans minuteur interne

QB2: utiliser la carte à puce RFID blanche B-LFTLAD-RCC

QB3G (mode Fast Track) : lorsque le lecteur QB3G propose d'ignorer la période d'incubation, sélectionner « OUI »

QB3G (mode Fail Safe) : option non disponible

- Déballez la cassette test et la laissez s'équilibrer à température ambiante pendant au moins 2 minutes.
- 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.
- Lancer immédiatement la lecture de la cassette test avec le Quantum Blue® Reader en appuyant sur le bouton de démarrage du QB2 ou en sélectionnant l'option «Démarrer la mesure» du QB3G.
- 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 prendre connaissance des fonctions de base et de la façon d'initialiser et d'utiliser les Quantum Blue® Readers, en particulier pour sélectionner les méthodes de tests et charger les paramètres spécifiques du lot à partir de la carte à puce RFID (QB2)/ carte à code-barres (QB3G) sur le Quantum Blue® Reader. Vérifier que la cassette test est bien insérée dans le Quantum Blue® Reader, 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, veuillez vérifier les paramètres suivants : i) pipetage, 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

- Le test Quantum Blue® Adalimumab est standardisé par rapport à la norme internationale de l'OMS pour l'Adalimumab (code NIBSC: 17/236). La valeur du matériel de référence est transférée aux calibrateurs du produit pour générer des résultats de test traçables vis-à-vis de la norme. L'intervalle de confiance à 95% de l'incertitude combinée des calibrateurs de produit est inférieur à 20,0%, et pour l'incertitude combinée des contrôles, inférieur à 25,0%.
- Le lecteur Quantum Blue® Reader utilise une courbe d'étalonnage spécifique au lot pour calculer la

concentration d'adalimumab. La gamme de mesure est comprise entre 1,3 et 35,0 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'adalimumab 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'adalimumab 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 Quantum Blue® Adalimumab 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 Quantum Blue® Adalimumab 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 spécifique et préconfiguré après 15 minutes de temps d'incubation, le résultat du test est également non valide et le dosage Quantum Blue® Adalimumab doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.

LIMITES

- Les réactifs fournis dans cette trousse sont optimisés pour mesurer des taux résiduels d'adalimumab 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® Adalimumab. Attendre que les taux résiduels de certolizumab (Cimzia®) descendent au moins en dessous de 2,9 µg/mL.
- Les résultats du test Quantum Blue® Adalimumab 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. 1).
- Des taux résiduels d'adalimumab compris entre 5 et 12 µg/mL sont considérés de manière consensuelle comme la meilleure fenêtre thérapeutique en termes d'efficacité de traitement. Cependant, les taux résiduels optimaux peuvent varier en fonction des individus, de la cible du traitement ou du phénotype de la maladie (réf. 1).

INTERPRETATION DES RESULTATS

Déterminer des concentrations minimales d'adalimumab dans les échantillons de sérum de patients peut soutenir le suivi thérapeutique des patients souffrant d'inflammation. En général, les concentrations résiduelles sériques atteignant au moins 5 µg/mL durant la thérapie d'entretien montrent une bonne corrélation avec une rémission (réf. 2, 3), une guérison endoscopique de la muqueuse intestinale et de faibles valeurs de CRP (réf. 4, 5). Un plateau de rémission endoscopique a été démontré pour des taux résiduels d'adalimumab dépassant 12 µg/mL (réf. 5).

Valeurs inférieures à 5 µg/mL

Des taux sériques sous-thérapeutiques d'adalimumab suggèrent un échec pharmacocinétique. Un ajustement thérapeutique, tenant compte des observations cliniques et résultats de laboratoire disponibles, devrait être envisagé. (réf. 1).

Valeurs comprises entre 5 et 12 µg/mL

Des taux résiduels thérapeutiques d'adalimumab peuvent servir d'indication à poursuivre la thérapie avec la dose en cours, chez les patients en rémission de MICI (réf. 1).

Valeurs supérieures à 12 µg/mL

Des taux résiduels supra-thérapeutiques d'adalimumab peuvent servir d'indication à diminuer la dose, conjointement avec le tableau clinique, chez les patients en rémission de MICI (réf. 1).

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Les caractéristiques de performance suivantes ont été établies à l'aide du Quantum Blue® Reader 2^{ème} génération et ont été vérifiées sur le Quantum Blue® Reader 3^{ème} génération.

Les caractéristiques de performances sont applicables pour les lecteurs des deux générations.

Comparaison des méthodes

Biais à 5 µg/mL : 0,3% (IC à 95% : -8,1-6,8%)

Biais à 12 µg/mL : 13,8% (IC à 95% : 7,9-21,7%)

La comparaison de méthodes a été déterminée selon la ligne directrice CLSI EP09-A3. Cent trente (130) échantillons cliniques et artificiellement modifiés (3,1% du total) ont été mesurés trois fois conformément aux instructions d'utilisation au moyen du test Quantum Blue® Adalimumab, ce qui a permis de constituer 390 valeurs, et au moyen d'un test ELISA de l'adalimumab disponible dans le commerce (réf. 6). Les mesures ont été réalisées sur quatre jours avec deux lots de cassettes test de Quantum Blue® Adalimumab. Les données de corrélation sont illustrées sur la figure 2.

Recouvrement : 80-90%

A six échantillons cliniques contenant des taux d'adalimumab proches des points de décision clinique, une solution à 5,44 µg/mL d'adalimumab 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 3.

Répétabilité : CV 16,6-28,6%

Précision intra-laboratoire : CV 19,1-29,9%

La répétabilité et la précision intra-laboratoire ont été établies selon la ligne directrice CLSI EP05-A3. Quatre échantillons regroupés de sérum de patients dont les concentrations d'adalimumab 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 4.

Reproductibilité : CV 25,6-26,1%

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. Quatre échantillons regroupés de sérum de patients dont les concentrations d'adalimumab 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 5.

Limite de blanc (LoB) : 0,2 µg/mL

La LoB a été établie 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 test. La LoB a été calculée avec un test non paramétrique.

Limite de détection (LoD) : 0,8 µg/mL

La LoD a été établie selon la ligne directrice CLSI EP17-A2 sur quatre échantillons cliniques dont les concentrations d'adalimumab étaient de 0,3, 0,4, 0,5 et 0,9 µg/mL. Les échantillons ont été mesurés pendant trois jours, à raison de cinq réplicats quotidiens permettant d'obtenir 60 valeurs. L'étude a été réalisée avec deux lots de cassettes test. La LoD a été calculée avec une analyse paramétrique.

Limite inférieure de quantification (LoQ inf) : 1,3 µg/mL

Limite supérieure de quantification (LoQ sup) : 35,0 µg/mL

La LoQ inf a été établie selon la ligne directrice CLSI EP17-A2 à partir de six échantillons cliniques ; la LoQ sup l'a été à partir de trois échantillons cliniques et deux échantillons artificiellement modifiés. Les échantillons ont été mesurés pendant au moins trois jours, à raison de cinq réplicats quotidiens permettant d'obtenir 90 (LoQ inf) et 75 (LoQ sup) valeurs. L'étude a été réalisée avec deux lots différents de cassettes test. Un profil de précision a été établi pour les échantillons et la LoQ déterminée comme l'intersection du profil avec le critère d'acceptation d'un CV < 30%.

Plage de linéarité : 1,0-35,0 µg/mL

La plage de linéarité du test Quantum Blue® Adalimumab a été déterminée selon la ligne directrice CLSI EP06-A.

Deux pools de sérum, de niveaux haut et bas, ont été regroupés de manière à obtenir au moins 15 niveaux de concentration 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

auxquelles les coefficients des ajustements de courbe des deuxième et troisième ordres ne sont pas déterminés comme étant significatifs. Les résultats sont présentés sur la figure 3.

Il est possible de diluer encore au 1:20 dans du tampon de dilution (1:400, au final) les échantillons à haute concentration d'adalimumab (jusqu'à 500 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'adalimumab s'étendaient de 7 à 800 µg/mL a été produite par mélange d'un échantillon fortement modifié (artificiellement) avec du sérum négatif. Les échantillons ont été dilués deux fois au 1:20 dans du tampon de dilution et mesurés en cinq réplicats au moyen du test Quantum Blue® Adalimumab. Un intervalle de linéarité a été déterminé pour les concentrations d'adalimumab comprises entre 7 et 502 µg/mL.

Effet crochet à forte dose :

Aucun effet crochet à haute concentration n'a été observé pour les échantillons dont les concentrations d'adalimumab allaient jusqu'à 787 µg/mL. L'existence d'un effet crochet a été testée sur trois lots indépendants de cassettes test.

SUBSTANCES INTERFERENTES

La sensibilité du test Quantum Blue® Adalimumab 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 / agent bloquant 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 avec les substances suivantes aux concentrations indiquées : infliximab (Remicade®, 10 µg/mL) et golimumab (Simponi®, 10 µg/mL). Une interférence a été détectée dans le cas de l'étanercept (Enbrel®), l'intervalle de confiance à 95% de la tendance à l'interférence dépassant le biais acceptable à 2,7 µg/mL. Les échantillons de patients auparavant traités par certolizumab (Cimzia®) ne doivent pas être soumis directement au test Quantum Blue® Adalimumab. Il convient d'attendre que les taux résiduels de certolizumab (Cimzia®) tombent au moins en dessous de 2,9 µg/mL.

Indices sériques

Aucune interférence n'a été détectée avec les substances suivantes jusqu'aux valeurs de concentration indiquées : Triglycérides (Intralipid® 1320 mg/dL ; équivalent à 37 mmol/L de triglycéride), bilirubine conjuguée (342 µmol/L ; 29 mg/dL), bilirubine non conjuguée (342 µmol/L ; 20 mg/dL), hémoglobine (200 mg/dL), TNFα (5,0 ng/mL) et facteurs rhumatoïdes (823 UI/mL).

Immunosuppresseur / Co-médication

Aucune interférence n'a été détectée avec les substances suivantes jusqu'aux valeurs de concentration indiquées : azathioprine (60 µmol/L, 3 µg/mL), 6-mercaptopurine (37 µmol/L, 2 µg/mL) et méthotrexate (1 363 µmol/L, 68 µg/mL).

USO PREVISTO

BÜHLMANN Quantum Blue® Adalimumab è un immunodosaggio diagnostico *in vitro* a flusso laterale per l'analisi quantitativa dei livelli minimi del farmaco adalimumab (Humira®) e del biosimilare adalimumab Hyrimoz® (Adalimumab-adaz) 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 adalimumab assieme ad altre evidenze cliniche e di laboratorio. Quantum Blue® Adalimumab è combinato con Quantum Blue® Reader.

Per l'uso in laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

Il test è progettato per la misurazione selettiva di adalimumab mediante un immunodosaggio a sandwich. Il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α) ricombinante è coniugato a oro colloidale. Il coniugato di oro è rilasciato da un pad nel sistema di reazione sulla cassetta del test (TC) quando viene applicato il campione. Adalimumab presente nel campione si lega al coniugato di oro. Un anticorpo monoclonale, altamente specifico per adalimumab, è immobilizzato sulla membrana analitica e cattura il complesso coniugato di oro/analita adalimumab, determinando una colorazione della linea di test (T). Il coniugato TNF α /oro libero rimanente si lega alla 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

Reagent	Quantità		Codice	Commenti
	LF-TLAD25	LF-TLAD10		
Cassetta di rilevazione	25 unità	10 unità	B-LFTLAD-TC	Sigillata a vuoto in busta laminata
Tampone di diluizione	1 flacone 10 mL	1 flacone 10 mL	B-LFTLAD-CB	Pronto per l'uso
Controlli Alto*/Basso*	2 flaconi 0.5 mL	2 flaconi 0.5 mL	B-LFTLAD-CONSET	Pronto per l'uso
Carta chip RFID	1 unità	1 unità	B-LFTLAD-RCC	Carta RFID bianca
Carta chip RFID	1 unità	1 unità	B-LFTLAD-RCC15	Carta RFID verde
Carta con codice a barre	1 unità	1 unità	B-LFTLAD-BCC	Scheda di plastica 2D con codice a barre

Tabella 1

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

VERIFICARE IL KIT DI TEST

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 delle sue prestazioni. Tuttavia, si consiglia di verificare il kit di test 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 membrana analitica).

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

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

Reagenti sigillati	
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 dall'imballaggio metallizzata 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 μ L e 100-1000 μ L
- Provette Eppendorf (o equivalente) per la diluizione dei campioni di siero
- Quantum Blue® Reader fornito da 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 potrebbero verificarsi irritazioni.
- La soluzione inutilizzata deve essere smaltita nel rispetto delle disposizioni locali, regionali e nazionali in materia.

Precauzioni tecniche

Componenti del kit

- Il test deve essere eseguito a temperatura ambiente (16-28 °C).
- Tutti i reagenti, comprese le cassette di rilevazione nell'imballaggio metallizzate, e i campioni del test devono essere equilibrati a temperatura ambiente prima di iniziare l'analisi.
- Prima di eseguire il test, estrarre la cassetta di rilevazione dall'imballaggio metallizzata. Lasciare equilibrare la cassetta di rilevazione nell'ambiente del laboratorio per almeno 2 minuti. Le cassette di rilevazione estratte dall'imballaggio metallizzata 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 di rilevazione.
- Le cassette di rilevazione non vanno riutilizzate.
- Manipolare le cassette di rilevazione con attenzione. Non contaminare il piano di appoggio del campione o la finestra di lettura mediante contatto cutaneo, altri liquidi, etc. (figura 1D).
- Assicurarsi di una posizione piana e orizzontale della cassetta di rilevazione durante l'esecuzione del test.

Procedura del test

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, manipolati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- Nota che ci sono due generazioni di lettori: Il Quantum Blue® Reader 2^a Generazione con numeri di serie tra 1000 e 3000 (QB2) e il Quantum Blue® Reader 3^a Generazione con numeri di serie superiori a 3000 (QB3G).
- Il QB2 deve essere acceso e programmato per il Quantum Blue® Adalimumab. Caricare il metodo di dosaggio impiegando la carta chip RFID (B-LFTLAD-RCC o B-LFTLAD-RCC15) prima di iniziare l'analisi (vedere il manuale del Quantum Blue® Reader).
- Il QB3G deve essere acceso e programmato per il dosaggio Quantum Blue® Adalimumab utilizzando la carta con codice a barre (B-LFTLAD-BCC) o tramite selezione dal menu di analisi (solo Fast Track Mode). Per maggiori informazioni consultare il manuale del Quantum Blue® Reader.
- Utilizzare la carta chip RFID (QB2) / carta con codice a barre (QB3G) per modificare i parametri di test specifici del lotto.
- I campioni manipolati in modo scorretto 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 35 µg/mL (fino a 500 µg/mL) possono essere ulteriormente diluiti 1:20 in tampone di diluizione (1:400, 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 ~2000 x g a temperatura ambiente. Decantare il siero.

I campioni di siero non diluito possono essere conservati refrigerati a 2-8 °C fino a 14 giorni. Per tempi di conservazione più lunghi, tenere i campioni non diluiti a ≤ -20 °C. I campioni sono stabili per almeno 3 mesi a ≤ -20 °C.

PROCEDURA DEL TEST

Per il dosaggio utilizzare solo reagenti equilibrati a temperatura ambiente (16-28 °C). La cassetta di rilevazione deve essere rimossa dall'imballaggio metallizzata prima dell'inizio del dosaggio.

La procedura per il dosaggio consiste in due fasi:

1. Diluizione dei campioni di siero con tampone di diluizione

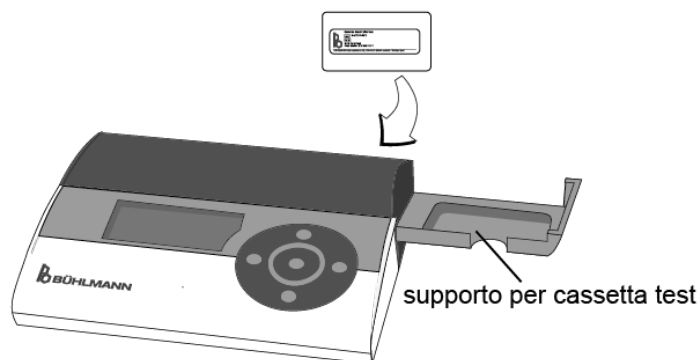
Diluire i campioni di siero 1:20 con tampone di diluizione (B-LFTLAD-CB) prima di usarli per l'analisi (*ad es.* miscelare 10 µL del campione di siero con 190 µL di tampone di diluizione) e miscelarlo mediante vortex, pipettando o agitandolo.



2. Esecuzione del test e lettura

QB2

Due metodi alternativi possono essere caricati dalle rispettive carte chip RFID: B-LFTLAD-RCC15 (con timer interno) o B-LFTLAD-RCC (senza timer interno). Selezionare una delle carte chip RFID prima di iniziare gli esperimenti. Caricare il metodo di test dalla carta chip RFID sul Quantum Blue® Reader.



QB3G

Per misurare i campioni con QB3G, BÜHLMANN mette a disposizione due diverse modalità operative: Fast Track Mode o Fail Safe Mode. Prima di avviare il dosaggio, informarsi della modalità operativa in cui il proprio lettore sta funzionando.

Il metodo di analisi può essere caricato dalla carta con codice a barre (Fast Track e Fail Safe Mode) o, se è stato usato in precedenza, selezionato dal menu di analisi (solo Fast Track Mode). Le misurazioni in Fast Track Mode possono essere effettuate con o senza timer interno. Le misurazioni in Fail Safe Mode possono essere effettuate solo con timer interno.

Seguire le istruzioni riportate sullo schermo di QB3G. Per le modalità Fast Track e Fail Safe Mode si possono consultare anche le Guide rapide a QB3G.



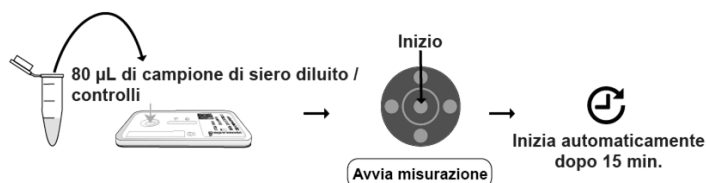
2.1. Metodo con timer interno

QB2: utilizzare la carta chip RFID verde B-LFTLAD-RCC15

QB3G (Fast Track Mode): quando QB3G chiede se si desidera saltare il tempo di incubazione, selezionare "NO"

QB3G (Fail Safe Mode): impostazione predefinita

- Estrarre dalla confezione la cassetta del test. Lasciare equilibrare la cassetta di rilevazione nell'ambiente del laboratorio per almeno 2 minuti.
- Aggiungere 80 µL di campione di siero diluito nel punto di dispensazione della cassetta (figura 1D).
- Inserire la cassetta di rilevazione nell'apposito vano a scorrere per cassetta del Quantum Blue® Reader.
- Chiudere il supporto della cassetta del test e avviare la misurazione premendo il pulsante di inizio su QB2 oppure l'opzione "Avvia misurazione" su QB3G.
- La scansione inizia automaticamente dopo 15 minuti.
- Per i controlli basso / alto: Ripetere il punto 2.1 utilizzando 80 µL di controllo invece del campione di siero diluito.



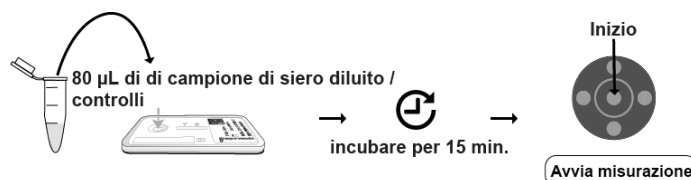
2.2. Metodo senza timer interno

QB2: utilizzare la carta chip RFID bianca B-LFTLAD-RCC

QB3G (Fast Track Mode): quando QB3G chiede se si desidera saltare il tempo di incubazione, selezionare "Sì"

QB3G (Fail Safe Mode): opzione non disponibile

- Estrarre dalla confezione la cassetta del test. Lasciare equilibrare la cassetta di rilevazione nell'ambiente del laboratorio per almeno 2 minuti.
- 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.
- Eseguire immediatamente la scansione della cassetta del test con Quantum Blue® Reader premendo il pulsante di inizio su QB2 oppure l'opzione "Avvia misurazione" su QB3G.
- Per i controlli basso / alto: Ripetere il punto 2.2 utilizzando 80 µL di controllo, invece del campione di siero diluito.



Nota: consultare il manuale del proprio Quantum Blue® Reader per imparare le funzioni basilari e come inizializzare e far funzionare i lettori Quantum Blue® Reader, in particolare come selezionare i metodi di analisi e come caricare i parametri lotto-specifici dalla scheda chip RFID (QB2) / carta con codice a barre (QB3G) sul Quantum Blue® Reader. Accertarsi che la cassetta del test sia stata inserita correttamente nel Quantum Blue® Reader, 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 temporizzazione *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

- Il test Quantum Blue® Adalimumab è standardizzato rispetto allo standard internazionale per Adalimumab dell'OMS (Codice NIBSC: 17/236). Il valore del materiale di riferimento è trasferito ai calibratori del prodotto, il che consente di generare risultati del test tracciabili rispetto allo standard. L'intervallo di confidenza al 95% dell'incertezza composta dei calibratori del prodotto è inferiore al 20,0%, l'incertezza composta dei controlli inferiore al 25,0%.
- Il lettore Quantum Blue® Reader utilizza una curva di calibrazione lotto-specifica per calcolare la

concentrazione di adalimumab. L'intervallo di misurazione è compreso tra 1,3 e 35,0 µg/mL.

VALIDAZIONE DEI RISULTATI

- Per un risultato valido, la linea di controllo (C) deve in 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 (T). Se la linea di rilevazione (T) non è rilevabile dopo 15 minuti d'incubazione (figura 1A), la concentrazione dell'adalimumab presente nel campione è al di sotto del limite di rilevazione. Se la linea di rilevazione (T) è rilevabile dopo 15 minuti d'incubazione (figura 1B), la concentrazione dell'adalimumab presente nel campione viene misurata tramite il Quantum Blue® Reader.
- Se è rilevabile solo la linea di rilevazione (T) dopo 15 minuti d'incubazione (figura 1C), il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® Adalimumab deve essere ripetuto con una nuova cassetta.
- Se né la linea di controllo (C), né la linea di rilevazione (T) sono rilevabili dopo 15 minuti d'incubazione (figura 1D), il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® Adalimumab deve essere ripetuto con una nuova cassetta.
- Dal momento che il Quantum Blue® Reader effettua una valutazione quantitativa sia delle linee di rilevazione (T) che di controllo (C), lo strumento effettua una ulteriore verifica della linea di controllo (C). Se l'intensità di segnale della linea di controllo (C) è inferiore ad una soglia specifica preconfigurata dopo 15 minuti d'incubazione, il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® Adalimumab deve essere ripetuto con una nuova cassetta.

LIMITAZIONI

- I reagenti forniti con questo kit sono ottimizzati per la misura dei livelli minimi di adalimumab in campioni di siero diluiti.
- I campioni dei pazienti passati dalla terapia certolizumab (Cimzia®) non devono essere analizzati direttamente con il test Quantum Blue® Adalimumab, perché si può verificare reattività crociata. Attendere che i livelli minimi di certolizumab (Cimzia®) scendano a valori quantomeno inferiori a 2,9 µg/mL.
- I risultati del test Quantum Blue® Adalimumab 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. 1).
- I livelli residui di adalimumab tra 5 e 12 µg/mL sono considerati consensualmente come la migliore finestra terapeutica in termini di 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. 1).

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La determinazione delle concentrazioni minimi di adalimumab nei campioni di siero dei pazienti può consentire

il monitoraggio terapeutico dei pazienti affetti da IBD. Generalmente, la concentrazione sierica minimi che raggiungono valori di 5 µg/mL e superiori durante la terapia di mantenimento mostrando una buona correlazione con la remissione clinica (rif. 2, 3), bassi valori di CRP, nonché la guarigione endoscopica della mucosa intestinale (rif. 4, 5). È stato dimostrato un plateau della remissione endoscopica per livelli minimi di adalimumab superiori a 12 µg/mL (rif. 5).

Valori inferiori a 5 µg/mL

Livelli sierici di adalimumab subterapeutici suggeriscono un fallimento farmacocinetico. Si deve valutare un aggiustamento della terapia, tenendo conto dei risultati clinici e di laboratorio disponibili (rif. 1).

Valori compresi nell'intervallo 5-12 µg/mL

Livelli minimi terapeutici di adalimumab possono servire da indicatore per la continuazione della terapia alla dose attuale in pazienti con remissione dell'IBD (rif. 1).

Valori superiori a 12 µg/mL

Livelli minimi sovraterapeutici di adalimumab possono servire da indicatore per una riduzione della dose, unitamente al quadro clinico, in pazienti con remissione dell'IBD (rif. 1).

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Le seguenti caratteristiche di prestazione sono state stabilite con Quantum Blue® Reader 2ª generazione e sono state verificate su Quantum Blue® Reader 3ª generazione.

Le caratteristiche prestazionali indicate si applicano a entrambe le generazioni di Reader.

Confronto tra metodi

Bias a 5 µg/mL: 0,3% (IC 95%: -8,1-6,8%)

Bias a 12 µg/mL: 13,8% (IC 95%: 7,9-21,7%)

Lo studio di confronto tra metodi è stato condotto in conformità con la linea guida CLSI EP09-A3. Centotrenta (130) campioni clinici e artificiali (3,1% del totale) sono stati misurati in triplicato con il test Quantum Blue® Adalimumab, ottenendo 390 valori, e con un test ELISA per adalimumab disponibile in commercio (rif. 6). Le misurazioni sono state effettuate nel corso di quattro giorni usando due lotti di cassette di rilevazione Quantum Blue® Adalimumab. I risultati sono riepilogati in figura 2.

Recupero: 80-90%

6 campioni di pazienti, comprendenti livelli di adalimumab prossimi al punto di decisione clinica, sono stati addizionati con 5,44 µg/mL di adalimumab in materiale del calibratore a base di siero. Ai campioni di "base" è stata aggiunta la corrispondente quantità di un pool di siero umano normale, filtrato. I campioni "base" e i campioni "base + aggiunta" sono stati misurati in dieci replicati con un lotto di reagente. I risultati sono illustrati in tabella 3.

Ripetibilità: 16,6-28,6% CV

Precisione intra-laboratorio: 19,1-29,9% CV

Ripetibilità e precisione intra-laboratorio sono state determinate in conformità con la linea guida CLSI EP05-A3. Quattro campioni di pool di sieri di pazienti contenenti concentrazioni di adalimumab 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 4.

Riproducibilità: 25,6-26,1% 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 diversi. Quattro campioni di pool di sieri di pazienti contenenti concentrazioni di adalimumab 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 un lotto diverso. I risultati sono riepilogati in tabella 5.

Limite del bianco (LoB): 0,2 µg/mL

Il valore LoB è stato determinato in conformità con la linea guida CLSI EP17-A2 con quattro campioni di siero di pazienti negativi. I campioni sono stati misurati nel corso di tre giorni in cinque replicati ogni giorno, ottenendo 60 valori di bianco. Lo studio è stato condotto con due lotti di cassette di rilevazione. Il valore LoB è stato calcolato utilizzando un'analisi non parametrica.

Limite di rilevabilità (LoD): 0,8 µg/mL

Il valore LoD è stato determinato in base alla linea guida CLSI EP17-A2 con quattro campioni di pazienti contenenti concentrazioni di adalimumab pari a 0,3, 0,4, 0,5 e 0,9 µg/mL. I campioni sono stati misurati nel corso di tre giorni in cinque replicati ogni giorno, ottenendo 60 valori. Lo studio è stato condotto con due lotti di cassette di rilevazione. Il valore LoD è stato calcolato usando un'analisi parametrica.

Limite inferiore di quantificazione (LLoQ): 1,3 µg/mL**Limite superiore di quantificazione (ULoQ): 35,0 µg/mL**

Il valore LLoQ è stato determinato in base alla linea guida CLSI EP17-A2 con sei campioni clinici; il valore ULoQ con tre campioni clinici e due campioni artificiali. I campioni sono stati misurati nel corso di almeno tre giorni in cinque replicati ogni giorno, ottenendo 90 (LLoQ) e 75 (ULoQ) valori. Lo studio è stato condotto con due lotti di cassette del test. È stato creato un profilo di precisione per i campioni e il valore LoQ è stato determinato come intersezione del profilo con il criterio di accettazione di <30% CV.

Intervallo di linearità: 1,0-35,0 µg/mL

L'intervallo di linearità del test Quantum Blue® Adalimumab è stato determinato in base alla linea guida CLSI EP06-A. Due pool di campioni, basso e alto, sono stati miscelati in modo da ottenere un totale di 15 livelli di concentrazione che coprissero ed eccedessero l'intervallo di misurazione atteso. Le miscele sono state analizzate in dieci replicati con due lotti di cassette di rilevazione. L'intervallo di linearità è stato definito come l'intervallo di concentrazione nel quale i coefficienti delle interpolazioni non lineari di secondo e terzo ordine sono risultati non significativi. I risultati sono riepilogati in figura 3.

I campioni con livelli elevati di adalimumab (fino a 500 µg/mL) possono essere ulteriormente diluiti 1:20 in tampone di diluizione (1:400, in totale) per ottenere risultati lineari che rientrino nell'intervallo di misurazione del dosaggio. È stata creata una serie di campioni con concentrazioni di adalimumab nell'intervallo 7-800 µg/mL miscelando un campione artificiale alto con siero negativo. I campioni sono stati diluiti due volte 1:20 in tampone di diluizione e misurati in cinque replicati con il test Quantum

Blue® Adalimumab. È stato stabilito un intervallo di linearità per livelli di adalimumab compresi tra 7 e 502 µg/mL.

Effetto gancio ad alte dosi

Non è stato osservato alcun effetto gancio ad alte dosi per concentrazioni di adalimumab fino a 787 µg/mL. La presenza di un effetto gancio ad alte dosi è stata esaminata usando tre lotti diversi di cassette di rilevazione.

SOSTANZE INTERFERENTI

La suscettibilità del test Quantum Blue® Adalimumab 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 differenza superiore al 30% è stata ritenuta un'interferenza.

Passaggio da un farmaco della stessa classe / bloccanti del TNFα

I bloccanti del TNFα sono stati esaminati a concentrazioni superiori di tre volte rispetto ai livelli minimi del farmaco raccomandati. Non sono state rilevate interferenze con le seguenti sostanze alle concentrazioni indicate: infliximab (Remicade®, 10 µg/mL) e golimumab (Simponi®, 10 µg/mL). È stata notata interferenza con etanercept (Enbrel®) con il 95% dell'intervallo di confidenza della tendenza all'interferenza superiore ad un bias accettabile a 2,7 µg/mL. I campioni dei pazienti che passano al farmaco da certolizumab (Cimzia®) non devono essere analizzati direttamente usando il test Quantum Blue® Adalimumab. Attendere che i livelli minimi di certolizumab (Cimzia®) scendano almeno sotto i 2,9 µg/mL.

Parametri sierici

Non sono state rilevate interferenze con le seguenti sostanze fino alle concentrazioni indicate: trigliceridi (Intralipid® 1320 mg/dL; equivalenti a 37 mmol/L di trigliceridi), bilirubina coniugata (342 µmol/L; 29 mg/dL), bilirubina non coniugata (342 µmol/L; 20 mg/dL), emoglobina (200 mg/dL), TNFα (5,0 ng/mL) e fattori reumatoidi (823 UI/mL).

Farmaci immunosoppressori concomitanti

Non è stata rilevata alcuna interferenza con le seguenti sostanze fino alle concentrazioni indicate: azatioprina (60 µmol/L, 3 µg/mL), 6-mercaptopurina (37 µmol/L, 2 µg/mL), e metotrexato (1363 µmol/L, 68 µg/mL).

INDICACIONES DE USO

BÜHLMANN Quantum Blue® Adalimumab es un inmunoensayo diagnóstico *in vitro* de flujo lateral para la determinación cuantitativa de las concentraciones mínimas de adalimumab (Humira®) y del biosimilar de adalimumab Hyrimoz® (Adalimumab-adaz) 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 adalimumab. Quantum Blue® Adalimumab se utiliza en combinación con el Quantum Blue® Reader.

Para uso en laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

La prueba ha sido diseñada para la determinación selectiva de adalimumab mediante un inmunoensayo de tipo sándwich. El factor de necrosis tumoral recombinante alfa (FNT α) 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 adalimumab presente en la muestra se unirá al conjugado de oro. En la membrana analítica está inmovilizado un anticuerpo monoclonal, altamente específico de adalimumab, que servirá para capturar el complejo del conjugado de oro y el analito adalimumab dando lugar a una coloración en la línea de test (T). El conjugado oro-FNT α 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-TLAD25	LF-TLAD10		
Casete de prueba	25 unidades	10 unidades	B-LFTLAD-TC	Sellado al vacío en una bolsa de aluminio
Tampón de incubación	1 frasco 10 mL	1 frasco 10 mL	B-LFTLAD-CB	Listo para usar
Controles Alto* / Bajo*	2 viales 0.5 mL	2 viales 0.5 mL	B-LFTLAD-CONSET	Listo para usar
Tarjeta chip RFID	1 unidad	1 unidad	B-LFTLAD-RCC	Tarjeta de plástico blanca
Tarjeta chip RFID	1 unidad	1 unidad	B-LFTLAD-RCC15	Tarjeta de plástico verde
Tarjeta con código de barras	1 unidad	1 unidad	B-LFTLAD-BCC	Tarjeta de plástico con código de barras 2D

Tabla 1

* Los controles contienen cantidades específicas de lote de adalimumab. 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 casete 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 casete de prueba (*p.ej.* la ausencia de rayaduras en la membrana analítica).

Si alguno de los casetes de prueba no cumpliera los criterios anteriormente mencionados, utilice otro casete 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 PERO NO PROVISTO

- Mezclador vórtex
- Cronómetro (opcional)
- Pipetas de precisión con puntas desechables: 10-100 μ L y 100-1000 μ L
- Tubos de Eppendorf (o equivalentes) para la dilución de las muestras de suero
- Quantum Blue® Reader disponible 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 (16-28 °C).
- Todos los reactivos, incluidos los casetes de prueba en bolsas de aluminio, y las muestras para análisis deben equilibrarse a temperatura ambiente 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 entorno del laboratorio 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 casete de prueba.
- Los casetes de prueba no pueden ser reutilizados.
- Los casetes 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 casete 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.
- Note que hay dos generaciones de lectores: El Quantum Blue® Reader de 2.ª generación con números de serie entre 1000 y 3000 (QB2) y el Quantum Blue® Reader de 3.ª generación con números de serie superiores a 3000 (QB3G).
- El lector QB2 debe encenderse y programarse para el ensayo Quantum Blue® Adalimumab. Cargue el método de prueba utilizando la tarjeta chip RFID (B-LFTLAD-RCC o B-LFTLAD-RCC15), antes de iniciar el ensayo (véase el manual del Quantum Blue® Reader).
- El lector QB3G debe encenderse y programarse para el ensayo Quantum Blue® Adalimumab ya sea usando la tarjeta de código de barras (B-LFTLAD-BCC) o seleccionando la opción correspondiente en el menú de las pruebas (solo en el Fast Track Mode). Para más información, consulte el manual del Quantum Blue® Reader.
- Utilizar la tarjeta con chip RFID (QB2) / tarjeta de código de barras (QB3G) para cambiar los parámetros de prueba específicos de 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 35 µg/mL (hasta 500 µg/mL) se pueden diluir adicionalmente en proporción 1:20 con tampón de incubación (dilución total 1:400) 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 ~2000 x g durante 15 minutos. Decante el suero. Las muestras de suero no diluido se pueden conservar refrigeradas a entre 2 y 8 °C durante un máximo de 14 días. Para períodos de conservación más largos, mantenga las muestras de suero no diluido a ≤ -20°C. Estas muestras son estables durante por lo menos 3 meses a ≤ -20 °C.

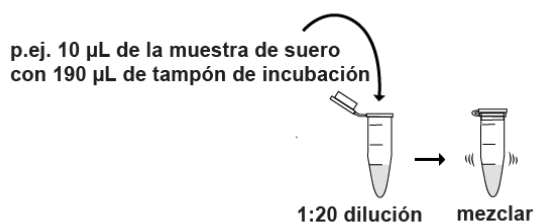
PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Utilice para el ensayo únicamente reactivos cuya temperatura se haya equilibrado con la temperatura ambiente (16-28 °C). El casete 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

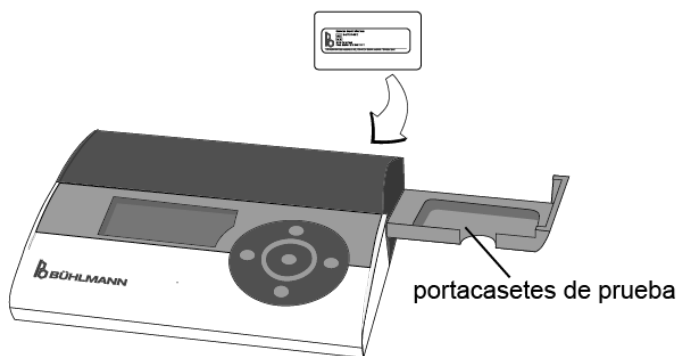
Antes de proceder a la medición, diluya la muestra de suero en proporción 1:20 con tampón de incubación (B-LFTLAD-CB) (*p.ej.* mezcle 10 µL de la muestra de suero con 190 µL de tampón de incubación) en un tubo de ensayo y mézclela bien mediante vórtex, pipeteo o agitación.



2. Procedimiento de ensayo y lectura de los resultados

QB2

Es posible cargar dos métodos alternativos a partir de sus respectivas tarjetas chip RFID: B-LFTLAD-RCC15 (con cronómetro interno) o B-LFTLAD-RCC (sin cronómetro interno). Seleccione una de las tarjetas chip RFID antes de iniciar los experimentos. Cargue el método de prueba desde la tarjeta chip RFID en el Quantum Blue® Reader.



QB3G

BÜHLMANN ofrece dos distintos modos de funcionamiento para medir muestras con el lector QB3G: el Fast Track Mode y el Fail Safe Mode. Antes de comenzar el ensayo, verifique en cuál de los modos está funcionando el lector.

El método de prueba puede cargarse desde la tarjeta de código de barras (tanto en el Fast Track Mode como en el Fail Safe Mode) o, si se ha utilizado previamente, seleccionarse desde el menú de las pruebas (solo en el Fast Track Mode). En el Fast Track Mode, las mediciones pueden realizarse con el temporizador interno o sin él. Las mediciones en el Fail Safe Mode solo pueden realizarse con el temporizador interno.

Siga las instrucciones mostradas en la pantalla del lector QB3G. Puede consultar asimismo las guías rápidas del lector QB3G para el Fast Track Mode y el Fail Safe Mode.



2.1. Método con cronómetro interno

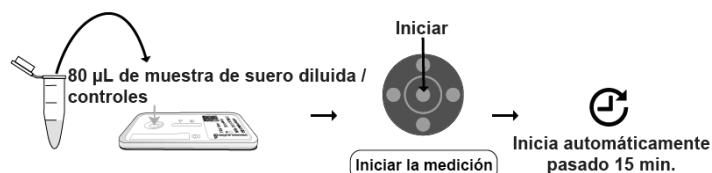
QB2: utilice la tarjeta chip RFID verde B-LFTLAD-RCC15

QB3G (Fast Track Mode): cuando el lector QB3G pregunte si omitir el tiempo de incubación, seleccione «NO»

QB3G (Fail Safe Mode): ajuste predeterminado

- Retire el casete de prueba de su embalaje. Deje que el casete de prueba se equilibre en el entorno del laboratorio durante como mínimo 2 minutos.
- Agregue 80 µL de muestra de suero diluida en el puerto de carga de muestra del casete (figura 1D).
- Inserte el casete en el portacasetes de prueba del Quantum Blue® Reader.
- Cierre el soporte del cartucho de prueba e inicie la medición presionando el botón de iniciar en el lector QB2 o la opción «Iniciar medición» en el lector QB3G.
- La lectura se inicia automáticamente pasados 15 minutos.

- Para controles bajo / alto: repita el paso 2.1 utilizando 80 µL de control en lugar de suero diluido.



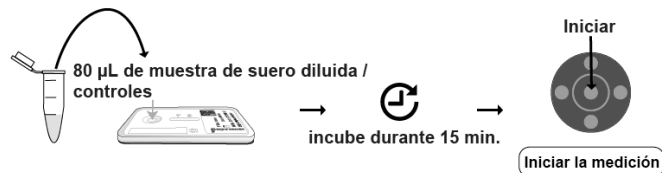
2.2. Método sin cronómetro interno

QB2: utilice la tarjeta chip RFID blanca B-LFTLAD-RCC

QB3G (Fast Track Mode): cuando el lector QB3G pregunte si omitir el tiempo de incubación, seleccione «SÍ»

QB3G (Fail Safe Mode): opción no disponible

- Retire el casete de prueba de su embalaje. Deje que el casete de prueba se equilibre en el entorno del laboratorio durante como mínimo 2 minutos.
- Agregue 80 µL de muestra de suero diluida en el puerto de carga de muestra del casete (figura 1D).
- Incube la muestra durante 15 ± 1 minutos (arranque un cronómetro manualmente).
- Inserte el casete en el portacasetes de prueba del Quantum Blue® Reader.
- Escanee inmediatamente el cartucho de prueba con el Quantum Blue® Reader presionando el botón de iniciar en el QB2 o la opción «Iniciar medición» en el QB3G.
- Para controles bajo / alto: repita el paso 2.2 utilizando 80 µL de control en lugar de suero diluido.



Nota: Consulte el manual de su Quantum Blue® Reader para conocer las funciones básicas y los procedimientos de inicialización y funcionamiento de los lectores Quantum Blue® Reader, en particular cómo seleccionar los métodos de prueba y cómo cargar los parámetros específicos del lote desde la tarjeta con chip RFID (QB2) o la tarjeta de código de barras (QB3G) en el lector Quantum Blue®. Inserte correctamente el cartucho de prueba en el Quantum Blue® Reader, con la ventana de lectura primero (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

- Quantum Blue® Adalimumab está estandarizado según la norma internacional de la OMS para el Adalimumab (código NIBSC: 17/236). El valor del material de referencia se transfiere a los calibradores del producto, lo que permite generar resultados analíticos contrastables con el estándar. El intervalo de confianza del 95% de la incertidumbre combinada de los calibradores del producto es inferior al 20,0% y la incertidumbre combinada de los controles es inferior al 25,0%.
- El lector Quantum Blue® Reader utiliza una curva de calibración específica del lote para calcular la concentración de adalimumab. El rango de medición es entre 1,3 y 35,0 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 adalimumab 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 adalimumab presente en la muestra de suero se calcula mediante el Quantum Blue® Reader.
- 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 Quantum Blue® Adalimumab debe repetirse con un casete 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 Quantum Blue® Adalimumab debe repetirse con un casete 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 específico preconfigurado después de 15 minutos de tiempo de incubación, el resultado de la prueba no es válido y el análisis Quantum Blue® Adalimumab debe repetirse con un casete de prueba nuevo.

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con este kit se han optimizado para medir concentraciones mínimas de adalimumab 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® Adalimumab, 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 2,9 µg/mL.
- Los resultados de la prueba Quantum Blue® Adalimumab 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. 1).

- Niveles valle de adalimumab de entre 5 y 12 µg/mL se consideran la ventana terapéutica de consenso para la mejor eficacia del tratamiento. Los niveles valle óptimos, no obstante, pueden ser individuales y variar en función del objetivo del tratamiento y el fenotipo de la enfermedad (ref. 1).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La determinación de los niveles valle de adalimumab en muestras de suero de pacientes puede ayudar a controlar el tratamiento de los pacientes con EII. En general, los niveles valle en suero que alcanzan un valor de 5 µg/mL o superior durante el mantenimiento del tratamiento se correlacionan bien con la remisión clínica (ref. 2, 3), valores bajos de proteína C reactiva y la curación endoscópica de la mucosa intestinal (ref. 4, 5). Se ha visto la existencia de una meseta de remisión endoscópica para valores valle de adalimumab por encima de 12 µg/mL (ref. 5).

Valores por debajo de 5 µg/mL

Los niveles subterapéuticos de adalimumab en suero sugieren un fracaso farmacocinético. Se debe contemplar un ajuste del tratamiento, tomando en consideración los hallazgos clínicos y de laboratorio disponibles (ref. 1).

Valores entre 5 y 12 µg/mL

Los niveles valle terapéuticos de adalimumab pueden servir como indicación para proseguir el tratamiento con la dosis actual en pacientes con remisión de la EII (ref. 1).

Valores por encima de 12 µg/mL

Los niveles valle supratrapéuticos de adalimumab pueden servir como indicación para reducir la dosis, conjuntamente con el cuadro clínico, en pacientes con remisión de la EII (ref. 1).

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Las características indicadas a continuación han sido establecidas con el Quantum Blue® Reader de 2ª generación y verificadas en el Quantum Blue® Reader de 3ª generación. Las características indicadas aplican para ambas generaciones del Quantum Blue® Reader.

Comparación de métodos

Sesgo a 5 µg/mL: 0,3% (IC 95%: -8,1-6,8%)

Sesgo a 12 µg/mL: 13,8% (IC 95%: 7,9-21,7%)

El estudio de comparación de métodos se ha realizado de conformidad con la directriz CLSI EP09-A3. Se midieron ciento treinta (130) muestras clínicas y artificiales (un 3,1% del total) por triplicado con la prueba Quantum Blue® Adalimumab, obteniéndose 390 valores, y con una prueba ELISA para adalimumab disponible comercialmente (ref. 6). Las determinaciones se realizaron a lo largo de cuatro días utilizando dos lotes de casete de prueba Quantum Blue® Adalimumab. Los resultados se resumen en la figura 2.

Recuperación: 80-90%

Se adicionaron con 5,44 µg/mL de adalimumab en material calibrador de origen sérico seis muestras de pacientes con niveles de adalimumab 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 3.

Repetibilidad: 16,6-28,6% CV

Precisión intralaboratorio: 19,1-29,9% 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, cuatro muestras de combinado de suero de paciente con concentraciones de adalimumab que cubrían el rango de medición del ensayo y los puntos de decisión clínica. Los resultados se resumen en la tabla 4.

Reproducibilidad: 25,6-26,1% 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, cuatro muestras de combinado de suero de paciente con concentraciones de adalimumab 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 5.

Límite para el blanco (LoB): 0,2 µg/mL

El LoB se ha establecido de conformidad con la directriz CLSI EP17-A2 con cuatro muestras de suero de paciente negativas. Las muestras se midieron a lo largo de tres días con cinco réplicas al día para obtener 60 valores de blanco. El estudio se realizó con dos lotes de casete de prueba. El LoB se calculó con un análisis no paramétrico.

Límite de detección (LoD): 0,8 µg/mL

El LoD se ha establecido de conformidad con la directriz CLSI EP17-A2 con cuatro muestras de adalimumab de pacientes con concentraciones de 0,3; 0,4; 0,5 y 0,9 µg/mL de adalimumab. Las muestras se midieron a lo largo de tres días con cinco réplicas al día para obtener 60 valores. El estudio se realizó con dos lotes de casete de prueba. El LoD se calculó con un análisis paramétrico.

Límite inferior de cuantificación (LLOQ): 1,3 µg/mL

Límite superior de cuantificación (ULOQ): 35,0 µg/mL

El LLOQ se ha establecido de conformidad con la directriz CLSI EP17-A2 con seis muestras clínicas; el ULOQ con tres muestras clínicas y dos muestras artificiales. Las muestras se midieron a lo largo de como mínimo tres días con cinco réplicas al día para obtener 90 (LLOQ) y 75 (ULOQ) valores. El estudio se realizó con dos lotes de casete de prueba. Se generó un perfil de precisión para las muestras y se determinó el LoQ como la intersección del perfil con el criterio de aceptación de <30% CV.

Rango lineal: 1,0-35,0 µg/mL

El rango lineal de la prueba Quantum Blue® Adalimumab se ha determinado de conformidad con la directriz CLSI EP06-A. Se mezclaron dos combinados de muestras, con niveles bajo y alto, para obtener un total de 15 niveles de concentración que cubrían y excedían el rango de medición esperado. Las mezclas se ensayaron en diez réplicas con

dos lotes de casete de prueba. El rango lineal se definió como el intervalo de concentraciones en el que los coeficientes de los ajustes no lineales de segundo y tercer orden se determinaron como no significativos. Los resultados se resumen en la figura 3.

Las muestras con niveles elevados de adalimumab (hasta 500 µg/mL) se pueden diluir adicionalmente en proporción 1:20 con tampón de incubación (dilución total 1:400) para obtener resultados lineales dentro del rango de medición del ensayo. Se generó una serie de muestras con concentraciones de adalimumab en el rango de entre 7 y 800 µg/mL mezclando una muestra artificial de nivel alto con suero negativo. Las muestras se diluyeron dos veces en proporción 1:20 con tampón de incubación y se midieron en cinco réplicas con la prueba Quantum Blue® Adalimumab. Se determinó un rango lineal para niveles de adalimumab entre 7 y 502 µg/mL.

Efecto gancho de dosis altas

No se ha observado ningún efecto gancho de dosis altas para muestras con concentraciones de adalimumab de hasta 787 µg/mL. La presencia de un efecto gancho de dosis altas se ensayó con tres lotes independientes de casete de prueba.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

La susceptibilidad de la prueba Quantum Blue® Adalimumab 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 / Bloqueadores del FNTα

Los bloqueadores del FNTα se ensayaron en concentraciones que superaban en tres veces los niveles valle de fármaco más bajos recomendados. No se detectó ninguna interferencia con las siguientes sustancias a las concentraciones indicadas: infliximab (Remicade®, 10 µg/mL), y golimumab (Simponi®, 10 µg/mL). Se detectó interferencia con etanercept (Enbrel®), excediendo el intervalo de confianza del 95% de la tendencia de interferencia el sesgo aceptable a 2,7 µg/mL. Las muestras de pacientes previamente en tratamiento con certolizumab (Cimzia®) no se deben analizar directamente con la prueba Quantum Blue® Adalimumab. Hay que esperar hasta que los niveles valle de certolizumab (Cimzia®) hayan descendido como mínimo por debajo de 2,9 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 (200 mg/dL), FNTα (5,0 ng/mL) y factores reumatoides (823 UI/mL).

Medicación inmunosupresora concomitante

No se detectó ninguna interferencia con las siguientes sustancias hasta las concentraciones indicadas: azatioprina (60 µmol/L, 3 µg/mL), 6-mercaptopurina (37 µmol/L, 2 µg/mL) y metotrexato (1363 µmol/L, 68 µg/mL).

USO PRETENDIDO

O BÜHLMANN Quantum Blue® Adalimumab é um imunoensaio de fluxo lateral de diagnóstico in vitro para determinação quantitativa dos níveis de valor de adalimumabe (Humira®) e o Hyrimoz® (Adalimumab-adaz) adalimumab biosimilar em amostras de soro. O teste serve como auxiliar na monitorização da terapêutica medicamentosa em pacientes com doenças intestinais inflamatórias (DII) recebendo terapia com adalimumabe, em conjunto com outros resultados clínicos e laboratoriais. O Quantum Blue® Adalimumab 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 adalimumabe por imunoensaio tipo sanduíche. O fator de necrose tumoral alfa recombinante (TNF α) é conjugado a colóides 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 adalimumabe presente na amostra se liga ao conjugado de ouro. Um anticorpo monoclonal, altamente específico para o adalimumabe, é imobilizado na membrana analítica e captura o complexo do conjugado de ouro e o analito adalimumabe, resultando na coloração da linha de teste (T). O conjugado de TNF α -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-TLAD25	LF-TLAD10		
Cassete de teste	25 unidades	10 unidades	B-LFTLAD-TC	Embalagem selada a vácuo
Tampão de diluição	1 frasco 10 mL	1 frasco 10 mL	B-LFTLAD-CB	Pronto para uso
Controles Baixo*/Alto*	2 frascos 0,5 mL	2 frascos 0,5 mL	B-LFTLAD-CONSET	Pronto para uso
Cartão Chip RFID	1 pedaço	1 pedaço	B-LFTLAD-RCC	Cartão de plástico branco
Cartão Chip RFID	1 pedaço	1 pedaço	B-LFTLAD-RCC15	Cartão de plástico verde
Cartão de código de barras	1 pedaço	1 pedaço	B-LFTLAD-BCC	Cartão de código de barras de plástico 2D

Tabela 1

* Os controles contêm quantidades específicas de adalimumab 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 enviados 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 nos rótulos.	
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 µL e 100-1000 µL
- Tubos Eppendorf (ou equivalentes) para diluição das amostras de soro
- Quantum Blue® Reader disponível na BÜHLMANN (referência: 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 (16-28 °C).
- Todos os reagentes (incluindo os cassetes de teste em embalagens aluminizadas) e amostras de teste devem ser equilibrados à temperatura ambiente antes do teste ser iniciado.
- 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. 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 reutilizados.
- Manuseie os cassetes de teste com cuidado. Não contamine a zona de introdução da amostra ou a janela de leitura por contato com a pele, outros líquidos, etc. (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.
- Note que há duas gerações de leitores: O Quantum Blue® Reader de 2ª geração com números de série entre 1000 e 3000 (QB2) e o Quantum Blue® Reader de 3ª geração com números de série acima de 3000 (QB3G).
- O leitor QB2 deve ser ligado e programado para o teste Quantum Blue® Adalimumab. Antes de iniciar o ensaio, carregue o método do ensaio usando o cartão com chip RFID (B-LFTLAD-RCC ou B-LFTLAD-RCC15) (ver manual do Quantum Blue® Reader).
- O leitor QB3G deve ser ligado e programado para o teste Quantum Blue® Adalimumab usando-se o cartão de código de barras (B-LFTLAD-BCC) ou selecionando-se no menu do teste (somente para o Fast Track Mode). Para mais informações, consulte o manual do Quantum Blue® Reader.
- Utilize o cartão com chip RFID (QB2) / cartão de código de barras (QB3G) 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 dias. As amostras diluídas não podem ser armazenadas por períodos de tempo prolongados.

- Amostras a uma concentração acima de 35 µg/mL (até 500 µg/mL) podem ser adicionalmente diluídas a 1:20 no tampão de detecção (1:400, 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 não diluídas podem ser conservadas refrigeradas a 2-8 °C durante até 14 dias. Para uma conservação mais prolongada, mantenha as amostras não diluídas a ≤-20 °C. Estas amostras são estáveis durante pelo menos 3 meses a ≤-20 °C.

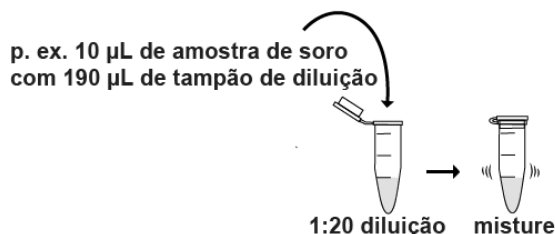
PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Para o teste, use somente reagentes equilibrados à temperatura ambiente (16-28 °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

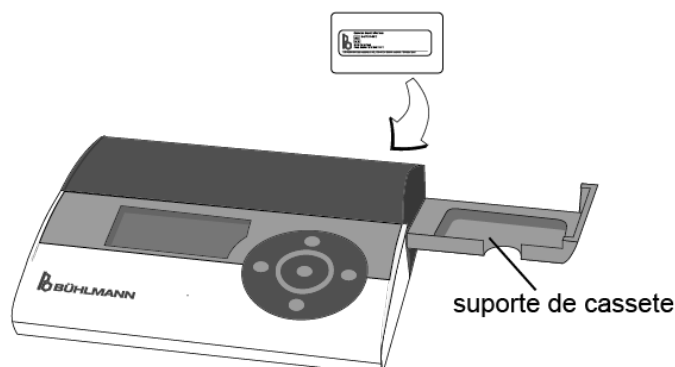
Antes da determinação, dilua a amostra de soro de 1:20 com tampão de diluição (B-LFTLAD-CB) (p. ex., misture 10 µL de amostra de soro com 190 µL de tampão de diluição) em um tubo de ensaio e misture bem no vórtex ou com a pipeta ou por agitação.



2. Procedimento e leitura do ensaio

QB2

É possível carregar dois métodos alternativos do respetivo cartão com chip RFID: B-LFTLAD-RCC15 (com cronômetro interno) ou B-LFTLAD-RCC (sem cronômetro interno). Selecione um dos cartões com chip RFID antes de iniciar as experiências. Carregue o método de teste do cartão com chip RFID no Quantum Blue® Reader.



QB3G

Dois modos de operação diferentes são disponibilizados pela BÜHLMANN para a medição de amostras com o QB3G: Fast Track Mode e Fail Safe Mode. Antes do início do teste, informe-se para identificar o modo de operação do seu leitor. O método de teste pode ser carregado a partir do cartão de código de barras (Fast Track Mode e Fail Safe Mode) ou selecionado no menu do teste, se já houver sido usado anteriormente (somente para o Fast Track Mode). As medições podem ser realizadas com ou sem um cronômetro interno no Fast Track Mode. No Fail Safe Mode, as medições somente podem ser feitas com um cronômetro interno.

Siga as instruções fornecidas na tela do QB3G. Também é possível consultar os Guias Rápidos do QB3G para o Fast Track Mode e o Fail Safe Mode.



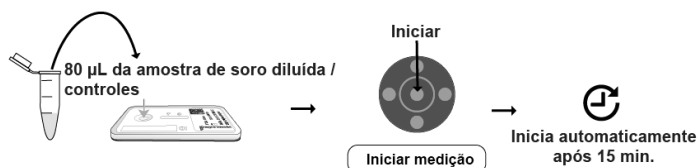
2.1. Método com cronômetro interno

QB2: utilize o cartão chip RFID verde B-LFTLAD-RCC15

QB3G (Fast Track Mode): quando o QB3G perguntar se você deseja ignorar o tempo de incubação, selecione "NÃO"

QB3G (Fail Safe Mode): configuração padrão

- Desembale o cassete do teste. Aguarde até pelo menos 2 minutos para que o cassete de teste atinja o equilíbrio com a temperatura ambiente do laboratório.
- Adicione 80 µL da amostra de soro diluído na zona de introdução da amostra da cassete de teste (figura 1D).
- Introduza o cassete de teste no suporte para ele existente no Quantum Blue® Reader.
- Feche o porta-cassete e inicie a medição pressionando o botão de iniciar no QB2, ou a opção "Iniciar medição" no QB3G.
- A leitura inicia-se automaticamente após 15 minutos.
- Para controles baixo / alto: repita a etapa 2.1 usando 80 µL do controle em vez da amostra de soro diluída.



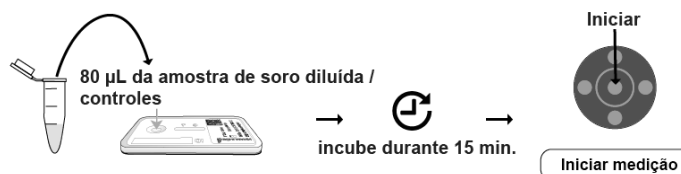
2.2. Método sem cronômetro interno

QB2: utilize o cartão chip RFID branco B-LFTLAD-RCC

QB3G (Fast Track Mode): quando o QB3G perguntar se você deseja ignorar o tempo de incubação, selecione "SIM"

QB3G (Fail Safe Mode): opção não disponível

- Desembale o cassete do teste. Aguarde até pelo menos 2 minutos para que o cassete de teste atinja o equilíbrio com a temperatura ambiente do laboratório.
- 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.
- Faça a leitura do cassete do teste com o Quantum Blue® Reader imediatamente pressionando o botão de iniciar no QB2, ou a opção "Iniciar medição" no QB3G.
- Para controles baixo / alto: repita a etapa 2.2 usando 80 µL do controle em vez da amostra de soro diluída.



Nota: Consulte o manual do Quantum Blue® Reader para conhecer as funções básicas e saber como inicializar e operar os Quantum Blue® Readers, especialmente como selecionar métodos de teste e como carregar parâmetros específicos a cada lote a partir do cartão RFID com chip (QB2) / cartão de código de barras (QB3G) no Quantum Blue® Reader. Certifique-se de inserir o cassete do teste corretamente no Quantum Blue® Reader, começando pela janela de leitura (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

- O Quantum Blue® Adalimumab é padronizado em relação ao Padrão Internacional da OMS para Adalimumab (Código NIBSC: 17/236). O valor do material de referência é transferido para os calibradores do produto, permitindo a geração de resultados de teste rastreáveis ao padrão. O intervalo de confiança de 95% da incerteza combinada dos calibradores do produto é inferior a 20,0%, enquanto a incerteza combinada dos controles fica abaixo de 25,0%.
- O leitor Quantum Blue® utiliza uma curva de calibração específica para cada lote para calcular a concentração de adalimumabe. A faixa de medição é de 1,3 a 35,0 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 adalimumab 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 adalimumab 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 Quantum Blue® Adalimumab 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 Quantum Blue® Adalimumab 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 a um limiar preconfigurado específico à determinada para esse lote após os 15 min de incubação, o resultado do teste é inválido e o teste de Quantum Blue® Adalimumab tem que ser repetido com outro cassete.

LIMITAÇÕES

- O imunoensaio de fluxo lateral é calibrado com adalimumab usando um ensaio de imunoglobulina G com marca CE para a quantificação.
- As amostras de pacientes que estão passando da terapia com certolizumabe (Cimzia®) para o adalimumabe não devem ser testadas diretamente com o Quantum Blue® Adalimumab, uma vez que pode ocorrer reatividade cruzada. Aguarde até que os níveis do certolizumabe (Cimzia®) caiam para pelo menos 2,9 µg/mL.
- Os resultados dos testes com o Quantum Blue® Adalimumab 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. 1).
- Níveis medidos de adalimumabe entre 5 e 12 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. 1).

VALORES ESPERADOS

A determinação dos níveis do adalimumabe em amostras séricas de pacientes pode subsidiar o monitoramento da terapia de pacientes com DIIs. De modo geral, níveis séricos que atingem um valor de 5 µg/mL e acima durante a manutenção da terapia, correlacionam-se bem com a remissão clínica refs. 2, 3), valores baixos de CRP, e com a cura endoscópica da mucosa intestinal (ref. 4, 5). Um platô

de remissão endoscópica foi demonstrado para os níveis de adalimumabe acima de 12 µg/mL (ref. 5).

Valores abaixo de 5 µg/mL

Níveis subterapêuticos de adalimumabe no soro sugerem falha farmacocinética. Deve-se considerar o ajuste da terapia, levando em conta os resultados clínicos e laboratoriais disponíveis (ref. 1).

Valores entre 5 e 12 µg/mL

Níveis terapêuticos do adalimumabe podem servir como indicação para a continuidade da terapia com a dose atual em pacientes em remissão de DIIs (ref. 1).

Valores acima de 12 µg/mL

Níveis supratrapêuticos do adalimumabe podem servir como indicação para a redução da dose em conjunção com o quadro clínico, em pacientes em remissão de DIIs (ref. 1).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

As seguintes características de desempenho foram estabelecidas com o Quantum Blue® Reader 2ª geração e foram verificadas no Quantum Blue® Reader 3ª geração.

As características de desempenho indicadas se aplicam às duas gerações do leitor.

Comparação de métodos

Desvio a 5 µg/mL: 0,3% (intervalo de confiança de 95%: -8,1-6,8%)

Desvio a 12 µg/mL: 13,8% (intervalo de confiança de 95%: 7,9-21,7%)

O estudo de comparação de métodos foi realizado de acordo com a diretriz EP09-A3 do CLSI. Cento e trinta (130) amostras clínicas e artificiais (3,1% do total) foram medidas em triplicata com o teste Quantum Blue® Adalimumab, resultando em 390 valores, e com um teste ELISA para adalimumabe comercialmente disponível (ref. 6). As medições foram realizadas por quatro dias, usando-se dois lotes de cassetes de teste Quantum Blue® Adalimumab. Os resultados estão resumidos na figura 2.

Recuperação: 80-90%

Seis amostras de pacientes, incluindo níveis de adalimumabe próximos dos pontos de decisão clínica, foram fortificadas com adalimumabe a 5,44 µg/mL 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 3.

Repetibilidade: 16,6-28,6% do CV

Precisão intralaboratorial: 19,1-29,9% do CV

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI. Quatro amostras séricas agrupadas de pacientes, com concentrações de adalimumabe 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 4.

Reprodutibilidade: 25,6-26,1% do 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. Quatro amostras séricas agrupadas de pacientes, com concentrações de adalimumabe 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 5.

Limite do branco (LoB): 0,2 µg/mL

O LoB foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI com quatro amostras séricas negativas de pacientes. As amostras foram medidas por três dias em cinco replicações por dia para produzir 60 valores de branco. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste. O LoB foi calculado usando-se análise não paramétrica.

Limite de detecção (LoD): 0,8 µg/mL

O LoD foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, usando-se quatro amostras de pacientes de adalimumabe com concentrações de 0,3, 0,4, 0,5 e 0,9 µg/mL de adalimumabe. As amostras foram medidas por três dias em cinco replicações por dia para produzir 60 valores. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste. O LoD foi calculado usando-se análise paramétrica.

Limite inferior de quantificação (LIQ): 1,3 µg/mL**Limite superior de quantificação (LSQ): 35,0 µg/mL**

O LIQ foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI com seis amostras clínicas, enquanto o LSQ foi determinado a partir de três amostras clínicas e duas artificiais. As amostras foram medidas por três dias em cinco replicações por dia para produzir 90 valores de LIQ e 75 de LSQ. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste. O perfil de precisão foi gerado para as amostras e o LQ foi determinado como a intersecção do perfil com o critério de aceitação de <30% do CV.

Faixa linear: 1,0-35,0 µg/mL

A faixa linear do teste Quantum Blue® Adalimumab foi determinada de acordo com a diretriz EP06-A do CLSI. Dois pools de amostras, alto e baixo, foram misturados para se obter 15 níveis de concentração abrangendo e ultrapassando a faixa de medição esperada. As misturas foram testadas em dez replicações com dois lotes de cassetes de teste. A faixa linear foi definida como o intervalo de concentração no qual coeficientes de ajuste não linear de segunda e terceira ordens não foram considerados significativos. Os resultados estão resumidos na figura 3.

Amostras com níveis elevados de adalimumabe (até 500 µg/mL) podem ser adicionalmente diluídas a 1:20 no tampão de detecção (1:400, no total) para se obter resultados dentro da faixa de medição do teste. Uma série de amostras com concentrações de adalimumabe na faixa

de 7 a 800 µg/mL foi gerada por meio da mistura de uma amostra artificial alta com um soro negativo. As amostras foram diluídas duas vezes a 1:20 no tampão de detecção e medidas em cinco replicações com o teste Quantum Blue® Adalimumab. Uma faixa linear foi determinada para níveis de adalimumabe entre 7 e 502 µg/mL.

Efeito gancho com dose elevada

Não foi observado efeito gancho com dose elevada para amostras com concentrações de adalimumabe até 787 µg/mL. A presença de efeito gancho com dose elevada foi testada em três lotes de cassetes de teste independentes.

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

A suscetibilidade do teste Quantum Blue® Adalimumab 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 / bloqueador de TNFα

Os bloqueadores de TNFα foram testados a concentrações três vezes acima dos níveis mais baixos recomendados para o medicamento. Nenhuma interferência foi detectada com as seguintes substâncias até as concentrações listadas: infliximabe (Remicade®, 10 µg/mL) e golimumabe (Simponi®, 10 µg/mL). Detectou-se interferência com etanercepte (Enbrel®) com o intervalo de confiança de 95% da tendência de interferência acima do desvio aceitável a 2,7 µg/mL. As amostras de pacientes que estão passando da terapia com certolizumabe (Cimzia®) para o adalimumabe não devem ser testadas diretamente com o teste Quantum Blue® Adalimumab. Aguarde até que os níveis do certolizumabe (Cimzia®) caiam para pelo menos 2,9 µg/mL.

Índices séricos

Nenhuma interferência foi detectada com as seguintes substâncias até as concentrações listadas: Triglicérides (Intralipid® 1320 mg/dL; equivalente a 37 mmol/L de triglicérides), bilirrubina conjugada (342 µmol/L; 29 mg/dL), bilirrubina não conjugada (342 µmol/L; 20 mg/dL) ou hemoglobina (200 mg/dL), TNFα (5,0 ng/mL) e fatores reumatóides (823 IU/mL).

Comedicação imunossupressora

Nenhuma interferência foi detectada com as seguintes substâncias até as concentrações listadas: azatioprina (60 µmol/L, 3 µg/mL), 6-mercaptopurina (37 µmol/L, 2 µg/mL) e metotrexato (1363 µmol/L, 68 µg/mL).

APPENDIX I

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

Test Results

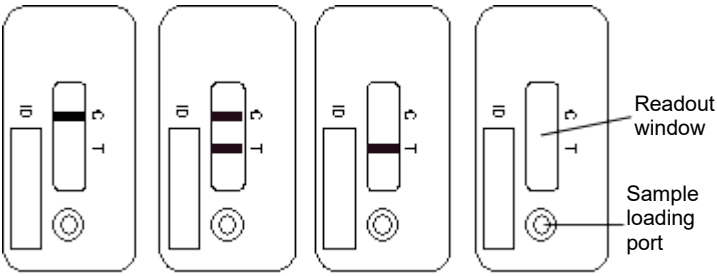


Figure 1A Figure 1B Figure 1C Figure 1D

Method Comparison

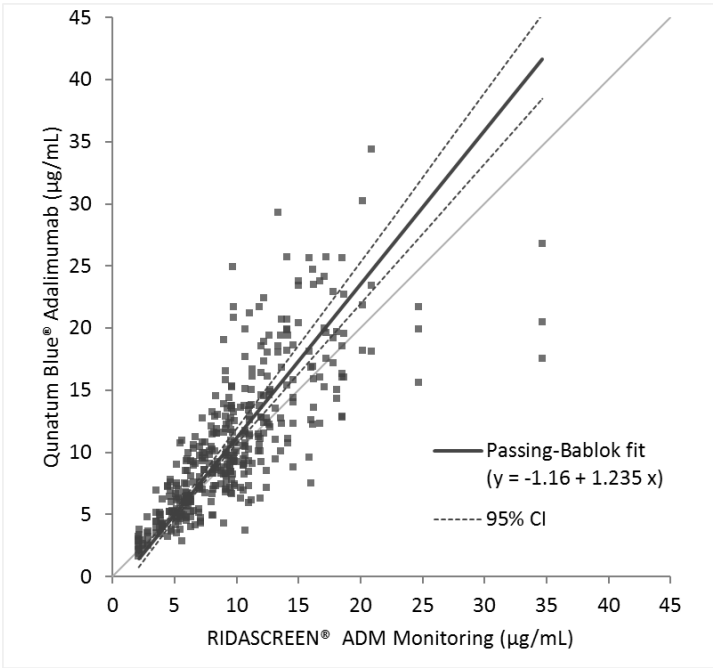


Figure 2

Recovery

Sample	Base [µg/mL]	Spike [µg/mL]	Expected Base + Spike [µg/mL]	Observed Base + Spike [µg/mL]	Recovery [%]
S1	2.6	5.44	8	6.7	83
S2	4.6	5.44	10.1	9	89
S3	5.2	5.44	10.7	8.6	80
S4	8.1	5.44	13.5	11.1	82
S5	8.5	5.44	13.9	12.5	90
S6	12.2	5.44	17.6	15.2	86

Table 3

Repeatability / Within-Laboratory Precision

Mean ADA Conc. [µg/mL]	Repeatability CV [%]	Between-run precision CV [%]	Between-day precision CV [%]	Within-lab precision CV [%]
2.03	18.7	3.4	1.6	19.1
6.63	16.6	12.6	0.0	20.9
9.40	17.8	7.3	1.1	19.3
22.70	28.6	3.6	8.0	29.9

Table 4

Reproducibility

Mean ADA Conc. [µg/mL]	Repeatability CV [%]	Between-day precision CV [%]	Between-lot/ instrument /operator precision CV [%]	Within-lab precision CV [%]
2.46	19.6	0.0	16.5	25.6
7.62	19.8	7.3	14.8	25.8
10.28	21.6	0.0	14.7	26.1
25.11	23.5	2.2	10.6	25.9

Table 5

Linearity

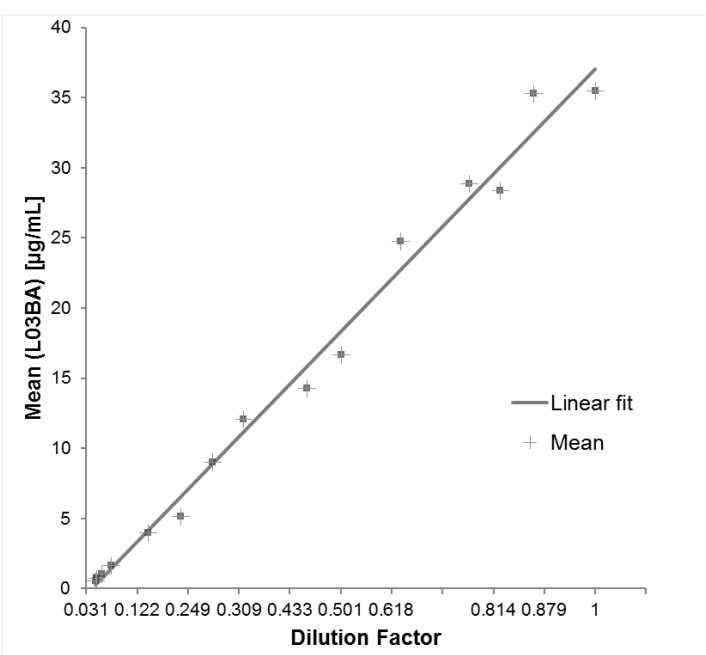


Figure 3

APPENDIX II

REFERENCES / REFERENZEN / RÉFÉRENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS / REFERÊNCIAS

1. 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)
2. Mazor Y et al. : *Adalimumab drug and antibody levels as predictors of clinical and laboratory response in patients with Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther. 40: 620–628 (2014)
3. Bodini G et al. : *Adalimumab trough serum levels and anti-adalimumab antibodies in the long-term clinical outcome of patients with Crohn's disease*. Scand J Gastroenterol. 51(9):1081-6 (2016)
4. Roblin X et al : *Association Between Pharmacokinetics of Adalimumab and Mucosal Healing in Patients With Inflammatory Bowel Diseases*. Clin Gastroenterol Hepatol. 12(1):80-84 (2014)
5. Ungar B. et al. : *Optimizing Anti-TNF- α Therapy: Serum Levels of Infliximab and Adalimumab Are Associated With Mucosal Healing in Patients With Inflammatory Bowel Diseases*. Clin Gastroenterol Hepatol. 4, 550-557 (2016)
6. Bian S. et al. : *Generation and characterization of a unique panel of anti-adalimumab specific antibodies and their application in therapeutic drug monitoring assays*. J Pharm Biomed Anal. 125:62-7 (2016)

APPENDIX III

INCIDENT REPORTING IN EU MEMBER STATES

If any serious incident in relation to this device has occurred, please report without delay to the manufacturer and competent authority of your Member State.

MELDUNG VON ZWISCHENFÄLLEN IN EU-MITGLIEDSSTAATEN

Falls sich ein ernsthafter Zwischenfall in Zusammenhang mit diesem Produkt ereignet hat, bitte melden Sie dies umgehend dem Hersteller und der zuständigen Behörde Ihres Mitgliedsstaates.

RAPPORTS D'INCIDENTS DANS LES ÉTATS MEMBRES DE L'UE

En cas d'incident grave en lien avec ce dispositif, signalez-le sans délai au fabricant et à l'autorité compétente de votre État membre.

SEGNALAZIONE DI INCIDENTI NEGLI STATI MEMBRI UE

Si prega di segnalare immediatamente al produttore e alle autorità competenti del proprio paese eventuali incidenti gravi avvenuti in relazione all'uso di questo dispositivo.

NOTIFICACIÓN DE INCIDENTES EN LOS ESTADOS MIEMBROS DE LA UE

Si se ha producido algún incidente grave en relación con este dispositivo, informe inmediatamente al fabricante y a la autoridad competente de su Estado miembro.

NOTIFICAÇÃO DE INCIDENTES EM ESTADOS-MEMBROS DA UE

Se algum incidente sério ocorrer associado a este dispositivo, notifique sem demora o fato ao fabricante e à autoridade competente de seu Estado-Membro.

APPENDIX IV

CHANGELOG

Date	Version	Change
2022-04-05	A3	Addition of (Humira®) and the adalimumab biosimilar Hyrimoz® (Adalimumab-adaz) in chapter <i>Intended use</i> Introduction of WHO standard in Chapter <i>Standardization</i>

APPENDIX V

SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

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

Symbol	Explanation
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura Limite de temperatura
TC	Test Cassette Testkassette Cassette test Cassette di rilevazione t Casete de prueba Cassete de teste
BUFCHASE	Chase Buffer Laufpuffer Tampon de dilution Tampone di diluzione Tampón de incubación Tampão de diluição
CONTROL L	Control Low Kontrolle Tief Contrôle Bas Controllo Basso Control Bajo Controle Baixo
CONTROL H	Control High Kontrolle Hoch Contrôle Élevé Controllo Alto Control Alto Controle Alto
RCC	RFID Chip Card RFID Chipkarte Carte à puce RFID Carta chip RFID Tarjeta chip RFID Cartão Chip RFID
BCC	Barcode Card Barcodekarte Carte à code-barres Carta con codice a barre Tarjeta con código de barras Cartão de código de barras

