



Quantum Blue[®] Infliximab

Quantitative
Lateral Flow Assay

For *In Vitro* Diagnostic Use.

LF-TLIF25	25 tests
LF-TLIF10	10 tests

Release date: 2021-11-11
Version A3

INTENDED USE

Quantum Blue® Infliximab is an *in vitro* diagnostic lateral flow immunoassay for the quantitative determination of trough levels of infliximab (Remicade®) and the infliximab biosimilars, CT-P13 (Remsima®; Inflectra®), SB2 (FLIXABI®) and GP1111 (Zessly®), in serum samples. The assay serves as an aid to therapeutic drug monitoring in patients with inflammatory bowel disease (IBD) under infliximab therapy in conjunction with other clinical and laboratory findings. Quantum Blue® Infliximab is combined with the Quantum Blue® Reader.

For laboratory use.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity		Code	Comments
	LF-TLIF25	LF-TLIF10		
Test Cassette	25 pieces	10 pieces	B-LFTLIF-TC	Vacuum-sealed in a foil bag pouch
Chase Buffer	1 bottle 10 mL	1 bottle 10 mL	B-LFTLIF-CB	Ready to use
Controls Low* / High*	2 vials 0.5 mL	2 vials 0.5 mL	B-LFTLIF-CONSET	Ready to use
RFID Chip Card	1 piece	1 piece	B-LFTLIF-RCC	White plastic card
RFID Chip Card	1 piece	1 piece	B-LFTLIF-RCC15	Green plastic card
Barcode Card	1 piece	1 piece	B-LFTLIF-BCC	2D Barcode plastic card

Table 1

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

CHECK YOUR TEST KIT

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

- Expiration date

- The fault-free condition of the pouch (e.g. absence of any perforation that could be caused by improper handling).
 - The fault-free condition of the test cassette (e.g. absence of scratches on the analytical membrane).
- Should one of the test cassettes not fulfil the criteria mentioned above, please use another test cassette.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

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

Table 2

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

PRECAUTIONS

Safety precautions

- None of the reagents of this test contains components of human origin.
- Patient specimens should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with Good Laboratory Practice (GLP) using appropriate precautions.
- **Reagents:** Avoid contact of reagents with the skin, eyes, or mucous membranes. If contact does occur, immediately wash with generous amounts of water; otherwise, irritation can occur.
- Unused solution should be disposed according to local state and federal regulations.

Technical precautions

Kit components

- The test must be performed at room temperature (20-26 °C).
- All reagents and test samples must be equilibrated to room temperature (20-26 °C) before starting the assay.
- Before performing the test, remove the test cassette from the foil pouch. Allow the test cassette to equilibrate in the laboratory environment (20-26 °C) for at least 2 minutes. Test cassettes

removed from the foil pouch must be used within 4 hours.

- Mix well (e.g. vortex) the reagents before use.
- Components must not be used after the expiration date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Do not disassemble the test cassettes.
- Test cassettes cannot be re-used.
- Handle the test cassettes with care. Do not contaminate the sample loading port or read-out window via skin contact, other liquids, etc. (figure 1D).
- Ensure a flat, horizontal position of the test cassette while performing the assay.

Test procedure

- Read 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 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® Infliximab assay. Load the assay method using the RFID chip card (B-LFTLIF-RCC or B-LFTLIF-RCC15), before starting the assay (see Quantum Blue® Reader manual).
- The QB3G must be switched on and programmed for the Quantum Blue® Infliximab assay either by using the barcode card (B-LFTLIF-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 20 µg/mL (up to 183.6 µg/mL) may be additionally diluted 1:10 in chase buffer (1:200, in total) to obtain results within the measuring range of the test.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Collect blood into plain venipuncture tubes without any additives avoiding hemolysis and let the serum clot at room temperature for at least 20 and for up to 60 minutes. Centrifuge at room temperature at ~2000 x g for 15 minutes. Decant the serum.

Undiluted serum samples can be stored unrefrigerated (temperatures up to 28 °C) or at 2-8 °C for up to 10 days. For longer storage, keep undiluted serum samples at ≤-20 °C. These samples are stable for at least 21 months at ≤-20 °C.

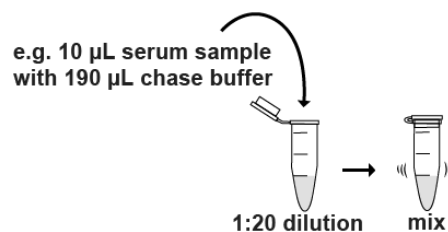
ASSAY PROCEDURE

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

The assay procedure consists of two steps:

1. Dilution of serum samples with chase buffer

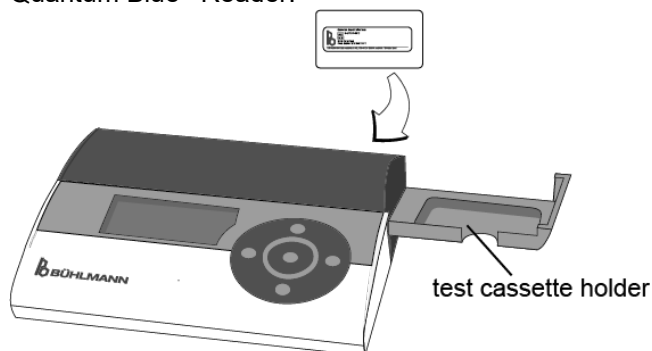
Prior to measurement dilute the serum sample 1:20 with chase buffer (B-LFTLIF-CB) (e.g. mix 10 µL serum sample with 190 µL chase buffer) in a test tube and mix it by vortexing, pipetting or shaking.



2. Lateral flow assay procedure and readout

QB2

Two alternative methods can be loaded from the respective RFID chip card: B-LFTLIF-RCC15 (with internal timer) or B-LFTLIF-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 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.



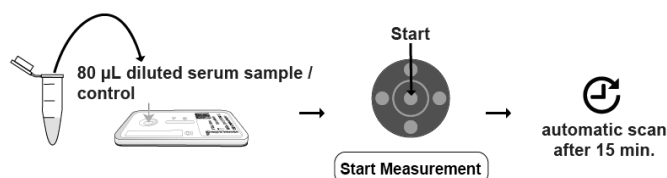
2.1. Method with internal timer

QB2: use the green RFID chip card B-LFTLIF-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-LFTLIF-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 minute (set a timer manually).
- Insert the test cassette into the test cassette holder of the Quantum Blue® Reader.
- Scan the test cassette with the Quantum Blue® Reader 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

- Calibrator values of the standard curve are assigned according to a value transfer protocol (ref. 1). The standard curve parameters are indicated in the enclosed QC data sheet. The calibrator material comprises infliximab in a human serum matrix and is standardized against internal reference material.
- The Quantum Blue® Reader uses a lot-specific calibration curve to calculate the infliximab concentration. The measuring range is between 0.4 and 20.0 µg/mL.
- Quantum Blue® Infliximab is standardized against the WHO International Standard for Infliximab (NIBSC code: 16/170). 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%.

VALIDATION OF RESULTS

- For a valid test result, the control line (C) must be visible in any case (see figure 1A and figure 1B). It is used as a functional test control only and cannot be used for the interpretation of the test line (T). If the test line (T) is not detectable after 15 minutes of incubation time (figure 1A), the concentration of infliximab present in the serum sample is below the detection limit. If a test line (T) is detectable after 15 minutes of incubation time (figure 1B), the infliximab concentration present in the serum

sample is calculated by the Quantum Blue® Reader.

- If only the test line (T) is detectable after 15 minutes of incubation time (figure 1C), the test result is invalid and the Quantum Blue® Infliximab assay has to be repeated using another test cassette.
- If neither the control line (C) nor the test line (T) are detectable after 15 minutes of incubation time (figure 1D), the test result is invalid and the Quantum Blue® Infliximab assay has to be repeated using another test cassette.
- As the Quantum Blue® Reader allows a quantitative evaluation of the test (T) and control (C) line, an additional validity check of the control line (C) is undertaken. If the signal intensity of the control line (C) is below a specific preconfigured threshold after 15 minutes of incubation time, the test result is invalid and the Quantum Blue® Infliximab assay has to be repeated using another test cassette.

LIMITATIONS

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

EXPECTED VALUES

The determination of infliximab trough levels in serum samples can support therapy monitoring and has been associated with improved clinical outcomes for IBD patients (ref. 3-8).

Values below 3 µg/mL

Sub-therapeutic infliximab levels in serum suggest pharmacokinetic failure. Therapy adjustment, taking into account available clinical and laboratory findings, should be considered (ref. 2, 3).

Values between 3-7 µg/mL

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

Values above 7 µg/mL

Supra-therapeutic infliximab trough levels may serve as an indication for dose reduction in conjunction with the clinical picture, in patients in IBD disease remission (ref 2). It was shown that dose de-escalation to reach the optimal

therapeutic window (3-7 µg/mL) has no effect on CRP values nor on Harvey Bradshaw or Mayo scores in Crohn's or ulcerative colitis patients, respectively (ref. 3).

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

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

The method comparison study was performed according to the CLSI guideline EP09-A3. One hundred and ten (110) clinical samples were measured in triplicate using two test cassette lots of Quantum Blue® Infliximab over three days. Reference values, with a final concentration interval between 1.2 and 22.2 µg/mL were established with a commercially available infliximab ELISA test (ref. 9). Bias was determined using a Passing-Bablok linear regression analysis. The results are summarized in figure 2.

Recovery: 83-100%

Six clinical specimens including infliximab levels close to clinical decision points were spiked with 3.2 µg/mL infliximab in serum-based calibrator material. "Baseline" samples were spiked with the corresponding volume of analyte-free specimen. "Baseline" and "baseline + spike" samples were measured in ten replicates with one reagent lot. The results are shown in table 3.

Repeatability: 16.3-25.0% CV

Within-laboratory precision: 18.5-25.3% CV

Repeatability and within-laboratory precision were established according to the CLSI guideline EP05-A3 using the standardized 20 days x 2 runs x 2 replicates study design. Seven, pooled, patient serum samples with infliximab concentrations covering the measuring range of the assay and clinical decision points were tested. The results are summarized in table 4.

Reproducibility: 22.6-29.3% CV

Reproducibility was established according to the CLSI guideline EP05-A3 by performing measurements using a 3 operators x 3 instruments/lots x 5 days x 5 replicates study design. Seven, pooled, patient serum samples with infliximab concentrations covering the measuring range of the assay and clinical decision points were tested. The results are summarized in table 5.

Limit of Detection (LoD): <0.21 µg/mL infliximab

The LoD was established according to the CLSI guideline EP17-A2 and with proportions of false positives (α) less than 5% and false negatives (β) less than 5% based on 120 determinations, with 60 blank and 60 low level replicates; and a **LoB of <0.10 µg/mL**.

Lower Limit of Quantitation (LLOQ): 0.32 µg/mL

Upper Limit of Quantitation (ULOQ): 22.7 µg/mL

The LLOQ and ULOQ were established according to the CLSI guideline EP17-A2 based on 60 determinations and a relative total error goal of 30.0%.

Linear range: 0.14-20.37 µg/mL

Linear range (additional dilution): 2.6 – 183.6 µg/mL

The linear range of the Quantum Blue® Infliximab test was determined according to the CLSI guideline EP06-A. Both samples prepared using the standard procedure as well as samples additionally diluted 1:10 in chase buffer were assessed. The linear range was defined as the interval of concentration levels in which coefficients of the second and third order fits were determined as not significant. Results for one test cassette lot, for the standard procedure, are shown in figure 3.

High dose hook effect

Samples exceeding the measuring range with concentrations of up to 354 µg/mL will be correctly indicated as above 20 µg/mL.

Specificity / cross-reactivity

The Quantum Blue® Infliximab test specifically recognizes the infliximab originator drug (Remicade®) as well as the infliximab biosimilars, CT-P13 (Remsima®; Inflectra®) (ref. 10), SB2 (FLIXABI®) (ref. 11) and GP1111 (Zessly®), in serum. The recovery of Zessly® values compared to expected values, based on IgG determination of drug concentrations and dilution factor in negative serum, were found in the range of 89.5% to 102.5%. In contrast, spiked serum with TNFα blockers, such as adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®), golimumab (Simponi®), and certolizumab (Cimzia®) up to 100 µg/mL resulted in a read out below the limit of blank.

INTERFERING SUBSTANCES

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

Within-class switch

TNFα blockers were tested at concentrations exceeding the lowest, recommended drug trough levels by three-fold. No interference was detected up to 10 µg/mL for adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®) and golimumab (Simponi®). Interference was detected with certolizumab (Cimzia®) with bias criteria not exceeded at a concentration of 1.7 µg/mL.

Serum indices

No interference was detected with the following substances up to the listed concentrations: Triglycerides (Intralipid® 1320 mg/dL), conjugated bilirubin (342 µmol/L; 28.8 mg/dL), unconjugated bilirubin (342 µmol/L; 20.0 mg/dL), hemoglobin (50 µmol/L; 322 mg/dL), TNFα (0.15 nmol/L; 2.6 ng/mL) and rheumatoid factors (497.3 IU/mL).

Immunosuppressive co-medication

No interference was detected with immunosuppressive co-medication such as azathioprine (216 µmol/L; 6.0 mg/dL), 6-mercaptopurine (216 µmol/L; 3.7 mg/dL), and methotrexate (3000 µmol/L; 136.3 mg/dL).

All performance characteristics, unless otherwise indicated, were assessed with infliximab (Remicade®, MSD).

ANWENDUNGSZWECK

Der Quantum Blue® Infliximab ist ein *in vitro* diagnostischer Lateral Flow Immunassay zur quantitativen Bestimmung von Infliximab Medikamentenspiegel (Remicade®) und Infliximab-Biosimilars CT-P13 (Remsuma®; Inflectra®), SB2 (FLIXABI®) und GP1111 (Zessly®) in Serumproben. Der Test dient als Hilfe zur therapeutischen Arzneimittelüberwachung bei Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung (CED) unter Infliximab-Therapie in Verbindung mit anderen klinischen und Laborbefunden. Quantum Blue® Infliximab wird mit dem Quantum Blue® Reader kombiniert.

Für Laborzwecke geeignet.

PRINZIP DER METHODE

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

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

Tabelle 1

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

ÜBERPRÜFUNG DES TESTKITS

Die BÜHLMANN Produkte wurden mit grösster Sorgfalt hergestellt und alle erdenklichen Anstrengungen wurden unternommen, um die Vollständigkeit dieses Kits und seine Leistung zu gewährleisten. Wir empfehlen Ihnen trotzdem,

das Testkit hinsichtlich des Zustands der Testkassette und deren Verpackung auf den folgenden Kriterien zu überprüfen:

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

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

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

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

Tabelle 2

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortex Mischer
- Timer (optional)
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen: 10-100 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 „Gute Laborpraxis“ (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen sollten getroffen werden.
- **Reagenzien:** Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten vermeiden. Im Falle eines Kontaktes sofort mit reichlich Wasser spülen, ansonsten kann eine Reizung auftreten.

Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss den gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Technische Vorsichtsmassnahme

Kitkomponenten

- Der Test muss bei Raumtemperatur (20-26 °C) durchgeführt werden.
- Alle Reagenzien und Testproben müssen vor dem Testbeginn auf Raumtemperatur (20-26 °C) gebracht werden.
- Entnehmen Sie die Testkassette aus dem Folienbeutel, bevor Sie den Test durchführen. Lassen Sie die Testkassette mindestens 2 Minuten lang in der Laborumgebung equilibrieren (20-26 °C). Vom Folienbeutel entnommene Testkassetten müssen innerhalb von 4 Stunden verwendet werden.
- Die Reagenzien müssen vor Gebrauch gut gemischt werden (z.B. Vortexen).
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Unterschiedliche Reagenzien-Lots dürfen nicht gemischt werden.
- Die Testkassette darf nicht auseinander gebaut werden.
- Testkassetten können nicht erneut verwendet werden.
- Die Testkassetten müssen mit Vorsicht behandelt werden. Die Ladevorrichtung der Probe oder das Messfenster der Probe darf nicht verunreinigt werden durch Hautkontakt, andere Flüssigkeiten usw. (Abbildung 1D).
- Die Testkassette muss bei der Durchführung des Tests eben und horizontal positioniert sein.

Testablauf

- Lesen Sie die Testanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig durch. Die Leistungsdaten können negativ beeinflusst werden, wenn Reagenzien nicht korrekt verdünnt, behandelt oder unter Bedingungen gelagert werden, die von denen in der Arbeitsanleitung beschriebenen abweichen.
- 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® Infliximab Test programmiert werden. Laden Sie die Testmethode mithilfe der RFID Chipkarte (B-LFTLIF-RCC oder B-LFTLIF-RCC15), bevor Sie den Test starten (siehe Handbuch des Quantum Blue® Readers).
- Der QB3G muss eingeschaltet und für den Quantum Blue® Infliximab Test programmiert werden, indem entweder die Barcodekarte (B-LFTLIF-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 20 µg/mL (bis 183,6 µg/mL) können zusätzlich 1:10 in Laufpuffer verdünnt werden (insgesamt 1:200), um Ergebnisse im Messbereich des Tests zu erhalten.

PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

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

Unverdünnte Serumproben können ungekühlt (Temperaturen bis zu 28 °C) oder bei 2-8 °C bis zu 10 Tage aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrung lagern Sie die unverdünnten Serumproben bei ≤-20 °C. Diese Proben sind bei ≤-20 °C mindestens 21 Monate stabil.

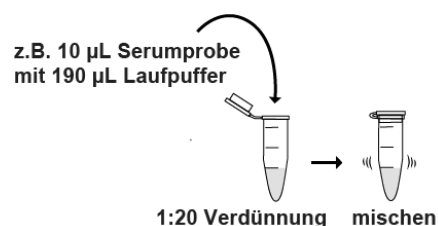
TESTDURCHFÜHRUNG

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

Der Arbeitsablauf gliedert sich in 2 Schritte:

1. Verdünnung der Serumproben mit Laufpuffer

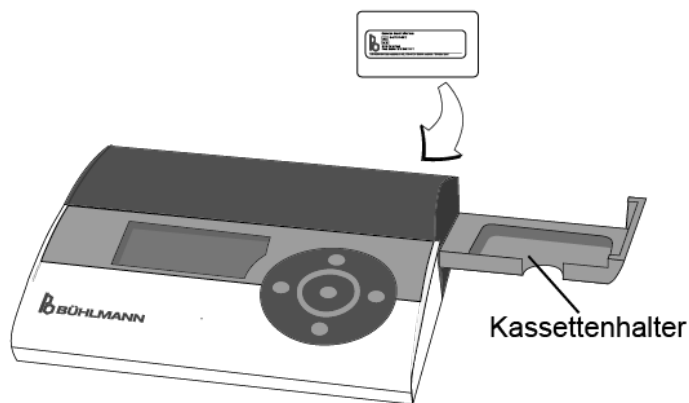
Die Serumprobe wird vor der Messung mit Laufpuffer (B-LFTLIF-CB) in einem Teströhrchen 1:20 verdünnt (z.B. 10 µL Serumprobe mit 190 µL Laufpuffer mischen) und durch vortexen, pipettieren oder schütteln gemischt.



2. Lateral-Flow Testablauf und Quantifizierung

QB2

Von der jeweiligen RFID Chipkarte können zwei alternative Methoden geladen werden: B-LFTLIF-RCC15 (mit integriertem Timer) oder B-LFTLIF-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 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

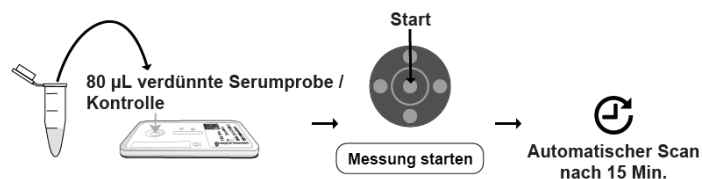
QB2: Verwenden Sie die grüne RFID Chipkarte B-LFTLIF-RCC15

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 am Quantum Blue® Reader 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.



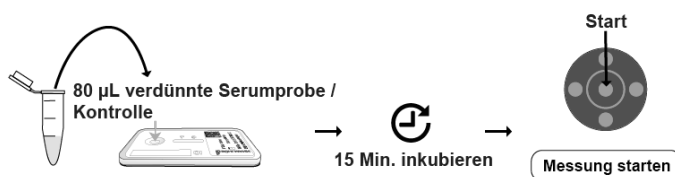
2.2. Methode ohne integrierten Timer

QB2: Verwenden Sie die weisse RFID Chipkarte B-LFTLIF-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 Wecker manuell einstellen).
- Die Testkassette in den Testkassettenhalter am Quantum Blue® Reader 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 Leistungen des Testes nicht innerhalb der erwarteten Bereiche liegen und wiederholte Messungen einen Durchführungsfehler ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipetten, Temperatur und

- Zeitmessung, ii) Verfallsdaten der Reagenzien, iii) Lagerung- und Inkubationsbedingungen.
- Der Selbsttest, der beim Einschalten des Quantum Blue® Readers durchgeführt wird, muss gültig sein.

STANDARDISIERUNG

- Kalibratorwerte der Standardkurve werden gemäss einem Werteübertragungsprotokoll (Ref. 1) zugewiesen. Die Standardkurvenparameter sind im beiliegenden QC-Datenblatt angegeben. Das Kalibratormaterial beinhaltet Infliximab in einer Matrix aus humanem Serum und wurde gegen ein internes Referenzmaterial standardisiert.
- Der Quantum Blue® Reader verwendet für die Berechnung der Infliximab Konzentration eine lot-spezifische Standardkurve. Der Messbereich liegt zwischen 0,4 und 20 µg/mL.
- Quantum Blue® Infliximab ist gegen den internationalen WHO-Standard für Infliximab (NIBSC-Code: 16/170) 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%.

VALIDIERUNG DER RESULTATE

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

EINSCHRÄNKUNGEN

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

ERWARTETE WERTE

Die Bestimmung von Infliximab Medikamentenspiegel in Serumproben kann die Therapieüberwachung unterstützen und wurde mit einem verbesserten Krankheitsverlauf bei Patienten mit entzündlicher Darmerkrankung (CED) in Verbindung gebracht (Ref. 3-8).

Werte unterhalb 3 µg/mL

Subtherapeutische Infliximab Medikamentenspiegel in Serum deuten auf ein pharmakokinetisches Versagen hin. Eine Therapieanpassung unter Berücksichtigung der verfügbaren klinischen Befunde und Laborbefunde sollte in Erwägung gezogen werden. (Ref. 2, 3).

Werte zwischen 3-7 µg/mL

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

Werte über 7 µg/mL

Supratherapeutische Infliximab Medikamentenspiegel können ein Indiz dafür sein, die Dosis unter Berücksichtigung des Krankheitsbilds bei CED-Patienten in Krankheitsremission zu reduzieren (Ref. 2). Es wurde gezeigt, dass eine Deeskalation der Dosis zum Erreichen des optimalen therapeutischen Fensters (3-7 µg/mL) keine Auswirkung auf CRP-Werte, „Harvey Bradshaw“ oder einen „Mayo-Score“ bei Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa hat (Ref. 3).

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

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

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

Die Methodenvergleichsstudie wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP09-A3 durchgeführt. Einhundertzehn (110) klinische Proben wurden in Dreifachbestimmung unter Verwendung von zwei Testkassettenchargen von Quantum Blue® Infliximab im Verlauf von drei Tagen gemessen. Referenzwerte mit einem Endkonzentrationsintervall von 1,2 – 22,2 µg/mL wurden mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Test für Infliximab ermittelt (Ref. 9). Die Verzerrung wurde mithilfe einer Analyse der linearen Regression nach Passing-Bablok bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

Wiederfindung: 83-100%

Sechs klinische Proben mit Infliximabspiegel nahe klinischer Entscheidungspunkte wurden mit 3,2 µg/mL Infliximab in Kalibratormaterial auf Serumbasis gespiked. Die „Baseline“ Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen der analytfreien Probe versetzt. Die „Baseline“- und die „Baseline + Spike“-Proben wurden in zehn Replikaten mit einer Reagenzcharge gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 angegeben.

Wiederholbarkeit: 16,3-25,0% CV

Präzision innerhalb des Labors (Within-laboratory precision): 18,5-25,3% CV

Die Wiederholbarkeit und die laborinterne Präzision wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP05-A3 mit dem standardisierten Studiendesign 20 Tage x 2 Läufe x 2 Replikate ermittelt. Getestet wurden sieben gepoolte Patientenserumproben, deren Infliximab-Konzentrationen den Messbereich des Assays und die klinischen Entscheidungspunkte abdeckten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Reproduzierbarkeit: 22,6-29,3% CV

Die Reproduzierbarkeit wurde gemäss CLSI-Leitlinie EP05-A3 mithilfe von Messungen mit dem Studiendesign 3 Bediener x 3 Geräte/Chargen x 5 Tage x 5 Replikate ermittelt. Getestet wurden sieben gepoolte Patientenserumproben, deren Infliximab-Konzentrationen den Messbereich des Assays und die klinischen Entscheidungspunkte abdeckten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Limit of Detection (LoD): <0,21 µg/mL Infliximab

Die LoD wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP17-A2 ermittelt und mit Anteilen von weniger als 5% Falschpositiven (α) und weniger als 5% Falschnegativen (β) basierend auf 120 Bestimmungen, mit 60 Leerproben- und 60 Niedrigspiegel-Replikaten; und einer **LoB von < 0,10 µg/mL**.

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

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

The LLoQ und ULoQ wurden gemäss CLSI-Richtlinie EP17-A2 basierend auf 60 Bestimmungen und einem relativen Gesamtfehler-Zielwert von 30,0% ermittelt.

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

Linearer Bereich (Zusatzverdünnung): 2,6 – 183,6 µg/mL

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

Bewertet wurden sowohl Proben, die nach dem Standardverfahren vorbereitet wurden, als auch Proben, die zusätzlich 1:10 in Chase-Puffer verdünnt wurden. Per Definition war der lineare Bereich das Intervall der Konzentrationsniveaus, in dem Koeffizienten der Anpassungen zweiter und dritter Ordnung als nicht signifikant bestimmt wurden. In Abbildung 3 sind die Ergebnisse für eine Testkassettencharge für das Standardverfahren gezeigt.

High-Dose-Hook Effekt

Proben, die oberhalb des Messbereichs mit Konzentrationen bis 354 µg/mL liegen, werden korrekt mit grösser 20 µg/mL angegeben.

Spezifität / Kreuzreaktivität

Der Quantum Blue® Infliximab Test erkennt spezifisch das Infliximab-Originalpräparat (Remicade®) sowie die Infliximab Biosimilars CT-P13 (Remsima®; Inflectra®) (Ref. 10), SB2 (FLIXABI®) (Ref. 11) und GP1111 (Zessly®), in Serum. Die Wiederfindung der Zessly®-Werte im Vergleich zu den erwarteten Werten, basierend auf der IgG-Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen und des Verdünnungsfaktors in negativem Serum, lag im Bereich von 89,5% bis 102,5%. Im Gegensatz hierzu ergab mit TNF α Blocker wie Adalimumab (Humira®), Etanercept (Enbrel®), Golimumab (Simponi®) und Certolizumab (Cimzia®) gespiketes Serum bis zu 100 µg/mL ein Messergebnis unterhalb des Limit of Blanks.

WECHSELWIRKENDE SUBSTANZEN

Die Empfindlichkeit des Quantum Blue® Infliximab Tests gegenüber wechselwirkenden Substanzen wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP07-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

TNF α Blocker wurden in Konzentrationen getestet, die den niedrigsten empfohlenen Medikamentenspiegel um das Dreifache überschritten. Bei Werten bis zu 10 µg/mL wurden für Adalimumab (Humira®), Etanercept (Enbrel®) und Golimumab (Simponi®) keine Wechselwirkungen nachgewiesen. Mit Certolizumab (Cimzia®) wurde eine Wechselwirkung nachgewiesen, wobei Biaskriterien bei einer Konzentration von 1,7 µg/mL nicht überschritten wurden.

Serum-Index

Mit den folgenden Stoffen wurden bis zu den angegebenen Konzentrationen keine Wechselwirkung festgestellt: Triglycerid (Intralipid® 1320 mg/dL), konjugiertes Bilirubin (342 µmol/L; 28,8 mg/dL), unkonjugiertes Bilirubin (342 µmol/L; 20,0 mg/dL), Hämoglobin (50 µmol/L; 322 mg/dL), TNF α (0,15 nmol/L, 2,6 ng/mL) und Rheumafaktoren (497,3 IE/mL).

Immunsuppressiva / Begleitmedikation

Mit Immunsuppressiva / Begleitmedikationen wie zum Beispiel Azathioprin (216 µmol/L; 6,0 mg/dL), 6-Mercaptopurin (216 µmol/L; 3,7 mg/dL) und Methotrexat

(3000 µmol/L; 136,6 mg/dL) wurden keine Wechselwirkung nachgewiesen. Alle Leistungseigenschaften, sofern nicht anderweitig darauf hingewiesen, wurden mit Infliximab (Remicade®, MSD) beurteilt.

UTILISATION PREVUE

Le Quantum Blue® Infiximab est un test diagnostique *in vitro* immunochromatographique à flux latéral. Il est destiné au dosage quantitatif des taux résiduels d'infiximab (Remicade®) et des médicaments biosimilaires de l'infiximab, CT-P13 (Remsima®, Inflectra®), SB2 (FLIXABI®) et GP1111 (Zessly®), dans des échantillons de sérum. Associé à d'autres informations cliniques et résultats obtenus en laboratoire, le test sert d'aide à la surveillance thérapeutique pharmacologique des patients souffrant d'une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI) et traités par infiximab. Le Quantum Blue® Infiximab s'utilise en association avec le Quantum Blue® Reader.

Pour utilisation en laboratoire uniquement.

PRINCIPE DU TEST

Le test permet la mesure sélective de l'infiximab par un dosage immunologique de type sandwich. Le facteur de nécrose tumorale alpha (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'infiximab présent dans l'échantillon se lie au conjugué. Un anticorps monoclonal, hautement spécifique de l'analyte, est immobilisé sur la membrane d'analyse et capture le conjugué / complexe d'analyte, ce qui entraîne une coloration de la ligne de test (T). Le restant du 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-TLIF25	LF-TLIF10		
Cassette test	25 pièces	10 pièces	B-LFTLIF-TC	Scellée sous vide dans un sachet
Tampon de dilution	1 flacon 10 mL	1 flacon 10 mL	B-LFTLIF-CB	Prêt à l'emploi
Contrôles Bas*/Elevé*	2 flacons 0,5 mL	2 flacons 0,5 mL	B-LFTLIF-CONSET	Prêts à l'emploi
Carte à puce RFID	1 pièce	1 pièce	B-LFTLIF-RCC	Carte en plastique blanche
Carte à puce RFID	1 pièce	1 pièce	B-LFTLIF-RCC15	Carte en plastique verte
Carte à code-barres	1 pièce	1 pièce	B-LFTLIF-BCC	Carte en plastique à code-barres 2D

Tableau 1

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

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 :

- Date d'expiration.
- L'état impeccable de l'emballage (par exemple absence de toute perforation pouvant entraîner 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 (20-26°C).
- Tous les réactifs et les échantillons doivent être équilibrés à température ambiante (20-26°C) avant de commencer le test.
- Avant de procéder au test, sortir la cassette test de son sachet en aluminium et la laisser s'équilibrer à température ambiante (20-26°C) pendant au moins 2 minutes. Les cassettes test sorties de leur sachet en aluminium doivent être utilisées dans les 4 heures.
- Bien mélanger les réactifs (vortex) avant utilisation.
- Les composants ne doivent pas être utilisés après la date de péremption indiquée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Ne pas démonter la cassette test.
- Les cassettes test sont à usage unique.
- Manipuler les cassettes test avec soin. Ne pas contaminer l'orifice de chargement de l'échantillon ou la fenêtre de lecture par contact avec la peau, d'autres liquides, etc. (figure 1D).
- Assurer une position horizontale plane de la cassette test durant l'analyse.

Procédure de test

- Lire attentivement les instructions avant d'effectuer le test. La performance d'analyse sera affectée si les réactifs sont dilués de manière incorrecte, manipulés ou entreposés dans des conditions autres que celles détaillées dans la présente notice d'utilisation.
- 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® Infliximab. Charger la méthode de dosage au moyen de la carte à puce RFID (B-LFTLIF-RCC ou B-LFTLIF-RCC15) avant le démarrage du test (cf. manuel du Quantum Blue® Reader).
- Le QB3G doit être allumé et programmé pour le dosage Quantum Blue® Infliximab, soit en utilisant la carte à code-barres (B-LFTLIF-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 20 µg/mL (jusqu'à 183,6 µg/mL), peuvent être dilués encore au 1:10 dans du tampon de dilution (1:200 au

final), afin d'obtenir un résultat compris dans la gamme de mesure du test.

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Prélever le sang dans des tubes de ponction veineuse sans additif et évitant l'hémolyse, et laisser le caillot sanguin se former à température ambiante pendant au moins 20 min et jusqu'à 60 min. Centrifuger à ~2000 x g, 15 minutes à température ambiante. Décanter le sérum.

Les échantillons de sérum non dilués peuvent être conservés sans réfrigération (températures jusqu'à 28 °C) ou réfrigérés à 2-8 °C jusqu'à 10 jours. Pour un stockage prolongé, conserver des échantillons de sérum non dilués à ≤ -20 °C. Ces échantillons sont stables pendant au moins 21 mois à ≤ -20 °C.

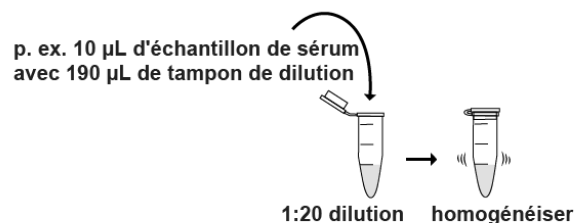
PROCEDURE DE DOSAGE

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

La procédure de dosage se déroule en 2 étapes :

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

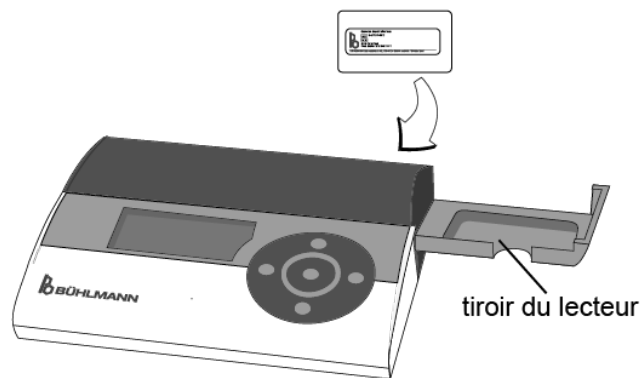
Avant la mesure, diluer l'échantillon de sérum au 1:20 avec le tampon de dilution (B-LFTLIF-CB) (par exemple, mélanger 10 µL d'échantillon de sérum avec 190 µL de tampon) dans un tube à essai et mélanger au vortex, à la pipette ou par agitation.



2. Procédure et lecture du dosage

QB2

Deux méthodes alternatives peuvent être chargées à partir des cartes à puce RFID respectives : B-LFTLIF-RCC15 (avec minuteur interne) ou B-LFTLIF-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 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

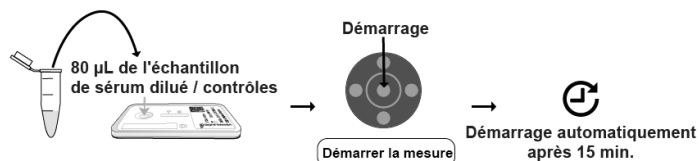
QB2: utiliser la carte à puce RFID verte B-LFTLIF-RCC15

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.



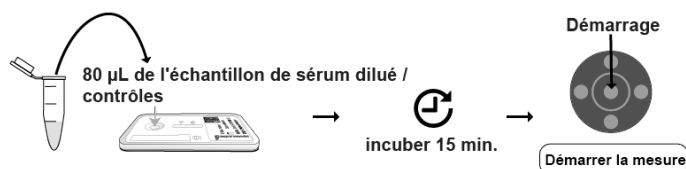
2.2. Méthode sans minuteur interne

QB2: utiliser la carte à puce RFID blanche B-LFTLIF-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, on vérifiera les paramètres suivants : i) pipetage, dispositifs de contrôle de la température et du temps, ii) date d'expiration des réactifs et iii) conditions de conservation et d'incubation.
- L'auto-vérification effectuée lors de la mise en marche du Quantum Blue® Reader doit être valide.

STANDARDISATION

- Les valeurs de calibrateurs de la courbe de calibration sont définies selon un protocole de transfert de valeur (réf. 1). Les paramètres de la courbe de calibration sont indiquées dans la fiche de contrôle qualité ci-jointe. Les calibrateurs contiennent Infliximab dans une matrice de sérum humaine et sont standardisés par rapport à une matrice de référence en interne.
- Le Quantum Blue® Reader utilise une courbe d'étalonnage spécifique du lot pour calculer la concentration d'infliximab. La gamme de dosage est comprise entre 0,4 et 20 µg/mL.
- Le test Quantum Blue® Infliximab est standardisé par rapport à la norme internationale de l'OMS pour l'Infliximab (code NIBSC: 16/170). 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%.

VALIDATION DES RESULTATS

- Pour valider un résultat de test, la ligne de contrôle (C) doit toujours être visible (voir figure 1A et figure 1B). Cette ligne est uniquement utilisée comme contrôle fonctionnel du test et ne peut servir à l'interprétation de la ligne de test (T). Si la ligne de test (T) n'est pas détectable au bout de 15 minutes de temps d'incubation (figure 1A), cela signifie qu'aucune quantité détectable d'infliximab n'est présente dans l'échantillon de sérum. Si une ligne de test (T) est détectable au bout de 15 minutes de temps d'incubation (figure 1B), la quantité d'infliximab présente dans l'échantillon de sérum est calculée par le Quantum Blue® Reader.
- Si seule la ligne de test (T) est détectable après 15 minutes de temps d'incubation (figure 1C), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de l'infliximab doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.
- Dans le cas où ni la ligne de contrôle (C) ni la ligne de test (T) ne sont détectables au bout de 15 minutes de temps d'incubation (figure 1D), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de l'infliximab doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.
- Étant donné que le Quantum Blue® Reader permet une évaluation quantitative des lignes de test (T) et de contrôle (C), une vérification supplémentaire de la validité de la ligne de contrôle (C) est effectuée. Si l'intensité du signal de la ligne de contrôle (C) est en dessous d'un seuil spécifique et préconfiguré après 15 minutes de temps d'incubation, le résultat du test est également non valide et le dosage de l'infliximab doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.

LIMITES

- Les réactifs fournis dans cette trousse sont optimisés pour mesurer des taux résiduels d'infliximab dans des échantillons de sérum dilués.
- En raison d'un risque de réaction croisée, ne pas soumettre les échantillons de patients auparavant traités par certolizumab (Cimzia®) directement au test

Quantum Blue® Infliximab. Attendre que les taux résiduels de certolizumab (Cimzia®) descendent au moins en dessous de 1,7 µg/mL.

- Les résultats du test Quantum Blue® Infliximab devraient être interprétés en association avec ceux d'autres investigations cliniques et de laboratoire. Ces dernières peuvent comprendre la détermination de l'activité de la maladie inflammatoire de l'intestin (MICI), la présence d'anticorps anti-médicament ainsi que des informations sur l'observance du patient quant à sa thérapie (réf. 2).
- Des taux résiduels d'infliximab compris entre 3 et 7 µg/mL sont considérés de manière consensuelle comme la meilleure fenêtre thérapeutique en termes d'efficacité de traitement (ref. 2, 6). Cependant, les taux résiduels optimaux peuvent varier en fonction des individus, de la cible du traitement ou du phénotype de la maladie (réf. 2).

VALEURS ATTENDUES

La détermination de concentrations résiduelles d'infliximab dans des échantillons de sérum de patients peut soutenir le suivi thérapeutique de patients souffrant d'inflammation et a été associée à de meilleurs résultats cliniques pour les patients atteints de MICI (réf. 3-8).

Valeurs inférieures à 3 µg/mL

Des taux sériques sous-thérapeutiques d'infliximab suggèrent un échec pharmacocinétique. Un ajustement thérapeutique, tenant compte des observations cliniques et résultats de laboratoire disponibles, devrait être envisagé. (réf. 2, 3).

Valeurs comprises entre 3-7 µg/mL

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

Valeurs supérieures à 7 µg/mL

Des taux résiduels supra-thérapeutiques d'infliximab peuvent servir d'indication à diminuer la dose, conjointement avec le tableau clinique, chez les patients en rémission de MICI (réf. 2). Il a été démontré qu'une désescalade de la dose pour atteindre la fenêtre thérapeutique optimale (3-7 µg/mL) n'a pas d'effet sur les valeurs de CRP ni sur les scores d'Harvey Bradshaw ou Mayo pour les patients souffrant respectivement de la maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique (réf. 3).

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

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

La comparaison de méthodes a été déterminée selon la ligne directrice CLSI EP09-A3. Cent dix (110) échantillons cliniques ont été mesurés en triple à l'aide de deux lots de cassettes test de Quantum Blue® Infliximab sur une

période de trois jours. Les valeurs de référence, avec une plage de concentrations finales de 1,2 à 22,2 µg/mL, ont été établies avec un test d'infliximab ELISA du commerce (réf. 9). Le biais a été déterminé en utilisant une analyse par régression linéaire de Passing-Bablok. Les résultats sont résumés sur la figure 2.

Recouvrement : 83-100%

A six échantillons cliniques contenant des taux d'infliximab proches des points de décision clinique, une solution à 3,2 µg/mL d'infliximab dans du sérum négatif a été ajoutée. Les échantillons « de ligne de base » ont été additionnés du volume correspondant de prélèvement sans analyte. Les échantillons « de ligne de base » et « de ligne de base + addition » ont été mesurés en dix réplicats avec un seul lot de réactifs. Les résultats apparaissent dans le tableau 3.

Répétabilité : 16,3-25,0% CV

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

La répétabilité et la précision intra-laboratoire ont été établies selon la ligne directrice CLSI EP05-A3 en utilisant le modèle d'étude standard de 20 jours x 2 analyses x 2 répétitions. Sept échantillons de sérum de patient réunis avec des concentrations en infliximab couvrant la plage de mesure du dosage et les points de décision clinique ont été testés. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Reproductibilité : 22,6-29,3% CV

La reproductibilité a été établie selon la ligne directrice CLSI EP05-A3 en réalisant les mesures à l'aide d'un modèle d'étude 3 opérateurs x 3 instruments/lots x 5 jours x 5 répétitions. Sept échantillons de sérum de patient réunis avec des concentrations en infliximab couvrant la plage de mesure du dosage et les points de décision clinique ont été testés. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 5.

Limite de détection (LoD) : <0,21 µg/mL d'infliximab

La LoD a été établie selon la ligne directrice CLSI EP17-A2 et avec des proportions de faux positifs (α) inférieure à 5% et de faux négatifs (β) inférieure à 5% en se basant sur 120 déterminations, avec 60 blancs et 60 répétitions de faible niveau; et une **LoB de < 0,10 µg/mL**.

Limite inférieure de quantification (LoQ inf) : 0,32 µg/mL

Limite supérieure de quantification (LoQ sup) : 22,7 µg/mL

La LoQ inf et la LoQ sup ont été établies selon la ligne directrice CLSI EP17-A2 en se basant sur 60 déterminations et un objectif d'erreur totale relative de 30,0%.

Plage de linéarité : 0,14-20,37 µg/mL d'infliximab

Plage de linéarité (dilution supplémentaire):

2.6 – 183.6 µg/mL

La plage de linéarité du test Quantum Blue® Infliximab a été déterminée selon la ligne directrice CLSI EP06-A. Les échantillons préparés en suivant la procédure standard ainsi que des échantillons avec une dilution additionnelle au 1/10e dans du tampon de dilution ont été évalués. La plage de linéarité a été définie comme l'intervalle de concentration dans lequel les coefficients du deuxième et du troisième ordre ont été déterminés comme étant non

significatifs. Les résultats pour un lot de cassettes test, en procédure standard, sont présentés sur la figure 3.

Effet crochet à forte dose

Les échantillons de concentration supérieure à la plage de mesure allant jusqu'à 354 µg/mL seront correctement rapportés comme supérieur à 20 µg/mL.

Spécificité/Réactivité croisée

Le test Quantum Blue® Infliximab reconnaît spécifiquement le médicament infliximab princeps (Remicade®) ainsi que ses biosimilaires, le CT-P13 (Remsima® ; Inflectra®) (réf. 10), le SB2 (FLIXABI®) (réf. 11) et le GP1111 (Zessly®), dans le sérum. La récupération des valeurs de Zessly® par rapport aux valeurs attendues, en se basant sur la détermination par IgG des concentrations en médicament et le facteur de dilution dans le sérum négatif, a donné des valeurs dans une plage de 89,5% à 102,5%. En revanche, les sérums enrichis à l'aide d'agents bloquants du TNF α , tels que l'adalimumab (Humira®), l'étanercept (Enbrel®), le golimumab (Simponi®) et le certolizumab (Cimzia®) jusqu'à 100 µg/mL ont donné une valeur sous la limite de blanc.

INTERFERENCES ENTRE SUBSTANCES

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

Commutation de classe / agents bloquants du TNF α

Des agents bloquants du TNF α ont été testés à des concentrations trois fois supérieures aux plus faibles taux résiduels de médicament recommandés. Aucune interférence n'a été détectée jusqu'à 10 µg/mL pour l'adalimumab (Humira®), l'étanercept (Enbrel®) et le golimumab (Simponi®). Une interférence a été détectée avec le certolizumab (Cimzia®), le critère de biais n'étant pas dépassé à une concentration de 1,7 µg/mL.

Indices de sérum

Aucune interférence n'a été détectée avec les substances suivantes jusqu'aux concentrations mentionnées : Triglycérides (Intralipid® 1320 mg/dL), bilirubine conjuguée (342 µmol/L; 28,8 mg/dL), bilirubine non conjuguée (342 µmol/L; 20,0 mg/dL), hémoglobine (50 µmol/L ; 322 mg/dL), TNF α (0,15 nmol/L ; 2,6 ng/mL) et facteurs rhumatoïdes (497,3 UI/mL).

Immuno-suppresseurs/co-médication

Aucune interférence n'a été détectée avec des immuno-suppresseurs/co-médicaments tels que l'azathioprine (216 µmol/L ; 6 mg/dL), la 6-mercaptopurine (216 µmol/L ; 3,7 mg/dL) et le méthotrexate (3000 µmol/L ; 136,3 mg/dL).

- Toutes les caractéristiques de performance, sauf indication contraire, ont été évaluées avec l'infliximab (Remicade®, MSD).

USO PREVISTO

Quantum Blue® Infliximab è un immunodosaggio diagnostico *in vitro* a flusso laterale per la determinazione quantitativa dei livelli minimi del farmaco infliximab (Remicade®) e dei biosimilari di infliximab, CT-P13 (Remsima®; Inflectra®), SB2 (FLIXABI®) e GP1111 (Zessly®), in campioni di siero. Il saggio serve come ausilio per il monitoraggio terapeutico dei farmaci in pazienti con malattia infiammatoria intestinale (IBD) in terapia con infliximab assieme ad altre evidenze cliniche e di laboratorio. Quantum Blue® Infliximab è combinato con Quantum Blue® Reader.

Per l'uso in laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

Il test è progettato per la misurazione selettiva di infliximab mediante un immunodosaggio a sandwich. Il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α) ricombinante è coniugato a oro colloidale. Questo coniugato di oro viene rilasciato da un pad in un sistema di reazione su una cassetta di rilevazione (TC) quando viene applicato il campione. L'infliximab presente nel campione si lega al coniugato di oro. Un anticorpo monoclonale, altamente specifico per l'infliximab, è immobilizzato sulla membrana analitica e cattura il complesso coniugato di oro e analita infliximab, determinando una colorazione di una linea di test (T). Il coniugato TNF α /oro libero rimanente si lega ad una linea di controllo (C). Le intensità dei segnali della linea di test (T) e della linea di controllo (C) sono misurate quantitativamente con il Quantum Blue® Reader.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

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

Tabella 1

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

VERIFICARE IL TEST KIT

I prodotti BÜHLMANN sono stati fabbricati con la massima attenzione e tutti gli sforzi possibili sono stati presi per assicurare la completezza di questo kit di test e della sua prestazioni. Tuttavia, si consiglia di verificare il kit per la

condizione delle cassette di rilevazione e l'imballaggio, secondo i seguenti criteri:

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

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

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

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

Tabella 2

MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI

- Miscelatore vortex
- Timer (opzionale)
- Pipette di precisioni con puntuali monouso: 10-100 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 potrebbe verificarsi irritazioni.
- La soluzione inutilizzata deve essere smaltita nel rispetto delle disposizioni locali, regionali e nazionali in materia.

Precauzioni tecniche

Componenti del kit

- Il test deve essere eseguito a temperatura ambiente (20-26 °C).
- Tutti i reagenti e i campioni devono essere equilibrati a temperatura ambiente (20-26°C) prima di iniziare l'analisi.
- Prima di eseguire il test, estrarre la cassetta di rilevazione dalla busta di alluminio. Lasciare equilibrare la cassetta nell'ambiente del laboratorio (20-26°C) per almeno 2 minuti. Le cassette di rilevazione estratte dal loro imballaggio devono essere usate entro 4 ore.
- Miscelare bene (vortexare) i reagenti prima dell'uso.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non mescolare lotti diversi di reagenti.
- Non disassemblare le cassette do test.
- Le cassette di rilevazione non possono essere riutilizzate.
- Manipolare le cassette di rilevazione con attenzione. Non contaminare la porta di caricamento del campione o la finestra di lettura mediante contatto con le pelle, altri liquidi, etc. (figura 1D).
- Assicurarsi di una posizione piana e orizzontale della cassetta di rilevazione durante l'esecuzione del saggio.

Procedura del test

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, manipolati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- 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® Infliximab. Caricare il metodo di dosaggio impiegando la carta chip RFID (B-LFTLIF-RCC o B-LFTLIF-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® Infliximab utilizzando la carta con codice a barre (B-LFTLIF-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 lotto specifici.
- I campioni manipolati in modo non appropriato possono dare origine a risultati inaccurati.
- I campioni diluiti devono essere conservati a 2-8 °C e analizzati entro 24 ore. I campioni diluiti non possono essere conservati per periodi maggiori.
- I campioni con concentrazioni superiori a 20 µg/mL (fino a 183,6 µg/mL) possono essere ulteriormente diluiti 1:10 in tampone di diluizione (1:200, in totale) per

ottenere risultati che rientrino nell'intervallo di misurazione del test.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Prelevare il sangue in provette semplici per prelievo venoso senza alcun additivo, evitando l'emolisi, e lasciare coagulare il siero a temperatura ambiente per almeno 20 minuti fino a 60 minuti. Centrifugare per 15 minuti a ~2'000 x g a temperatura ambiente. Decantare il siero. I campioni di siero non diluiti possono essere conservati fuori dal frigorifero (temperatura massima: 28 °C) o a 2-8 °C per non più di 10 giorni. Per tempi di conservazione più lunghi, tenere i campioni non diluito a ≤ -20 °C. I campioni sono stabili per almeno 21 mesi ≤ -20 °C.

PROCEDURA DEL TEST

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

La procedura per il dosaggio consiste in due fasi:

1. Diluizione dei campioni di siero con tampone di diluizione

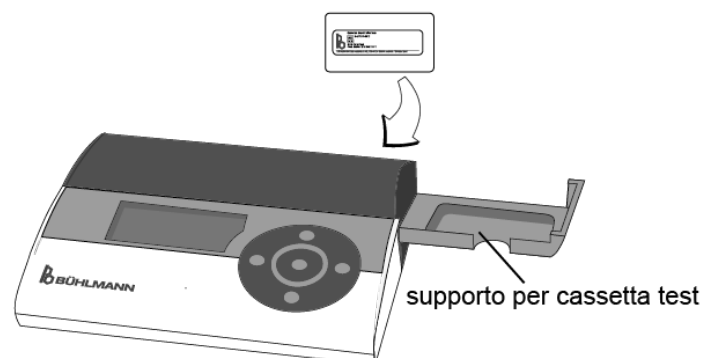
Diluire i campioni di siero 1:20 con tampone di diluizione (B-LFTLIF-CB) prima di usarli per l'analisi (*ad es.* miscelare 10 µL del campione di siero con 190 µL di tampone di diluizione) e miscelarlo mediante vortex, pipettando o agitandolo.



2. Esecuzione del test e lettura

QB2

Due metodi alternativi possono essere caricati dalle rispettive carte chip RFID: B-LFTLIF-RCC15 (con timer interno) o B-LFTLIF-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 sono disponibili 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.



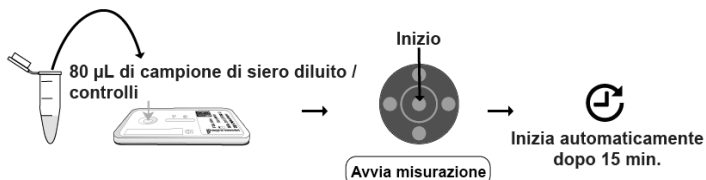
2.1. Metodo con timer interno

QB2: utilizzare la carta chip RFID verde B-LFTLIF-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 80µL di controllo invece del campione di siero diluito.



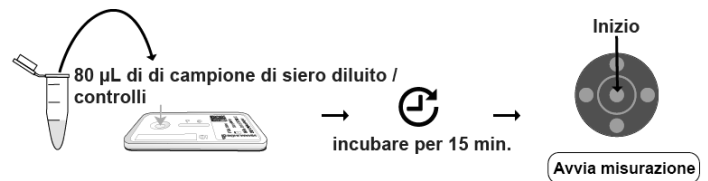
2.2. Metodo senza timer interno

QB2: utilizzare la carta chip RFID bianca B-LFTLIF-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 tempo di incubazione ii) data di scadenza dei reagenti e iii) condizioni di conservazione e incubazione.
- I risultati del self-test, che viene eseguito quando si accende il Quantum Blue® Reader, deve essere valido.

STANDARDIZZAZIONE

- I valori del calibratore della curva standard sono assegnati secondo il valore sul protocollo di trasferimento (rif. 1). I parametri della curva standard sono indicati nella scheda dati-QC allegata. Il materiale del calibratore contiene Infliximab in una matrice di siero umano ed è stato standardizzato contro materiali di riferimento interni.
- Il Quantum Blue® Reader utilizza una curva standard lotto-specifica per calcolare la concentrazione d'infliximab. L'intervallo del dosaggio è compreso tra 0,4 e 20 µg/mL.
- Il test Quantum Blue® Infliximab è standardizzato rispetto allo standard internazionale per infliximab dell'OMS (Codice NIBSC: 16/170). 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%.

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

LIMITAZIONI

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

VALORI ATTESI

La determinazione delle concentrazioni minime di infliximab nei campioni del siero dei pazienti può supportare il

monitoraggio terapeutico nei pazienti con IBD ed è stata associata a migliori esiti clinici per i pazienti con IBD (rif. 3-8).

Valore inferiore 3 µg/mL

Livelli sierici di infliximab subterapeutici suggeriscono un fallimento farmacocinetico. Si deve valutare un aggiustamento della terapia, tenendo conto dei risultati clinici e di laboratorio disponibili (rif. 2, 3).

Valori compresi nell'intervallo 3-7 µg/mL

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

Valori superiori a 7 µg/mL

Livelli minimi sovraterapeutici di infliximab possono servire da indicatore per una riduzione della dose, unitamente al quadro clinico, in pazienti con remissione dell'IBD (rif. 2). È stato mostrato che la diminuzione della dose per raggiungere la finestra terapeutica ottimale (3-7 µg/mL) non ha effetti sui valori di CRP, né sugli score Harvey Bradshaw o Mayo per quanto riguarda rispettivamente pazienti affetti da Crohn o colite ulcerativa (rif. 3).

CARATTERISTICA 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 metodi

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

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

Lo studio sul confronto metodi è stato condotto secondo le linee guida CLSI EP09-A3. Sono stati misurati in triplicato centodieci (110) campioni clinici usando due lotti di cassette di rilevazione di Quantum Blue® Infliximab nell'arco di tre giorni. I valori di riferimento, con un intervallo di concentrazione finale di 1,2–22,2 µg/mL, sono stati determinati con un test ELISA per infliximab disponibile in commercio (rif. 9). Il bias è stato determinato usando l'analisi di regressione lineare di Passing-Bablok. I risultati sono riassunti nella figura 2.

Recupero: 83-100%

Sei campioni clinici, inclusi campioni con livelli di infliximab prossimi a valori decisionali clinici, sono stati addizionati con una concentrazione di infliximab pari a 3.2 µg/mL in materiale calibratore a base di siero. I campioni "basali" sono stati arricchiti con il corrispondente volume di campione privo dell'analita. I campioni "basali" e "basali + arricchiti" sono stati misurati in dieci replicati con un lotto di reagenti. I risultati sono illustrati nella tabella 3.

Ripetibilità: 16,3-25,0% CV

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

La ripetibilità e la precisione intra-laboratorio sono state determinate secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI usando il seguente disegno standardizzato: x 20 giorni x 2 analisi x 2 replicati. Sono stati testati sette campioni aggregati di siero di pazienti con concentrazioni di infliximab a copertura dell'intervallo di misurazione del test

e delle soglie decisionali cliniche. I risultati sono riepilogati in tabella 4.

Riproducibilità: 22,6-29,3% CV

La riproducibilità è stata determinata secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI eseguendo le misurazioni con il seguente disegno: 3 operatori x 3 strumenti/lotti x 5 giorni x 5 replicati. Sono stati testati sette campioni aggregati di siero di pazienti con concentrazioni di infliximab a copertura dell'intervallo di misurazione del test e delle soglie decisionali cliniche. I risultati sono riepilogati in tabella 5.

Limite di rilevabilità (LoD): <0,21 µg/mL infliximab

Il LoD è stato determinato secondo le linee guida EP17-A2 del CLSI e con percentuali di falsi positivi (α) inferiori al 5% e di falsi negativi (β) inferiori al 5% basandosi su 120 determinazioni, con 60 replicati del bianco e 60 replicati con bassi livelli; e un **limite del bianco (LoB) <0,10 µg/mL**.

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

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

I valori di LLoQ e di ULoQ sono stati determinati secondo le linee guida EP17-A2 del CLSI basandosi su 60 determinazioni e un obiettivo di errore relativo totale del 30,0%.

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

Intervallo di linearità (additional dilution):

2,6 – 183,6 µg/mL

L'intervallo di linearità del test Quantum Blue® Infliximab è stato determinato secondo le linee guida CLSI EP06-A. Sono stati misurati entrambi i campioni preparati sia usando la procedura standard sia diluendoli ulteriormente in rapporto 1:10 con il tampone di diluizione. Il range di linearità è stato definito come l'intervallo tra i livelli di concentrazione in cui i coefficienti degli adattamenti del secondo e del terzo ordine risultavano non significativi. I risultati di un lotto di cassette di rilevazione, per la procedura standard, sono mostrati nella figura 3.

Effetto gancio da dosi alte

I campioni al di sopra del range di misurazione, con concentrazioni fino a un massimo di 354 µg/mL, saranno correttamente indicati come superiori a 20 µg/mL.

Specificità/reattività crociata

Il test Quantum Blue® Infliximab rileva specificamente il farmaco originatore (Remicade®) e i biosimilari di infliximab, CT-P13 (Remsima®; Inflectra®) (rif. 10), SB2 (FLIXABI®) (rif. 11) e GP1111 (Zessly®), in siero. Il

recupero dei valori di Zessly® rispetto ai valori attesi, basati sulla determinazione delle IgG delle concentrazioni del farmaco e sul fattore di diluizione nel siero negativo, si è attestato nel range dall'89,5% al 102,5%. Al contrario, i test condotti su siero addizionato con bloccanti del TNF α , quali adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®), golimumab (Simponi®) e certolizumab (Cimzia®) fino a 100 µg/mL hanno prodotto letture inferiori al limite del bianco.

SOSTANZE INTERFERENTI

La suscettibilità del test Quantum Blue® Infliximab a sostanze interferenti è stata valutata secondo la linea guida EP07-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 raccomandati dalla linea guida CLSI EP07-A2. Una errore superiore al 30% è stata ritenuta un'interferenza.

Cambio farmacologico intra-classe

Bloccanti del TNF α sono stati testati a concentrazioni tre volte superiori rispetto ai livelli minimi farmacologici raccomandati. Non è stata rilevata alcuna interferenza fino a 10 µg/mL per adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®) e golimumab (Simponi®). Sono state rilevate interferenze con certolizumab (Cimzia®) con criteri di scostamento non superati ad una concentrazione di 1,7 µg/mL.

Parametri sierici

Nessuna interferenza è stata riscontrata per le seguenti sostanze fino alle concentrazioni elencate: Trigliceridi (Intralipid® 1320 mg/dL; bilirubina coniugata (342 µmol/L; 28,8 mg/dL), bilirubina libera (342 µmol/L; 20,0 mg/dL), emoglobina (50 µmol/L; 322 mg/dL), TNF α (0,15 nmol/L; 2,6 ng/mL) e fattori reumatoidi (497,3 IU/mL).

Co-somministrazione di immunosoppressori

Nessuna interferenza è stata riscontrata per la co-somministrazione di immunosoppressori come la azatioprina (216 µmol/L; 6,0 mg/dL), 6-mercaptopurina (216 µmol/L; 3,7 mg/dL), e metotressato (3000 µmol/L; 136,3 mg/dL).

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

INDICACIONES DE USO

Quantum Blue® Infiximab es un inmunoensayo de flujo lateral *de diagnóstico in vitro* para la detección cuantitativa de concentraciones mínimas de infiximab (Remicade®) y de los biosimilares del infiximab, CT-P13 (Remsima®, Inflectra®), SB2 (FLIXABI®) and GP1111 (Zessly®), en muestras de suero. El ensayo sirve como ayuda, junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio, para monitorizar fármacos terapéuticos en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que reciben un tratamiento con infiximab. Quantum Blue® Infiximab se utiliza en combinación con el Quantum Blue® Reader.

Para uso en laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

La prueba ha sido diseñada para la determinación selectiva de infiximab mediante un inmunoensayo de tipo sándwich. El factor de necrosis tumoral recombinante alfa (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 infiximab presente en la muestra se unirá al conjugado de oro. En la membrana analítica está inmovilizado un anticuerpo monoclonal, altamente específico de infiximab, que servirá para capturar el complejo del conjugado de oro y el analito infiximab dando lugar a una coloración en la línea de test (T). El conjugado oro-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-TLIF25	LF-TLIF10		
Cartucho de prueba	25 unidades	10 unidades	B-LFTLIF-TC	Sellado al vacío en una bolsa de aluminio
Tampón de incubación	1 frasco 10 mL	1 frasco 10 mL	B-LFTLIF-CB	Listo para usar
Controles Alto* / Bajo*	2 viales 0,5 mL	2 viales 0,5 mL	B-LFTLIF-CONSET	Listo para usar
Tarjeta chip RFID	1 unidad	1 unidad	B-LFTLIF-RCC	Tarjeta de plástico blanca
Tarjeta chip RFID	1 unidad	1 unidad	B-LFTLIF-RCC15	Tarjeta de plástico verde
Tarjeta con código de barras	1 unidad	1 unidad	B-LFTLIF-BCC	Tarjeta de plástico con código de barras 2D

Tabla 1

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

REVISE SU KIT DE PRUEBA

Los productos BÜHLMANN se fabrican con el máximo cuidado y realizando todos los esfuerzos posibles para asegurar que el kit de análisis está completo y su rendimiento es el esperado. No obstante, recomendamos

que compruebe por sí mismo el kit de análisis y en particular el estado del cartucho de prueba y su bolsa conforme a los criterios siguientes:

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

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

CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS

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

Tabla 2

MATERIALES NECESARIOS PERONO PROVISTO

- Vórtex
- Cronómetro (opcional)
- Pipetas de precisión con puntas desechables: 10-100 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 (20-26 °C). Todos los reactivos y las muestras para análisis deben equilibrarse a temperatura ambiente (entre 20 y 26 °C) antes de iniciar el ensayo.

- Antes de realizar el análisis, saque el casete de prueba de la bolsa de aluminio. Deje que el casete de prueba se equilibre en el ambiente del laboratorio (20-26 °C) durante como mínimo 2 minutos. Los casetes de prueba extraídos de la bolsa de aluminio deben utilizarse en un plazo de 4 horas.
- Mezclar bien (*p.ej.* mediante vórtex) los reactivos antes de usarlos.
- Los componentes no se deben utilizar más allá de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No se deben mezclar reactivos de lotes diferentes.
- No se debe desmontar el cartucho de prueba.
- Los cartuchos de prueba no pueden ser reutilizados.
- Los cartuchos de prueba se debe manipular con cuidado. No se debe contaminar el puerto de carga de muestra ni la ventana de lectura de resultados mediante contacto con la piel, otros líquidos, etc. (figura 1D).
- El cartucho de prueba se debe mantener en posición horizontal, plana, mientras se realiza el ensayo.

Procedimiento de análisis

- Lea atentamente las instrucciones antes de llevar a cabo el análisis. El rendimiento de la prueba se verá adversamente afectado si los reactivos se diluyen o se manipulan de manera incorrecta o se conservan en condiciones distintas de las indicadas en estas instrucciones de uso.
- 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® Infliximab. Cargue el método de prueba utilizando la tarjeta chip RFID (B-LFTLIF-RCC o B-LFTLIF-RCC15), antes de iniciar el ensayo (véase el manual del Quantum Blue® Reader).
- El lector QB3G debe encenderse y programarse para el ensayo Quantum Blue® Infliximab ya sea usando la tarjeta de código de barras (B-LFTLIF-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 20 µg/mL (hasta 183,6 µg/mL) se pueden diluir adicionalmente en proporción 1:10 con tampón de incubación (dilución total 1:200) para obtener resultados dentro del rango de medición de la prueba.

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recoja la sangre en tubos para venopunción normales sin ningún aditivo, evitando la hemólisis, y espere un mínimo de 20 y un máximo de 60 minutos para que el suero coagule a temperatura ambiente. Centrifugue los tubos a temperatura ambiente a ~2'000 x g durante 15 minutos. Decante el suero.

Las muestras de suero no diluido pueden conservarse sin refrigeración (a temperaturas de hasta 28 °C) o a 2-8 °C durante un máximo de 10 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 21 meses a ≤ -20°C.

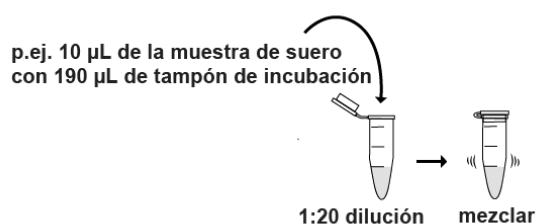
PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

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

El procedimiento de ensayo consta de dos pasos:

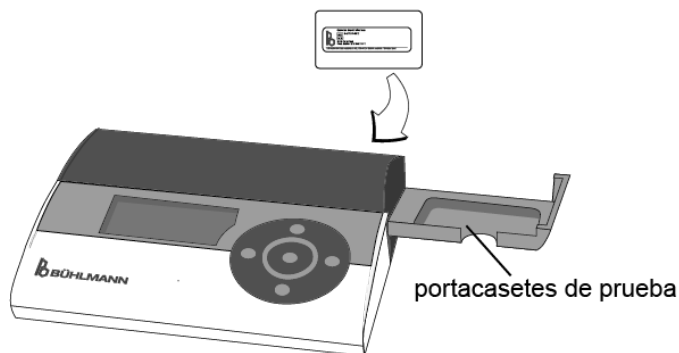
1. Dilución de las muestras de suero con tampón de incubación

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



2. Procedimiento de ensayo y lectura de los resultados QB2

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



QB3G

Dos modos distintos de funcionamiento están disponibles 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.



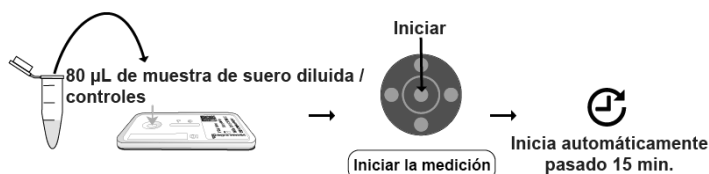
2.1. Método con cronómetro interno

QB2: utilice la tarjeta chip RFID verde B-LFTLIF-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.
- Añada 80 µL de muestra de suero diluida en el puerto de carga de muestra del cartucho de prueba (figura 1D).
- Inserte el cartucho de prueba 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 bajos / altos: repita el paso 2.1 utilizando 80 µL de control en lugar de suero diluido.



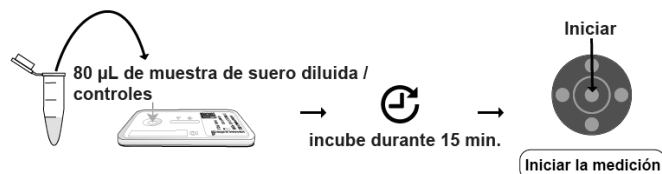
2.2. Método sin cronómetro interno

QB2: utilice la tarjeta chip RFID blanca B-LFTLIF-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.
- Añada 80 µL de muestra de suero diluida en el puerto de carga de muestra del cartucho de prueba (figura 1D).
- Incube la muestra durante 15 ± 1 minutos. (arranque un cronómetro manualmente).
- Inserte el cartucho de prueba en el portacasetes de prueba del Quantum Blue® Reader.
- 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 bajos / altos: 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

- Los valores de calibradores de la curva estándar se asignan siguiendo un protocolo de transferencia de valores (ref. 1). Los parámetros de la curva estándar se indican en la ficha de datos de CC adjunta. El material calibrador comprende Infiximab en una matriz de suero humano y está estandarizado con respecto a un material de referencia interno.
- El Quantum Blue® Reader utiliza una curva de calibración específica del lote para calcular la concentración de infliximab. El rango de ensayo es entre 0,4 y 20 µg/mL.
- Quantum Blue® Infiximab está estandarizado según la norma internacional de la OMS para el infliximab (código NIBSC: 16/170). 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%.

VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

LIMITACIONES

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

variar en función del objetivo del tratamiento y el fenotipo de la enfermedad (ref. 2).

VALORES ESPERADOS

La determinación de los niveles valle de infliximab en muestras de suero de pacientes puede ayudar a controlar el tratamiento de los pacientes con inflamación y se ha asociado con una mejoría clínica de los enfermos de EII (ref. 3-8).

Valores por debajo de 3 µg/mL

Los niveles subterapéuticos de infliximab en suero sugieren un fracaso farmacocinético. Se debe contemplar un ajuste del tratamiento, tomando en consideración los hallazgos clínicos y de laboratorio disponibles (ref. 2, 3).

Valores entre 3-7 µg/mL

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

Valores por encima de 7 µg/mL

Los niveles valle supratrapéuticos de infliximab puedan servir como indicación para reducir la dosis, conjuntamente con el cuadro clínico, en pacientes con remisión de la EII (ref. 2). Se ha visto que la disminución escalonada de la dosis hasta alcanzar la ventana terapéutica óptima (3-7 µg/mL) no tiene ningún efecto en los valores de proteína C reactiva ni en las puntuaciones de Harvey Bradshaw o Mayo de pacientes con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa respectivamente (ref. 3).

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

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

El estudio de comparación de métodos se ha realizado de conformidad con la directriz CLSI EP09-A3. Se midieron ciento diez (110) muestras clínicas por triplicado con dos lotes de cartuchos de prueba de Quantum Blue® Infliximab durante tres días. Los valores de referencia, con un intervalo de concentración final de 1,2-22,2 µg/mL se establecieron con una prueba ELISA de infliximab comercial (ref. 9). El sesgo se determinó mediante un análisis de regresión lineal de Passing-Bablok. Los resultados se resumen en la figura 2.

Recuperación: 83-100%

Se adicionaron con 3,2 µg/mL de infliximab en material calibrador de origen sérico seis muestras clínicas con niveles de infliximab próximos a puntos de decisión clínica. Las muestras de referencia se enriquecieron con el volumen correspondiente de muestra sin analitos. Se midieron las muestras de referencia y las muestras enriquecidas en diez repeticiones con un lote de reactivos. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Repetibilidad: 16,3-25,0% CV**Precisión intralaboratorio: 18,5-25,3% CV**

La repetibilidad y la precisión intralaboratorio se establecieron de acuerdo con la norma EP05-A3 del CLSI utilizando un diseño de estudio estandarizado de 20 días × 2 series × 2 repeticiones. Se analizaron siete muestras combinadas de suero de pacientes con concentraciones de infliximab que abarcaban el intervalo de medición del ensayo y se analizaron los puntos de decisión clínica. Los resultados se resumen en la tabla 4.

Reproducibilidad: 22,6-29,3% CV

La reproducibilidad se estableció de acuerdo con la norma EP05-A3 del CLSI realizando mediciones con un diseño de estudio de 3 operadores × 3 instrumentos/lotas × 5 días × 5 repeticiones. Se analizaron siete muestras combinadas de suero de pacientes con concentraciones de infliximab que abarcaban el intervalo de medición del ensayo y se analizaron los puntos de decisión clínica. Los resultados se resumen en la tabla 5.

Límite de detección (LoD): <0,21 µg/mL de infliximab

El LoD se determinó de acuerdo con la norma EP17-A2 del CLSI y con proporciones de falsos positivos (α) inferiores al 5% y de falsos negativos (β) inferiores al 5% sobre la base de 120 determinaciones, con 60 muestras de blanco y 60 repeticiones de valores bajos, y un **LoB de <0,10 µg/mL**.

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

El LLOQ y el ULOQ se determinaron de acuerdo con la norma EP17-A2 del CLSI sobre la base de 60 determinaciones y un objetivo de error total relativo del 30,0%.

Rango lineal: 0,14-20,37 µg/mL de infliximab**Rango lineal (dilución adicional): 2.6 – 183.6 µg/mL**

El rango lineal de la prueba Quantum Blue® Infliximab se ha determinado de conformidad con la directriz CLSI EP06-A. Se evaluaron tanto las muestras preparadas mediante el procedimiento estándar como las muestras preparadas con una dilución adicional de 1:10 en el tampón de detección. El intervalo de linealidad se definió como el intervalo de valores de concentración en el que los coeficientes de los ajustes de segundo y tercer orden se determinaron como no significativos. Los resultados de un lote de cartuchos de prueba, para el procedimiento estándar, se muestran en la figura 3.

Efecto gancho de dosis altas

Las muestras que superen el intervalo de medición con concentraciones de hasta 354 µg/mL se indicarán correctamente como superiores a 20 µg/mL.

Especificidad/Reactividad cruzada

La prueba Quantum Blue® Infliximab reconoce específicamente el fármaco original infliximab (Remicade®) así como los biosimilares de infliximab, CT-P13 (Remsima®; Inflectra®) (ref. 10), SB2 (FLIXABI®) (ref. 11) y GP1111 (Zessly®), en suero. Los valores recuperados de Zessly® relativos a los valores esperados, basados en la determinación de IgG de las concentraciones del fármaco y el factor de dilución en suero negativo, se mantuvieron en el intervalo de 89,5% a 102,5%. En contraste, la adición del

suero con bloqueadores del FNT α , como adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®), golimumab (Simponi®) y certolizumab (Cimzia®) en concentraciones de hasta 100 µg/mL dio lugar a lecturas de resultados por debajo del límite para el blanco.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

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

Dentro de la misma clase

Los bloqueantes del FNT α se ensayaron en concentraciones que superaban en tres veces los niveles valle de fármaco más bajos recomendados. En la comprobación efectuada no se detectó ninguna interferencia hasta 10 µg/mL para adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®) y golimumab (Simponi®). Se detectó interferencia con certolizumab (Cimzia®) sin excederse el criterio de sesgo a una concentración de 1,7 µg/mL.

Índices séricos

No se detectó ninguna interferencia con las siguientes sustancias hasta las concentraciones indicadas: triglicéridos (Intralipid® 1320 mg/dL; bilirrubina conjugada (342 µmol/L; 28,8 mg/dL), bilirrubina no conjugada (342 µmol/L; 20,0 mg/dL), hemoglobina (50 µmol/L; 322 mg/dL), FNT α (0,15 nmol/L; 2,6 ng/mL) y factores reumatoides (497,3 UI/mL).

Medicación concomitante/inmunosupresora

No se detectó ninguna interferencia con medicación concomitante /inmunosupresora tal como azatioprina (216 µmol/L; 6,0 mg/dL), 6-mercaptopurina (216 µmol/L; 3,7 mg/dL) y metotrexato (3000 µmol/L; 136,3 mg/dL).

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

APLICAÇÃO DO TESTE

O Quantum Blue® Infiximab é um imunoensaio de fluxo lateral de diagnóstico *in vitro* para determinação quantitativa dos níveis mínimos de infliximabe (Remicade®) e dos biossimilares de infliximabe CT-P13 (Remsima®; Inflectra®), SB2 (FLIXABI®) e GP1111 (Zessly®), em amostras de soro. O teste serve como auxiliar na monitorização da terapêutica medicamentosa em pacientes com doenças intestinais inflamatórias (DII) recebendo terapia com infliximabe, em conjunto com outros resultados clínicos e laboratoriais. O Quantum Blue® Infiximab é combinado ao Quantum Blue® Reader.

Somente para uso laboratorial.

PRINCÍPIO DO TESTE

O teste se destina à medição seletiva do infliximabe 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 infliximabe presente na amostra se liga ao conjugado de ouro. Um anticorpo monoclonal, altamente específico para o infliximabe, é imobilizado na membrana analítica e captura o complexo do conjugado de ouro e o analito infliximabe, 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-TLIF25	LF-TLIF10		
Cassete de teste	25 unidades	10 unidades	B-LFTLIF-TC	Embalagem selada a vácuo
Tampão de diluição	1 frasco 10 mL	1 frasco 10 mL	B-LFTLIF-CB	Pronto para uso
Controles Baixo*/Alto*	2 frascos 0,5 mL	2 frascos 0,5 mL	B-LFTLIF-CONSET	Pronto para uso
Cartão Chip RFID	1 unidade	1 unidade	B-LFTLIF-RCC	Cartão de plástico branco
Cartão Chip RFID	1 unidade	1 unidade	B-LFTLIF-RCC15	Cartão de plástico verde
Cartão de código de barras	1 unidade	1 unidade	B-LFTLIF-BCC	Cartão de código de barras de plástico 2D

Tabela 1

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

CONFIRA SEU KIT

Os produtos BÜHLMANN foram fabricados com o máximo cuidado e foram envidados todos os esforços para assegurar a integralidade deste kit de teste e o seu desempenho. Não obstante, aconselhamos a verificar as

condições do cassete de teste e da sua respectiva embalagem no kit com base nos seguintes critérios:

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

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

ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES

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

Tabela 2

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Vórtex
- Cronômetro (opcional)
- Pipetas de precisão com pontas descartáveis: 10-100 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 (20-26 °C).
- Todos os reagentes e amostras de teste devem ser equilibrados à temperatura ambiente (20-26 °C) antes do início do ensaio.
- Antes de realizar o teste, remova o cassete de teste da embalagem aluminizada. Aguarde até pelo menos 2 minutos para que o cassete de teste atinja o equilíbrio com a temperatura ambiente do laboratório (20-26 °C). Os cassetes de teste removidos da embalagem aluminizada devem ser usados dentro de 4 horas.
- Misture bem (p. ex., no vórtex) os reagentes antes de usar.
- Os componentes não podem ser utilizados após a data de validade impressa nos rótulos.
- Não misture lotes de reagentes diferentes.
- Não desmonte a cassete de teste.
- Os cassetes de teste não podem ser 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® Infiximab. Antes de iniciar o ensaio, carregue o método do ensaio usando o cartão com chip RFID (B-LFTLIF-RCC ou B-LFTLIF-RCC15) (ver manual do Quantum Blue® Reader).
- O leitor QB3G deve ser ligado e programado para o teste Quantum Blue® Infiximab usando-se o cartão de código de barras (B-LFTLIF-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 horas. As amostras diluídas não podem ser armazenadas por períodos de tempo prolongados.

- Amostras a uma concentração acima de 20 µg/mL (até 183,6 µg/mL) podem ser adicionalmente diluídas a 1:10 no tampão de detecção (1:200, no total) para se obter resultados dentro da faixa de medição do teste.

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Colha sangue para tubos de punção venosa simples, sem quaisquer aditivos e evitando a hemólise. , e deixe o coágulo de soro à temperatura ambiente durante 20 a 60 minutos. Centrifugue à temperatura ambiente, a ~2000 x g, durante 15 minutos. Decante o soro.

As amostras não diluídas de soro podem ser armazenadas sem refrigeração (temperaturas até 28 °C), ou a uma temperatura na faixa de 2-8 °C por até 10 dias. Para uma conservação mais prolongada, mantenha as amostras não diluídas a ≤-20 °C. Estas amostras são estáveis durante pelo menos 21 meses a ≤-20 °C.

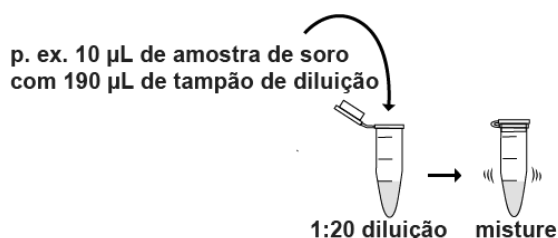
PROCEDIMENTO DO ENSAIO

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

O procedimento do ensaio consiste em dois passos:

1. Diluição das amostras de soro com tampão de diluição

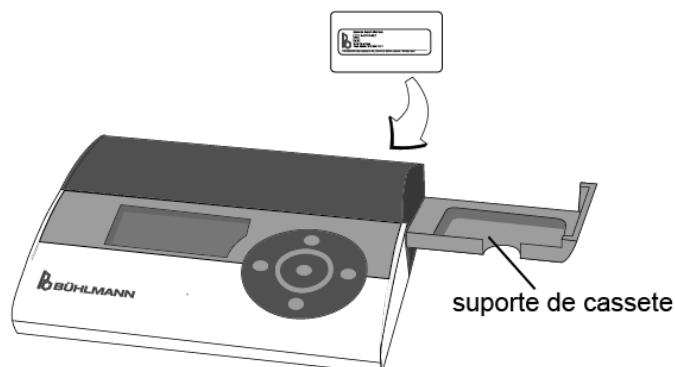
Antes da determinação, dilua a amostra de soro de 1:20 com tampão de diluição (B-LFTLIF-CB) (p. ex., misture 10 µL de amostra de soro com 190 µL de tampão de diluição) em um tubo de ensaio e misture bem no vórtex ou com a pipeta ou por agitação.



2. Procedimento e leitura do ensaio

QB2

É possível carregar dois métodos alternativos do respetivo cartão com chip RFID: B-LFTLIF-RCC15 (com cronômetro interno) ou B-LFTLIF-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 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.



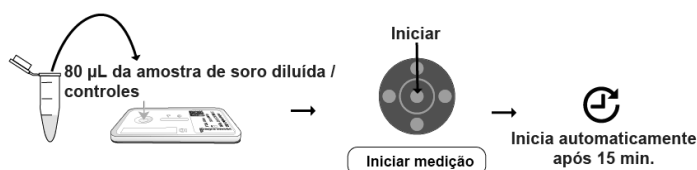
2.1. Método com cronômetro interno

QB2: utilize o cartão chip RFID verde B-LFTLIF-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 diluído.



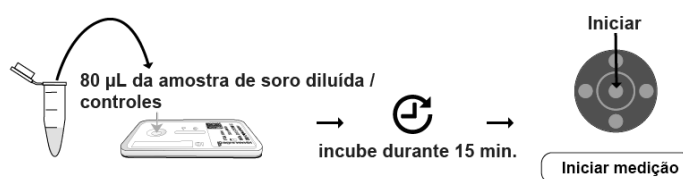
2.2. Método sem cronômetro interno

QB2: utilize o cartão chip RFID branco B-LFTLIF-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 diluído 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 diluído.



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

- Os valores do calibrador da curva padrão são atribuídos de acordo com um protocolo de transferência de valores (ref. 1). Os parâmetros da curva padrão são indicados na folha de dados do CQ incluída. O material do calibrador compreende infliximab em uma matriz de soro humano e é padronizado contra material de referência interno.
- O Quantum Blue® Reader da BÜHLMANN utiliza uma curva de calibração específica de cada lote para calcular a concentração de infliximabe. O intervalo de detecção do ensaio é de 0,4 a 20 µg/mL.
- O Quantum Blue® Infliximab é padronizado em relação ao Padrão Internacional da OMS para infliximabe (Código NIBSC: 16/170). 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%.

VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

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

LIMITAÇÕES

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

VALORES ESPERADOS

A determinação dos níveis mínimos de infliximabe em amostras de soro pode apoiar o monitoramento da terapia e tem sido associada a melhores resultados clínicos para pacientes com DIIs (ref. 3-8).

Valores inferiores a 3 µg/mL

Níveis subterapêuticos de infliximabe no soro sugerem falha farmacocinética. Deve-se considerar o ajuste da terapia, levando em conta os resultados clínicos e laboratoriais disponíveis (ref. 2,3).

Valores entre 3-7 µg/mL

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

Valores acima de 7 µg/mL

Níveis supratrapêuticos do infliximabe podem servir como indicação para a redução da dose em conjunção com o quadro clínico, em pacientes em remissão de DIIs (ref. 2). Demonstrou-se que a diminuição da dose para atingir a janela terapêutica ideal (3-7 µg/mL) não tem efeito nos valores da PCR nem nas pontuações de Harvey Bradshaw das pessoas com Doença de Crohn, nem nas pontuações Mayo das pessoas com colite ulcerosa (ref. 3).

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

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

O estudo de comparação de métodos foi realizado de acordo com a diretriz EP09-A3 do CLSI. Cento e dez (110) amostras clínicas foram medidas em triplicata usando-se dois lotes de cassetes de teste do Quantum Blue® Infliximab por três dias. Valores de referência com um intervalo final de concentração de 1,2 - 22,2 µg/mL foram estabelecidos com um teste ELISA para infliximabe comercialmente disponível (ref. 9). O desvio foi determinando usando-se uma análise de regressão linear de Passing-Bablok. Os resultados estão resumidos na figura 2.

Recuperação: 83-100%

Seis amostras clínicas, incluindo níveis de infliximabe próximos aos pontos de decisão clínica, foram fortificadas com 3,2 µg/mL de infliximabe em material de calibrador à base de soro. As amostras de "referência" foram fortificadas com o volume correspondente de amostra isenta de analito. As amostras de "referência" e as de "referência + fortificante" foram medidas em dez replicatas com um único lote de reagente. Os resultados podem ser vistos na tabela 3.

Repetibilidade: 16,3-25,0% CV

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

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se o arranjo de estudo padrão de 20 dias x 2 corridas x 2 replicatas. Sete amostras séricas agrupadas de pacientes, com concentrações de infliximabe abrangendo a faixa de medição do teste e pontos de decisão clínica, foram testadas. Os resultados estão resumidos na tabela 4.

Reprodutibilidade: 22,6-29,3% CV

A reprodutibilidade foi determinada de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, por meio de medições empregando um arranjo de estudo de 3 operadores x 3 instrumentos/lotos x 5 dias x 5 replicatas. Sete amostras séricas agrupadas de pacientes, com concentrações de infliximabe abrangendo a faixa de medição do teste e pontos de decisão clínica, foram testadas. Os resultados estão resumidos na tabela 5.

Limite de Detecção (LoD): <0,21 µg/mL de infliximabe

O LoD foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI e com as proporções de falsos positivos (α) inferiores a 5% e falsos negativos (β) inferiores a 5% com base em 120 determinações, com 60 brancos e 60 replicatas de baixo nível, e um **LoB <0,10 µg/mL**.

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

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

O LIQ e o LSQ foram determinados de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, com base em 60 determinações e uma meta de erro relativo total de 30,0%.

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

Faixa linear (diluição adicional): 2.6 – 183.6 µg/mL

A faixa linear do teste Quantum Blue® Infliximab foi determinada de acordo com a diretriz EP06-A do CLSI. Amostras preparadas usando-se o procedimento padrão e amostras adicionalmente diluídas a 1:10 no tampão de detecção foram avaliadas. A faixa linear foi definida como o intervalo de níveis de concentração nos quais os coeficientes de ajuste de segunda e terceira ordens não foram considerados significativos. Os resultados para um lote de cassetes de teste, para o procedimento padrão, estão mostrados na figura 3.

Efeito gancho com doses elevadas

As amostras que excederem a faixa de medição a concentrações até 354 µg/mL serão corretamente indicadas como acima de 20 µg/mL.

Especificidade/Reatividade cruzada

O teste Quantum Blue® Infliximab reconhece especificamente o medicamento original do infliximabe (Remicade®), bem como os biossimilares do infliximabe, CT-P13 (Remsima®; Inflectra®) (ref. 10), SB2 (FLIXABI®) (ref. 11) e GP1111 (Zessly®), no soro. A recuperação dos valores de Zessly® em comparação aos valores esperados, com base na determinação do IgG de concentrações de medicamentos e no fator de diluição em soro negativo, foi determinada na faixa de 89,5% a 102,5%. Em contraste, soro fortificado com bloqueadores do TNF α , tais como adalimumabe (Humira®), etanercepte (Enbrel®), golimumabe (Simponi®) e certolizumabe (Cimzia®) até 100 µg/mL, resultou em uma leitura abaixo do limite de branco.

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

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

Comutação de classe

Os bloqueadores de TNF α foram testados a concentrações três vezes acima dos níveis mais baixos recomendados para o medicamento. Nenhuma interferência foi detectada até 10 µg/mL para o adalimumabe (Humira®), etanercepte (Enbrel®) e golimumabe (Simponi®). Detectou-se interferência com certolizumabe (Cimzia®) com critério de desvio não ultrapassado a uma concentração de 1,7 µg/mL.

Índices séricos

Não foi detectada qualquer interferência com as seguintes substâncias até às concentrações indicadas: Triglicéridos (Intralipid® 1320 mg/dL), bilirrubina conjugada (342 µmol/L; 28,8 mg/dL), bilirrubina não conjugada (342 µmol/L; 20,0 mg/dL), hemoglobina (50 µmol/L; 322 mg/dL), TNF α (0,15 nmol/L; 2,6 ng/mL) e fatores reumatóides (497,3 UI/mL)

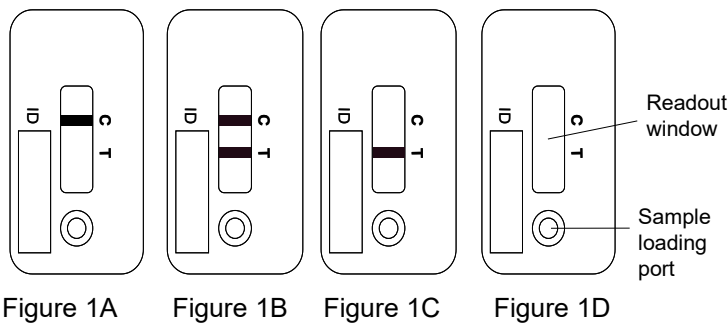
Imunossupressivos/co-medicação

Não foi detectada qualquer interferência com imunossupressivos/co-medicação como azatioprina (216 µmol/L; 6,0 mg/dL), 6-mercaptopurina (216 µmol/L; 3,7 mg/dL) e metotrexato (3000 µmol/L; 136,3 mg/dL). Todas as características de desempenho, exceto se indicado de outra forma, foram avaliadas com infliximabe (Remicade®, MSD).

APPENDIX I

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

Test Results



Method Comparison

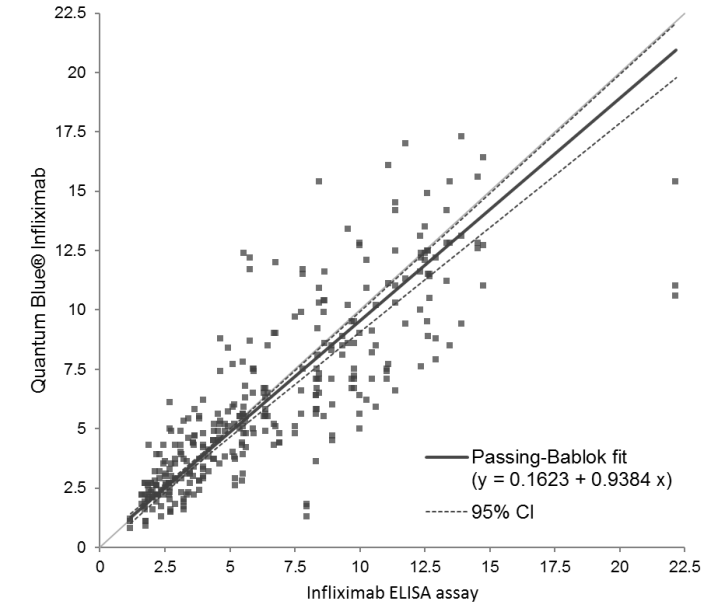


Figure 2

Recovery

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

Table 3

Repeatability / Within-Laboratory Precision

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

Table 4

Reproducibility

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

Table 5

Linearity Plot

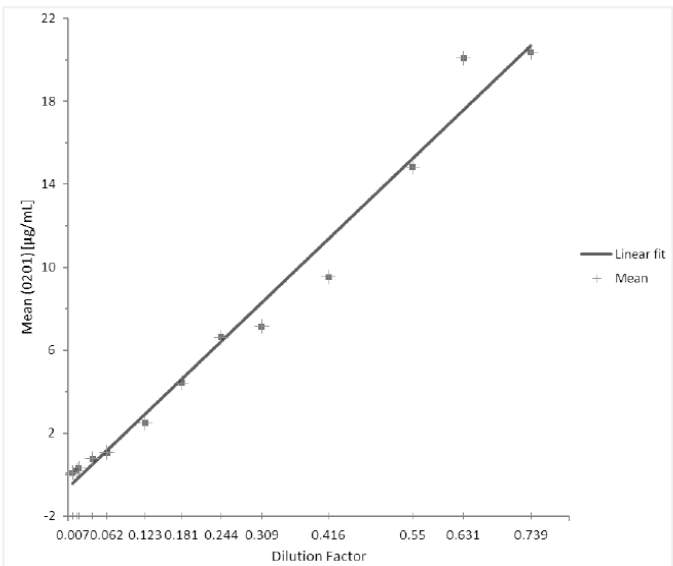


Figure 3

APPENDIX II

REFERENCES / REFERENZEN / RÉFÉRENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS / REFERÊNCIAS

1. Blirup-Jensen et al.: *Protein standardization V: value transfer. A practical protocol for the assignment of serum protein values from a Reference Material to a Target Material*. Clin Chem Lab Med; 46, 1470 – 9 (2008)
2. Mitrev N et al.: *Review article: consensus statements on therapeutic drug monitoring of anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther. 46(11-12):1037-1053 (2017)
3. Vande Casteele, N.: *Trough Concentration of Infliximab Guide Dosing for Patients With Inflammatory Bowel Disease*. Journal of Gastroenterology, 148, 1320–1329 (2015)
4. Papamichael K, et al.: *Improved Long-term Outcomes of Patients With Inflammatory Bowel Disease Receiving Proactive Compared With Reactive Monitoring of Serum Concentrations of Infliximab*. Clin Gastroenterol Hepatol. 15(10):1580-1588 (2017)
5. Deora V, et al.: *Therapeutic drug monitoring was helpful in guiding the decision-making process for children receiving infliximab for inflammatory bowel disease*. Acta Paediatr Int J Paediatr. 106(11):1863-1867. (2017)
6. Mitchell RA, et al.: *The Utility of Infliximab Therapeutic Drug Monitoring among Patients with Inflammatory Bowel Disease and Concerns for Loss of Response: A Retrospective Analysis of a Real-World Experience*. Can J Gastroenterol Hepatol. 2016
7. Amiot A, et al.: *Therapeutic drug monitoring is predictive of loss of response after de-escalation of infliximab therapy in patients with inflammatory bowel disease in clinical remission*. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 40(1):90-98. (2016)
8. Burgess C. et al.: *Utility of regular infliximab levels in pediatric Crohn's disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 63:S224 (2016).
9. Vande Casteele N. et al.: *Detection of infliximab levels and anti-infliximab antibodies: a comparison of three different assays*. Aliment Pharmacol Ther. 36, 765-771 (2012)
10. Afonso J. et al.: *Therapeutic drug monitoring of CT-P13: a comparison of four different immunoassays*. Therap Adv Gastroenterol. 10(9):661-671 (2017)
11. Magro F. et al.: *The performance of Remicade®-optimized quantification assays in the assessment of Flixabi® levels*. Therap Adv Gastroenterol. 11 (2018)

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
2021-11-11	A3	Addition of Zessly® (Infliximab) Biosimilar Update to Chapter <i>Specimen collection and storage</i> Introduction of WHO standard in Chapter <i>Standardization</i> Revision of Chapter <i>References</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 Contenudo 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 Cartuccia di rilevazione Cartucho de prueba Cassete de teste
BUF CHASE	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

