

# LISA TRACKER<sup>®</sup> anti-Rituximab

**REF LTR 003-48**

**DEFINITION**

Le coffret **LISA-TRACKER anti-Rituximab** (Theradiag) permet le dosage quantitatif par méthode ELISA des anticorps anti-Rituximab dans le sérum ou plasma.

**VALEUR DIAGNOSTIQUE**

En plus de son indication pour le traitement de patients atteints de lymphomes non-hodgkinien, le Rituximab, en association au méthotrexate (MTX) est indiqué pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde active, sévère, chez les patients adultes qui ont présenté une réponse inadéquate ou une intolérance aux traitements de fond (DMARDs), dont au moins un anti-TNF $\alpha$ .

Le Rituximab est un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule CD20 présente à la surface des cellules B, du stade pré-B au stade de lymphocyte B mature. Il s'agit d'un anticorps chimérique composé de domaines constants humains (chaîne lourde  $\gamma 1$  et chaîne légère kappa) et de domaines variables murins. Certains patients, au cours de leur traitement, peuvent développer des anticorps dirigés contre le Rituximab.

Le coffret **LISA-TRACKER anti-Rituximab** (Theradiag) permet aux praticiens de suivre au cours du temps l'évolution du taux des anticorps anti-Rituximab dans le plasma/sérum chez un patient.

**ECHANTILLONS**

- Les dosages peuvent être effectués sur plasma (tubes de prélèvement : EDTA, Héparine ou Citrate) ou sérum.
- Eviter d'utiliser des sérum lipémiques, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus de 1 fois.
- Afin de limiter toutes fixations non spécifiques, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

**PRINCIPE DES TESTS**

Le Rituximab est adsorbé sur un support solide (microplaques).

- Dans un premier temps, l'échantillon dilué est distribué dans un puits de la microplaque. S'il contient des anticorps anti-Rituximab, ceux-ci vont se fixer au Rituximab adsorbé. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non-fixés.
- On ajoute ensuite du Rituximab biotinylé. Après incubation, un deuxième lavage permet d'éliminer l'excès d'anticorps.
- Ensuite, la streptavidine conjuguée à la peroxydase de Raifort est ajoutée. Elle se fixe au complexe « Rituximab adsorbé / anticorps anti-Rituximab / Rituximab biotinylé » précédemment formé. Après incubation, un troisième lavage permet d'éliminer l'excès de conjugué.

**REF LTR 003-96**

**Français**

- L'étape de chromogénèse est réalisée en déposant le substrat de l'enzyme : TMB (3,3',5,5' tétraméthylbenzidine). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-Rituximab présente dans l'échantillon.
- L'addition de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> permet de bloquer la réaction enzymatique.
- La lecture des densités optiques à 450 nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.
- Une gamme étalon permet de définir la quantité d'anticorps anti-Rituximab (ng/ml) présente dans l'échantillon.

**COMPOSITION DU COFFRET**

	48 tests	96 tests
Une microplaque de barrettes jaunes amovibles, sensibilisée par du Rituximab.  <b>MP</b>	6 barrettes	12 barrettes
Cinq flacons « Etalon - anti-Rituximab », (ng/ml).  <b>A-RIT CAL n</b> Prêts à l'emploi. Ils peuvent être utilisés plusieurs fois. <i>La quantité en anticorps anti-Rituximab est indiquée sur le flacon.</i> <b>Bouchons jaunes.</b>	5 x 1,5ml	5 x 1,5ml
Flacon « contrôle positif - anti-Rituximab », (ng/ml).  <b>A-RIT CONTROL +</b> A diluer. Il peut être utilisé plusieurs fois. <i>Les valeurs attendues (ng/ml) sont indiquées sur le flacon.</i> <b>Bouchon jaune.</b>	1 x 1ml	1 x 1ml
Flacon d'anticorps biotinylé Prêt à l'emploi. <b>A-RIT Ab BIOT</b> <b>Bouchon jaune.</b>	1 x 7,5ml	2 x 7,5ml
Flacon de streptavidine conjuguée à la peroxydase. Prêt à l'emploi. <b>CONJ HRP</b> <b>Bouchon vert.</b>	1 x 12ml	1 x 12ml
Flacon de Tampon Phosphate-Tween pH 7,2 (concentré 10x) - <u>A reconstituer en eau distillée.</u>  <b>BUF WASH 10x</b> <b>Bouchon blanc.</b>	1 x 100ml	1 x 100ml
Flacon de Substrat (TMB). Prêt à l'emploi. <b>SUBS TMB</b> <b>Bouchon noir.</b>	1 x 12ml	1 x 12ml
Flacon de solution d'arrêt H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.25 N). Prêt à l'emploi. <b>SOLN STOP</b> <b>Bouchon violet.</b>	1 x 15ml	1 x 15ml

## MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

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

## STABILITE ET CONDITIONS DE CONSERVATION

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

## PREPARATION DES REACTIFS

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

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

- Diluer le Tampon Phosphate-Tween concentré au 1/10 en eau distillée.

**BUF**   **WASH**   **10x**

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

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

### 2. Préparation des échantillons et du contrôle positif

- Diluer les échantillons et le contrôle positif au 1/2 en tampon TDL (exemple : 100µl + 100µl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

### 3. Utilisation de l'anticorps biotinylé - prêts à l'emploi

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

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

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

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

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

## PRECAUTIONS D'EMPLOI

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

¶ La température des réactifs peut influencer le résultat final.

- S'assurer que les plaques soient bien égouttées après chaque lavage.

- Ne pas utiliser les réactifs si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent.

- Les étalons et le contrôle sont d'origine humaine. Pour chacun, les recherches d'anticorps anti-HIV 1 et 2, anti-HCV et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. S'agissant de produits potentiellement infectieux, il est

toutefois nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.

- Les réactifs en solution (excepté le substrat & la solution d'arrêt) contiennent comme agent de conservation, de l'azide de sodium à une concentration <0.1% ou du ProClin® 300 à une concentration <0.6%. Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. L'azide de sodium peut former des mélanges explosifs lors de son élimination dans les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.

- À cette concentration, le ProClin® 300 peut être irritant pour les yeux, la peau et nuisible en cas d'ingestion en quantités importantes. C'est un sensibilisant cutané; une exposition prolongée ou répétée peut entraîner une réaction allergique chez certains sujets sensibles.

- Le coffret **LISA-TRACKER anti-Rituximab** (Theradiag) a été élaboré dans le respect du Règlement (CE) n° 1272/2008 en ce qui concerne la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances et des mélanges.

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

## MODE OPERATOIRE

### 1. Préparation du test

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

Pour chaque essai, prévoir :

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

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

Déposer 100µl par puits pour chaque étalon.

Déposer 100µl par puits de contrôle dilué.

Déposer 100µl d'échantillons dilués.

Laisser incuber 60 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

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

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

### 3. Incubation de l'anticorps biotinylé

Déposer 100µl d'anticorps biotinylé, prêt à l'emploi.

Incuber 60 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

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

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

### 4. Incubation du Conjugué

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

Incuber 30 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

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

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

## 5. Incubation du Substrat

Déposer 100µl de substrat dans tous les puits.  
Incuber 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

## 6. Arrêt de la réaction

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

## 7. Lecture

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

## RESULTATS ET INTERPRETATION

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

## CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES DES DOSAGES

### Limite de détection

Estimée à partir des 154 échantillons issus d'une population « individus sains ».

Limite de détection Anti-Rituximab
5 ng/ml > 99 <sup>ème</sup> percentile

### Plage de mesure

Anti-Rituximab
5 ng/ml - 100 ng/ml

### Etude des substances interférentes

**LISA-TRACKER anti-Rituximab** (Theradiag) a été évalué

- sur une population de sérums contenant des substances potentiellement interférentes (cryoglobulines, facteurs rhumatoïdes, anticorps hétérophiles, taux élevés de triglycérides, de bilirubine, d'IgG et/ou d'IgM, de protéine C1q, autoanticorps) et sur une population de sérums de patients présentant des cancers.
- sur des échantillons en solution complétés avec les composés suivants : bilirubine (à 0,2 mg/ml), hémodglobine (à 2 mg/ml), triglycérides (à 10 mg/ml) et facteurs rhumatoïdes (à 1000 UI/ml).  
⇒ Aucune interférence n'a été détectée.

### Précision

Paramètres	Intra-essai (4 tests dans le même essai)		Inter-essais (4 tests dans 4 essais différents)	
	Valeur moyenne	CV (%)	Valeur moyenne	CV (%)
Anti-Rituximab (ng/ml)	98	1.4	96	6.0
	53	1.4	47	10.6
	22	6.8	23	4.5
	12	9.1	12	12.8

## LIMITES

L'efficacité de ce kit n'est confirmée que pour les sérums / plasma humains, l'applicabilité des autres types d'échantillons n'est pas vérifiée.

Des résultats fiables et reproductibles seront obtenus lorsque la procédure de dosage est effectuée conformément aux instructions et dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire.

Le diagnostic clinique ne doit pas être établi sur la base des résultats d'un seul résultat de test mais doit intégrer toutes les conclusions cliniques et de laboratoire.

## CONTROLE DE QUALITE

Il est conseillé d'utiliser des contrôles de qualité interne ou externe. Le contrôle **IMMUNO-TROL anti-Rituximab** (Theradiag), réf: LTR 003-PC, renferme des anticorps dirigés contre le **Rituximab**. Il est à tester de façon identique à celle des échantillons.

## BIBLIOGRAPHIE

**Cartron G & al.** Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use: Thought for the best use ? Critical Reviews in Oncology/Hematology 62 (2007) 43-52.

**Dieter Huhn & al.** Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood, 2001; 98: 1326-1331.

**Ferdinand Breedveld & al.** Rituximab pharmacokinetics in patients with Rheumatoid Arthritis: B-Cell levels do not correlate with clinical response. Journal of Clinical Pharmacology, 2007; 47: 1119-1128.

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

**Magda Nakou & al.** Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. Arthritis Research & Therapy 2009, 11:R131.

**Mark S. Cragg & al.** A new anti-idiotype antibody capable of binding rituximab on the surface of lymphoma cells. Blood. 2004;104:2540-2542.

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

**Piketty ML & al.** Biotin: an emerging analytical interference, Ann Biol Clin2017 ; 75(4) : 366-8.

**R. John Looney & al.** B Cell depletion as a novel treatment for Systemic Lupus Erythematosus : a Phase I/II dose-escalation trial of Rituximab. *Arthritis & Rheumatism*. Vol. 50, No. 8, August 2004, 2580–2589.

**Saito K & al.** Extremely high titer of anti-human chimeric antibody following re-treatment with rituximab in a patient with active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Nov;44(11):1462-4. Epub 2005 Aug 16.

**Schmidt E & al..** Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus. *Clinical Immunology*, 2009; 132: 334–341.

**Stanley B. Cohen & al for the REFLEX Trial Group.** Rituximab for Rheumatoid Arthritis Refractory to Anti-Tumor Necrosis Factor. *Arthritis Rheum*. 2006 Sep;54(9):2793-806.

**Thurlings RM & al.** Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimaeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 409–412.

**Tobinai K & al.** Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDE-C2B8, rituximab) in relapsed B-cell lymphoma. *Annals of Oncology* 1998; 9: 527-534.

#### SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

Réactifs	Mode opératoire
Étalons	
Contrôle positif dilué	100µl / puits
Echantillons dilués	
Incubation	1 h à température ambiante
Lavage*	Laver 3 fois en tampon de dilution/lavage (TDL) : 3 x 300µl / puits
Anticorps secondaires biotinylés	100µl / puits (réactifs spécifiques)
Incubation	1 h à température ambiante
Lavage*	Laver 3 fois en tampon de dilution/lavage (TDL) : 3 x 300µl / puits
Streptavidine-HRP	100µl / puits
Incubation	30 minutes à température ambiante
Lavage*	Laver 3 fois en tampon de dilution/lavage (TDL) : 3 x 300µl / puits
Substrat (TMB)	100µl / puits
Incubation	15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière
Solution « stop »	100µl / puits

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

#### Exemples de configuration de dosage : 26 sérum à doser en anti-Rituximab

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>Etalon 5</b>	Sérum3	Sérum11	Sérum19								
<b>B</b>	<b>Etalon 4</b>	Sérum4	Sérum12	Sérum20								
<b>C</b>	<b>Etalon 3</b>	Sérum5	Sérum13	Sérum21								
<b>D</b>	<b>Etalon 2</b>	Sérum6	Sérum14	Sérum22								
<b>E</b>	<b>Etalon 1</b>	Sérum7	Sérum15	Sérum23								
<b>F</b>	<b>C+</b>	Sérum8	Sérum16	Sérum24								
<b>G</b>	Sérum1	Sérum9	Sérum17	Sérum25								
<b>H</b>	Sérum2	Sérum10	Sérum18	Sérum26								
Dosage anti-Rituximab												

## INDEX DES SYMBOLES



Déclaration de conformité CE



Test ELISA



Référence produit



Numéro de Lot



Date d'expiration



Dispositif de Diagnostic *In Vitro*



Fabricant



Modifications apportées à la version précédente



Nombre de tests



Consulter les instructions d'utilisation



Limites de température



Risque biologique



Contient de l'azide de sodium



A reconstituer



Attention



14 rue Ambroise Croizat  
CS 90136 CROISSY BEAUBOURG  
77435 MARNE LA VALLEE CX2  
France



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



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