

RIDASCREEN® IFX Monitoring

REF G09041



1. Zweckbestimmung

Für die *In-vitro*-Diagnostik. Dieser Test ist ein Enzym-Immunoassay zum quantitativen Nachweis von Infliximab (IFX, Remicade[®], anti-TNF α) in humanem Serum und Plasma.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Therapeutisches Medikamenten-Monitoring

Infliximab (IFX) ist ein chimärer therapeutischer Antikörper, der gegen das pro-inflammatorische Zytokin TNF α gerichtet ist. Die Einführung von Infliximab hat die Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen wie z. B. Spondyloarthritis, rheumatoider Arthritis (RA) oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) revolutioniert. Es wurde nachgewiesen, dass Infliximab lang anhaltende Remissionen auslösen kann und die Lebensqualität von Patienten verbessert. ^[1] Bei einigen Patienten jedoch wirkt die IFX-Therapie nicht (primäre Nonresponder), bei anderen verliert sie im Laufe der Zeit ihre Wirksamkeit (sekundäre Nonresponder). ^[2]

Ein Medikament kann nur dann wirksam sein, wenn adäquate Konzentrationen im Blutkreislauf vorhanden sind. Für das therapeutische Medikamenten-Monitoring (TDM) wird die Serumkonzentration von IFX direkt vor der nächsten Infusion verwendet. Diese wird auch als Talspiegel-Konzentration bzw. trough concentration bezeichnet. Aktuelle Publikationen zu TDM haben gezeigt, dass eine Beziehung zwischen einer guten klinischen Wirksamkeit und einer adäquaten Talspiegel-Konzentration bei CED-^[3] und RA-Patienten besteht. ^[4, 5] Dies ist ein Beleg dafür, dass TDM sehr wesentlich für die Behandlungsoptimierung ist und für das Überwinden einer sekundären Nonrespons genutzt werden kann.

Im RIDASCREEN[®] IFX Monitoring wird ein hoch-spezifischer monoklonaler Antikörper (MA-IFX6B7), der bei der KU Leuven isoliert und charakterisiert wurde, verwendet. Er detektiert ausschließlich Infliximab (Remicade[®]). Andere anti-TNF α -Medikamente wie z. B. Adalimumab oder Golimumab interferieren nicht mit der Messung. ^[6]

Biosimilars von Infliximab (Remicade[®], Remsima[®], Inflectra[®] und Flixabi[®]) können ebenfalls mit RIDASCREEN[®] IFX Monitoring quantifiziert werden.^[7]

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Der diagnostische Wert von TDM bei CED-Patienten wird im Folgenden sowohl für die Induktionstherapie als auch die Erhaltungstherapie-Phase beschrieben.

Induktionstherapie-Phase: Es wurde gezeigt, dass IFX-Talspiegel-Konzentrationen während der Post-Induktionstherapie (Woche 14) mit einer anhaltenden klinischen Response in Zusammenhang stehen. ^[8, 9] Die Messung der Infliximab-Talspiegel-Konzentration während oder kurz nach der Induktionstherapie-Phase kann dabei unterstützen, unterversorgte Patienten zu identifizieren und die individuelle Dosis zu optimieren.^[10]

Erhaltungstherapie-Phase: : Es wurde gezeigt, dass Patienten, deren Talspiegel-Konzentrationen während der Erhaltungstherapie-Phase gemessen und adaptiert wurden, mit höherer Wahrscheinlichkeit in Remission verbleiben als Patienten ohne gemessene und adaptierte Talspiegel-Konzentrationen. ^[11] Das regelmäßige Überprüfen der Talspiegel-Konzentrationen während der Erhaltungstherapie-Phase ist daher hilfreich, um das Behandlungsschema zu optimieren und die Behandlungsergebnisse zu verbessern. ^[12] Entsprechend des TAXIT-Algorithmus wird für den RIDASCREEN® IFX Monitoring eine therapeutische Talspiegelkonzentration in einem Konzentrationsbereich von 3 - 7 µg/ml empfohlen.^[12]

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Patienten, die nicht mehr auf IFX ansprechen, höheren Nutzen aus einer, auf IFX-Serumkonzentrationsmessungen basierenden, individuellen Behandlung ziehen als aus einer empirischen Strategie, die andere Therapieoptionen nutzt. ^[13]

Patientenproben, welche in der Induktionstherapiephase genommen werden, (gewöhnlich in Woche 2 und Woche 6) zeigen üblicherweise höhere Talspiegelkonzentrationen als Patienten, bei denen die Probe in der Erhaltungstherapiephase genommen werden (in Woche 12 - 14 und in den darauffolgenden Wochen). Daher wird geraten Serumproben, welche während der Induktionstherapiephase genommen werden, höher zu verdünnen.

Immunogenität

Aufgrund des immunogenen Charakters des Medikaments entwickeln sich häufig Antikörper gegen das Medikament. Dies stellt auch die Ursache für einen sekundären Wirksamkeitsverlust dar. ^[14] Im Falle von nicht nachweisbaren Talspiegelkonzentrationen kann die anschließende Messung von Anti-Medikamenten-Antikörpern dabei unterstützen eine hilfreiche Behandlungsstrategie zu bestimmen. Hierfür eignet sich der RIDASCREEN® Anti-IFX Antibodies (G09042).

3. Testprinzip

Im RIDASCREEN® IFX Monitoring wird ein hochspezifischer Antikörper gegen IFX (MA-IFX6B7, isoliert und charakterisiert an der KU Leuven) in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt.

An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte sind TNF α -Moleküle gebunden. Eine Verdünnung der zu untersuchenden Patientenprobe wird in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und darin inkubiert. Während dieses Inkubationsschrittes bindet IFX spezifisch an das TNF α auf der Platte. Nach einem Waschschrift folgt eine zweite Inkubation mit MA-IFX6B7, welcher mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Bei Anwesenheit von IFX bildet sich ein Sandwich-Komplex aus dem immobilisierten TNF α , IFX und dem konjugierten Antikörper. Nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden in einem weiteren Waschschrift entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in

den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die gemessene Extinktion ist proportional zu der in der Probe vorhandenen IFX-Konzentration.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

Plate	96 Best.	Mikrotiterplatte; 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit humanem TNF α
Standard 1-6	1300 μ l	6 Standards; Konzentrationen der Standards 1 bis 6: 0 / 5 / 10 / 20 / 60 / 120 ng/ml; enthält 0,09 % NaN $_3$; gebrauchsfertig; gegen den internationalen WHO Standard kalibriert 16/170
Low Control +	1300 μ l	Niedrige Positivkontrolle; enthält 30 ng/ml IFX und 0,09 % NaN $_3$; gebrauchsfertig
Control +	1300 μ l	Positivkontrolle; enthält 70 ng/ml IFX und 0,09 % NaN $_3$; gebrauchsfertig
Diluent	100 ml	Probenverdünnungspuffer; enthält 0,09 % NaN $_3$; gebrauchsfertig; orange gefärbt
Conjugate	12 ml	Konjugat; peroxidase-konjugierter monoklonaler Antikörper (MA-IFX6B7); gebrauchsfertig; rot gefärbt
Substrate	12 ml	Substrat; Wasserstoffperoxid / Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig
Wash 20x	50 ml	Waschpuffer (20-fach konz.); Detergenz in Phosphatpuffer-Lösung und antimikrobielle Agentien
Stop	6 ml	Stopp-Lösung; 0,5 M H $_2$ SO $_4$; gebrauchsfertig
2 Abdeckfolien		

Gefahrstoffangabe gemäß Kennzeichnungspflicht. Weitere Detail siehe Safety Data Sheets (SDS) auf www.r-biopharm.com.

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf dem jeweiligen Etikett aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Geöffnete Komponenten (Reagenzien, Mikrotiterstreifen) sollten bis zum nächsten Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und können für 6 Monate aufbewahrt werden. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C für einen Monat haltbar. Mikrobielle

Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden. Der Alu-Beutel, der die Mikrotiterstreifen enthält, ist mit einer Schere so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern. Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

6.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

6.2. Zubehör

- Präzisionsmikropipetten und Standardlaborpipetten
- Messzylinder (1000 ml)
- Saubere Glas- oder Plastikröhrchen für die Verdünnung der Proben
- Stoppuhr
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm/ Referenzfilter 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)
- Abfallbehälter mit 0,5 %-igen Hypochloritlösung
- 37 °C Brutschrank

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *In-vitro*-Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Mischen Sie keine Reagenzien oder beschichtete Mikrotiterplatten von Kits mit verschiedenen Lotnummern.

Die im Kit befindlichen Kontrollseren (Standard 1-6, Niedrige Positivkontrolle, Positivkontrolle) wurden auf HIV- und HCV-Ak sowie Hbs-Ag untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten sie, ebenso wie die Patientenproben und alle Materialien, die mit ihnen in Berührung kommen, als potentiell infektiös behandelt und entsprechend den jeweiligen nationalen Sicherheitsbestimmungen gehandhabt werden.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren, Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Proben Einmal-Handschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In den

Bereichen, in denen mit den Proben oder den Test-Reagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Das Stopp-Reagenz enthält 0,5 M Schwefelsäure. Hautkontakt sowie Kontakt mit Kleidung vermeiden! Bei Hautkontakt mit Wasser spülen.

Die Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Das Substrat enthält Wasserstoffperoxid.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

In diesem Assay können EDTA-Plasma-, Citrat-Plasma- sowie Serum-Proben verwendet werden. Nach der Blutentnahme sollte zur Vermeidung einer Hämolyse das Serum möglichst schnell vom Blutkuchen getrennt werden. Überführen Sie die Proben in ein sauberes Röhrchen.

Proben können für 3 - 4 Tage bei 2 - 8 °C, oder bei -20 °C für mindestens ein Jahr eingefroren, gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Die Proben werden in Probenverdünnungspuffer verdünnt (siehe 9.3.1).

Verdünnte Proben können für mindestens 8 h bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

9. Testdurchführung

9.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterplatte **Plate** auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch sind die Mikrotiterstreifen (im verschlossenen Beutel) und die Reagenzien wieder bei 2 - 8 °C zu lagern. Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind. Ein direkter Kontakt von Proben mit den Kitkomponenten ist zum Ausschluss von Kreuzkontamination zu vermeiden. Direkte Sonneneinstrahlung ist zu vermeiden. Es wird empfohlen die Mikrotiterplatte zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten während der verschiedenen Inkubationsschritte abzudecken oder abzukleben.

Um die Anleitungen zur Testdurchführung auf ELISA-Pipettierautomaten zu erhalten, wenden Sie sich bitte an die R-Biopharm AG oder den örtlichen Distributor.

9.2. Vorbereitung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrats **Wash | 20x** wird mit 19 Teilen destilliertem Wasser gemischt (1:20). Hierfür werden 50 ml des Konzentrats in einen 1000 ml Messzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die rekonstituierte Lösung kann für mindestens einen Monat bei 2 - 8 °C gelagert

werden. Bei höheren Temperaturen kann die konzentrierte Waschlösung milchig-schlierig aussehen ohne, dass es die Qualität beeinträchtigt. Nach der Verdünnung ist die Lösung wieder klar.

9.3. Vorbereitung der Proben

Serum- oder Plasmaproben können bei 2 - 8 °C für 3 - 4 Tage, oder bei -20 °C für mindestens 1 Jahr gelagert werden (siehe auch Kapitel 8). Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Proben müssen im Probenverdünnungspuffer verdünnt werden. (siehe 9.3.1.)

Verdünnte Proben können bei Raumtemperatur für mindestens 8 Stunden gelagert werden.

9.3.1. Verdünnung der Proben

a) Zur Messung der Talspiegel-Konzentration während der Erhaltungstherapie-Phase

Zur Messung der Talspiegel-Konzentration (Medikamentenkonzentration direkt vor der Verabreichung der nächsten Medikamentendosis) während der Erhaltungstherapie-Phase (= von Woche 12 - 14 und nachfolgende), werden die Proben 1:100 verdünnt:

10 µl der Probe werden in 990 µl Probenverdünnungspuffer **Diluent** verdünnt (1:100). 100 µl der endverdünnten Probe werden anschließend im Test eingesetzt.

Wird die Probe 1:100 verdünnt, können IFX-Konzentrationen zwischen 0,5 und 12 µg/ml bestimmt werden.

b) Zur Messung der Talspiegel-Konzentration während der Induktionstherapie-Phase

Um Talspiegelkonzentrationen während der Induktionstherapie-Phase (= typischerweise in Woche 2 und Woche 6) bzw. um mittlere Konzentrationen zu messen oder Konzentrationen >12,0 µg/ml, werden die Probe 1:400 verdünnt:

10 µl der Probe werden in 390 µl Probenverdünnungspuffer **Diluent** verdünnt (1:40).

Anschließend werden 100 µl dieser Lösung mit 900 µl **Diluent** verdünnt (1:10).

100 µl der endverdünnten Probe werden anschließend im Test eingesetzt.

Wird die Probe 1:400 verdünnt, können IFX-Konzentrationen zwischen 2,0 und 48 µg/ml bestimmt werden.

9.4. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen erfolgt die Zugabe von 100 µl der Standards 1 - 6 (**Standard | 1** - **Standard | 6**), der Positivkontrolle **Control | +**, der niedrigen Positivkontrolle **Low Control | +** sowie der endverdünnten Proben. Obwohl empfohlen wird, die Standards, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmungen zu pipettieren, werden auch zuverlässige

Ergebnisse mit Einfachbestimmungen erzielt. Die abgedeckte Platte wird anschließend für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert.

9.5. Erster Waschschrift

Sorgfältiges Waschen ist zum Erzielen korrekter Ergebnisse unerlässlich und sollte daher strikt nach Anleitung erfolgen. Das Inkubat in den Kavitäten sollte zunächst in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit-Lösung zwecks Desinfektion entleert werden. Danach wird die Platte sorgfältig auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um Restfeuchte zu entfernen. Anschließend wird die Platte 5-mal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 9.2.) gewaschen. Dabei muss sichergestellt werden, dass der Waschpuffer nach jedem Waschgang restlos von der Platte entfernt wird. Dies wird durch sorgfältiges Ausklopfen der Platte auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers erreicht.

Bei der Verwendung eines Waschautomaten ist auf die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Mikrotiter-Plattentyp zu achten.

Bei den Waschsritten muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden. Nach dem letzten Waschschrift sollte die Platte gründlich auf saugfähigem, sauberem Papier oder Labortüchern ausgeschlagen werden, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen.

9.6. Zweite Inkubation

Es werden 100 µl Konjugat Conjugate in alle Vertiefungen gegeben. Anschließend wird die abgedeckte Platte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

9.7. Zweiter Waschschrift

Nach Ablauf der Inkubationszeit sollte das Konjugat in den Kavitäten zunächst in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit-Lösung zwecks Desinfektion entleert werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen.

Anschließend wird die Platte 5-mal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

9.8. Dritte Inkubation

Es werden 100 µl Substrat Substrat in alle Vertiefungen gegeben. Anschließend wird die Platte für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl Stopp-Reagenz Stop in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt.

Nach vorsichtigem Mischen (durch leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm (Referenzfilter 620 nm) gemessen.

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle müssen bei jeder Testdurchführung die Standards 1 bis Standard 6 **Standard | 1** - **Standard | 6** , die Positivkontrolle **Control | +** und die niedrige Positivkontrolle **Low Control | +** (alle in Doppelbestimmung empfohlen) mitgeführt werden, um die Reagenzien-Stabilität und die korrekte Testdurchführung sicherzustellen.

Folgende Spezifikationen müssen bei jedem Lauf getroffen werden, um valide zu sein:

O.D. Wert für Standard 1 **Standard | 1** < 0,080

O.D. Wert für Standard 6 **Standard | 6** > 1,400

a) Wenn der Multiplikationsfaktor 1:100 verwendet wird (Erhaltungstherapie-Phase):

Konzentration für die niedrige Positivkontrolle **Low Control | +**:
3 µg/ml, Bereich 2 - 4 µg/ml

Konzentration für die Positivkontrolle **Control | +**:
7 µg/ml, Bereich 5 - 10 µg/ml

b) Wenn der Multiplikationsfaktor 1:400 verwendet wird (Induktionstherapie-Phase):

Konzentration für die niedrige Positivkontrolle **Low Control | +**:
12 µg/ml, Bereich 8 - 16 µg/ml

Konzentration für die Positivkontrolle **Control | +**:
28 µg/ml, Bereich 20 - 40 µg/ml

Der Verdünnungsfaktor muss mit einbezogen werden, wenn die IFX-Konzentrationen berechnet werden. Hierfür muss die gemessene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor mit dem die Proben verdünnt wurden multipliziert (siehe Kapitel **11. Auswertung und Interpretation**). Die Konzentrationen werden in µg/ml angegeben.

Rechenbeispiel für den Verdünnungsfaktor 1:100:

$$60 \text{ ng/ml} \times 100 \text{ (Verdünnungsfaktor)} = 6 \text{ µg/ml}$$

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, oder wenn das Substrat trübe oder blau ist, bevor es auf die Platte gegeben wird, kann dies ein Zeichen dafür sein, dass die Haltbarkeit des Tests überschritten ist. Wenn die angegebenen Werte nicht getroffen werden, müssen die folgenden Punkte geprüft werden:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

Im Falle eines hohen Hintergrunds (OD von Standard 1 > 0,08) waren die Waschschrirte ungenügend. Der Test sollte wiederholt werden und auf eine korrekte Durchführung der Waschschrirte geachtet werden.

Sind nach Testwiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm-Distributor.

11. Auswertung und Interpretation

Für die Ergebnisermittlung wird die Auswertesoftware RIDA[®]SOFT Win.net benötigt. Die RIDA[®]SOFT Win.net bzw. ein Update kann auf Anfrage von der R-Biopharm AG oder über Ihren lokalen R-Biopharm-Distributor bezogen werden.

Alternativ zur RIDA[®]SOFT Win.net kann auch andere Auswertesoftware, die das 4-Parameter-logistic-log-Modell zur Verfügung stellt, verwendet werden.

Die Auswertung des RIDASCREEN[®] IFX Monitoring erfolgt über eine Standardkurve, die bei jedem Lauf mitgeführt werden muss.

Die R-Biopharm AG ermittelt in der Qualitäts-Endkontrolle unter optimalen Testbedingungen für jede Kitcharge die Standardkurve (inkl. der Parameter A - D) sowie jeweils einen Sollwert und einen erlaubten OD-Bereich für den Kalibrator bzw. einen erlaubten Konzentrationsbereich für Positivkontrolle und Low-Positivkontrolle.

Der Verdünnungsfaktor wird entsprechend der therapeutisch relevanten Phase gewählt und muss bei der Bestimmung der IFX-Konzentrationen mit einberechnet werden.

Beispiel: Das Ergebnis der 1:100 verdünnten Probe, welches durch Interpolation der Kalibrationskurve erzielt wurde liegt bei 60 ng/ml. Die entsprechende IFX Konzentration der unverdünnten Probe ist somit 6 µg/ml.

Beispiel: Das Ergebnis der 1:400 verdünnten Probe, welches durch Interpolation der Kalibrationskurve erzielt wurde liegt bei 60 ng/ml. Die entsprechende IFX Konzentration der unverdünnten Probe ist somit 24 µg/ml.

Wenn die RIDA[®]SOFT Win.net Software benutzt wird, wird der Verdünnungsfaktor automatisch mit einberechnet, wenn die entsprechende Methode ausgewählt wird:

Bei einer 1:100 Verdünnung: RIDA[®]SOFT Win.net-Methode IFX100.met

Bei einer 1:400 Verdünnung: RIDA[®]SOFT Win.net-Methode IFX400.met

Die Konzentration wird in µg/ml angegeben.

12. Grenzen der Methode

Einige Patienten entwickeln eine Immunogenität gegen Infliximab, die dazu führt, dass ein Teil des Infliximab als gebundener Anteil an anti-Infliximab Antikörper vorliegt. Der gebundene IFX-Anteil wird vom RIDASCREEN[®] IFX Monitoring nicht gemessen. Der RIDASCREEN[®] IFX Monitoring detektiert den freien, funktionell aktiven IFX-Anteil.

Individuelle Infliximab-Konzentrationen, die über den RIDASCREEN® IFX Monitoring bestimmt werden, können nicht als alleiniger Indikator für eine Änderung des Behandlungsschema herangezogen werden. Jeder Patient sollte zusätzlich gründlich klinisch untersucht werden, bevor Änderungen am Behandlungsschema vorgenommen werden.

Während der Erhaltungstherapie-Phase wird eine therapeutische Talspiegelkonzentration in einem Konzentrationsbereich von 3 - 7 µg/ml empfohlen. Allerdings können sich die Konzentrationen, die mit einer Remission in Zusammenhang stehen, auf Grund von Intra- und Inter-individuellen Variabilitäten in der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Patient zu Patient unterscheiden. Außerdem scheinen höhere Talspiegelkonzentrationen bei gewissen Krankheitsphänotypen, wie zum Beispiel perianalen Erkrankungen oder zur Erreichung einer endoskopischen Heilung mit einer höheren Antwortrate und Remission in Zusammenhang zu stehen. ^[15,16]

13. Leistungsmerkmale

13.1. Beispiel typischer O.D. Werte

Standard	O.D.
1	0,007
2	0,104
3	0,212
4	0,453
5	1,357
6	2,508

13.2. Präzision

13.2.1. Intra-Assay-Präzision

Die Intra-Assay Präzision wurde mit 4 Referenzen in je 21 Replikaten in einem Lauf getestet. Aus den OD-Werten dieser Messungen wurden die IFX-Konzentrationen über die Standardkurve ermittelt und daraus die Mittelwerte (MW), die Standardabweichungen (SD) und die Variationskoeffizienten (VK) der Messungen für jede Probe errechnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Referenz	1	2	3	4
Mittelwert (µg/ml)	0,61	1,12	3,2	7,67
SD	0,04	0,05	0,15	0,51
% VK	6,6	4,6	4,7	6,8

13.2.2. Inter-Assay-Präzision

Die Inter-Assay Präzision wurde mit 4 Referenzen in 5 Läufen getestet. Aus den OD-Werten dieser Messungen wurden die Infliximab-Konzentrationen über die Standardkurve ermittelt und daraus die Mittelwerte (MW), die Standardabweichungen (SD) und die Variationskoeffizienten (VK) der Messungen für jede Probe errechnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Referenz	1	2	3	4
Mittelwert (µg/ml)	0,77	1,58	4,17	9,82
SD	0,04	0,09	0,16	0,94
% VK	5,4	5,4	3,7	9,6

13.3. Spezifität

13.3.1. Humanes Serum/ Plasma gesunder Personen

Die Spezifität wurde durch die Testung von 72 Donor-Proben von nicht behandelten Personen, belgischen Ursprungs erhoben. Keine der Proben zeigte eine detektierbare IFX-Konzentration, was zu einer Spezifität von 100 % führte.

13.3.2. Interferenz

Eine Auswahl von 30 potentiell interferierenden Proben wurde getestet. Diese enthielt HAMA positive, lipämische und hämolysierte Proben, Proben mit hohen Bilirubin- und Cholesterol- Konzentrationen, sowie Proben von schwangeren Frauen der ersten Schwangerschaftshälfte. Es wurde keine Wechselwirkung mit den getesteten Faktoren gefunden.

13.3.3. Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu den Biopharmazeutika Adalimumab und Golimumab gezeigt, welche zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden.

13.4. Analytische Sensitivität

Für die Bestimmung der analytischen Sensitivität wurden Verdünnungsreihen vom Standard 2 (5 ng/ml) hergestellt und zusammen mit zwei Kontrollproben getestet. Die Nachweisgrenze wurde als < 1ng/ml festgelegt. Berechnet man den Verdünnungsfaktor 1:100 mit ein, entspricht dies einer Konzentration von 0.1 µg/ml.

13.5. Wiederfindung

17 IFX negative Proben wurden mit unterschiedlichen IFX- Konzentrationen versetzt. Aus den OD-Werten dieser Messung wurde die IFX-Konzentration über die Standardkurve ermittelt und danach die Wiederfindung berechnet. Die mittlere Wiederfindung beträgt 103,5 %.

Probe	Zielwert (µg/ml)	Gemessen (µg/ml)	Wiederfindung %
1	0,25	0,285	114,0
2	0,5	0,5	100,0
3	1	0,95	95,0
4	2	1,95	97,5
5	3	3,18	106,0
6	3,5	3,53	100,9
7	4	3,88	97,0
8	4,5	4,74	105,3
9	5	5,34	106,8
10	5,5	6,07	110,4
11	6	6,57	109,5
12	7	7,73	110,4
13	8	8,42	105,3
14	9	8,86	98,4
15	10	10,29	102,9
16	11	11,26	102,4
17	12	11,68	97,3
Mittelwert			103,5

13.6. Korrelation mit dem Referenz-Assay










Zwei klinische Probenpanels mit einer Anzahl von 102 und 30 Proben wurden mit dem RIDASCREEN® IFX Monitoring analysiert und die Ergebnisse mit denen des Referenz-Assays verglichen (Inhouse-Test von KU Leuven). Es wurden Korrelationskoeffizienten von 0,95 und 0,97 zwischen den beiden Assays ermittelt.

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-11-14	4. Packungsinhalt 9.4 Erste Inkubation

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	Verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Plate	Mikrotiterplatte
Standard 1-6	Standard 1 - 6
Low Control +	Niedrige Positivkontrolle
Control +	Hohe Positivkontrolle
Diluent	Probenverdünnungspuffer
Conjugate	Konjugat
Substrate	Substrat
Wash 20x	Waschpuffer (20x)
Stop	Stop-Reagenz

16. Literatur

1. Vogelaar L, Spijker AV, van der Woude CJ. The impact of biologics on health-related quality of life in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol* 2009;2:101-109.
2. Yanai H, Hanauer SB. Assessing response and loss of response to biological therapies in IBD. *Am J Gastroenterol* 2011;106:685-698.
3. Vermeire S, Gils A. Value of drug level testing and antibody assays in optimising biological therapy. *Frontline Gastroenterol* 2013;4:41-43.
4. Ducourau E, Mulleman D, Paintaud G, et al. Antibodies toward infliximab are associated with low infliximab concentration at treatment initiation and poor infliximab maintenance in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R105.
5. Mulleman D, Meric JC, Paintaud G, et al. Infliximab concentration monitoring improves the control of disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R178.
6. Van Stappen T, Brouwers E, Tops S, et al. Generation of a highly specific monoclonal antibody standard for harmonization of TNF-coated infliximab assays. *Ther Drug Monit* 2015;37:479-485.
7. Gils A, Van Stappen T, Dreesen E, et al. Harmonization of Infliximab and Anti-Infliximab Assays Facilitates the Comparison Between Originators and Biosimilars in Clinical Samples. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22:969-975.
8. Cornillie F, Hanauer SB, Diamond RH, et al. Postinduction serum infliximab trough level and decrease of C-reactive protein level are associated with durable sustained

- response to infliximab: a retrospective analysis of the ACCENT I trial. *Gut* 2014;63:1721-1727.
9. Vande Casteele N, Ballet V, Van Assche G, et al. Early serial trough and antidrug antibody level measurements predict clinical outcome of infliximab and adalimumab treatment. *Gut* 2012;321; author reply 322.
 10. Van Stappen T, Bollen L, Vande Casteele N, et al. Rapid test for infliximab drug concentration allows immediate dose adaptation. *Clin Transl Gastroenterol* 2016;7:e206.
 11. Maser EA, Villela R, Silverberg MS, et al. Association of trough serum infliximab to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1248-1254.
 12. Vande Casteele N, Ferrante M, Van Assche G, et al. Trough concentrations of infliximab guide dosing for patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2015;148:1320-1329.
 13. Steenholdt C, Brynskov J, Thomsen OO, et al. Individualised therapy is more cost-effective than dose intensification in patients with Crohn's disease who lose response to anti-TNF treatment: a randomised, controlled trial. *Gut* 2014;63:919-927.
 14. Baert F, Noman M, Vermeire S, et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003;348:601-608.
 15. Yarur AJ, Kanagala V, Stein DJ, et al. Higher infliximab trough levels are associated with perianal fistula healing in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2017;45:933-940.
 16. Ungar B, Levy I, Yavne Y, et al. Optimizing anti-TNF- α therapy: Serum levels of infliximab and adalimumab associate with mucosal healing in patients with inflammatory bowel diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:550–557.