

RIDASCREEN® VDZ Monitoring

REF G09045



1. Zweckbestimmung

Für die *In-vitro*-Diagnostik. RIDASCREEN® VDZ Monitoring ist ein Enzym-Immunoassay zum quantitativen Nachweis von Vedolizumab (VDZ, Entyvio®, anti- Integrin $\alpha_4\beta_7$) in humanem Serum und Plasma.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Therapeutisches Medikamenten-Monitoring

Vedolizumab (VDZ) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der ausschließlich an das Integrin $\alpha_4\beta_7$ von Lymphozyten bindet. VDZ inhibiert die Interaktion der $\alpha_4\beta_7$ -exprimierenden Zellen mit dem mucosalen Zelladhäsionsmolekül-1 auf endothelialen Zellen. Dadurch werden die $\alpha_4\beta_7$ -exprimierenden Zellen an der Infiltration in die gastrointestinale Mukosa und das darmassoziierte lymphatische Gewebe gehindert. VDZ unterdrückt so Entzündungen im Darm und wurde daher für die Behandlung von Patienten mit moderater bis schwerer Colitis Ulcerosa (CU) ^[1] und Morbus Crohn (MC) ^[2,3] zugelassen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass VDZ eine klinische Remission induzieren und dadurch die Lebensqualität für betroffene Patienten verbessern kann.

Ein Medikament kann nur dann wirksam sein, wenn adäquate Konzentrationen im Blutkreislauf vorhanden sind. Für das therapeutische Medikamenten-Monitoring (TDM) wird die Serumkonzentration von VDZ direkt vor der nächsten Infusion verwendet. Diese wird auch als Talspiegel-Konzentration bzw. trough level-Konzentration bezeichnet. Aktuelle Publikationen zu TDM haben gezeigt, dass eine Beziehung zwischen einer guten klinischen Wirksamkeit und einer adäquaten Talspiegel-Konzentration bei Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn Patienten besteht ^[4, 5,6]. Dies ist ein Beleg dafür, dass TDM im Hinblick auf eine Therapieanpassung sehr nützlich sein kann.

Im RIDASCREEN® VDZ Monitoring werden hoch-spezifische monoklonale Antikörper (MA-VDZ6F3 und MA-VDZ6E6), die bei der KU Leuven isoliert und charakterisiert wurden, verwendet. Sie detektieren ausschließlich Vedolizumab (Entyvio®). Anti-TNF α -Medikamente (wie z. B. Infliximab, Adalimumab oder Golimumab) interferieren nicht mit der Messung. Als Beispiel für TDM wird der Gebrauch von VDZ durch Talspiegelmessungen bei CU- und MC-Patienten näher beleuchtet.

Colitis Ulcerosa

VDZ wird in Woche 0, 2 und 6 verabreicht (Induktionsphase) und nach einem guten klinischen Ansprechen in Woche 14, wird die Behandlung durch Infusionen alle 8 Wochen fortgesetzt (Erhaltungstherapiephase).

In der GEMINI 1 Studie wurde der Zusammenhang zwischen der Verabreichung von VDZ und seiner Effektivität evaluiert und ein positiver Effekt auf die klinische Remission, das klinische Ansprechen und die mukosale Heilung bei Colitis Ulcerosa-Patienten gefunden ^[1]. VDZ-Talspiegelmessungen während oder kurz nach der

Induktion können so benutzt werden, um unterdosierte Patienten zu identifizieren. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass höhere VDZ-Konzentrationen in der Erhaltungstherapiephase bei CU-Patienten mit einer tieferen Remission assoziiert sind [5]. Daraus lässt sich schließen, dass eine regelmäßige Überwachung der VDZ-Talspiegel während der Erhaltungstherapiephase nützlich für das VDZ-Behandlungsschema sein kann.

Morbus Crohn

VDZ wird in Woche 0, 2 und 6 verabreicht (Induktionsphase). Nach einem guten klinischen Ansprechen in Woche 14 wird die Behandlung durch Infusionen alle 8 Wochen fortgesetzt (Erhaltungstherapiephase). In der GEMINI 2 und 3 Studie wurde der Zusammenhang zwischen der Verabreichung von VDZ und seiner Effektivität evaluiert und ein moderater positiver Effekt gefunden [2,3].

In beiden Studien waren die klinischen Remissionsraten in Woche 10 höher als in Woche 6. Die Europäische Arzneimittel-Agentur erlaubt vor einer Bewertung eines Therapieansprechens in Woche 14, eine zusätzliche Gabe von VDZ in Woche 10. Auf Grund dieses Dosierungsschemas sind die Talspiegel in der Induktionsphase in Woche 2, 6, 10 und 14 höher, verglichen mit der Erhaltungstherapiephase, in der VDZ alle 8 Wochen verabreicht wird.

Immunogenität

Bei der Behandlung mit VDZ ist die Immunogenitätsrate sehr gering ($\leq 4\%$) und wird nur als geringe Beeinträchtigung für die Behandlungseffizienz angesehen. [5]

3. Testprinzip

Im RIDASCREEN® VDZ Monitoring werden spezifische Antikörper in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt. An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte sind monoklonale Antikörper gegen VDZ (MA-VDZ6F3) gebunden. Eine Verdünnung der zu untersuchenden Patientenprobe wird in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und darin inkubiert. Während dieses Inkubationsschrittes bindet VDZ spezifisch an den auf der Platte gebundenen Antikörper MA-VDZ6F3. Anschließend erfolgt ein Waschschriff und eine zweite Inkubation zusammen mit einem monoklonalen Antikörper gegen VDZ (MA-VDZ6E6), welcher mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Wenn VDZ in der Probe vorhanden ist, bildet sich ein Sandwich-Komplex aus dem immobilisierten anti-VDZ Antikörper, VDZ und dem konjugierten Antikörper. Nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden in einem weiteren Waschschriff 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 VDZ-Konzentration.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

Plate	96 det.	Mikrotiterplatte; 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit monoklonalem Antikörper MA-VDZ6F3
Standard 1-6	1300 µl	6 Standards; Konzentrationen der Standards 1 bis 6: 0 / 10 / 30 / 100 / 200 / 500 ng/ml; enthält 0,09 % NaN ₃ ; gebrauchsfertig
Low Control +	1300 µl	Niedrige Positivkontrolle; enthält 120 ng/ml VDZ und 0,09 % NaN ₃ ; gebrauchsfertig
Control +	1300 µl	Positivkontrolle; enthält 250 ng/ml VDZ 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-VDZ6E6); 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 Details 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) können bis zum nächsten Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert und 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)
- 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 NaN_3 . 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 Reaktionsgefäß.

Proben können für 3 - 4 Tage bei 2 - 8 °C, oder bei -20 °C für mindestens ein Jahr 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 | 20** 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 Verabreichung der nächsten Medikamentendosis) während der Erhaltungstherapie-Phase (= von Woche 14 und nachfolgend), 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 VDZ-Konzentrationen zwischen 1 und 50 µg/ml bestimmt werden.

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

Um Talspiegelkonzentrationen während der Induktionstherapie-Phase (= in Woche 2, 6 und 14 und bei Morbus Crohn zusätzlich in Woche 10 (siehe Kapitel 2.)) zu messen bzw. um mittlere Konzentrationen zu messen, wird 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 VDZ-Konzentrationen zwischen 4 und 200 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 Platte wird anschließend für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert.

9.5 Erster Waschschritt

Sorgfältiges Waschen ist wichtig zum Erzielen korrekter Ergebnisse 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 auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um Restfeuchte zu entfernen.

Anschließend wird 5-mal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 9.2.) gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen. Bei der Verwendung eines Waschautomaten ist auf die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Mikrotiter-Plattentyp zu achten.

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

9.6 Zweite Inkubation

Zugabe von 100 µl Konjugat **Conjugate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

9.7 Zweiter Waschschrritt

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 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

Zugabe von 100 µl Substrat **Substrate** in alle Vertiefungen. 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 (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 | +** (empfohlen in Doppelbestimmung) mitgeführt werden, um 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 :
12 µg/ml, Bereich 8 – 16 µg/ml

Konzentration für die Positivkontrolle :
25 µg/ml, Bereich 17 – 34 µg/ml

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

Konzentration für die niedrige Positivkontrolle :
48 µg/ml, Bereich 32 – 64 µg/ml

Konzentration für die Positivkontrolle :
100 µg/ml, Bereich 68 – 136 µg/ml

Der Verdünnungsfaktor muss mit einbezogen werden, wenn die VDZ-Konzentrationen berechnet werden. Hierfür muss die gemessene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor, mit dem die Proben verdünnt wurden, multipliziert werden (siehe **Kapitel 11. Auswertung und Interpretation**).

Die Konzentrationen werden in µg/ml angegeben.

Rechenbeispiel für den Verdünnungsfaktor 1:100:

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

Eine Abweichung von den geforderten Werten sowie eine Reagenzienrübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten können ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu prüfen:

- 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 Waschschrte ungenügend. Der Test sollte wiederholt werden und auf eine korrekte und intensivere Durchführung der Waschschrte geachtet werden (höhere Anzahl an Waschzyklen, längere Standzeiten).

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® VDZ 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, sowie jeweils einen Sollwert und einen erlaubten OD-Bereich für den Kalibrator bzw. einen erlaubten Konzentrationsbereich für Positivkontrolle und Low-Positivkontrolle.

Der Verdünnungsfaktor muss berücksichtigt werden, wenn die VDZ-Konzentration der Patientenproben berechnet werden, indem die gemessene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert wird.

Beispiel: Das Ergebnis der 1:100 verdünnten Probe, welches durch Interpolation der Kalibrationskurve erzielt wurde liegt bei 120 ng/ml. Die entsprechende VDZ Konzentration der unverdünnten Probe ist somit 12 µg/ml.

Beispiel: Das Ergebnis der 1:400 verdünnten Probe, welches durch Interpolation der Kalibrationskurve erzielt wurde liegt bei 150 ng/ml. Die entsprechende VDZ Konzentration der unverdünnten Probe ist somit 60 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 VDZ100.met

Bei einer 1:400 Verdünnung: RIDA®SOFT Win.net-Methode VDZ400.met

Die Konzentration wird in µg/ml angegeben.

12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN® VDZ Monitoring detektiert den freien VDZ-Anteil und nicht jenen VDZ-Anteil, der auf Grund der Immunogenität an anti-Vedolizumab Antikörper gebunden vorliegt.

Der RIDASCREEN® VDZ Monitoring dient als Test zur Generierung einer diagnostischen Aussage, welche dazu dient, klinische Entscheidungen zu unterstützen, aber nicht, um klinische Entscheidungen zu treffen. Die Ergebnisse des RIDASCREEN® VDZ Monitoring sollten immer in Zusammenhang mit allen anderen verfügbaren Informationen zum Patienten, zum Medikament und den Krankheits-spezifischen Parametern getroffen werden.

13. Leistungsmerkmale

13.1. Beispiel typischer O.D. Werte

Standard	O.D.
1	0,011
2	0,091
3	0,232
4	0,740
5	1,323
6	2,499

13.2. Präzision

13.2.1 Intra-Assay-Präzision

Die Intra-Assay Präzision wurde mit 4 Referenzen in je 20 Replikaten in einem Lauf getestet. Aus den OD-Werten dieser Messungen wurden die VDZ-Konzentrationen ermittelt. Die Mittelwerte (MW), die Standardabweichungen (SD) und die Variationskoeffizienten (VK) der Messungen für jede Probe wurden berechnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Referenz	1	2	3	4
Mittelwert (µg/ml)	2,64	7,11	13,87	32,35
SD	0,12	0,39	0,75	2,33
% VK	4,6	5,5	5,4	7,2

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 VDZ-Konzentrationen ermittelt. Die Mittelwerte (MW), die Standardabweichungen (SD) und die Variationskoeffizienten (VK) der Messungen für jede Probe wurden errechnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Referenz	1	2	3	4
Mittelwert (µg/ml)	2,67	7,29	14,31	33,42
SD	0,15	0,49	0,93	4,05
% VK	5,8	6,7	6,5	12,1

13.3. Spezifität

13.3.1. Humanes Serum/ Plasma gesunder Personen

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

13.3.2. Interferenz

Die Interferenz wurde anhand von 27 RF positiven Proben von Patienten, welche unter einer Autoimmun-Erkrankung leiden und mit einem anderen Medikament als Entyvio® behandelt wurden untersucht. Keine der Proben zeigte eine detektierbare VDZ Konzentration, was einer Spezifität von 100 % entspricht.

Ein Probenpanel von 25 potentiell interferierenden Proben wurde getestet. Diese enthielt HAMA positive, lipämische und hämolysierte Proben, Proben mit hohen 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 Infliximab, Adalimumab und Golimumab gezeigt, welche zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden.

13.4. Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze für VDZ liegt unter 2,5 ng/ml. Berechnet man den Verdünnungsfaktor 1:100 mit ein, entspricht dies einer Konzentration von 0,25 µg/ml.

13.5. Wiederfindung

15 VDZ negative Proben (5 negative Serumproben, 5 negative EDTA Plasmaproben, 5 negative Citrat- Plasmaproben) wurden mit unterschiedlichen VDZ- Konzentrationen versetzt (6 µg/ml, 12 µg/ml und 40 µg/ml). Basierend auf den OD-Werten dieser Messung wurde die VDZ-Konzentration über die Standardkurve ermittelt und danach die Wiederfindung berechnet. Die mittlere Wiederfindung beträgt 98,1 %.

Probe	Nr.	VDZ (µg/ml)	Wiederfindung (%)
Referenzwert 43,0 µg/ml			
Serum	1	41,7	97,0 %
	2	42,9	99,8 %
	3	41,4	96,3 %
	4	39,3	91,4 %
	5	38,9	90,5 %
EDTA Plasma	6	41,5	96,5 %
	7	43,4	100,9 %
	8	44,5	103,5 %
	9	42,5	98,8 %
	10	38,3	89,1 %
Citrate Plasma	11	42,9	99,8 %
	12	41,2	95,8 %
	13	39,7	92,8 %
	14	40,5	94,2 %
	15	39,3	91,4 %
Referenzwert 10,2 µg/ml			
Serum	1	10,5	102,9 %
	2	9,4	92,2 %
	3	10,5	102,9 %
	4	10,2	100,0 %
	5	10,6	103,9 %

Sample	Nr.	VDZ (µg/ml)	Wiederfindung
EDTA Plasma	6	10,1	99,0 %
	7	9,8	96,1 %
	8	11,1	108,8 %
	9	10,0	98,0 %
	10	9,7	95,1 %
Citrate Plasma	11	11,1	108,8 %
	12	9,9	97,1 %
	13	9,8	96,1 %
	14	10,4	102,0 %
	15	9,8	96,1 %
Referenzwert 6,5 µg/ml			
Serum	1	6,0	92,3 %
	2	5,7	87,7 %
	3	5,7	87,7 %
	4	6,4	98,5 %
	5	6,9	106,2 %
EDTA Plasma	6	6,2	95,4 %
	7	7,6	116,9 %
	8	6,3	96,6 %
	9	6,7	103,1 %
	10	6,2	95,4 %
Citrate Plasma	11	6,4	98,5 %
	12	6,2	95,4 %
	13	7,4	113,8 %
	14	5,7	87,7 %
	15	6,8	104,6 %
Mittelwert			98,1 %

13.6. Korrelation mit dem Referenz-Assay und diagnostische Sensitivität

Ein klinisches Probenpanels mit 17 Proben wurde mit dem RIDASCREEN® VDZ Monitoring analysiert und die Ergebnisse mit denen eines Referenz-Assays verglichen (Inhouse-Test von KU Leuven). Es wurde ein Korrelationskoeffizienten von 0,98 zwischen den beiden Assays ermittelt.










Alle Proben die laut dem Referenzassay messbare VDZ Konzentrationen zeigten (16 Proben) wurden auch im RIDASCREEN® VDZ Montierung positiv gefunden, was einer diagnostischen Sensitivität von 100 % entspricht.

14. Versionsübersicht

Version number	Chapter and description
2019-12-10	9.4. Erste Inkubation

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro</i> -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. Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 2013;369:699-710.
2. Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2013;369:711-721.
3. Sands BE, Feagan BG, Rutgeerts P, et al. Effects of vedolizumab induction therapy for patients with Crohn's disease in whom tumor necrosis factor antagonist treatment failed. *Gastroenterology* 2014;147:618-627.
4. Rosario M, Dirks NL, Milch C, et al. A Review of the Clinical Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Immunogenicity of Vedolizumab. *Clin Pharmacokinet* 2017;56:1287-1301.
5. Rosario M, French JL, Dirks NL, et al. Exposure–efficacy Relationships for Vedolizumab Induction Therapy in Patients with Ulcerative Colitis or Crohn's Disease. *J Crohns Colitis* 2017;11:921-929.
6. Dreesen E, Verstockt B, Bian S, et al. Evidence to support monitoring of vedolizumab trough concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018; *Epub ahead of print.*
7. Bian S, Dreesen E, Tang HT, et al. Antibodies toward vedolizumab appear from the first infusion onward and disappear over time. *Inflamm Bowel Dis* 2017;23:2202-2208.