

RIDASCREEN® GLM Monitoring

REF G09047



1. Zweckbestimmung

Für die *in vitro* Diagnostik. RIDASCREEN® GLM Monitoring ist ein Enzyme-Linked Immuno-Assay (ELISA) für die quantitative Bestimmung von Golimumab (GLM, Simponi®) in humanem Serum und Plasma.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Therapeutisches Drug Monitoring

Golimumab (GLM) ist ein humaner monoklonaler Antikörper, der aus TNF-alpha immunisierten transgenen Mäusen gewonnen wird, die durch eine gentechnische Veränderung humane IgGs produzieren.¹ Golimumab bindet an die löslichen und transmembranen bioaktiven Formen von humanem TNF-alpha, sodass hochaffine Komplexe entstehen und die Bindung von TNF-alpha an seine Rezeptoren verhindert wird.² Golimumab ist zugelassen für die Behandlung von verschiedenen chronischen immunvermittelten Entzündungserkrankungen, bei denen TNF-alpha eine wichtige Rolle spielt, darunter rheumatoide Arthritis (RA), Psoriasisarthritis, Spondylitis ankylosans und Colitis ulcerosa (UC).

Medikamente können ihre pharmakologische Wirkung nur entfalten, wenn sie in einer entsprechenden Konzentration im Kreislauf vorliegen. Für das therapeutische Drug Monitoring (TDM) wurde die Serumkonzentration von Golimumab unmittelbar vor der nächsten Infusion, definiert als Talspiegel-Konzentration, verwendet. Neueste Daten zu TDM weisen auf eine positive Beziehung zwischen GLM-Talspiegel-Konzentrationen und klinischen Ergebnissen bei Patienten mit RA³ und UC⁴ hin. TDM könnte somit eine wichtige Option für die Optimierung der Behandlung darstellen. RIDASCREEN® GLM Monitoring verwendet einen hochspezifischen monoklonalen Antikörper (MA-GOM171D8), der in der KU Leuven isoliert und charakterisiert wurde. Er erkennt ausschließlich Golimumab; andere Anti-TNF-Medikamente (wie Infliximab, Adalimumab) beeinflussen die Messwerte nicht.

Colitis ulcerosa

Der diagnostische Nutzen von TDM für UC-Patienten wird unten beschrieben. In den meisten europäischen Ländern erhalten Patienten die gleiche Induktionsbehandlung in der täglichen klinischen Praxis (200 mg in Woche 0 und 100 mg in Woche 2), gefolgt von einer auf das Körpergewicht abgestimmten Dosisstratifizierung in der Erhaltung, d. h. 50 mg alle vier Wochen bei Patienten mit einem Körpergewicht unter 80 kg und 100 mg Golimumab alle vier Wochen bei Patienten mit einem Körpergewicht von mindestens 80 kg. Auswertungen aus PURSUIT und Beobachtungsstudien aus realen Anwendungen zeigen klinische Response-Raten von etwa 50 % nach einer Induktionstherapie mit Golimumab.⁵⁻⁷ Es wurde auch eine Expositions-Response-Beziehung beobachtet, da Patienten mit einer höheren Einnahmemenge des Wirkstoffs eine größere Wahrscheinlichkeit für verbesserte Ergebnisse aufwiesen.^{4,8} GLM-Talspiegel-Konzentrationsmessungen während oder kurz

nach der Induktion können somit für die Identifizierung von unterbehandelten Patienten herangezogen werden. In PURSUIT-M hatten Non-Responder in Woche 6 geringere Serumspiegel des Wirkstoffs im Vergleich zu Respondern in Woche 6. Diese frühen Non-Responder erhielten 100 mg Golimumab als Erhaltungsdosis und ihre Wirkstoffexposition stieg bis Woche 14 auf Spiegel, die mit denen der Responder vergleichbar waren.⁹

Seit Juli 2018 wurde die Posologie deshalb dahingehend geändert, dass die Dosis bei Patienten, die auf eine Induktion unzureichend ansprechen, auf 100 mg in Woche 6 erhöht und im Anschluss daran alle vier Wochen wiederholt werden kann. Eine regelmäßige Kontrolle der GLM-Talspiegel-Konzentrationen während einer Induktions- oder Erhaltungstherapie kann deshalb für eine Bewertung des GLM-Behandlungsplans nützlich sein.

Immunogenität

Derzeit ist unklar, ob der Ausfall der Response gegenüber GLM auf die Bildung von Anti-Drug-Antikörpern zurückzuführen ist, da Studien eine geringe Immunogenitätsrate ergaben.¹⁰ Bei nicht nachweisbaren Talspiegel-Konzentrationen kann eine anschließende Messung der Anti-Drug-Antikörper jedoch hilfreich für die Ermittlung der optimalen Behandlungstherapie sein.

3. Testprinzip

Beim RIDASCREEN® GLM Monitoring wird ein hochspezifischer monoklonaler Antikörper gegen GLM (MA-GOM171D8, an der KU Leuven isoliert und charakterisiert) in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt.

TNF α -Moleküle werden auf die Welloberfläche in der Mikrotiterplatte appliziert. Eine Verdünnung der Serum- oder Plasmaprobe des Patienten wird in das Well der Mikrotiterplatte pipettiert und inkubiert. Während dieser Inkubationsphase bindet GLM speziell an das TNF α auf der Platte. Nach dem Waschen folgt eine zweite Inkubationsphase mittels mit Meerrettichperoxidase konjugiertem MA-GOM171D8. Wenn GLM vorhanden ist, bildet sich zwischen immobilisiertem TNF α , GLM und konjugierten Antikörpern ein Sandwich-Komplex. Nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden in einem nachfolgenden Waschschrift entfernt. Nach Zugabe des Substrats schlägt die farblose Lösung in den Mikrowells bei positivem Ergebnis in blau um. Bei Zugabe eines Stopp-Reagenz schlägt die Farbe von blau in gelb um. Die Aufnahme ist proportional zu der in der Probe vorhandenen Konzentration von GLM.

4. Packungsinhalt

Ein Kit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Packungsinhalt

Platei	96 Best.	Mikrotiterplatte, 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Streifenhalter; 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 GLM; enthält 0,09 % NaN ₃ ; gebrauchsfertig
Low Control +	1300 μ l	Low-Positivkontrolle; enthält 30 ng/ml GLM und 0,09 % NaN ₃ ; gebrauchsfertig
Control +	1300 μ l	Positivkontrolle; enthält 70 ng/ml GLM 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-GOM171D8); gebrauchsfertig; rot gefärbt
Substrate	12 ml	Substrat; Wasserstoffperoxid / Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig
Wash 20x	50 ml	Waschpuffer (20-fache Konz.); phosphatgepufferte NaCl-Lösung; enthält Reinigungsmittel und antimikrobielle Wirkstoffe
Stop	6 ml	Stoppreagenz; 0,5 M H ₂ SO ₄ ; gebrauchsfertig
2 Abdeckfolien		

Informationen über Gefahrenstoffe erfüllen die Kennzeichnungsvorschriften. Weitere Informationen sind in den Sicherheitsdatenblättern (SDB) enthalten, siehe www.r-biopharm.com.

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien müssen bei 2 bis 8 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Geöffnete Komponenten (Reagenzien, Mikrowellstreifen) sollten bis zum nächsten Gebrauch bei 2 bis 8 °C aufbewahrt werden und sind einen Monat lang haltbar. Der verdünnte Waschpuffer kann bei einer Aufbewahrung bei 2 bis 8 °C einen Monat lang verwendet werden. Eine mikrobielle Verunreinigung ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Beim Öffnen des Aluminiumbeutels, der die Mikrotiterstreifen enthält, darf der Klemmverschluss nicht abgerissen werden. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind unverzüglich wieder in den Aluminiumbeutel mit dem Trockenmittel zurückzulegen und bei 2 bis 8 °C aufzubewahren, bis sie aufgebraucht sind. Das farblose Substrat muss ebenfalls vor direkter Lichteinstrahlung geschützt werden, damit es sich nicht zersetzt oder durch Autooxidation blau verfärbt. Wenn sich das Substrat einmal blau verfärbt hat, darf es 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 Kunststoffröhrchen für die Verdünnung der Proben
- Stoppuhr
- Waschautomat oder Mehrkanalpipette (300 µl)
- Mikroplattenlesegerät (450 nm, Referenzfilter 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)
- Abfallbehälter mit 0,5 %-iger Hypochloritlösung
- 37 °C Inkubator

7. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen für Benutzer

In-Vitro-Diagnostikum.

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.

Reagenzien oder beschichtete Mikrotiterstreifen aus Sets mit unterschiedlichen Chargen-Nummern dürfen nicht vermischt werden.

Bestimmte Inhaltsstoffe der Standards und Positivkontrollmischungen werden aus Materialien biologischen Ursprungs gewonnen. Nach derzeitigem Kenntnisstand sind

keine Verfahren bekannt, die garantieren können, dass solche Materialien keine Infektionserreger enthalten. Kalibratoren und Positivkontrollmischungen sowie Patientenproben und alle Materialien, die damit in Kontakt kommen, sollten deshalb als potenziell infektiös behandelt 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 Hände waschen. In den Bereichen, in denen mit den Proben oder den Test-Reagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Das Stoppreagenz enthält 0,5 M Schwefelsäure, die Reizungen verursachen kann. Kontakt mit der Haut und Kleidung ist zu vermeiden. Bei Kontakt mit den Augen oder der Haut mit reichlich Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

Die Reagenzien enthalten NaN_3 als Konservierungsmittel. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden. Um die Bildung von potenziell explosionsgefährlichen Metallaziden in den Laborleitungen zu vermeiden, sind die Abflüsse nach Entsorgung dieser Lösungen gründlich zu spülen.

Das Substrat enthält Wasserstoffperoxid und N-Methyl-2-Pyrrolidon (> 3 %).

Weitere Informationen sind in den Sicherheitsdatenblättern (SDB) enthalten, siehe www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

In diesem Testeinsatz können EDTA-Plasmaproben, Citratplasmaproben und Serumproben verwendet werden. Serum sollte nach der Sammlung schnellstmöglich vom Blut getrennt werden, um eine mögliche Hämolyse zu vermeiden. Geben Sie Serum in ein sauberes Aufbewahrungsröhrchen.

Proben können bei 2 bis 8 °C mindestens 3 bis 4 Tage bzw. bei -20 °C mindestens sechs Monate aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Proben sind mit einem Probenverdünnungspuffer zu verdünnen (siehe 9.3.1.).

Verdünnte Proben können bei Raumtemperatur mindestens 8 Stunden aufbewahrt werden.

9. Testdurchführung

9.1. Allgemeines

Alle Reagenzien und die Mikrotiterplatte Plate müssen vor dem Gebrauch Raumtemperatur (20 bis 25 °C) annehmen können. Die Mikrotiterstreifen dürfen erst aus dem Aluminiumbeutel entnommen werden, wenn sie Raumtemperatur erreicht haben. Reagenzien unmittelbar vor dem Gebrauch gründlich mischen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen (in verschlossenen Beuteln) und die Reagenzien sind nach dem Öffnen bei 2 bis 8 °C aufzubewahren. Gebrauchte Mikrotiterstreifen dürfen nicht noch einmal benutzt werden. Die Reagenzien und die Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Fläschchen auslaufen. Zur

Vermeidung von Kreuzkontamination dürfen die Proben nicht in direkten Kontakt mit den Komponenten des Sets kommen. Der Test darf nicht in direktem Sonnenlicht durchgeführt werden. Während der Inkubation sollte die Mikrotiterplatte abgedeckt werden oder es sollte eine Folie darübergelegt werden, um Verluste durch Verdunstung zu meiden.

Für Hinweise zur Durchführung des Tests mit ELISA-Instrumenten wenden Sie sich bitte an R-Biopharm AG oder an Ihren Fachhändler vor Ort.

9.2. Vorbereitung des Waschpuffers

1 Teil Waschpufferkonzentrat **Wash | 20x** mit 19 Teilen destilliertem Wasser mischen (1:20). 50 ml Konzentrat in einen 1000-ml-Messzylinder gießen und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen. Die rekonstituierte Lösung kann bei 2 bis 8 °C mindestens einen Monat lang aufbewahrt werden. Bei höheren Temperaturen kann die konzentrierte Waschlösung trüb aussehen, dies beeinträchtigt ihre Wirkung jedoch nicht. Nach Verdünnung wird die Lösung klar.

9.3. Vorbereitung der Proben

Serum- oder Plasmaproben können bei 2 bis 8 °C 3 bis 4 Tage bzw. bei -20 °C mindestens sechs Monate lang aufbewahrt werden (siehe auch Kapitel 8). Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Proben sind mit einem Probenverdünnungspuffer zu verdünnen (siehe 9.3.1.).

Verdünnte Proben können bei Raumtemperatur mindestens 8 Stunden aufbewahrt werden.

9.3.1 Probenverdünnung

a) Messung der Talspiegel-Konzentrationen in der Therapieerhaltungsphase

Für die Messung der Talspiegel-Konzentration (Wirkstoffkonzentration unmittelbar vor Verabreichung der nächsten Dosis) während der Erhaltungsphase der Behandlung werden die Proben im Verhältnis 1:100 verdünnt:

10 µl der Probe werden in 990 µl Probenverdünnungspuffer **Diluent** verdünnt (1:100).

100 µl dieser endgültig verdünnten Probe werden dann getestet.

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

b) Messung der Talspiegel-Konzentrationen in der Therapieinduktionsphase

Für die Messung der Talspiegel-Konzentrationen während der Induktionstherapie oder für die Messung von dazwischenliegenden Wirkstoffkonzentrationen oder Konzentrationen > 12,0 µg/ml werden die Proben im Verhältnis 1:200 verdünnt:

10 µl der Probe werden in 1990 µl Probenverdünnungspuffer **Diluent** verdünnt (1:200).

100 µl dieser endgültig verdünnten Probe werden dann getestet.

Wenn die Probe 1:200 verdünnt ist, können GLM-Konzentrationen zwischen 1,0 und 24 µg/ml bestimmt werden.

9.4. Erste Inkubation

Platzieren Sie eine ausreichende Anzahl an Wells im Halterahmen und pipettieren Sie danach 100 µl der Standards (1 - 6 **Standard | 1** bis **Standard | 6**), Positivkontrolle **Control | +**, Low-Positivkontrolle **Low control | +** und der Proben in die entsprechenden Wells. Obwohl empfohlen wird, die Standards, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmungen zu pipettieren, werden auch zuverlässige Ergebnisse mit Einfachbestimmungen erzielt. Inkubieren Sie danach die abgedeckte Mikrotiterplatte eine Stunde lang bei 37 °C.

9.5. Erstes Waschen

Sorgfältiges Waschen ist Voraussetzung für eine korrekte Auswertung. Deshalb sollte der Waschvorgang genau nach den Anweisungen durchgeführt werden. Die inkubierte Substanz in den Wells muss zur Desinfektion in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit-Lösung gegeben werden. Die Platte ist umgedreht kräftig auf saugfähigem Papier auszuklopfen, damit die Flüssigkeit vollständig aus den Wells entfernt wird. Danach wird die Platte fünfmal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen (siehe 9.2). Die Platte ist umgedreht kräftig auf saugfähigem Papier auszuklopfen, damit die Flüssigkeit vollständig aus den Wells entfernt wird.

Stellen Sie bei Verwendung eines Waschautomaten sicher, dass der Automat korrekt auf die verwendete Mikrotiterplatte eingestellt ist. Außerdem muss sichergestellt werden, dass in jeder Waschphase die gesamte Flüssigkeit abgesaugt wird. Nach dem letzten Waschen ist die Platte umgedreht kräftig auf saugfähigem Papier auszuklopfen, damit die Flüssigkeit vollständig aus den Wells entfernt wird.

9.6. Zweite Inkubation

In jedes Well werden 100 µl Konjugat **Conjugate** gegeben. Inkubieren Sie danach die abgedeckte Mikrotiterplatte 30 Minuten lang bei 37 °C.

9.7. Zweites Waschen

Die inkubierte Substanz in den Wells muss zur Desinfektion in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit-Lösung gegeben werden. Die Platte ist umgedreht kräftig auf saugfähigem Papier auszuklopfen, damit die Flüssigkeit vollständig aus den Wells entfernt wird. Anschließend wird die Platte fünfmal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen. Die Platte ist umgedreht kräftig auf saugfähigem Papier auszuklopfen, damit die Flüssigkeit vollständig aus den Wells entfernt wird.

9.8. Dritte Inkubation

In jedes Well werden 100 µl Substrat **Substrate** gegeben. Danach wird die Platte bei 37 °C 10 Minuten lang im Dunkeln inkubiert. Anschließend ist die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stoppreagenz **Stop** in jedes Well zu stoppen.

Nach sorgfältigem Durchmischen (durch leichtes seitliches Klopfen auf die Platte) wird die Absorption bei 450 nm (Referenzfilter 620 nm) in einem Plattenlesegerät gemessen.

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle müssen bei jedem durchgeführten Test jeder Standard 1 bis Standard 6 **Standard | 1** – **Standard | 6**, Positivkontrolle **Control | +** und Low-Positivkontrolle **Low control | +** (am besten jeweils doppelt) verwendet werden, um die Stabilität der Reagenzien und die korrekte Vorgehensweise sicherzustellen.

Als Voraussetzung für die Gültigkeit der einzelnen Durchgänge müssen folgende Spezifikationen erfüllt sein:

OD-Wert für Standard 1 **Standard | 1** < 0,080

OD-Wert für Standard 6 **Standard | 6** > 1,400

a) Bei Verwendung eines Verdünnungsfaktors von 1:100 (Erhaltungstherapiephase):

Konzentration für die Low-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) Bei Verwendung eines Verdünnungsfaktors von 1:200 (Induktionstherapiephase):

Konzentration für die Low-Positivkontrolle **Low Control | +**:
6 µg/ml, Bereich 4-8 µg/ml

Konzentration für die Positivkontrolle **Control | +**:
14 µg/ml, Bereich 10-20 µg/ml

Für die Berechnung der GLM-Konzentration in den Kontrollen wird der gleiche Multiplizitätsfaktor verwendet wie für die Proben (siehe **Kapitel 11. Auswertung und Interpretation**). Die Konzentration wird dann in µg/ml angegeben.

Berechnungsbeispiel für Verdünnungsfaktor 1:100:

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

Wenn die Werte von den geforderten Werten abweichen, wenn das Substrat trüb ist oder sich vor Zugabe in die Wells blau verfärbt hat, kann dies ein Hinweis darauf sein, dass die Reagenzien verfallen sind. Wenn die geforderten Werte nicht erreicht werden, sollte vor der Testwiederholung Folgendes geprüft werden:

- Haltbarkeitsdatum der verwendeten Reagenzien
- Funktionstüchtigkeit der verwendeten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Inspektion der Komponenten des Sets auf Kontamination oder Undichtheiten – blau verfärbte Substratlösungen dürfen nicht mehr verwendet werden.

Bei einem hohen Hintergrundsignal (OD-Standard 1 > 0,08) war das Waschen unzureichend und der Test muss mit einem gründlicheren Waschvorgang wiederholt werden (höhere Zyklenzahl, längere Einweichzeit).

Wenn die Bedingungen bei Wiederholung des Tests erneut nicht erfüllt werden, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm Vertriebspartner.

11. Auswertung und Interpretation

Für die Analyse der Auswertung wird RIDA[®]SOFT Win.net benötigt. RIDA[®]SOFT Win.net oder eine Aktualisierung erhalten Sie auf Anfrage bei R-Biopharm AG oder von Ihrem lokalen R-Biopharm Vertriebspartner.

Jede andere Auswertungssoftware, die das 4-Parameter Logistic-Log-Modell bietet, kann als Alternative zu RIDA[®]SOFT Win.net verwendet werden.

Die Auswertung von RIDASCREEN[®] GLM Monitoring erfolgt mit einer Standardkurve, die bei jeder Testdurchführung erstellt werden muss.

In der abschließenden Qualitätskontrolle hat R-Biopharm AG für jede Setcharge unter optimalen Bedingungen die Zielwerte und den zulässigen Konzentrationsbereich für die Positivkontrolle und die Low-Positivkontrolle festgelegt.

Der Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der GLM-Konzentration in Patientenproben berücksichtigt werden, indem die gemessene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert wird.

Beispiel: Das Ergebnis der 1:100 verdünnten Probe wird durch Interpolation der Kalibrierkurve erhalten und lautet 60 ng/ml. Die entsprechende GLM-Konzentration in der unverdünnten Probe beträgt dann 6 µg/ml.

Beispiel: Das Ergebnis der 1:200 verdünnten Probe wird durch Interpolation der Kalibrierkurve erhalten und lautet 80 ng/ml. Die entsprechende GLM-Konzentration in der unverdünnten Probe beträgt dann 16 µg/ml.

Die Software RIDA[®]SOFT Win.net wendet den Verdünnungsfaktor automatisch an, wenn die passende Methode ausgewählt wird:

Für eine Verdünnung 1:100: RIDA[®]SOFT Win.net-Methode GLM100.met.

Für eine Verdünnung 1:200: RIDA[®]SOFT Win.net-Methode GLM200.met.

Die Konzentration wird in µg/ml angegeben.

12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN[®] GLM Monitoring-Test weist den freien, funktional aktiven Teil des GLM nach und nicht den Teil des GLM, der bedingt durch die Immunogenizität an Anti-Golimumab-Antikörper gebunden ist.

Mit RIDASCREEN[®] GLM Monitoring gemessene individuelle Golimumab-Konzentrationen können nicht als alleiniger Indikator für Anpassungen des

Behandlungsplans verwendet werden. Vielmehr muss jeder Patient gründlich klinisch untersucht werden, ehe Behandlungspläne verändert werden.

13. Leistungsmerkmale

13.1. Beispiel für typische optische Dichtewerte (OD-Werte)

Tabelle 2: Beispiel für typische optische Dichtewerte

Standard	OD
1	0,007
2	0,119
3	0,233
4	0,508
5	1,387
6	2,483

13.2. Präzision

13.2.1 Intra-Assay-Präzision

Die Intra-Assay-Präzision wurde in einem einzelnen Lauf mit 4 Referenzen in jeweils 20 Replikaten bestimmt. Aus den OD-Werten dieser Messungen wurden die GLM-Konzentrationen ermittelt. Für jede Probe wurden der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient (CV) berechnet. Die Auswertung ist in Tabelle 3 erfasst.

Tabelle 3: Intra-Assay-Präzision

Referenz	1	2	3	4
Mittelwert (µg/ml)	0,64	1,33	3,35	9,29
SD	0,03	0,06	0,12	0,43
% CV	4,8	4,2	3,6	4,6

13.2.2 Inter-Assay-Präzision

Die Inter-Assay-Präzision wurde in 5 Läufen mit 4 Referenzen in jeweils 20 Replikaten bestimmt. Aus den OD-Werten dieser Messungen wurden die GLM-Konzentrationen ermittelt. Für jede Probe wurden der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient (CV) berechnet. Die Auswertung ist in Tabelle 4 erfasst.

Tabelle 4: Inter-Assay-Präzision

Referenz	1	2	3	4
Mittelwert (µg/ml)	0,66	1,32	3,21	8,20
SD	0,04	0,05	0,13	0,73
% CV	6,3	4,1	3,9	8,9

13.3. Spezifität

13.3.1 Normales Humanserum/-plasma

Ermittlung der Spezifität durch Testen von 100 Proben von gesunden Spendern niederländischer oder belgischer Abstammung. In keiner Probe konnte eine Konzentration von GLM nachgewiesen werden, was einer Spezifität von 100 % entspricht.

13.3.2 Interferenz

Ein Panel mit 24 potenziell interferierenden Proben wurde getestet, darunter HAMA-positive Proben, lipämische Proben, Proben mit hohen Cholesterinwerten, hämolysierte Proben und Proben aus dem ersten Schwangerschaftstrimester. Es wurde keine Wechselwirkung mit den untersuchten Faktoren beobachtet.

Ein Panel von 27 klinischen Proben mit positivem Rheumafaktor wurde getestet und bei drei Proben konnte GLM nachgewiesen werden (unter 0,2 µg/ml). Der Rheumafaktor könnte somit das RIDASCREEN® GLM Monitoring beeinflussen, allerdings nur in einem sehr geringen Umfang, der die untere Bestimmungsgrenze des Testeinsatzes nicht übersteigt.

13.3.3 Kreuzreaktivität

Für folgende Biopharmazeutika zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen konnte keine Kreuzreaktivität beobachtet werden: Infliximab, Adalimumab, Vedolizumab und Ustekinumab.

13.4. Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde auf 1 ng/ml festgelegt. Bei einem Verdünnungsfaktor von 1:100 entspricht dies 0,1 µg/ml.

13.5. Wiederfindung

15 GLM-negative Proben wurden mit unterschiedlichen GLM-Konzentrationen versetzt. Auf Basis der OD-Werte dieser Messung wurde die GLM-Konzentration aus der Standardkurve und der berechneten Wiederfindung ermittelt. Die mittlere Wiederfindung beträgt 93 % (Tabelle 5).

Tabelle 5: Wiederfindung von 15 GLM-negativen Proben mit unterschiedlichen GLM-Konzentrationen

Nr.	GLM (µg/ml)	Wiederfindung (%)
Richtwert 1,71 µg/ml		
1	1,59	93 %
2	1,50	88 %
3	1,40	82 %
4	1,51	88 %
5	1,67	97 %
6	1,74	102 %
7	1,62	95 %
8	1,47	86 %
9	1,73	101 %
10	1,66	97 %
11	1,43	84 %
12	1,51	88 %
13	1,59	93 %
14	1,55	90 %
15	1,56	91 %
Richtwert 3,46 µg/ml		
1	2,80	81 %
2	3,01	87 %
3	2,79	81 %

Nr.	GLM (µg/ml)	Wiederfindung (%)
4	3,19	92 %
5	2,96	86 %
6	2,93	85 %
7	3,59	104 %
8	3,12	90 %
9	3,50	101 %
10	3,49	101 %
11	3,15	91 %
12	3,30	95 %
13	3,36	97 %
14	2,85	82 %
15	2,86	83 %
Richtwert 10,01 µg/ml		
1	10,75	107 %
2	9,97	100 %
3	10,30	103 %
4	9,75	97 %
5	9,84	98 %
6	10,63	106 %
7	9,29	93 %
8	9,06	90 %
9	8,85	88 %
10	8,86	88 %
11	9,98	100 %
12	9,10	91 %
13	9,33	93 %
14	9,61	96 %
15	10,21	102 %
Mittelwert		93 %

13.6. Korrelation mit Referenz-Testeinsatz und diagnostischer Sensitivität

Ein klinisches Probenpanel mit 18 Proben wurde mit RIDASCREEN® GLM Monitoring analysiert und die Auswertung wurde mit der des Referenz-Testeinsatzes verglichen (GLM ELISA, entwickelt an der KU Leuven). Daraus wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,91 ermittelt.

Alle Proben mit messbaren GLM-Spiegeln laut Referenz-Testeinsatz wurden positiv nachgewiesen (18 Proben), d. h. die diagnostische Sensitivität beträgt 100 %.










14. Versionsübersicht

Tabelle 6: Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Beschreibung
2019-12-10	9.4. Erste Inkubation

15. Symbolerklärungen

Allgemeine Symbole

	In-Vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargen-Nummer
	Verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikel-Nummer
	Anzahl der Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Plate	Mikrotiterplatte
Standard 1-6	Standard 1 - 6
Low Control +	Low-Positivkontrolle
Control +	Positivkontrolle
Diluent	Probenverdünnungspuffer
Conjugate	Konjugat
Substrate	Substrat
Wash 20x	Waschpuffer (20-fache Konz.)
Stop	Stoppreagenzien

16. Literatur

1. Hutas G. Golimumab, a fully human monoclonal antibody against TNFalpha. Current opinion in molecular therapeutics 2008;10:393-406.
2. Shealy DJ, Cai A, Staquet K, et al. Characterization of golimumab, a human monoclonal antibody specific for human tumor necrosis factor α . MAbs 2010;2:428-439.
3. Kneepkens EL, Plasencia C, Krieckaert CL, et al. Golimumab trough levels, antidrug antibodies and clinical response in patients with rheumatoid arthritis treated in daily clinical practice. Annals of the rheumatic diseases 2014;73:2217-2219.
4. Detrez I, Dreesen E, Van Stappen T, et al. Variability in Golimumab Exposure: A 'Real-Life' Observational Study in Active Ulcerative Colitis. Journal of Crohn's and Colitis 2016;10:575-581.
5. Bosca-Watts MM, Cortes X, Iborra M, et al. Short-term effectiveness of golimumab for ulcerative colitis: Observational multicenter study. World journal of gastroenterology 2016;22:10432–10439.
6. Tursi A, Allegretta L, Della Valle N, et al. Effectiveness of golimumab in inducing remission and clinical response in outpatient ulcerative colitis. Clinics and research in hepatology and gastroenterology 2016;40:e61-e63.
7. Taxonera C, Rodríguez C, Bertoletti F, et al. Clinical Outcomes of golimumab as first, second or third anti-TNF agent in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. Inflammatory bowel diseases 2017;23:1394-1402.

8. Adedokun O, Xu Z, Marano C, et al. Pharmacokinetics and Exposure-Response Relationship of Golimumab in Patients with Moderately-to-Severely Active Ulcerative Colitis: Results from Phase 2/3 PURSUIT Induction and Maintenance Studies. *Journal of Crohn's and Colitis* 2017;11:35-46.
9. Philip G, Marano C, Adedokun J, et al. P698 Early dose optimisation in non-responders to golimumab induction treatment for ulcerative colitis is supported by pharmacokinetic data. 2018;12:S464-S465.
10. Vermeire S, Gils A, Accossato P, et al. Immunogenicity of biologics in inflammatory bowel disease. *Therapeutic advances in gastroenterology* 2018;11:1756283X17750355.