

## RIDASCREEN® UST Monitoring

**REF** G09049



## 1. Zweckbestimmung

Für die *in vitro* Diagnostik. RIDASCREEN® UST Monitoring ist ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für die quantitative Bestimmung von Ustekinumab (UST, Stelara®) in menschlichem Serum und Plasma.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

### Therapeutisches Drug-Monitoring

Ustekinumab (UST) ist ein vollständig humaner monoklonaler Antikörper, der an die p40-Untereinheit der Interleukine IL-12 und IL-23 bindet und somit die Interaktion mit den Zytokinrezeptoren auf T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Antigen-präsentierenden Zellen verhindert.<sup>1</sup> UST ist für die Therapie von mäßigem bis schwerem Morbus Crohn (MC), mäßiger bis schwerer Plaque-Psoriasis und Psoriasis-Arthritis zugelassen.<sup>2-4</sup>

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 Biologika unmittelbar vor der nächsten Gabe, definiert als Talspiegel, verwendet. Jüngste Daten weisen auf eine positive Beziehung zwischen der UST-Serumkonzentration, entweder am Talspiegel oder zu einem dazwischenliegenden Zeitpunkt gemessen, und klinischen Ergebnissen bei Patienten mit Morbus Crohn bzw. Plaque-Psoriasis hin. TDM könnte somit eine wichtige Möglichkeit für die Optimierung der Behandlung sein.

RIDASCREEN® UST Monitoring stützt sich auf hochspezifische monoklonale Antikörper, die an der Universität Leuven, Belgien (KU Leuven) entwickelt wurden. Anti-TNF-Wirkstoffe (wie Infliximab, Adalimumab, Golimumab) oder Anti-Integrin- $\alpha_4\beta_7$ -Wirkstoffe (wie Vedolizumab) beeinträchtigen die Messung nicht.

Als ein Beispiel für TDM wird die Verwendung von UST-Konzentrationsmessungen bei Plaque-Psoriasis und MC beschrieben.

### Morbus Crohn

UST wird in Woche 0 intravenös (i.v.) und danach alle 8 Wochen subkutan (s.c.) verabreicht. Die Induktionsstudien UNITI-1 und -2 zeigten klinische Response-Raten von 33,7 % bzw. 55,5 % der Patienten in Woche 6. Während der Erhaltungstherapie mit Ustekinumab s.c. alle 8 Wochen befanden sich in der IM-UNITI-Studie 53,1 % der Patienten in Woche 44 in Remission.<sup>2</sup>

Verschiedene Studien haben den Zusammenhang zwischen dem Talspiegel von Ustekinumab und dem klinischen, biologischen und endoskopischen Ansprechen aufgezeigt, was auf den Nutzen des therapeutischen Drug-Monitoring für die klinische Entscheidungsfindung hinweist.<sup>5-7</sup>

## **Plaque-Psoriasis**

UST wird gewichtsabhängig subkutan in Woche 0, in Woche 4 und danach alle 12 Wochen verabreicht. Aus den Studien Phoenix 1 und 2 ging hervor, dass die Behandlung mit Ustekinumab bei Patienten mit mäßiger bis schwerer Psoriasis zu einer schnellen, signifikanten Verbesserung des Zustandes führt.<sup>3,4</sup>

Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigte eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Woche 4 nach der Injektion bei mit Ustekinumab behandelten Psoriasis-Patienten, was darauf hindeutet, dass unterexponierte Patienten, die von einer Therapieoptimierung profitieren könnten, durch das Monitoring der Ustekinumab-Konzentration 4 Wochen nach der Injektion rechtzeitig identifiziert werden könnten.<sup>8</sup>

## **Immunogenität**

Die Immunogenität von Ustekinumab hat sich als sehr gering erwiesen.<sup>8,9</sup>

## **3. Testprinzip**

Im RIDASCREEN® UST Monitoring kommen zwei hochspezifische monoklonale Antikörper (MA-UST56C1H12 und MA-UST56A2D11, beide an der KU Leuven isoliert und charakterisiert) zum Einsatz. Monoklonale Antikörper gegen Ustekinumab (MA-UST56C1H12) werden auf die Welloberfläche in der Mikrotiterplatte appliziert. Während dieser Inkubationsphase bindet Ustekinumab spezifisch an die Antikörper auf der Platte. Nach dem Waschen folgt eine zweite Inkubationsphase mit an Meerrettichperoxidase konjugiertem MA-UST56A2D11. Wenn UST vorhanden ist, bildet sich zwischen immobilisiertem MA-UST56C1H12, UST 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 UST-Konzentration.

#### 4. Packungsinhalt

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

**Tab. 1:** Packungsinhalt

Plate	96-Well	Mikrotiterplatte, 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Streifenhalter; beschichtet mit monoklonalem Antikörper MA-UST56C1H12
Standard   1-6	1300 µl	6 Standards; Konzentrationen der Standards 1 bis 6: 0 / 2,5 / 10 / 20 / 60 / 120 ng/ml; enthält 0,09 % NaN <sub>3</sub> ; gebrauchsfertig
Low Control   +	1300 µl	Low-Positivkontrolle; enthält 8 ng/ml UST und 0,09 % NaN <sub>3</sub> ; gebrauchsfertig
Control   +	1300 µl	Positivkontrolle; enthält 70 ng/ml UST und 0,09 % NaN <sub>3</sub> ; gebrauchsfertig
Diluent	100 ml	Probenverdünnungspuffer; enthält 0,09 % NaN <sub>3</sub> ; gebrauchsfertig; orange gefärbt
Conjugate	12 ml	Konjugat; Peroxidase-konjugierter monoklonaler Antikörper MA-UST56A2D11; 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	Stopp-Reagenz; 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; gebrauchsfertig
2 Abdeckfolien		

Informationen über Gefahrenstoffe erfüllen die Kennzeichnungsvorschriften. Für weitere Informationen siehe Sicherheitsdatenblätter (SDB) unter [www.r-biopharm.com](http://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 zwei Monate 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 Stopp-Reagenz 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  $\text{NaN}_3$  als Konservierungsmittel. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden. Um die Bildung von explosionsfähigen 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 (> 0,3 %).

Weitere Informationen sind in den Sicherheitsdatenblättern (SDB) enthalten, siehe [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8 Entnahme und Lagerung der Proben

Für diesen Test 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 12 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. 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 darüber gelegt 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 Herstellung 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 12 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 in der Therapieerhaltungsphase

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

10 µl Probe werden in 990 µl Probenverdünnungspuffer **Diluent** (1:100) verdünnt. 100 µl dieser endgültig verdünnten Probe werden dann getestet.

Wenn die Probe 1:100 verdünnt ist, können UST-Konzentrationen zwischen 0,04 und 12 µg/ml bestimmt werden.

#### b) Messung der Talspiegel in der Therapieinduktionsphase

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

10 µl Probe werden in 1990 µl Probenverdünnungspuffer **Diluent** (1:200) verdünnt. 100 µl dieser endgültig verdünnten Probe werden dann getestet.

Wenn die Probe 1:200 verdünnt ist, können UST-Konzentrationen zwischen 0,08 und 24 µg/ml bestimmt werden.

## 9.4 Erste Inkubation

Platzieren Sie eine ausreichende Anzahl an Wells im Halterahmen und geben Sie danach 100 µl Standards 1-6 ( **Standard | 1** bis **Standard | 6** ), Positivkontrolle **Control | +** , Low-Positivkontrolle **Low control | +** und 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 Erster Waschschrift**

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**

Geben Sie 100 µl Konjugat  in jedes Well. Inkubieren Sie danach die abgedeckte Mikrotiterplatte 30 Minuten lang bei 37 °C.

### **9.7 Zweiter Waschschrift**

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**

Geben Sie 100 µl Substrat  in jedes Well. Danach wird die Platte bei 37 °C 10 Minuten lang im Dunkeln inkubiert. Anschließend ist die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopp-Reagenz  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 | +** :

0,8 µg/ml, Bereich 0,55-1,10 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 | +** :

1,6 µg/ml, Bereich 1,10-2,20 µg/ml

Konzentration für die Positivkontrolle **Control | +** :

14 µg/ml, Bereich 10-20 µg/ml

Für die Berechnung der UST-Konzentration in den Kontrollen wird der gleiche Multiplikationsfaktor 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 RIDASOFT® Win.NET benötigt. RIDASOFT® 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 RIDASOFT® Win.NET verwendet werden.

Die Auswertung von RIDASCREEN® UST 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 UST-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 UST-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 UST-Konzentration in der unverdünnten Probe beträgt dann 16 µg/ml.

Die Software RIDASOFT® Win.NET wendet den Verdünnungsfaktor automatisch an, wenn die passende Methode ausgewählt wird:

Für eine Verdünnung 1:100: RIDASOFT® Win.NET-Methode UST100.met.

Für eine Verdünnung 1:200: RIDASOFT® Win.NET-Methode UST200.met.

Die Konzentration wird in µg/ml angegeben.

## 12 Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN® UST Monitoring Test weist den freien, funktional aktiven Teil von UST nach und nicht den Teil von UST, der bedingt durch die Immunogenität an Anti-Ustekinumab-Antikörper gebunden ist.

Individuelle Ustekinumab-Konzentrationen, die mit RIDASCREEN® UST Monitoring gemessen werden, dürfen nicht als einziger Indikator für Anpassungen des Therapieplans verwendet werden. Jeder Patient muss einer gründlichen klinischen Untersuchung unterzogen werden, bevor Therapiepläne geändert werden.

## 13 Leistungsmerkmale

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

**Tab. 2:** Beispiel für typische optische Dichtewerte

Standard	OD
1	0,009
2	0,085
3	0,306
4	0,608
5	1,637
6	2,660

## 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 UST-Konzentrationen ermittelt. Für jede Probe wurden der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient (CV) berechnet. Die Auswertung ist in Tabelle 3 erfasst.

**Tab. 3:** Intra-Assay-Präzision

Literatur	1	2	3	4
Mittelwert (µg/ml)	0,61	1,65	3,07	8,37
SD	0,04	0,08	0,18	0,76
% CV	<b>5,9</b>	<b>5,0</b>	<b>6,0</b>	<b>9,0</b>

### 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 UST-Konzentrationen ermittelt. Für jede Probe wurden der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient (CV) berechnet. Die Auswertung ist in Tabelle 4 erfasst.

**Tab. 4:** Inter-Assay-Präzision

Literatur	1	2	3	4
Mittelwert (µg/ml)	0,58	1,62	3,01	8,65
SD	0,03	0,08	0,15	0,73
% CV	4,4	4,9	4,8	8,4

### 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 UST nachgewiesen werden, was einer Spezifität von 100 % entspricht.

#### 13.3. 2 Interferenz

Ein Panel mit 25 potenziell interferierenden Proben wurde getestet, darunter HAMA-positive Proben, lipämische Proben, Proben mit hohen Cholesterinwerten, hämolytische Proben und Proben aus dem ersten Schwangerschaftstrimester. Es wurde keine Wechselwirkung mit den untersuchten Faktoren beobachtet.

Ein Panel von 27 klinischen Rheumafaktor-positiven Proben wurde getestet und bei nur einer Probe konnte eine nachweisbare Konzentration von 0,12 µg/ml gemessen werden. Der Rheumafaktor könnte somit den RIDASCREEN® UST Monitoring Test beeinflussen, allerdings nur in einem sehr geringen Ausmaß, das die untere Bestimmungsgrenze des Tests nicht übersteigt.

#### 13.3.3 Kreuzreaktivität

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

### 13.4 Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde auf 0,12 ng/ml festgelegt. Bei einem Verdünnungsfaktor von 1:100 entspricht dies 0,01 µg/ml.

### 13.5 Wiederfindung

15 UST-negative Proben wurden mit unterschiedlichen UST-Konzentrationen versetzt. Ausgehend von den OD-Werten dieser Messung wurde die UST-Konzentration aus der Standardkurve bestimmt und die Wiederfindung berechnet. Die mittlere Wiederfindung beträgt 98 % (Tabelle 5).

**Tab. 5:** Wiederfindung von 15 UST-negativen Proben mit unterschiedlichen UST-Konzentrationen

<b>Richtwert</b>			
<b>Matrix</b>	<b>Nr.</b>	<b>UST (µg/ml)</b>	<b>Wiederfindung (%)</b>
<b>Richtwert 0,79 µg/ml</b>			
Serum	1	0,72	90 %
	2	0,78	98 %
	3	0,82	104 %
	4	0,74	94 %
	5	0,70	89 %
EDTA-Plasma	6	0,71	89 %
	7	0,82	104 %
	8	0,76	96 %
	9	0,74	94 %
	10	0,74	93 %
Citratplasma	11	0,79	99 %
	12	0,81	102 %
	13	0,70	88 %
	14	0,73	92 %
	15	0,74	94 %
<b>Matrix</b>	<b>Nr.</b>	<b>UST (µg/ml)</b>	<b>Wiederfindung (%)</b>
<b>Richtwert 3,26 µg/ml</b>			
Serum	1	3,34	102 %
	2	3,43	105 %
	3	3,21	99 %
	4	2,95	90 %
	5	3,23	99 %
EDTA-Plasma	6	3,42	105 %
	7	3,31	102 %
	8	3,20	98 %
	9	3,34	102 %
	10	3,39	104 %
Citratplasma	11	3,11	95 %
	12	2,97	91 %
	13	3,14	96 %
	14	3,27	100 %
	15	3,20	98 %
<b>Matrix</b>	<b>Nr.</b>	<b>UST (µg/ml)</b>	<b>Wiederfindung (%)</b>
<b>Richtwert 8,99 µg/ml</b>			
Serum	1	8,77	98 %
	2	10,00	111 %
	3	9,33	104 %
	4	8,78	98 %
	5	8,07	90 %

EDTA-Plasma	6	9,63	107 %
	7	8,97	100 %
	8*	9,49	106 %
	9	8,50	95 %
	10	9,32	104 %
	11	9,37	104 %
	12	8,75	97 %
	13	8,15	91 %
	14	8,95	100 %
	15	8,90	99 %
<b>Mittelwert</b>			<b>98 %</b>

### 13.6 Korrelation mit Referenztest und diagnostische Sensitivität

Ein klinisches Probenpanel mit 15 Proben wurde mit RIDASCREEN® UST Monitoring analysiert und die Ergebnisse wurden mit jenen des Referenztests (UST ELISA, entwickelt an der KU Leuven) verglichen. Daraus wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,97 ermittelt.

Alle Proben mit messbaren UST-Spiegeln laut Referenztest wurden als positiv nachgewiesen (14 Proben), d. h. die diagnostische Sensitivität beträgt 100 %.










## 14 Versionsübersicht

Tab. 6: Versionsübersicht






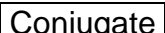

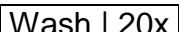

Versionsnummer	Kapitel und Beschreibung
07-07-2020	Dokumentfreigabe

## 15 Symbolerklärungen

### Allgemeine Symbole

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

### Testspezifische Symbole

	Mikrotiterplatte
	Standard 1 - 6
	Low-Positivkontrolle
	Positivkontrolle
	Probenverdünnungspuffer
	Conjugate
	Substrate
	Waschpuffer (20-fache Konz.)
	Stopp-Reagenz

## 16 Literatur

1. Benson JM, Peritt D, Scallon BJ, et al. A human monoclonal antibody targeting interleukin-12 and interleukin-23 for treatment of immune-mediated disorders. *Mabs* 2011;3:535-545.
2. Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, et al. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2016;375:1946-1960.
3. Leonardi CL, Kimball AB, Papp KA et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). *Lancet* 2008;371:1665-1674.
4. Papp KA, Langley RG, Lebwohl M et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet* 2008;371:1675-1684.
5. Battat R, Kopylov U, Bessissow T, et al. Association between ustekinumab trough concentrations and clinical, biomarker, and endoscopic outcomes in patients with Crohn's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2017;15:1427-1434.
6. Adedokun OJ, Xu Z, Gasink C, et al. Pharmacokinetics and exposure response relationships of ustekinumab in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2018;154:1660-1671.
7. Soufflet N, Boschetti G, Roblin X et al. Concentrations of Ustekinumab During Induction Therapy Associate With Remission in Patients With Crohn's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019;pii:S1542-3565(19)30248-4.
8. Van den Berghe N, De Keyser E, Soenen R, et al. Clinical response correlates with 4-week post injection ustekinumab concentrations in moderate-to-severe psoriasis patients. *Br J Dermatol* 2019;doi:10.1111/bjd.18016
9. Vermeire S, Gils A, Accossato P, et al., Immunogenicity of biologics in inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol* 2018;11:1756283X17750355.