

RIDASCREEN® UST Monitoring

REF G09049



1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica *in vitro*. RIDASCREEN® UST Monitoring è un test di immunoassorbimento enzimatico destinato alla determinazione quantitativa di ustekinumab (UST, Stelara®) nel siero e nel plasma umano.

2. Sintesi e spiegazione del test

Monitoraggio terapeutico del farmaco

L'ustekinumab (UST) è un anticorpo monoclonale interamente umano che si lega alla subunità proteica p40 condivisa dalle citochine IL-12 e IL-23 impedendone, così, l'interazione con i recettori delle citochine posti sulla superficie di linfociti T, di cellule Natural Killer e di cellule che presentano l'antigene.¹ L'UST è stato approvato per il trattamento della malattia di Crohn (MC), da moderata a grave, della psoriasi a placche e dell'artrite psoriasica.²⁻⁴

Un medicinale può esercitare il suo effetto farmacologico solo quando si raggiungono adeguate concentrazioni nella circolazione sanguigna. Per il monitoraggio terapeutico del farmaco (TDM), è stata utilizzata la concentrazione sierica dei preparati biologici appena prima della successiva somministrazione, definita come concentrazione minima. Dati recenti hanno evidenziato una correlazione positiva tra la concentrazione di UST, misurata a un intervallo di concentrazione minima o intermedia, e gli esiti clinici in pazienti affetti rispettivamente da malattia di Crohn e da psoriasi a placche. Il TDM può pertanto essere determinante nell'ottimizzazione del trattamento.

Il RIDASCREEN® UST Monitoring utilizza anticorpi monoclonali altamente specifici sviluppati presso l'Università di Leuven, in Belgio (KU Leuven). I farmaci anti TNF (come l'infliximab, l'adalimumab o il golimumab) o anti integrina $\alpha_4\beta_7$ (come il vedolizumab) non interferiscono con la misurazione.

Come esempio di TDM, è stato descritto l'uso delle misurazioni della concentrazione di UST in pazienti affetti da psoriasi a placche e CD.

Malattia di Crohn

L'UST viene somministrato per via endovenosa (EV) alla settimana 0 e, successivamente, ogni 8 settimane per via sottocutanea (SC). Gli studi UNITI-1 e -2 relativi all'induzione hanno evidenziato che il 33,7% e il 55,5% dei pazienti ha avuto rispettivamente una risposta clinica alla settimana 6. Durante la terapia di mantenimento con somministrazione SC di ustekinumab ogni 8 settimane, il 53,1% dei pazienti era in remissione clinica alla settimana 44 nello studio IM-UNITI.²

Diversi studi hanno evidenziato la correlazione tra le concentrazioni minime di ustekinumab e la risposta clinica, biologica ed endoscopica mostrando l'utilità del monitoraggio terapeutico del farmaco nell'orientare il processo decisionale clinico.⁵⁻⁷

Psoriasi a placche

L'UST viene somministrato per via sottocutanea in base al peso del paziente alla settimana 0, alla settimana 4 e successivamente ogni 12 settimane. Gli studi Phoenix 1 e 2 hanno dimostrato che la terapia con ustekinumab fa registrare miglioramenti rapidi e significativi in pazienti con psoriasi a placche di grado da moderato a grave.^{3,4} Uno studio recente ha evidenziato una correlazione tra concentrazione e risposta alla settimana 4 a seguito dell'iniezione in pazienti affetti da psoriasi trattati con ustekinumab, mostrando che il monitoraggio delle concentrazioni di ustekinumab, dopo 4 settimane dall'iniezione, potrebbe consentire l'identificazione tempestiva dei pazienti sotto-esposti, che potrebbero beneficiare dell'ottimizzazione della terapia.⁸

Immunogenicità

È stato dimostrato che l'immunogenicità di ustekinumab è molto bassa.^{8,9}

3. Principio del test

Nel RIDASCREEN® UST Monitoring vengono utilizzati due anticorpi monoclonali altamente specifici (MA-UST56C1H12 e MA-UST56A2D11, entrambi isolati e caratterizzati presso l'università di KU Leuven). Anticorpi monoclonali anti-ustekinumab (MA-UST56C1H12) sono applicati alla superficie del pozzetto nella piastra da microtitolazione. Durante questa fase di incubazione, ustekinumab si lega specificamente agli anticorpi sulla piastra. Dopo il lavaggio, segue una seconda fase di incubazione con MA-UST56A2D11, coniugato con perossidasi del rafano. In presenza di UST, si forma un composto a sandwich costituito da MA-UST56C1H12 immobilizzato, UST e anticorpi coniugati. Gli anticorpi non legati marcati da enzima vengono rimossi durante un'ulteriore fase di lavaggio. Dopo l'aggiunta di un substrato, la soluzione in precedenza incolore nei micropozzetti diventerà blu in caso di risultato del test positivo. All'aggiunta del reagente bloccante, il colore vira dal blu al giallo. L'assorbanza è proporzionale alla concentrazione di UST presente nel campione.

4. Contenuto della confezione

Un kit è sufficiente per 96 determinazioni (Tabella 1).

Tabella 1: Contenuto della confezione

Plate	96 determinazioni	Piastra da microtitolazione, 12 strisce di micropozzetti (separabili) in telaio di fissaggio; rivestimento con anticorpo monoclonale MA-UST56C1H12
Standard 1-6	1300 µl	6 standard; concentrazioni degli standard da 1 a 6: 0 / 2,5 / 10 / 20 / 60 / 120 ng/ml; contiene 0,09% di NaN ₃ ; pronto per l'uso
Low Control +	1300 µl	Controllo positivo Low; contiene 8 ng/ml di UST e lo 0,09% di NaN ₃ ; pronto per l'uso
Control +	1300 µl	Controllo positivo; contiene 70 ng/ml di UST e lo 0,09% di NaN ₃ ; pronto per l'uso
Diluent	100 ml	Tampone di diluizione del campione; contiene lo 0,09% di NaN ₃ ; pronto per l'uso; di colore arancione
Conjugate	12 ml	Coniugato; coniugato perossidasi; anticorpo monoclonale MA-UST56A2D11; pronto per l'uso; di colore rosso
Substrate	12 ml	Substrato; perossido di idrogeno/tetrametilbenzidina (TMB); pronto per l'uso
Wash 20x	50 ml	Tampone di lavaggio (conc. x 20); soluzione di NaCl tamponata al fosfato; contiene agenti detergenti e antimicrobici
Stop	6 ml	Reagente bloccante; 0,5 M H ₂ SO ₄ ; pronto per l'uso
2 covers per piastra		

Le informazioni sulle sostanze pericolose sono conformi ai requisiti di etichettatura. Per ulteriori dettagli, consultare le schede dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com.

5. Istruzioni di conservazione

Tutti i reagenti devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C e possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. I componenti aperti (reagenti, strisce di micropozzetti) devono essere conservati a una

temperatura compresa tra 2 e 8 °C fino all'uso successivo e possono essere conservati per 2 mesi. Il tampone di lavaggio diluito può essere utilizzato per un mese se conservato a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Evitare la contaminazione microbica. Dopo la data di scadenza, la garanzia di qualità non è più valida. La busta in alluminio contenente le strisce da microtitolazione deve essere aperta in modo tale da non rimuovere la chiusura a clip. Le strisce da microtitolazione inutilizzate devono essere immediatamente riposte nella busta in alluminio con un agente essiccante e conservate a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C finché non saranno state utilizzate tutte le strisce. Evitare l'esposizione diretta alla luce del substrato incolore, per prevenire la decomposizione o la colorazione blu per auto-ossidazione. Un substrato diventato blu non deve essere utilizzato.

6. Reagenti necessari ma non in dotazione

6.1 Reagenti

-Acqua distillata o deionizzata

6.2 Accessori

- Micropipette di precisione e pipette standard da laboratorio
- Cilindro graduato (1000 ml)
- Provette pulite di vetro o di plastica per la diluizione dei campioni
- Cronometro
- Dispositivo di lavaggio per micropiastre o pipetta multicanale (300 µl)
- Lettore di micropiastre (450 nm, filtro di riferimento 620 nm)
- Carta filtrante (carta da laboratorio)
- Contenitore per rifiuti con soluzione di ipoclorito allo 0,5%
- Incubatore da 37 °C

7. Avvertenze e misure precauzionali

Uso per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici e attenersi rigorosamente alle istruzioni per eseguire il test.

Non mescolare reagenti o strisce da microtitolazione rivestite provenienti da kit con numeri di lotto diversi.

Alcuni ingredienti degli standard e delle miscele del controllo positivo derivano da materiali di origine biologica. Nessun test noto può garantire che tali materiali siano completamente esenti da agenti infettivi. Pertanto, i calibratori e le miscele del controllo positivo, così come i campioni dei pazienti e tutti i materiali che entrano in contatto con essi, devono essere trattati come potenzialmente infettivi.

Non pipettare con la bocca campioni o reagenti ed evitare il contatto con cute lesa o mucose. Durante la manipolazione dei campioni, indossare guanti monouso e lavarsi

le mani dopo aver terminato il test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni o con i reagenti del test.

Il reagente bloccante contiene 0,5 M di acido solforico che è irritante. Evitare il contatto con la cute e con gli indumenti. In caso di contatto con gli occhi o la pelle, lavare abbondantemente con acqua e consultare un medico.

I reagenti contengono NaN_3 come conservante. Questa sostanza non deve entrare in contatto con la cute o le mucose. Per evitare la formazione di azoturi metallici potenzialmente esplosivi all'interno delle tubature del laboratorio, lavare a fondo gli scarichi dopo lo smaltimento di queste soluzioni.

Il substrato contiene perossido di idrogeno e N-metil-2-pirrolidone (>0,3%).

Per ulteriori dettagli, consultare le schede dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

In questo test possono essere utilizzati campioni di plasma EDTA, campioni di plasma citrato e campioni di siero. Dopo la raccolta, il siero deve essere separato dal coagulo il più rapidamente possibile per evitare l'emolisi. Trasferire il siero in una provetta pulita per la conservazione. I campioni possono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C per almeno 3 - 4 giorni, o alla temperatura di -20 °C per almeno 12 mesi. Evitare il ripetuto congelamento e scongelamento. Diluire i campioni nell'apposito tampone di diluizione (vedere 9.3.1.).

I campioni diluiti possono essere conservati per almeno 8 ore a temperatura ambiente.

9. Esecuzione del test

9.1 Informazioni generali

Tutti i reagenti e la piastra da microtitolazione Plate devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25 °C) prima dell'utilizzo. Le strisce da microtitolazione devono essere rimosse dalla busta in alluminio solo dopo aver raggiunto la temperatura ambiente. Mescolare con cura i reagenti immediatamente prima dell'utilizzo. Dopo l'apertura, le strisce di micropozzetti non utilizzate (in buste sigillate) e i reagenti devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Una volta usate, le strisce di micropozzetti non devono essere riutilizzate. I reagenti e le strisce di micropozzetti non devono essere utilizzati se l'imballaggio è danneggiato o se i flaconcini presentano perdite. Impedire il contatto diretto dei campioni con i componenti del kit per evitare la contaminazione crociata. Il test non deve essere eseguito alla luce solare diretta. Durante l'incubazione, si raccomanda di coprire la piastra da microtitolazione o di sigillarla con una pellicola per evitare la perdita per evaporazione.

Per istruzioni sulle modalità di esecuzione del test con sistemi ELISA, contattare R-Biopharm AG o il distributore di zona.

9.2 Preparazione del tampone di lavaggio

Miscelare 1 parte di concentrato per tampone di lavaggio **Wash | 20x** con 19 parti di acqua distillata (1:20). Versare 50 ml di concentrato in un cilindro graduato da 1000 ml e aggiungere acqua distillata fino a ottenere 1000 ml. La soluzione ricostituita può essere conservata per almeno un mese a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. A temperature più elevate, la soluzione di lavaggio concentrata può apparire torbida senza che ciò ne alteri le caratteristiche. Una volta eseguita la diluizione, la soluzione risulterà trasparente.

9.3 Preparazione dei campioni

I campioni di siero o plasma possono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C per 3-4 giorni, o alla temperatura di -20 °C per almeno 12 mesi (vedere anche il capitolo 8). Evitare il ripetuto congelamento e scongelamento. Diluire i campioni nell'apposito tampone di diluizione (vedere 9.3.1.).

I campioni diluiti possono essere conservati per almeno 8 ore a temperatura ambiente.

9.3.1 Diluizione del campione

a) Misurazione delle concentrazioni minime durante la fase di mantenimento della terapia

Per misurare la concentrazione minima (concentrazione del farmaco poco prima della somministrazione della dose successiva) durante la fase di mantenimento della terapia, i campioni sono diluiti 1:100:

10 µl di campione vengono diluiti in 990 µl di tampone di diluizione del campione **Diluent** (1:100).

100 µl di questo campione diluito finale sono poi utilizzati nel test.

Se il campione viene diluito 1:100, è possibile stabilire concentrazioni di UST tra 0,04 e 12 µg/ml.

b) Misurazione delle concentrazioni minime durante la fase di induzione della terapia

Per misurare le concentrazioni minime durante la terapia di (re)induzione oppure per misurare concentrazioni intermedie o >12,0 µg/ml del farmaco, i campioni vengono diluiti 1:200:

10 µl di campione vengono diluiti in 1990 µl di tampone di diluizione del campione **Diluent** (1:200).

100 µl di questo campione diluito finale sono poi utilizzati nel test.

Se il campione viene diluito 1:200, è possibile stabilire concentrazioni di UST tra 0,08 e 24 µg/ml.

9.4 Prima incubazione

Dopo avere inserito un numero sufficiente di pozzetti nel telaio, aggiungere ai pozzetti corrispondenti 100 µl di Standard 1-6 (da **Standard | 1** a **Standard | 6**), controllo positivo **Control | +** , controllo positivo Low **Low control | +** e campioni. Anche se si consiglia di eseguire calibratori, controlli e campioni in duplicato, si ottengono risultati ugualmente affidabili eseguendo l'analisi in singlicato. Incubare poi la piastra da microtitolazione coperta a 37 °C per 1 ora.

9.5 Primo lavaggio

Un accurato lavaggio è importante per ottenere risultati corretti e deve pertanto essere effettuato attenendosi rigorosamente alle istruzioni. Il prodotto di incubazione dei pozzetti deve essere svuotato in un contenitore per rifiuti contenente soluzione di ipoclorito per la disinfezione. Picchiettare con vigore la piastra rovesciata contro la carta assorbente per garantire la rimozione completa del liquido dai micropozzetti. Lavare poi la piastra 5 volte utilizzando ogni volta 300 µl di tampone di lavaggio diluito (vedere 9.2). Picchiettare con vigore la piastra rovesciata contro la carta assorbente per garantire la rimozione completa del liquido dai micropozzetti. Quando si utilizza un dispositivo di lavaggio per micropiastre, accertarsi che la macchina sia regolata correttamente sul tipo di piastra da microtitolazione impiegato. Inoltre, assicurarsi che tutto il liquido venga aspirato in ogni fase del lavaggio. Dopo averla lavata l'ultima volta, picchiettare con vigore la piastra rovesciata contro la carta assorbente per garantire la rimozione completa del liquido dai micropozzetti.

9.6 Seconda incubazione

Aggiungere 100 µl di coniugato **Conjugate** in ogni pozzetto. Quindi incubare la piastra da microtitolazione coperta a 37 °C per 30 minuti.

9.7 Secondo lavaggio

Il prodotto di incubazione dei pozzetti deve essere svuotato in un contenitore per rifiuti contenente soluzione di ipoclorito per la disinfezione. Picchiettare con vigore la piastra rovesciata contro la carta assorbente per garantire la rimozione completa del liquido dai micropozzetti. Lavare poi la piastra 5 volte utilizzando ogni volta 300 µl di tampone di lavaggio diluito. Picchiettare con vigore la piastra rovesciata contro la carta assorbente per garantire la rimozione completa del liquido dai micropozzetti.

9.8 Terza incubazione

Aggiungere 100 µl di substrato **Substrate** a ogni pozzetto. Incubare poi la piastra a 37 °C al buio per 10 minuti. Arrestare quindi la reazione aggiungendo 50 µl di reagente bloccante **Stop** a ogni pozzetto.

Dopo avere miscelato accuratamente (picchiettando leggermente sul lato della piastra), misurare l'assorbanza a 450 nm (filtro di riferimento 620 nm) in un lettore per piastre.

10. Controllo qualità: indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

Per il controllo di qualità, ogni Standard da 1 a 6 – , controllo positivo e controllo positivo Low (ciascuno in duplicato come raccomandato) devono essere utilizzati a ogni esecuzione del test per garantire la stabilità del reagente e la correttezza della procedura.

Affinché un ciclo sia valido, è necessario che durante la sua esecuzione vengano soddisfatte le seguenti specifiche:

Valore OD per Standard 1 < 0,080

Valore OD per Standard 6 > 1,400

a) Se viene usato il fattore di diluizione 1:100 (fase di terapia di mantenimento):

Concentrazione per il controllo positivo Low :

0,8 µg/ml, intervallo 0,55 - 1,10 µg/ml

Concentrazione per il controllo positivo :

7 µg/ml, intervallo 5 - 10 µg/ml

b) Se viene usato il fattore di diluizione 1:200 (fase della terapia di induzione):

Concentrazione per il controllo positivo Low :

1,6 µg/ml, intervallo 1,10 - 2,20 µg/ml

Concentrazione per il controllo positivo :

14 µg/ml, intervallo 10 - 20 µg/ml

Per calcolare la concentrazione di UST nei controlli, deve essere utilizzato lo stesso fattore di moltiplicazione dei campioni (vedere **Capitolo 11. Valutazione e interpretazione**).

La concentrazione è quindi espressa in µg/ml.

Esempio di calcolo per fattore di diluizione 1:100:

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

Se i valori differiscono da quelli richiesti, se il substrato è torbido o è diventato blu prima dell'aggiunta ai pozzetti, è possibile che i reagenti siano scaduti. Se i valori fissati non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare quanto segue:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata (ad es. calibrazione)
- Procedura di esecuzione del test corretta
- Controllo visivo che i componenti del kit non presentino contaminazione o perdite: non utilizzare una soluzione di substrato diventata blu.

Un segnale di fondo elevato (OD standard 1 > 0,08) indica lavaggio insufficiente. Ripetere il test con un lavaggio più energico (maggior numero di cicli, tempo di immersione).

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo la ripetizione del test, contattare il produttore o il proprio distributore R-Biopharm di zona.

11. Valutazione e interpretazione

Per l'analisi dei risultati, è necessario il software RIDASOFT® Win.NET.

RIDASOFT® Win.NET o un suo aggiornamento può essere richiesto a R-Biopharm AG o al proprio distributore di zona R-Biopharm.

Come alternativa a RIDASOFT® Win.NET, può essere utilizzato qualsiasi altro software di valutazione che fornisca il modello logaritmico logistico a 4 parametri.

La valutazione di RIDASCREEN® UST Monitoring è ottenuta mediante curva standard, che deve sempre essere elaborata durante l'esecuzione del test.

Nel controllo di qualità finale, R-Biopharm AG ha stabilito i valori target e l'intervallo di concentrazione consentito per il controllo positivo e il controllo positivo Low per ciascun lotto del kit in condizioni di test ottimali.

Nel calcolare la concentrazione di UST nei campioni dei pazienti moltiplicando la concentrazione misurata per il fattore di diluizione, è necessario tenere conto del fattore di diluizione.

Esempio: il risultato del campione diluito 1:100, ottenuto per interpolazione dalla curva di calibrazione, è 60 ng/ml. La concentrazione di UST corrispondente nel campione non diluito è dunque 6 µg/ml.

Esempio: il risultato del campione diluito 1:200, ottenuto per interpolazione dalla curva di calibrazione, è 80 ng/ml. La concentrazione di UST corrispondente nel campione non diluito è dunque 16 µg/ml.

Se viene utilizzato il software RIDASOFT® Win.NET, il fattore di diluizione viene applicato automaticamente quando viene utilizzato il metodo appropriato:

Per la diluizione 1:100 selezionare: RIDASOFT® Win.NET metodo UST100.met.

Per la diluizione 1:200 selezionare: RIDASOFT® Win.NET metodo UST200.met.

La concentrazione viene indicata in µg/ml.

12. Limiti del metodo

Il test RIDASCREEN® UST Monitoring rileva la quota di UST libero, funzionalmente attivo e non la quota di UST legato da anticorpi anti-ustekinumab a causa dell'immunogenicità.

Le concentrazioni singole di ustekinumab misurate con il test RIDASCREEN® UST Monitoring non devono essere utilizzate come unico criterio per decidere di modificare il regime posologico, e, prima di procedere in tal senso, ogni paziente deve essere sottoposto a un esame clinico completo e approfondito.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Esempio di valori tipici di densità ottica (O.D.):

Tabella 2: Esempio di valori tipici di densità ottica

Standard	O.D.
1	0,009
2	0,085
3	0,306
4	0,608
5	1,637
6	2,660

13.2. Precisione

13.2.1 Precisione intra-analisi

La precisione intra-analisi è stata determinata in un unico ciclo utilizzando 4 riferimenti in 20 replicati ciascuno. Le concentrazioni di UST sono state determinate dai valori di OD di queste misurazioni. Per ogni campione sono stati calcolati il valore medio, la deviazione standard (SD) e il coefficiente di variazione (CV). I risultati sono elencati nella Tabella 3 riportata di seguito.

Tabella 3: Precisione intra-analisi

Riferimento	1	2	3	4
Media (µg/ml)	0,61	1,65	3,07	8,37
SD	0,04	0,08	0,18	0,76
% CV	5,9	5,0	6,0	9,0

13.2.2 Precisione inter-analisi

La precisione inter-analisi è stata determinata in 5 cicli utilizzando 4 riferimenti in 20 replicati ciascuno. Le concentrazioni di UST sono state determinate dai valori di OD di queste misurazioni. Per ogni campione sono stati calcolati il valore medio, la deviazione standard (SD) e il coefficiente di variazione (CV). I risultati sono elencati nella Tabella 4 riportata di seguito.

Tabella 4: Precisione inter-analisi

Riferimento	1	2	3	4
Media ($\mu\text{g/ml}$)	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 Specificità

13.3.1 Siero/plasma umano normale

La specificità è stata determinata testando 100 campioni di donatori sani di origine olandese e belga. Nessuno dei campioni ha evidenziato una concentrazione rilevabile di UST, con conseguente specificità del 100%.

13.3.2 Interferenze

È stato analizzato un panel di 25 campioni potenzialmente interferenti composto da campioni HAMA positivi, lipemici, ipercolesterolemici, emolizzati e di donne nel primo semestre di gravidanza. Non è stata osservata alcuna interazione con i fattori esaminati.

È stato testato un panel di 27 campioni clinici positivi per il fattore reumatoide e solo in un campione è stato misurato un livello rilevabile di 0,12 $\mu\text{g/ml}$. Quindi, il fattore reumatoide potrebbe interferire con RIDASCREEN® UST Monitoring, ma solo in piccola parte non superando il limite inferiore di quantificazione del test.

13.3.3 Reattività incrociata

Non è stata osservata alcuna reattività incrociata per i seguenti biofarmaci applicati per il trattamento di malattie autoimmuni: infliximab, adalimumab, golimumab e vedolizumab.

13.4 Sensibilità analitica

Il limite di rivelazione è stato determinato come pari a 0,12 ng/ml. Tenendo conto di un fattore di diluizione 1:100, questo corrisponde a 0,01 $\mu\text{g/ml}$.

13.5 Recupero

15 campioni negativi di UST sono stati addizionati con concentrazioni variabili di UST. In base ai valori OD di questa misurazione, la concentrazione di UST è stata determinata utilizzando la curva standard e il recupero calcolato. Il recupero medio è del 98% (Tabella 5).

Tabella 5: Recupero di 15 campioni negativi di UST addizionati con concentrazioni di UST variabili.

Valore di riferimento			
Matrice	Nr.	UST ($\mu\text{g/ml}$)	Recupero (%)
Valore di riferimento 0,79 $\mu\text{g/ml}$			
Siero	1	0,72	90 %
	2	0,78	98 %
	3	0,82	104 %
	4	0,74	94 %
	5	0,70	89 %
Plasma con EDTA	6	0,71	89 %
	7	0,82	104 %
	8	0,76	96 %
	9	0,74	94 %
	10	0,74	93 %
Plasma citrato	11	0,79	99 %
	12	0,81	102 %
	13	0,70	88 %
	14	0,73	92 %
	15	0,74	94 %
Matrice	Nr.	UST ($\mu\text{g/ml}$)	Recupero (%)
Valore di riferimento a 3,26 $\mu\text{g/ml}$			
Siero	1	3,34	102 %
	2	3,43	105 %
	3	3,21	99 %
	4	2,95	90 %
	5	3,23	99 %
Plasma con EDTA	6	3,42	105 %
	7	3,31	102 %
	8	3,20	98 %
	9	3,34	102 %
	10	3,39	104 %
Plasma citrato	11	3,11	95 %
	12	2,97	91 %
	13	3,14	96 %
	14	3,27	100 %
	15	3,20	98 %
Matrice	Nr.	UST ($\mu\text{g/ml}$)	Recupero (%)
Valore di riferimento 8,99 $\mu\text{g/ml}$			
Siero	1	8,77	98 %
	2	10,00	111 %
	3	9,33	104 %
	4	8,78	98 %

	5	8,07	90 %
	6	9,63	107 %
	7	8,97	100 %
Plasma con EDTA	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 %
Media			98 %

13.6 Correlazione con test di riferimento e sensibilità diagnostica

È stato analizzato un panel di 15 campioni clinici utilizzando il RIDASCREEN® UST Monitoring e i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli del test di riferimento (UST ELISA sviluppato dall'università di KU Leuven). È stato determinato un coefficiente di correlazione di 0,97.

Tutti i campioni con livelli di UST misurabili secondo il test di riferimento sono risultati positivi (14 campioni) con una sensibilità diagnostica del 100%.

14. Cronologia delle versioni

Tabella 6: Cronologia delle versioni

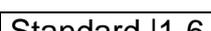
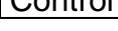
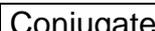
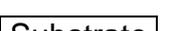
Numero della versione	Capitolo e descrizione
2020-07-07	Pubblicazione del documento

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Uso per la diagnostica <i>in vitro</i>
	Leggere il foglio illustrativo
	Numero di lotto
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici del test

	Piastra da microtitolazione
	Standard 1-6
	Controllo positivo Low
	Controllo positivo
	Tampone di diluizione del campione
	Coniugato
	Substrato
	Tampone di lavaggio (conc. x 20)
	Reagente bloccante

16. Bibliografia

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.