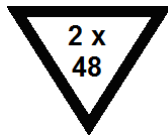



# LISA TRACKER

## Duo Certolizumab


**REF****LTC 005****42 déterminations****Français**

### DEFINITION

Le coffret **LISA-TRACKER Duo Certolizumab** () permet le dosage par méthode ELISA du Certolizumab pegol (anti-TNF $\alpha$ ) ainsi que des anticorps anti-Certolizumab pegol, dans le sérum. Ces tests sont quantitatifs et peuvent s'effectuer de manière individuelle ou de manière simultanée grâce à un protocole de dosage uniformisé.

### VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les anti-TNF $\alpha$  sont des agents thérapeutiques largement utilisés pour traiter des patients atteints par diverses maladies inflammatoires. Le Certolizumab pegol est l'un des anti-TNF $\alpha$  préconisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Il s'agit d'un fragment Fab' d'anticorps humanisé recombinant, conjugué à du polyéthylène glycol, capable de se fixer au TNF $\alpha$ . Il permet ainsi de bloquer l'action du TNF $\alpha$  responsable de l'état inflammatoire. Cependant, au cours du traitement, certains patients peuvent développer des anticorps dirigés contre le Certolizumab pegol. Il en résulte une diminution du taux plasmatique de l'anti-TNF $\alpha$  ainsi qu'une réapparition ou une augmentation des symptômes de la maladie.

Le coffret **LISA-TRACKER Duo Certolizumab** () permet le dosage de 2 paramètres : Certolizumab pegol et anticorps anti-Certolizumab pegol. Ce coffret permet aux praticiens de suivre au cours du temps l'évolution du taux plasmatique de ces 2 paramètres chez un patient.

### ECHANTILLONS

- Les dosages peuvent être effectués sur plasma (tubes de prélèvement : EDTA, Héparine ou Citrate) ou sérum.
- Eviter d'utiliser des sérums lipémiques, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus de 1 fois.
- Afin de limiter toutes fixations non spécifiques, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

### PRINCIPE DES TESTS

#### A) Dosage du Certolizumab pegol

L'antigène TNF $\alpha$  humain est adsorbé sur un support solide constitué de 6 barrettes de 8 micropuits (microplaque).

- Dans un premier temps, l'échantillon dilué est distribué dans un puits de la microplaque. S'il contient du Certolizumab pegol, celui-ci va se fixer au TNF $\alpha$  adsorbé. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non-fixés.

- On ajoute ensuite un anticorps anti-polyéthylène glycol biotinylé (anti-PEG-biot). Après incubation, un deuxième lavage permet d'éliminer l'excès d'anticorps.

- Ensuite, la streptavidine conjuguée à la peroxydase de Raifort est ajoutée. Elle se fixe au complexe « TNF $\alpha$  / Certolizumab pegol / anti-PEG-biot. » précédemment formé. Après incubation, un troisième lavage permet d'éliminer l'excès de conjugué.

- L'étape de chromogénèse est réalisée en déposant le substrat de l'enzyme: TMB (3,3',5,5' tétraméthylbenzidine). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité de Certolizumab pegol présente dans l'échantillon.

- L'addition de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> permet de bloquer la réaction enzymatique.

- La lecture des densités optiques à 450 nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.

- Une gamme étalon permet de définir la quantité de Certolizumab pegol ( $\mu$ g/ml) présente dans l'échantillon.

#### B) Dosage des anticorps anti-Certolizumab pegol

Le Certolizumab pegol est adsorbé sur un support solide constitué de 6 barrettes de 8 micropuits (microplaque).

- Dans un premier temps, l'échantillon dilué est distribué dans un puits de la microplaque. S'il contient des anticorps anti-Certolizumab pegol, ceux-ci vont se fixer au Certolizumab pegol adsorbé. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non-fixés.

- On ajoute ensuite du Certolizumab pegol biotinylé. Après incubation, un deuxième lavage permet d'éliminer l'excès d'anticorps.

- Ensuite, la streptavidine conjuguée à la peroxydase de Raifort est ajoutée. Elle se fixe au complexe « Certolizumab pegol adsorbé / anticorps anti-Certolizumab pegol / Certolizumab pegol biotinylé » précédemment formé. Après incubation, un troisième lavage permet d'éliminer l'excès de conjugué.

- L'étape de chromogénèse est réalisée en déposant le substrat de l'enzyme : TMB (3,3',5,5' tétraméthylbenzidine). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-Certolizumab pegol présente dans l'échantillon.

- L'addition de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> permet de bloquer la réaction enzymatique.

- La lecture des densités optiques à 450 nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.

- Une gamme étalon permet de définir la quantité d'anticorps anti-Certolizumab pegol (UA/ml) présente dans l'échantillon.

## COMPOSITION DU COFFRET

Le coffret est composé de 4 familles de réactifs :

Couleur	Réactifs « dosage Certolizumab pegol »	Réactifs « dosage anticorps anti-Certolizumab pegol »	Réactifs « communs »
bouchons des flacons de réactifs	Bleu	Blanc ou Incolore	Vert, Blanc, Noir ou Violet
micropuits	Bleu	Incolore	-

### A) Réactifs spécifiques au dosage du Certolizumab pegol

Une microplaque de 6 barrettes bleues amovibles, sensibilisée par du TNF $\alpha$ humain. <b>MP</b>	6 barrettes
Cinq flacons « Etalon - Certolizumab pegol », ( $\mu\text{g/ml}$ ). <u>Prêts à l'emploi.</u> Ils peuvent être utilisés plusieurs fois. <b>La quantité de Certolizumab pegol est indiquée sur le flacon.</b> <b>Bouchons bleus.</b>	5 x 1,5ml
Flacon « contrôle positif - Certolizumab pegol », ( $\mu\text{g/ml}$ ). <u>A diluer.</u> Il peut être utilisé plusieurs fois. <b>Les valeurs attendues (<math>\mu\text{g/ml}</math>) sont indiquées sur le flacon.</b> <b>Bouchon bleu.</b>	1 x 250 $\mu\text{l}$
Flacon d'anticorps biotinylé. <u>Prêt à l'emploi.</u>	1 x 7,5ml

### B) Réactifs spécifiques au dosage des anticorps anti-Certolizumab pegol

Une microplaque de 6 barrettes incolores amovibles, sensibilisée par du Certolizumab pegol. <b>MP</b>	4 barrettes
Cinq flacons « Etalon - anti-Certolizumab pegol », (UA/ml). <u>Prêts à l'emploi.</u> Ils peuvent être utilisés plusieurs fois. <b>La quantité en anticorps anti-Certolizumab pegol est indiquée sur le flacon.</b> <b>Bouchons incolores</b>	5 x 1,5ml
Flacon « contrôle positif - anti-Certolizumab pegol », (UA/ml). <u>A diluer.</u> Il peut être utilisé plusieurs fois. <b>Les valeurs attendues (UA/ml) sont indiquées sur le flacon.</b> <b>Bouchon incolore.</b>	1 x 1ml
Flacon d'anticorps biotinylé <u>Prêt à l'emploi.</u>	1 x 7,5ml

### C) Réactifs communs

Flacon de streptavidine conjuguée à la peroxydase. <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>Bouchon vert.</b>	<b>CONJ</b> <b>HRP</b>	1 x 12ml
Flacon de Tampon Phosphate-Tween pH 7,2 (concentré 10x) - <u>A reconstituer en eau distillée.</u> <b>Bouchon blanc.</b>	<b>BUF</b> <b>WASH</b> <b>10x</b>	1 x 100ml
Flacon de Tampon Phosphate pH 7,2 (concentré 10x) - <u>A reconstituer en eau distillée.</u> <b>Bouchon blanc.</b>	<b>BUF</b> <b>PHOS</b> <b>10x</b>	1 x 100ml
Flacon de Substrat (TMB). <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>Bouchon noir.</b>	<b>SUBS</b> <b>TMB</b>	1 x 12ml
Flacon de solution d'arrêt H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.25 N). <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>Bouchon violet.</b>	<b>SOLN</b> <b>STOP</b>	1 x 15ml

### MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Eau distillée
- Pipettes de précision
- Lecteur muni d'un filtre 450 nm
- Peigne de lavage 8 canaux.

### STABILITE ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Tous les réactifs et les barrettes de puits sensibilisées doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas utiliser un coffret dont les dates de péremption sont dépassées.
- Après la première ouverture, conserver les barrettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet déshydratant, correctement refermée et les remettre immédiatement entre +2°C et +8°C.

### PREPARATION DES REACTIFS

A l'exception du TDL, qui peut être préparé à l'avance, les réactifs doivent être préparés de manière extemporanée.

#### 1. Tampon de dilution et de lavage (TDL)

- Diluer le Tampon Phosphate-Tween concentré au 1/10 en eau distillée. **BUF** **WASH** **10x**

- Durée de conservation : 3 mois entre +2°C et +8°C (ne plus utiliser si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent).

*Remarque : en présence de cristaux dans la solution concentrée, placer le flacon 15 min. à +37°C avant utilisation.*

#### 2. Tampon Phosphate

- Diluer le Tampon Phosphate concentré au 1/10 en eau distillée. **BUF** **PHOS** **10x**

- Durée de conservation : 3 mois entre +2°C et +8°C (ne plus utiliser si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent).

*Remarque : en présence de cristaux dans la solution concentrée, placer le flacon 15 min. à +37°C avant utilisation.*

### 3. Préparation des échantillons et des contrôles positifs

#### a) Echantillons

- **Dosage du Certolizumab pegol:** les diluer au 1/7000 en tampon TDL (exemple : faire une dilution au 1/100 suivie d'une dilution au 1/70, soit 10µl + 990µl de TDL, agiter, puis prendre 10µl de cette solution et les mettre dans 690µl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.
- **Dosage des anticorps anti-Certolizumab :** les diluer au 1/2 en tampon TDL (exemple : 130µl + 130µl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

#### b) Contrôles positifs

- **Dosage du Certolizumab pegol :** le diluer au 1/7000 en tampon TDL (exemple : faire une dilution au 1/100 suivie d'une dilution au 1/70, soit 10µl + 990µl de TDL, agiter, puis prendre 10µl de cette solution et les mettre dans 690µl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.
- **Dosage des anticorps anti-Certolizumab pegol :** le diluer au 1/2 en tampon TDL (exemple : 130µl + 130µl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

#### 4. Utilisation des anticorps biotinylés - prêts à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et les transférer dans un tube à partir duquel se fera le dépôt.

#### 5. Utilisation du conjugué (streptavidine-HRP) - prêt à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et le transférer dans un tube à partir duquel se fera le dépôt.

#### 6. Utilisation du substrat - prêt à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et le transférer dans un tube opaque à partir duquel se fera le dépôt.


### PRECAUTIONS D'EMPLOI


- Retirer tous les réactifs hors de leur logement de conditionnement et les ramener impérativement à température ambiante (+18°C / +25°C) au minimum une demi-heure avant de commencer le dosage.


- La température des réactifs peut influencer le résultat final.
- S'assurer que les plaques soient bien égouttées après chaque lavage.
- Ne pas utiliser les réactifs si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent.

- Les étalons, les contrôles et le tampon de dilution des Etalons-TNF, sont d'origine humaine. Pour chacun, les recherches d'anticorps anti-HIV 1 et 2, anti-HCV et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. S'agissant de produits potentiellement infectieux, il est toutefois nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.

- Les réactifs en solution (excepté le substrat & la solution d'arrêt) contiennent comme agent de conservation, de l'azide de sodium à une concentration <0.1% ou du ProClin® 300 à une concentration <0.6%. Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. L'azide de sodium peut former des mélanges explosifs lors de son élimination dans les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.

-  À cette concentration, le ProClin® 300 peut être irritant pour les yeux, la peau et nuisible en cas d'ingestion en quantités importantes. C'est un sensibilisant cutané; une exposition prolongée ou répétée peut entraîner une réaction allergique chez certains sujets sensibles.

- Le coffret **LISA-TRACKER Duo Certolizumab** () a été élaboré dans le respect du Règlement (CE) n° 1272/2008 en ce qui concerne la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances et des mélanges.

- **LISA-TRACKER Duo Certolizumab** () a été optimisé pour les conditions opératoires précisées dans cette notice. Le non-respect des dilutions, de la préparation des réactifs, du protocole ou la substitution d'un réactif par un autre produit peuvent affecter les performances finales du test.

### MODE OPERATOIRE

#### 1. Préparation du test

Utiliser la feuille de travail contenue dans le coffret pour noter la localisation des échantillons.

Pour chaque essai, et pour chaque spécificité de dosage, prévoir :

- 5 puits « étalon » (gamme de calibration)
- 1 puits « contrôle positif »
- 1 puits par échantillon

Dans le cas d'un dosage « simultané » placer les barrettes correspondantes à chaque spécificité sur un support de plaque.

#### Remarque :

Dans le cadre de l'utilisation d'un automate de dilution/répartition, placer les barrettes dans l'ordre suivant : dosage du Certolizumab puis dosage des anti-Certolizumab.

#### 2. Incubation des étalons, des contrôles positifs et des échantillons

Déposer 100µl par puits pour chaque étalon.

Déposer 100µl par puits de chaque contrôle dilué.

Déposer 100µl d'échantillons dilués dans les puits correspondant aux spécificités recherchées.

Laisser incuber 60 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de dilution et de lavage (TDL) (300µl/puits), puis :

**Procéder à une série de 3 lavages en tampon phosphate (300µl/puits).**

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

#### 3. Incubation de l'anticorps biotinylé

Déposer 100µl d'anticorps biotinylé spécifique, prêt à l'emploi, dans tous les puits **respectifs.**

Incuber 60 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de dilution et de lavage (TDL) (300µl/puits).

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

#### 4. Incubation du Conjugué

Déposer 100µl de conjugué prêt à l'emploi dans tous les puits.

Incuber 30 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de dilution et de lavage (TDL) (300µl/puits).

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

#### 5. Incubation du Substrat

Déposer 100µl de substrat dans tous les puits.

Incuber 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

#### 6. Arrêt de la réaction

Ajouter 100µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans tous les puits.

## 7. Lecture

Lire la densité optique de chaque puits avec un lecteur de microplaques muni d'un filtre 450nm au cours des 30 minutes suivant l'arrêt de la réaction.

## RESULTATS ET INTERPRETATION

### A) Dosage du Certolizumab pegol

- La densité optique (DO) de l'étalon 1 doit être au moins égale à 0.8.
- La valeur (µg/ml) du contrôle positif doit être comprise dans la fourchette d'acceptation inscrite sur le flacon.
- Tracer la courbe d'étalonnage (polynomiale) en portant en abscisse (axe des X) la quantité de Certolizumab pegol (µg/ml) de chaque étalon et, en ordonnée (axe des Y), la DO correspondante.
- La quantité de Certolizumab pegol de l'échantillon dosée peut être lue directement sur la courbe.
- Tout échantillon possédant une DO supérieure à celle de l'étalon 1 est considéré « hors-gamme ». Il peut être redilué afin d'estimer précisément la quantité du Certolizumab pegol. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution.

### B) Dosage des anticorps anti-Certolizumab pegol

- La densité optique (DO) de l'étalon 1 doit être au moins égale à 0.8.
- La valeur (UA/ml) du contrôle positif doit être comprise dans la fourchette d'acceptation inscrite sur le flacon.
- Tracer la courbe d'étalonnage (polynomiale) en portant en abscisse (axe des X) la quantité d'anticorps anti-Certolizumab pegol (UA/ml) de chaque étalon et, en ordonnée (axe des Y), la DO correspondante.
- La quantité d'anticorps anti-Certolizumab pegol de l'échantillon dosée peut être lue directement sur la courbe.
- Tout échantillon possédant une DO supérieure à celle de l'étalon 1 est considéré « hors-gamme ». Il peut être redilué afin d'estimer précisément la quantité d'anticorps anti-Certolizumab pegol. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution.

## CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES DES DOSAGES

### Limite de détection / Seuil de positivité

Estimée à partir d'une population « individus sains » de :

- 152 échantillons pour le Certolizumab pegol
- 142 échantillons pour les anticorps anti-Certolizumab pegol

Limite de détection Certolizumab pegol calculée avec la gamme étalon de 0-84µg/ml	Limite de détection Anti- Certolizumab pegol
3 µg/ml > 98 <sup>ème</sup> percentile	5 UA/ml > 99 <sup>ème</sup> percentile

### Plage de mesure

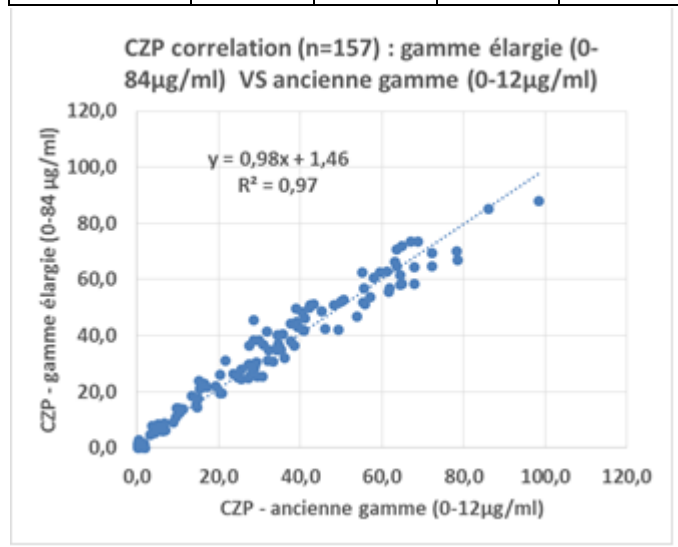
Certolizumab pegol calculée avec la gamme étalon de 0-84µg/ml	Anti-Certolizumab pegol
3µg/ml – 84µg/ml	5 UA/ml - 160 UA/ml

## Etude des substances interférentes

**LISA-TRACKER Duo Certolizumab** (Theradiag) a été évalué sur une population de sérums contenant des substances potentiellement interférentes (cryoglobulines, facteurs rhumatoïdes, anticorps hétérophiles, taux élevés de triglycérides, de bilirubine, d'IgG et/ou d'IgM, de protéine C1q) et sur une population de sérums de patients présentant des maladies autoimmunes. Aucune interférence n'a été détectée.

### Précision

Paramètres	Intra-essai *4 tests dans le même essai **3 tests dans le même essai		Inter-essais *4 tests dans 4 essais différents **3 tests dans 6 essais différents	
	Valeur moyenne	CV (%)	Valeur moyenne	CV (%)
Certolizumab (µg/ml)**	5,8	10,4	5,5	11,1
	28,8	16,5	28,1	12,9
	71,5	6,1	56,2	22,6
Anti-Certolizumab (UA/ml)*	10	6,7	10	9,5
	40	3,6	40	11,5
	85	4,4	84	12,6



### Corrélation

Les résultats du dosage du Certolizumab (CZP) – gamme de mesure élargie (0 - 84µg/ml) – ont été comparés à ceux obtenus avec l'ancienne gamme de mesure (0 - 12µg/ml). L'analyse de la courbe de régression linéaire montre que les résultats obtenus avec les deux gammes sont similaires.

### LIMITES

La présence de biotine dans les échantillons de patients peut potentiellement impacter les immunodosages utilisant la technologie Streptavidine - Biotine.

### CONTROLE DE QUALITE

Il est conseillé d'utiliser des contrôles de qualité interne ou externe pour les différentes spécificités. Les contrôles **IMMUNO-TROL Certolizumab** ou **anti-Certolizumab** (Theradiag), réf: LTC 002-PC ou LTC 003-PC, renferment du **Certolizumab** ou des anticorps dirigés contre le **Certolizumab**. Ils sont à tester de façon identique à celle des échantillons.

## BIBLIOGRAPHIE

---

**Ainsworth MA & al.** Tumor necrosis factor-alpha binding capacity and anti-infliximab antibodies measured by fluidphase radioimmunoassays as predictors of clinical efficacy of infliximab in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2008 Apr;103(4):944-8.

**Afif W & al.** Clinical Utility of Measuring Infliximab and Human Anti-Chimeric Antibody Concentrations in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:1133–1139.

**Arends S & al.** The formation of autoantibodies and antibodies to TNF- $\alpha$  blocking agents in relation to clinical response in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010 Sep-Oct;28(5):661-8.

**Baert F & al.** Influence of Immunogenicity on the Long-Term Efficacy of Infliximab in Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2003;348:601-8.

**Bartelds GM & al.** Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA.* 2011 Apr 13;305(14):1460-8.

**Bendtzen K.** Is There a Need for Immunopharmacologic Guidance of Anti-Tumor Necrosis Factor Therapies. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 63, No. 4, April 2011, pp 867–870.

**Candon S & al.** Clinical and biological consequences of immunization to infliximab in pediatric Crohn's disease. *Clin Immunol.* 2006 Jan;118(1):11-9.

**Choy & al.** Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis : a phase II double-blinded, randomized, dose escalating trial. *Rheumatology* 2002;41:1133-1137.

**Desroches M & al.** Treatment failure with antagonists of TNF- $\alpha$ : mechanisms and implications for the care of patients. *Eur. Cytokine Netw.*, Vol. 21 n° 4, December 2010, 226-31.

**DeVries & al.** Inefficacy of infliximab in ankylosing spondylitis is correlated with antibody formation. *Ann Rheum Dis.* 2007 Jan;66(1):133-4.

**Edrees & al.** Anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis: correlation of TNF-alpha serumlevel with clinical response and benefit from changing dose or frequency of infliximab infusions. *Clin Exp Rheumatol.* 2005 Jul-Aug;23(4):469-74.

**Jaminitski & al.** The presence or absence of antibodies to infliximab or adalimumab determines the outcome of switching to etanercept. *Rheum Dis.* 2011 Feb;70(2):284-8.

**Koren & al.** Recommendation on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products. *Journal of Immunological Methods*, 333 (2008) 1-9.

**Korswagen LA & al.** Venous and Arterial Thromboembolic Events in Adalimumab-Treated Patients With Anti-adalimumab Antibodies. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 63, No. 4, April 2011, pp 877–883.

**Krzysiek R & al.** Circulating Concentration of Infliximab and Response to Treatment in Ankylosing Spondylitis: Results From a Randomized Control Study. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)* Vol. 61, No. 5, May 15, 2009, pp 569–57.

**Marotte & al.** Circulating tumour necrosis factor-alpha bioactivity in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab: link to clinical response. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):R149-55.

**Mire-Sluis & al.** Recommendation for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of Immunological Methods*, 289 (2004) 1-16.

**Piketny ML & al.** Biotin: an emerging analytical interference, *Ann Biol Clin* 2017 ; 75(4) : 366-8.

**Radstake TRDJ & al.** Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1739–1745.

**Ram Raj Singh, & al.** TNF $\alpha$  blockade in human diseases : mechanisms and future. *Clin.Immunol.*, 2008 February ; 126(2):121-136.

**Seow CH & al.** Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis. *Gut.* 2010 Jan;59(1):49-54.

**Sparado A & al.** Switching from infliximab or etanercept to adalimumab in resistant or intolerant patients with spondyloarthritis: a 4-year study. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Jun;49(6):1107-11.

**Steenholdt C, & al.** Cut-off levels and diagnostic accuracy of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, March 2011, Vol. 46, N°3, Pages 310-318.

**Takeuchi & al.** Baseline tumour necrosis factor alpha levels predict the necessity for dose escalation of infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Jul;70(7):1208-15.

**Ternant D & al.** An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of Infliximab. *Ther Drug Monit.*, 2006 April ; 28(2):169-174.

**Van den Bemt BJJ & al.** Anti-infliximab antibodies are already detectable in most patients with rheumatoid arthritis halfway through an infusion cycle: an open-label pharmacokinetic cohort study. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2011.

**Vetterlein & al.** No antibodies to PEG detected in patients treated with certolizumab pegol. *Ann Rheum Dis* 2008;67(Suppl II):236.

**Wolbink GJ & al.** Development of Anti-infliximab Antibodies and Relationship to Clinical Response in Patients With Rheumatoid Arthritis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 54, No. 3, March 2006, pp711–715.

## SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

---

### A) Dilution des échantillons :

Dosage du Certolizumab pegol	Dosage des anticorps anti- Certolizumab pegol
au 1/7000	au 1/2

### B) Dilution des contrôles positifs :

Dosage du Certolizumab pegol	Dosage des anticorps anti- Certolizumab pegol
au 1/7000	au 1/2

**C) Mode opératoire :**

Réactifs	Mode opératoire
Etalons	100µl / puits
Contrôles positifs dilués	
Echantillons dilués	
Incubation	1 h à température ambiante
Lavage*	Laver 3 fois en tampon de dilution/lavage (TDL) : 3 x 300µl / puits
<b>Lavage*</b>	<b>Laver 3 fois en tampon phosphate : 3 x 300µl / puits</b>
Anticorps secondaires biotinylés	100µl / puits ( <b>réactifs spécifiques</b> )
Incubation	1 h à température ambiante
Lavage*	Laver 3 fois en tampon de dilution/lavage (TDL) : 3 x 300µl / puits
Streptavidine-HRP	100µl / puits
Incubation	30 minutes à température ambiante
Lavage*	Laver 3 fois en tampon de dilution/lavage (TDL) : 3 x 300µl / puits
Substrat (TMB)	100µl / puits
Incubation	15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière
Solution « stop »	100µl / puits

\* **Eliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.**

**D) Exemples de configuration de dosage :**

**a) 42 sérums à doser en Certolizumab pegol et anti-Certolizumab pegol**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Etalon 5	Sérum 3	Sérum 11	Sérum 19	Sérum 27	Sérum 35	Etalon 5	Sérum 3	Sérum 11	Sérum 19	Sérum 27	Sérum 35
<b>B</b>	Etalon 4	Sérum 4	Sérum 12	Sérum 20	Sérum 28	Sérum 36	Etalon 4	Sérum 4	Sérum 12	Sérum 20	Sérum 28	Sérum 36
<b>C</b>	Etalon 3	Sérum 5	Sérum 13	Sérum 21	Sérum 29	Sérum 37	Etalon 3	Sérum 5	Sérum 13	Sérum 21	Sérum 29	Sérum 37
<b>D</b>	Etalon 2	Sérum 6	Sérum 14	Sérum 22	Sérum 30	Sérum 38	Etalon 2	Sérum 6	Sérum 14	Sérum 22	Sérum 30	Sérum 38
<b>E</b>	Etalon 1	Sérum 7	Sérum 15	Sérum 23	Sérum 31	Sérum 39	Etalon 1	Sérum 7	Sérum 15	Sérum 23	Sérum 31	Sérum 39
<b>F</b>	C+	Sérum 8	Sérum 16	Sérum 24	Sérum 32	Sérum 40	C+	Sérum 8	Sérum 16	Sérum 24	Sérum 32	Sérum 40
<b>G</b>	Sérum 1	Sérum 9	Sérum 17	Sérum 25	Sérum 33	Sérum 41	Sérum 1	Sérum 9	Sérum 17	Sérum 25	Sérum 33	Sérum 41
<b>H</b>	Sérum 2	Sérum 10	Sérum 18	Sérum 26	Sérum 34	Sérum 42	Sérum 2	Sérum 10	Sérum 18	Sérum 26	Sérum 34	Sérum 42

Dosage  
Certolizumab

Dosage anti-  
Certolizumab

**b) 2 patients à doser en Certolizumab pegol et anti-Certolizumab pegol**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Etalon 5	Etalon 5										
<b>B</b>	Etalon 4	Etalon 4										
<b>C</b>	Etalon 3	Etalon 3										
<b>D</b>	Etalon 2	Etalon 2										
<b>E</b>	Etalon 1	Etalon 1										
<b>F</b>	C+	C+										
<b>G</b>	Sérum 1	Sérum 1										
<b>H</b>	Sérum 2	Sérum 2										

Dosage  
Adalimum

Dosage anti-  
Adalimumab

c) 42 sérums à doser en anti- Certolizumab pegol

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>Etalon 5</b>	Sérum 3	Sérum 11	Sérum 19	Sérum 27	Sérum 35						
<b>B</b>	<b>Etalon 4</b>	Sérum 4	Sérum 12	Sérum 20	Sérum 28	Sérum 36						
<b>C</b>	<b>Etalon 3</b>	Sérum 5	Sérum 13	Sérum 21	Sérum 29	Sérum 37						
<b>D</b>	<b>Etalon 2</b>	Sérum 6	Sérum 14	Sérum 22	Sérum 30	Sérum 38						
<b>E</b>	<b>Etalon 1</b>	Sérum 7	Sérum 15	Sérum 23	Sérum 31	Sérum 39						
<b>F</b>	<b>C+</b>	Sérum 8	Sérum 16	Sérum 24	Sérum 32	Sérum 40						
<b>G</b>	Sérum 1	Sérum 9	Sérum 17	Sérum 25	Sérum 33	Sérum 41						
<b>H</b>	Sérum 2	Sérum 10	Sérum 18	Sérum 26	Sérum 34	Sérum 42						

Dosage anti-Certolizumab

INDEX DES SYMBOLES



Déclaration de conformité CE



Nombre de tests



Test ELISA



Consulter les instructions d'utilisation



Référence produit



Limites de température



Numéro de Lot



Risque biologique



Date d'expiration



Contient de l'azide de sodium



Dispositif de Diagnostic *In Vitro*



A reconstituer



Fabricant



Attention



14 rue Ambroise Croizat  
CS 90136 CROISSY BEAUBOURG  
77435 MARNE LA VALLEE CX2  
France

Tel : 01 64 62 10 12  
Fax : 01 64 62 09 66

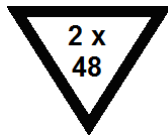
E-mail : [support@theradiag.com](mailto:support@theradiag.com)  
Internet : [www.theradiag.com](http://www.theradiag.com)






# LISA TRACKER Duo Certolizumab


English

**REF** LTC 005

**42 determinations**
**DEFINITION**

**LISA-TRACKER Duo Certolizumab** () is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for the quantitative determination of Certolizumab pegol (anti-TNF $\alpha$ ) and anti-Certolizumab pegol antibodies in human serum samples. These tests can be separately or simultaneously done by following the standardized assay protocols.

**DIAGNOSTIC VALUE**

Anti-TNF $\alpha$  are therapeutic agents widely used to treat patients with various inflammatory diseases. Certolizumab pegol is one of the anti-TNF $\alpha$  recommended for the treatment of the rheumatoid arthritis. This Fab' part of humanized monoclonal antibody conjugated to polyethylene glycol is able to bind TNF $\alpha$ . It blocks the action of TNF $\alpha$  responsible for the inflammatory state. However, during the treatment, some patients can develop antibodies against Certolizumab pegol. Consequently, the plasmatic level of anti-TNF $\alpha$  decreases and simultaneously the disease symptoms reappear or increase.

**LISA-TRACKER Duo Certolizumab** () allows the detection of 2 parameters: Certolizumab pegol and anti-Certolizumab pegol antibodies. This kit allows the physician to monitor the level of these 2 parameters in patient sera.

**SAMPLES COLLECTION AND HANDLING**

- The test should be performed on plasma (EDTA, heparin or citrate collection tubes) or on serum.
- Lipemic sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- To avoid any non-specific binding, samples which have been frozen for more than 6 months or which are cloudy, should be centrifuged and filtered.

**ASSAY PRINCIPLE**
**A. Dosage of Certolizumab pegol**

The TNF $\alpha$  is coated onto a polystyrene microtiter plate (6 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the TNF $\alpha$  coated well, which allows to bind. After incubation, unbound proteins are removed by washing.
- Biotinylated anti-polyethylene glycol antibodies (anti-PEG-biot) are added. After incubation, unbound antibodies are removed by washing
- Then horseradish peroxidase labelled streptavidin is added. The streptavidin binds to the complex formed with biotinylated anti-PEG antibodies. After incubation, the wells are washed again to eliminate any excess of conjugate.

- The bound enzyme is revealed by addition of substrate TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidin). The colour intensity is proportional to the amount of Certolizumab pegol.
- Adding H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> allows to stop the enzymatic reaction.
- After stopping the reaction by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the optical density is read by a spectrophotometer at 450nm.

A range of calibration allows to define the quantity of Certolizumab pegol of each patient samples expressed in  $\mu$ g/mL.

**B. Dosage of anti-Certolizumab pegol**

The Certolizumab pegol is coated onto a polystyrene microtiter plate (6 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the antibody coated well, which allows to bind. After incubation, unbound proteins are removed by washing.
- Biotinylated Certolizumab pegol is added. After incubation, unbound antibodies are removed by washing
- Then horseradish peroxidase labelled streptavidin is added. The streptavidin binds to the complex formed with biotinylated Certolizumab pegol. After incubation, the wells are washed again to eliminate any excess of conjugate.
- The bound enzyme is revealed by addition of substrate TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidin). The colour intensity is proportional to the amount of anti-Certolizumab pegol antibodies.
- Adding H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> allows to stop the enzymatic reaction.
- After stopping the reaction by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the optical density is read by a spectrophotometer at 450nm.

A range of calibration allows to define the quantity of anti-Certolizumab pegol antibodies of each patient samples expressed in AU/mL.

**REAGENTS**

3 reagent families :

Color	Certolizumab pegol reagents	anti-Certolizumab pegol antibodies reagents	Common reagents
cap of vials	Blue	White or colorless	Green, White, Black or Purple
microwells	Blue	colorless	-

### A) Specific reagents for the Certolizumab pegol determination

Strips of individual breakaway blue wells coated with human TNF $\alpha$ <b>MP</b>	6 strips
5 vials of « Certolizumab pegol » Standards, ( $\mu\text{g/mL}$ ). <b>CER CAL n</b> <u>Ready to use.</u> The vials can be reused several times. <b>The quantity of Certolizumab pegol is indicated on the vial label</b> <b>Blue caps</b>	5 x 1.5mL
«Positive control - Certolizumab pegol», ( $\mu\text{g/mL}$ ). <u>To dilute.</u> The vials can be reused several times. <b>CER CONTROL +</b> <b>The quantity of Certolizumab pegol is indicated on the vial label</b> <b>Blue cap</b>	1 x 250 $\mu\text{L}$
Biotinylated antibody vial. <u>Ready to use</u> <b>CER Ab BIOT</b> <b>Blue cap</b>	1 x 7.5mL

### B) Specific reagents for the anti-Certolizumab pegol antibodies determination

Strips of individual breakaway colorless wells coated with Certolizumab pegol. <b>MP</b>	6 strips
5 vials of « anti-Certolizumab pegol » Standards, (AU/mL). <b>A-CER CAL n</b> <u>Ready to use.</u> The vials can be reused several times. <b>The quantity of anti-Certolizumab pegol is indicated on the vial label</b> <b>Colorless cap.</b>	5 x 1.5mL
« Positive control – anti-Certolizumab pegol », (AU/mL). <b>A-CER CONTROL +</b> <u>To dilute.</u> The vial can be reused several times. <b>The quantity of anti-Certolizumab pegol is indicated on the vial label.</b> <b>Colorless cap.</b>	1 x 1mL
Biotinylated antibody vial. <u>Ready to use.</u> <b>A-CER Ab BIOT</b> <b>White cap.</b>	1 x 7.5mL

### C) Common reagents

HRP labelled Streptavidin. <u>Ready to use.</u> <b>CONJ HRP</b> <b>Green cap.</b>	1 x 12mL
Phosphate-Tween Buffer pH 7,2 (10x) – <u>To reconstitute with distilled water.</u> <b>White cap.</b> <b>BUF WASH 10x</b>	1 x 100mL
Phosphate Buffer pH 7,2 (10x) – <u>To reconstitute with distilled water.</u> <b>White cap.</b> <b>BUF PHOS 10x</b>	1 X 100ml
Substrate (TMB). <u>Ready to use</u> <b>SUBS TMB</b> <b>Black cap.</b>	1 x 12mL
Stop solution - H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.25 N). <u>Ready to use.</u> <b>SOLN STOP</b> <b>Purple cap</b>	1 x 15mL

### MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- distilled water
- precision pipettes
- microplate spectrophotometer with 450 nm filter
- 8 channel pipettes

### STABILITY AND STORAGE

- Store reagents and micro-wells at +2°C/+8°C in their own package.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- Store unused strips into their plastic bag (closed securely) with the desiccant.
- Store all components immediately after use again at +2°C/+8°C.

### SETUP

Except the TDL, which can be prepare in advance, all reagents must be prepared extemporaneously.

#### 1. Dilution and Wash buffer (TDL)

- Dilute concentrated Phosphate-Tween Buffer 1/10 in distilled water.

**BUF WASH 10x**

- Shelf life : 3 months at +2°C/+8°C (avoid to use if signs of contamination or other visible changes occur).

*NB. If there are crystals in the concentrated solution, warm the bottle up to +37°C for 15 minutes before use.*

#### 2. Phosphate buffer

- Dilute concentrated Phosphate Buffer 1/10 in distilled water.

**BUF PHOS 10x**

- Shelf life : 3 month at +2°C/+8°C (avoid to use if signs of contamination or other visible changes occur).

*NB. If there are crystals in the concentrated solution, warm the bottle up to +37°C for 15 minutes before use.*

#### 3. Preparation of samples and positive controls

##### a. Samples

##### - Certolizumab pegol determination

- Dilute to 1/7000 in TDL

Ex: perform a 1/100 dilution followed by a 1/70 dilution (10 $\mu\text{L}$  sample + 990 $\mu\text{L}$  TDL, vortex, add 10 $\mu\text{L}$  of the 1/100 dilution into 690 $\mu\text{L}$  of TDL).

- Vortex vigorously.

##### - Anti-Certolizumab pegol determination

- Dilute to 1/2 in TDL

Ex : 130 $\mu\text{L}$  sample + 130 $\mu\text{L}$  TDL

- Vortex vigorously.

##### b. Positive controls

##### - Certolizumab pegol determination

- Dilute to 1/7000 in TDL

Ex: perform a 1/100 dilution followed by a 1/70 dilution (10 $\mu\text{L}$  sample + 990 $\mu\text{L}$  TDL, vortex, add 10 $\mu\text{L}$  of the 1/100 dilution into 690 $\mu\text{L}$  of TDL).

- Vortex vigorously.

##### - anti-Certolizumab pegol determination

- Dilute to 1/2 in TDL

Ex : 130 $\mu\text{L}$  positive control + 130 $\mu\text{L}$  TDL

- Vortex vigorously.

#### 4. Use of ready-to-use biotinylated antibodies.

- Estimate the amount required for handling and transfer to a tube.

#### 5. Use of ready-to-use HRP Streptavidin conjugate.

- Estimate the amount required for handling and transfer to a tube.

#### 6. Use of ready-to-use substrate.

- Estimate the amount required for handling and transfer to a dark tube.

### PRECAUTIONS

---

Unpack all reagents in order to let them warm at room temperature (+18°C/+25°C) at least half an hour before starting the test.


⚠ The temperature of the reagents can impact the final result.


Check that all plates are well drained after each wash.


Avoid to use reagents if signs of contamination or other visible changes occur.

*Human sources for the preparation of standards and controls have been tested and found negative for antibody to HIV 1 and 2, antibody to hepatitis C virus and hepatitis B virus antigen. Nevertheless, no test can offer complete assurance that HIV, hepatitis B virus or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled as potentially infective materials.*

Reagents in solution (except for substrate buffer and stop solution) contain <0.1% of sodium azide and <0.6% of ProClin® 300. Do not eat and avoid contact with skin and eyes. Azide can form explosive mixtures in copper or lead piping. Rinse thoroughly after flushing.

 At this concentration, ProClin® 300 is irritating to eyes and skin, and may be detrimental if enough quantity is ingested. It is a skin sensitizer; prolonged or repeated exposure may cause allergic reaction in certain sensitive individuals.

**LISA-TRACKER Duo Certolizumab** () has been developed according to EC regulation n°1272/2008 relating to the classification, labelling and packaging of substances and mixtures.

**LISA-TRACKER Duo Certolizumab** () has been optimized for the use as describe in this procedure. Do not substitute other manufacturer's reagents. Dilution or adulteration of these reagents may also affect the performance of the test. Close adherence to the test procedure will assure optimal performance.

### METHOD

---

#### 1. Preparing the test

Use the work sheet to note the sample locations.

Set out:

- 5 "standard" wells
- 1 well for positive control
- 1 well for each sample

For a simultaneous testing of the 2 parameters, detach the exact number of wells needed. Return unused wells to plastic pouch provided in the kit, with the desiccant bag.

#### Remark :

If a dispensing/diluting device is used, place the specific wells in the following order : dosage of Certolizumab and dosage of anti-Certolizumab.

#### 2. Samples, positive controls and standards incubation

Add 100 µl of standards, diluted controls or samples.

Incubate for 60 minutes at room temperature (+18°C/+25°C).

*Wash step:*

Remove the content of the wells by rapid inversion.

**Wash 3 times with 300µL of TDL buffer.**

**Wash 3 times with 300µL of phosphate buffer.**

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess of liquid.

#### 3. Incubation of biotinylated antibodies

Add 100µL of specific biotinylated antibodies in identified wells.

Incubate for 60 minutes at room temperature (+18°C/+25°C).

*Wash step:*

Remove the content of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300µL of dilution and washing buffer.

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess of liquid.

#### 4. Incubation of Conjugate

Add 100µL of conjugate.

Incubate for 30 minutes at room temperature (+18°C/+25°C).

*Wash step:*

Remove the content of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300µL of dilution and washing buffer.

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess of liquid.

#### 5. Incubation of Substrate

Add 100µL substrate into each well.

Incubate for 15 minutes at room temperature (+18°C/+25°C). Protect from light.

#### 6. Stop of the reaction

Add 100µl of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to each well.

#### 7. Reading

Read the optical density of each well at 450nm within 30 minutes after stopping reaction.

### RESULTS AND INTERPRETATION

---

#### A. Dosage of Certolizumab pegol

- The OD of the standard 1 should be at least 0.8.
- The positive control value should be comprised into the range indicated on the vial label.
- Trace the standard curve (polynomial curve), plotting the units of the 5 standard points (µg/mL) along the abscissa (X axis) and the corresponding OD values along the ordinate (Y axis).
- The Certolizumab pegol value can be directly read on the curve.
- Samples with values greater than that of standard 1 may be diluted to obtain a more precise result. The number of units should be multiplied by the selected dilution.

#### B. Dosage of anti-Certolizumab pegol

- The OD of the standard 1 should be at least 0.8.
- The positive control value should be comprised into the range indicated on the vial label.

- Trace the standard curve (polynomial curve), plotting the units of the 5 standard points (AU/mL) along the abscissa (X axis) and the corresponding OD values along the ordinate (Y axis).
- The anti-Certolizumab pegol value can be directly read on the curve.
- Samples with values greater than that of standard 1 may be diluted to obtain a more precise result. The number of units should be multiplied by the selected dilution.

## CHARACTERISTICS AND PERFORMANCE OF THE TEST

### Limits of detection / threshold values

Estimated on healthy patient samples:

- 152 samples for Certolizumab pegol
- 142 samples for anti-Certolizumab pegol antibodies

Limit of detection <b>Certolizumab pegol</b> Calculated with the range standard of 0 – 84µg/mL	Limit of detection <b>Anti-Certolizumab pegol</b>
3 µg/mL >98 <sup>th</sup> percentile	5 AU/mL >99 <sup>th</sup> percentile

### Assay range

<b>Certolizumab pegol</b> Calculated with the range standard of 0 – 84µg/mL	<b>Anti-Certolizumab pegol</b>
3 µg/mL – 84 µg/mL	5 AU/mL - 160 AU/mL

### Interfering Substances Study

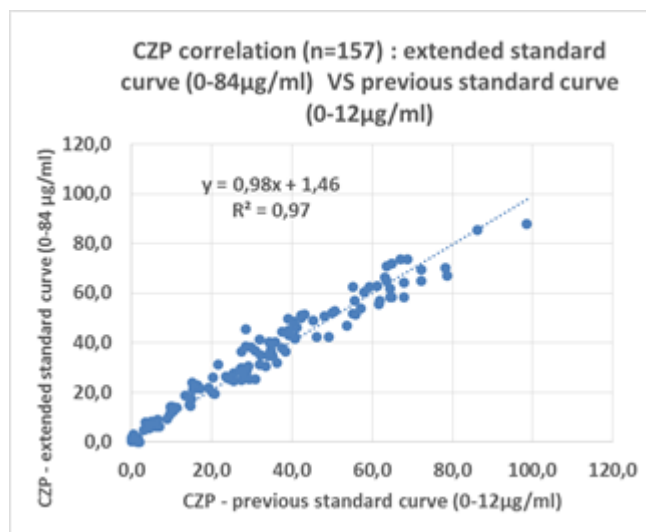
**LISA-TRACKER Duo Certolizumab** (Theradag) was evaluated to assess potential cross reactivity to other antibodies and interference from serum components (cryoglobulins, rheumatoid factors, heterophilic antibodies, high levels of triglycerides, bilirubin, IgG and/or IgM, and C1q proteins, autoantibodies). No interference was detected.

### Precision

Parameters	Intra-run *4 tests in a same assay **3 tests in a same assay		Inter-runs *4 tests 4 different assays **3 tests 6 different assays	
	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)
<b>Certolizumab (µg/mL)**</b>	5.8	10.4	5.5	11.1
	28.8	16.5	28.1	12.9
	71.5	6.1	56.2	22.6
<b>Anti-Certolizumab (AU/mL)*</b>	10	6.7	10	9.5
	40	3.6	40	11.5
	85	4.4	84	12.6

### Correlation

The results of the Certolizumab (CZP) determination obtained with the extended standard range (0-84µg/mL) were compared to the results obtained with the previous standard range (0-12µg/mL). A linear regression analysis of the two results showed that both are equivalent.



## LIMITS

The presence of biotin in patients' specimens can potentially impact the immunodosages using the Streptavidin-Biotin technology.

## QUALITY CONTROL

It is recommended to use internally and externally sourced control material for the different specificities. **IMMUNO-TROL Certolizumab** or **anti-Certolizumab** controls (Theradag), Cat.n: LTC 002-PC or LTC 003-PC, contain **Certolizumab** or antibodies directed against **Certolizumab**. These materials are to be assayed in the same manner as the unknown samples.

## REFERENCES

**Ainsworth MA & al.** Tumor necrosis factor-alpha binding capacity and anti-infliximab antibodies measured by fluidphase radioimmunoassays as predictors of clinical efficacy of infliximab in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2008 Apr;103(4):944-8.

**Afif W & al.** Clinical Utility of Measuring Infliximab and Human Anti-Chimeric Antibody Concentrations in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:1133–1139.

**Arends S & al.** The formation of autoantibodies and antibodies to TNF-α blocking agents in relation to clinical response in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010 Sep-Oct;28(5):661-8.

**Baert F & al.** Influence of Immunogenicity on the Long-Term Efficacy of Infliximab in Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2003;348:601-8.

**Bartelds GM & al.** Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA.* 2011 Apr 13;305(14):1460-8.

**Bentzen K.** Is There a Need for Immunopharmacologic Guidance of Anti-Tumor Necrosis Factor Therapies. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 63, No. 4, April 2011, pp 867–870.

**Candon S & al.** Clinical and biological consequences of immunization to infliximab in pediatric Crohn's disease. *Clin Immunol.* 2006 Jan;118(1):11-9.

**Choy & al.** Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis : a phase II double-blinded, randomized, dose escalating trial. *Rheumatology* 2002;41:1133-1137.

**Desroches M & al.** Treatment failure with antagonists of TNF- $\alpha$ : mechanisms and implications for the care of patients. Eur. Cytokine Netw., Vol. 21 n° 4, December 2010, 226-31.

**DeVries & al.** Inefficacy of infliximab in ankylosing spondylitis is correlated with antibody formation. Ann Rheum Dis. 2007 Jan;66(1):133-4.

**Edrees & al.** Anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis: correlation of TNF-alpha serumlevel with clinical response and benefit from changing dose or frequency of infliximab infusions. Clin Exp Rheumatol. 2005 Jul-Aug;23(4):469-74.

**Jaminitzki & al.** The presence or absence of antibodies to infliximab or adalimumab determines the outcome of switching to etanercept. Rheum Dis. 2011 Feb;70(2):284-8.

**Koren & al.** Recommendation on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products. Journal of Immunological Methods, 333 (2008) 1-9.

**Korswagen LA & al.** Venous and Arterial Thromboembolic Events in Adalimumab-Treated Patients With Anti-adalimumab Antibodies. ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 63, No. 4, April 2011, pp 877–883.

**Krzysiek R & al.** Circulating Concentration of Infliximab and Response to Treatment in Ankylosing Spondylitis: Results From a Randomized Control Study. Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research) Vol. 61, No. 5, May 15, 2009, pp 569–57.

**Marotte & al.** Circulating tumour necrosis factor-alpha bioactivity in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab: link to clinical response. Arthritis Res Ther. 2005;7(1):R149-55.

**Mire-Sluis & al.** Recommendation for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. Journal of Immunological Methods, 289 (2004) 1-16.

**Piketny ML & al.** Biotin: an emerging analytical interference, Ann Biol Clin2017 ; 75(4) : 366-8.

**Radstake TRDJ & al.** Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2009;68:1739–1745.

**Ram Raj Singh, & al.** TNF $\alpha$  blockade in human diseases : mechanisms and future. Clin.Immunol., 2008 February ; 126(2):121-136.

**Seow CH & al.** Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis. Gut. 2010 Jan;59(1):49-54.

**Sparado A & al.** Switching from infliximab or etanercept to adalimumab in resistant or intolerant patients with spondyloarthritis: a 4-year study. Rheumatology (Oxford). 2010 Jun;49(6):1107-11.

**Steenholdt C, & al.** Cut-off levels and diagnostic accuracy of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in Crohn's disease. Scandinavian Journal of Gastroenterology, March 2011, Vol. 46, N°3, Pages 310-318.

**Takeuchi & al.** Baseline tumour necrosis factor alpha levels predict the necessity for dose escalation of infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2011 Jul;70(7):1208-15.

**Ternant D & al.** An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of Infliximab. Ther Drug Monit., 2006 April ; 28(2):169-174.

**Van den Bemt BJF & al.** Anti-infliximab antibodies are already detectable in most patients with rheumatoid arthritis halfway through an infusion cycle: an open-label pharmacokinetic cohort study. BMC Musculoskeletal Disorders 2011.

**Vetterlein & al.** No antibodies to PEG detected in patients treated with certolizumab pegol. Ann Rheum Dis 2008;67(Suppl II):236.

**Wolbink GJ & al.** Development of Anti-infliximab Antibodies and Relationship to Clinical Response in Patients With Rheumatoid Arthritis. ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 54, No. 3, March 2006, pp711–715.

## SUMMARY OF METHOD

### A) Sample Dilution

Certolizumab pegol	Anti-Certolizumab pegol
1/7000	1/2

### B) Positive Control Dilution

Certolizumab pegol	Anti-Certolizumab pegol
1/7000	1/2

### C) Procedure

Reagents	Procedure
Standards	100 $\mu$ L / well
Diluted positive controls	
Diluted samples	
Incubation	1 h at room temperature
Washing*	Wash 3 times with TDL buffer : 3 x 300 $\mu$ L / well
<b>Washing*</b>	<b>Wash 3 times with phosphate buffer : 3 x 300<math>\mu</math>L / well</b>
Biotinylated antibodies	100 $\mu$ L / wells ( <b>specific reagents</b> )
Incubation	1 h at room temperature
Washing*	Wash 3 times with TDL buffer : 3 x 300 $\mu$ L / well
HRP-Streptavidin	100 $\mu$ L / well
Incubation	30 minutes at room temperature
Washing*	Wash 3 times with TDL buffer : 3 x 300 $\mu$ L / well
Substrate (TMB)	100 $\mu$ L / well
Incubation	15 minutes at room temperature. Protect from light.
Stop solution	100 $\mu$ L / well

\* Dry the microplate by tapping it gently on a towel to eliminate the excess of liquid.

**D) Configuration of the assays**

**a. 42 sera for Certolizumab and anti-Certolizumab pegol**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19	Sera 27	Sera 35	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19	Sera 27	Sera 35
<b>B</b>	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20	Sera 28	Sera 36	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20	Sera 28	Sera 36
<b>C</b>	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21	Sera 29	Sera 37	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21	Sera 29	Sera 37
<b>D</b>	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22	Sera 30	Sera 30	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22	Sera 30	Sera 30
<b>E</b>	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23	Sera 31	Sera 39	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23	Sera 31	Sera 39
<b>F</b>	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24	Sera 32	Sera 40	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24	Sera 32	Sera 40
<b>G</b>	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25	Sera 33	Sera 41	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25	Sera 33	Sera 41
<b>H</b>	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26	Sera 34	Sera 42	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26	Sera 34	Sera 42

Certolizumab  
pegol assay

anti-  
Certolizumab  
pegol assay

**b. 2 sera for Certolizumab and anti-Certolizumab pegol**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Standard 5	Standard 5										
<b>B</b>	Standard 4	Standard 4										
<b>C</b>	Standard 3	Standard 3										
<b>D</b>	Standard 2	Standard 2										
<b>E</b>	Standard 1	Standard 1										
<b>F</b>	C+	C+										
<b>G</b>	Sera 1	Sera 1										
<b>H</b>	Sera 2	Sera 2										

Certolizumab  
pegol assay

anti-  
Certolizumab  
pegol assay

### c. 42 sera for anti-Certolizumab pegol determination

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19	Sera 27	Sera 35						
<b>B</b>	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20	Sera 28	Sera 36						
<b>C</b>	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21	Sera 29	Sera 37						
<b>D</b>	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22	Sera 30	Sera 30						
<b>E</b>	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23	Sera 31	Sera 39						
<b>F</b>	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24	Sera 32	Sera 40						
<b>G</b>	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25	Sera 33	Sera 41						
<b>H</b>	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26	Sera 34	Sera 42						

anti-  
Certolizumab  
pegol assay

#### SYMBOLS USED



EC Declaration of conformity



Number of test



ELISA Test



Consult Instructions



Catalogue number



Temperature limitation



Lot Number



Biological hazard



Expiry Date



Contains sodium azide



*In Vitro* Diagnostic Device



Reconstitute with



Manufacturer



Warning



14 rue Ambroise Croizat  
CS 90136 CROISSY BEAUBOURG  
77435 MARNE LA VALLEE CX2  
France

Tel : +33 (0)1 64 62 10 12  
Fax : +33 (0)1 64 62 09 66

E-mail : [support@theradiag.com](mailto:support@theradiag.com)  
Internet : [www.theradiag.com](http://www.theradiag.com)