

# LISA TRACKER

## Duo Rituximab

Français


REF

LTR 005

2 x  
48

42 déterminations


### DEFINITION

Le coffret **LISA-TRACKER Duo Rituximab** () permet le dosage par méthode ELISA du Rituximab (anticorps anti-CD20) ainsi que des anticorps anti-Rituximab, 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

En plus de son indication pour le traitement de patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens, le Rituximab, en association au méthotrexate (MTX) est indiqué pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde active, sévère, chez les patients adultes qui ont présenté une réponse inadéquate ou une intolérance aux traitements de fond (DMARDs), dont au moins un anti-TNF $\alpha$ .

Le Rituximab est un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule CD20 présente à la surface des cellules B, du stade pré-B au stade de lymphocyte B mature. Il s'agit d'un anticorps chimérique composé de domaines constants humains (chaîne lourde  $\gamma$ 1 et chaîne légère kappa) et de domaines variables murins. Certains patients, au cours de leur traitement, peuvent développer des anticorps dirigés contre le Rituximab.

Le coffret **LISA-TRACKER Duo Rituximab** () permet le dosage de 2 paramètres : Rituximab et anticorps anti-Rituximab. 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.
- Éviter 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 Rituximab

Un anticorps anti-rituximab (anti-idiotypique) 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 Rituximab, celui-ci va se fixer à l'anticorps anti-Rituximab adsorbé. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non-fixés.

- On ajoute ensuite un anticorps anti-IgG humaines 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 « anti-Rituximab / Rituximab / anti-IgGh 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 de Rituximab 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 Rituximab ( $\mu$ g/ml) présente dans l'échantillon.

#### B) Dosage des anticorps anti-Rituximab

Le Rituximab 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-Rituximab, ceux-ci vont se fixer au Rituximab adsorbé. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non-fixés.

- On ajoute ensuite du Rituximab 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 « Rituximab adsorbé / anticorps anti-Rituximab / Rituximab 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-Rituximab 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-Rituximab (ng/ml) présente dans l'échantillon.

## COMPOSITION DU COFFRET

Le coffret est composé de 3 familles de réactifs :

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

### A) Réactifs spécifiques au dosage du Rituximab

Une microplaque de 6 barrettes bleues amovibles, sensibilisée par un anticorps anti-Rituximab <b>MP</b>	6 barrettes
Cinq flacons « Etalon - Rituximab », (µg/ml). <u>Prêts à l'emploi.</u> Ils peuvent être utilisés plusieurs fois. <b>La quantité de Rituximab est indiquée sur le flacon.</b> <b>Bouchons bleus.</b> <b>RIT</b> <b>CAL</b> <b>n</b>	5 x 1,5ml
Flacon « contrôle positif - Rituximab », (µg/ml). <u>A diluer.</u> Il peut être utilisé plusieurs fois. <b>Les valeurs attendues (µg/ml) sont indiquées sur le flacon.</b> <b>Bouchon bleu.</b> <b>RIT</b> <b>CONTROL</b> <b>+</b>	1 x 250µl
Flacon d'anticorps biotinylé. <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>Bouchon bleu.</b> <b>RIT</b> <b>Ab</b> <b>BIOT</b>	1 x 7,5ml

### B) Réactifs spécifiques au dosage des anticorps anti-Rituximab

Une microplaque de 6 barrettes jaunes amovibles, sensibilisée par du Rituximab. <b>MP</b>	6 barrettes
Cinq flacons « Etalon - anti-Rituximab », (ng/ml). <u>Prêts à l'emploi.</u> Ils peuvent être utilisés plusieurs fois. <b>La quantité en anticorps anti-Rituximab est indiquée sur le flacon.</b> <b>Bouchons jaunes.</b> <b>A-RIT</b> <b>CAL</b> <b>n</b>	5 x 1,5ml
Flacon « contrôle positif – anti-Rituximab », (ng/ml). <u>A diluer.</u> Il peut être utilisé plusieurs fois. <b>Les valeurs attendues (ng/ml) sont indiquées sur le flacon.</b> <b>Bouchon jaune.</b> <b>A-RIT</b> <b>CONTROL</b> <b>+</b>	1 x 1ml
Flacon d'anticorps biotinylé <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>Bouchon jaune.</b> <b>A-RIT</b> <b>Ab</b> <b>BIOT</b>	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) - A reconstituer en eau distillée. <b>Bouchon blanc.</b> <b>BUF</b> <b>WASH</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. Préparation des échantillons et des contrôles positifs

##### a) Echantillons

- **Dosage du Rituximab** : les diluer au 1/1001 en tampon TDL (exemple : 3µl + 3ml de TDL). Dans le cas où une micropipette ne permettrait pas de prélever 3µl, une dilution en série de l'échantillon doit être envisagée. Dans ce cas, réaliser une dilution au 1/101 (10µl + 1ml de TDL), suivi d'une dilution au 1/10 (100µl de la dilution au 1/101 + 900µl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.
- **Dosage des anticorps anti-Rituximab** : les diluer au 1/2 en tampon TDL (exemple : 100µl + 100µl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

### b) Contrôles positifs

- **Dosage du Rituximab** : le diluer au 1/1001 en tampon TDL (exemple : 3µl + 3ml de TDL). Dans le cas où une micropipette ne permettrait pas de prélever 3µl, une dilution en série doit être envisagée. Dans ce cas, réaliser une dilution au 1/101 (10µl + 1ml de TDL), suivi d'une dilution au 1/10 (100µl de la dilution au 1/101 + 900µl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.
- **Dosage des anticorps anti-Rituximab** : le diluer au 1/2 en tampon TDL (exemple : 100µl + 100µl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.
- 3. 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.
- 4. 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.
- 5. 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 et les contrôles 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 Rituximab** (Theradag) 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 Rituximab** (Theradag) 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 Rituximab puis dosage des anti-Rituximab.

#### 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).

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 Rituximab

- La densité optique (DO) de l'étalon 1 doit être au moins égale à 0.8.
- La valeur ( $\mu\text{g/ml}$ ) du contrôle positif doit être comprise dans la fourchette d'acceptation inscrite sur le flacon.
- Tracer une courbe d'étalonnage polynomiale de degré 4 ou de type 4PL, en portant en abscisse (axe des X) la quantité de Rituximab ( $\mu\text{g/ml}$ ) de chaque étalon et, en ordonnée (axe des Y), la DO correspondante.
- La quantité de Rituximab 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 de Rituximab. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution.

### B. Dosage des anticorps anti-Rituximab

- La densité optique (DO) de l'étalon 1 doit être au moins égale à 0.8.
- La valeur ( $\text{ng/ml}$ ) 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-Rituximab ( $\text{ng/ml}$ ) de chaque étalon et, en ordonnée (axe des Y), la DO correspondante.
- La quantité d'anticorps anti-Rituximab 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-Rituximab. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution.

## CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES DES DOSAGES

### Limite de détection


Estimée à partir des 154 échantillons issus d'une population « individus sains ».

Limite de détection Rituximab	Limite de détection Anti-Rituximab
2 $\mu\text{g/ml}$ > 99 <sup>ème</sup> percentile	5 $\text{ng/ml}$ > 99 <sup>ème</sup> percentile

### Plage de mesure

Rituximab	Anti-Rituximab
2 $\mu\text{g/ml}$ - 50 $\mu\text{g/ml}$	5 $\text{ng/ml}$ - 100 $\text{ng/ml}$

### Etude des substances interférentes

**LISA-TRACKER Duo Rituximab** () 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 auto-immunes. Aucune interférence n'a été détectée.

## Précision

Paramètres	Intra-essai (4 tests dans le même essai)		Inter-essais (4 tests dans 4 essais différents)	
	Valeur moyenne	CV (%)	Valeur moyenne	CV (%)
Rituximab ( $\mu\text{g/ml}$ )	48.1	7.6	48.8	4.6
	28.0	4.9	28.1	7.4
	9.6	4.0	10.7	9.8
	3.8	1.4	4.0	5.1
Anti-Rituximab ( $\text{ng/ml}$ )	98	1.4	96	6.0
	53	1.4	47	10.6
	22	6.8	23	4.5
	12	9.1	12	12.8


## LIMITES

Le dosage du Rituximab montre une réaction croisée vis-à-vis des sérums de patients traités par Ibritumomab tiuxetan et Tositumomab, qui sont 2 autres anti-CD20.

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 Rituximab** ou **anti-Rituximab** (, réf: LTR 002-PC ou LTR 003-PC, renferment du **Rituximab** ou des anticorps dirigés contre le **Rituximab**. Ils sont à tester de façon identique à celle des échantillons.

## BIBLIOGRAPHIE

**Cartron G & al.** Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use : Thought for the best use ? Critical Reviews in Oncology/Hematology 62 (2007) 43-52.

**Dieter Huhn & al.** Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood, 2001; 98: 1326-1331.

**Ferdinand Breedveld & al.** Rituximab pharmacokinetics in patients with Rheumatoid Arthritis: B-Cell levels do not correlate with clinical response. Journal of Clinical Pharmacology, 2007; 47:1119-1128.

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

**Magda Nakou & al.** Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. Arthritis Research & Therapy 2009, 11:R131.

**Mark S. Cragg & al.** A new anti-idiotypic antibody capable of binding rituximab on the surface of lymphoma cells. Blood. 2004;104:2540-2542.

**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.

**R. John Looney & al.** B Cell depletion as a novel treatment for Systemic Lupus Erythematosus : a Phase I/II dose-escalation trial of Rituximab. Arthritis & Rheumatism. Vol. 50, No. 8, August 2004, 2580-2589.

**Saito K & al.** Extremely high titer of anti-human chimeric antibody following re-treatment with rituximab in a patient with active systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford). 2005 Nov;44(11):1462-4. Epub 2005 Aug 16.

**Schmidt E & al.** Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus. *Clinical Immunology*, 2009; 132: 334–341.

**Stanley B. Cohen & al for the REFLEX Trial Group.** Rituximab for Rheumatoid Arthritis Refractory to Anti-Tumor Necrosis Factor. *Arthritis Rheum.* 2006 Sep;54(9):2793-806.

**Thurlings RM & al.** Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimaeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 409–412.

**Tobinai K & al.** Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) in relapsed B-cell lymphoma. *Annals of Oncology* 1998; 9: 527-534.

**SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE**

**A) Dilution des échantillons :**

Dosage du Rituximab	Dosage des anticorps anti-Rituximab
au 1/1001	au 1/2

**B) Dilution des contrôles positifs :**

Dosage du Rituximab	Dosage des anticorps anti-Rituximab
au 1/1001	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
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 Rituximab et anti-Rituximab**

	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 Rituximab

Dosage anti-Rituximab

b) 2 sérums à doser en Rituximab et en anti-Rituximab

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

Dosage Rituximab	Dosage anti-Rituximab
------------------	-----------------------

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



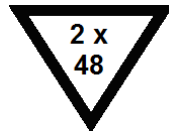
14 rue Ambroise Croizat  
CS 90136 CROISSY BEAUBOURG  
77435 MARNE LA VALLEE CX2  
France

Tél : 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 Rituximab

**REF** LTR 005

**English**


### DEFINITION

**LISA-TRACKER Duo Rituximab** () is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for the quantitative determination of Rituximab (anti-CD20) and anti-Rituximab antibodies in human serum samples. These tests can be separately or simultaneously done by following the standardized assay protocols.

### DESCRIPTION AND DIAGNOSTIC VALUE

Rituximab is indicated for the treatment of Non-Hodgkin's Syndrome, Chronic Lymphocytic Leukemia and Rheumatoid Arthritis in association with Methotrexate in patients with an insufficient response or an intolerance to conventional treatments (DMARDS) or anti-TNF treatments.

Rituximab is a monoclonal antibody directed against transmembrane CD20 molecule expressed on the surface of B-cell (pre-B state to mature B-lymphocyte). Rituximab is a chimeric antibody constituted with human constant domains ( $\gamma 1$  heavy chain and kappa light chain) and murine variable domains. During the course of the treatment, some patients can develop antibodies directed against Rituximab

**LISA-TRACKER Duo Rituximab** () allows the detection of 2 parameters: Rituximab and anti-Rituximab 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 Rituximab

Anti-rituximab antibody (anti-idiotypic) 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.
- Anti-human IgG biotinylated antibodies 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 anti-IgG antibodies. After incubation, the wells are washed again to eliminate any excess of conjugate.

#### 42 determinations

- The bound enzyme is revealed by addition of substrate TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine). The colour intensity is proportional to the amount of Rituximab.
- Adding  $H_2SO_4$  allows to stop the enzymatic reaction.
- After stopping the reaction by  $H_2SO_4$ , the optical density is read by a spectrophotometer at 450nm.

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

#### B. Dosage of anti-Rituximab

Rituximab 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 Rituximab 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 Rituximab. 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' tetramethylbenzidine). The colour intensity is proportional to the amount of anti-Rituximab antibodies.
- Adding  $H_2SO_4$  allows to stop the enzymatic reaction.
- After stopping the reaction by  $H_2SO_4$ , the optical density is read by a spectrophotometer at 450nm.

A range of calibration allows to define the quantity of anti-Rituximab antibodies of each patient samples expressed in  $ng/mL$ .

### REAGENTS

3 reagent families :

Color	Rituximab reagents	anti-Rituximab antibodies reagents	Common reagents
cap of vials	Blue	Yellow	Green, White, Black or Purple
microwells	Blue	Yellow	-

## A) Specific reagents for Rituximab determination

Strips of individual breakaway blue wells coated with anti-Rituximab antibody (anti-idiotypic). <b>MP</b>	6 strips
5 vials of « Rituximab » Standards, (µg/mL). <u>Ready to use.</u> The vials can be reused several times. <b>The quantity of Rituximab is indicated on the vial label.</b> <b>Blue caps</b> <b>RIT</b> <b>CAL</b> <b>n</b>	5 x 1.5mL
«Positive control - Rituximab», (µg/mL). <u>To dilute.</u> The vials can be reused several times. <b>The quantity of Rituximab is indicated on the vial label.</b> <b>Blue cap</b> <b>RIT</b> <b>CONTROL</b> <b>+</b>	1 x 250µL
Biotinylated antibody vial. <u>Ready to use.</u> <b>Blue cap</b> <b>RIT</b> <b>Ab</b> <b>BIOT</b>	1 x 7.5mL

## B) Specific reagents for anti-Rituximab antibodies determination

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

## C) Common reagents

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

#### a. Samples

##### - Rituximab determination

- Dilute to 1/1001 in TDL  
Ex : 3µL sample + 3mL TDL  
If a micropipette is not available to take 3µL, a serial dilution of the sample should be done. In a first time make a 1/101 dilution of the sample (10µL + 1mL of TDL). In a second time, make a 1/10 dilution of the 1/101 dilution (100µL of the 1/101 dilution + 900µL TDL).

- Vortex vigorously.

##### - Anti-Rituximab determination

- Dilute to 1/2 in TDL  
Ex : 100µL sample + 100µL TDL  
- Vortex vigorously.

#### b. Positive controls

##### - Rituximab determination

- Dilute to 1/1001 in TDL  
Ex : 3µL positive control + 3mL TDL  
If a micropipette is not available to take 3µL, a serial dilution of the sample should be done. In a first time make a 1/101 dilution of the sample (10µL + 1mL of TDL). In a second time, make a 1/10 dilution of the 1/101 dilution (100µL of the 1/101 dilution + 900µL TDL).

- Vortex vigorously.

##### - anti-Rituximab determination

- Dilute to 1/2 in TDL  
Ex : 100µL positive control + 100µL TDL  
- Vortex vigorously.

### 3. Use of ready-to-use biotinylated antibody.

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



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

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

#### 5. 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 Rituximab** () has been developed according to EC regulation n°1272/2008 relating to the classification, labelling and packaging of substances and mixtures.

- **LISA-TRACKER Duo Rituximab** () 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 Rituximab then dosage of anti-Rituximab.

#### 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.

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), in the dark.

#### 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 Rituximab

- 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 a degree 4 polynomial standard curve or a 4PL standard 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 Rituximab 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-Rituximab

- 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 (ng/mL) along the abscissa (X axis) and the corresponding OD values along the ordinate (Y axis).
- The anti-Rituximab 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 154 healthy patient samples.

Limit of detection Rituximab	Limit of detection Anti-Rituximab
2 µg/mL > 99 <sup>th</sup> percentile	5 ng/mL > 99 <sup>th</sup> percentile

### Assay range

Rituximab	Anti-Rituximab
2 µg/mL - 50 µg/mL	5 ng/mL - 100 ng/mL

### Interfering Substances Study

**LISA-TRACKER Duo Rituximab** () 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)		Inter-runs (4 tests 4 different assays)	
	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)
Rituximab (µg/mL)	48.1	7.6	48.8	4.6
	28.0	4.9	28.1	7.4
	9.6	4.0	10.7	9.8
	3.8	1.4	4.0	5.1
Anti-Rituximab (ng/mL)	98	1.4	96	6.0
	53	1.4	47	10.6
	22	6.8	23	4.5
	12	9.1	12	12.8

## LIMITS

Sera of patients treated with Ibritumomab tiuxetan or Tositumomab, 2 others anti-CD20, may cross-react with Rituximab test.

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 Rituximab** or **anti-Rituximab** controls () , Cat.n: LTR 002-PC or LTR 003-PC, contain **Rituximab** or antibodies directed against **Rituximab**. These materials are to be assayed in the same manner as the unknown samples.

## REFERENCES

**Cartron G & al.** Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use : Thought for the best use ? Critical Reviews in Oncology/Hematology 62 (2007) 43-52.

**Dieter Huhn & al.** Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood, 2001; 98: 1326-1331.

**Ferdinand Breedveld & al.** Rituximab pharmacokinetics in patients with Rheumatoid Arthritis: B-Cell levels do not correlate with clinical response. Journal of Clinical Pharmacology, 2007; 47:1119-1128.

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

**Magda Nakou & al.** Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. Arthritis Research & Therapy 2009, 11:R131.

**Mark S. Cragg & al.** A new anti-idiotypic antibody capable of binding rituximab on the surface of lymphoma cells. Blood. 2004;104:2540-2542.

**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.

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

**R. John Looney & al.** B Cell depletion as a novel treatment for Systemic Lupus Erythematosus : a Phase I/II dose-escalation trial of Rituximab. Arthritis & Rheumatism.Vol. 50, No. 8, August 2004, 2580-2589.

**Saito K & al.** Extremely high titer of anti-human chimeric antibody following re-treatment with rituximab in a patient with active systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford). 2005 Nov;44(11):1462-4. Epub 2005 Aug 16.

**Schmidt E & al.** Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus. Clinical Immunology, 2009; 132: 334-341.

**Stanley B. Cohen & al for the REFLEX Trial Group.** Rituximab for Rheumatoid Arthritis Refractory to Anti-Tumor Necrosis Factor. Arthritis Rheum. 2006 Sep;54(9):2793-806.

**Thurlings RM & al.** Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimaeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2010; 69: 409-412.

**Tobinai K & al.** Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) in relapsed B-cell lymphoma. Annals of Oncology 1998; 9: 527-534.

**SUMMARY OF METHOD**

**A) Sample Dilution**

<b>Rituximab</b>	<b>Anti-Rituximab</b>
1/1001	1/2

**B) Positive Control Dilution**

<b>Rituximab</b>	<b>Anti-Rituximab</b>
1/1001	1/2

**C) Procedure**

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

	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

Rituximab assay

anti-Rituximab assay

**b. 2 sera for Rituximab and anti-Rituximab**

	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										

Rituximab assay	anti-Rituximab assay
-----------------	----------------------

**SYMBOLS USED**



EC Declaration of conformity



ELISA Test



Catalogue number



Lot Number



Expiry Date



*In Vitro* Diagnostic Device



Manufacturer



Number of test



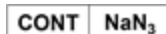
Consult Instructions



Temperature limitation



Biological hazard



Contains sodium azide



Reconstitute with



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)