

# LISA TRACKER

## Duo Trastuzumab

Français


REF

LTTR 005

2 x  
48


42 déterminations

### DEFINITION

Le coffret **LISA-TRACKER Duo Trastuzumab** () permet le dosage par méthode ELISA du Trastuzumab (anti-HER2) ainsi que des anticorps anti-Trastuzumab, 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

Le Trastuzumab est un anticorps monoclonal recombinant humanisé dirigé contre le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2), facteur de prolifération cellulaire. Le Trastuzumab est indiqué dans le traitement du cancer du sein métastatique avec surexpression tumorale HER2 et du cancer gastrique métastatique. Il inhibe la prolifération des cellules tumorales humaines qui surexpriment HER2. Au cours du traitement, certains patients peuvent développer des anticorps dirigés contre le Trastuzumab.

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

L'antigène HER2 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 Trastuzumab, celui-ci va se fixer à la protéine HER2 adsorbée. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non-fixés.

- On ajoute ensuite un antigène HER2 biotinylé. Après incubation, un deuxième lavage permet d'éliminer l'excès d'antigène biotinylé.

- Ensuite, la streptavidine conjuguée à la peroxydase de Raifort est ajoutée. Elle se fixe au complexe « HER2 / Trastuzumab / HER2 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 Trastuzumab 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 Trastuzumab (µg/ml) présente dans l'échantillon.

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

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

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

## COMPOSITION DU COFFRET

Le coffret est composé de 3 familles de réactifs :

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

### A) Réactifs spécifiques au dosage du Trastuzumab

Une microplaque de 6 barrettes bleues amovibles, sensibilisée par du HER2 humain. <b>MP</b>	6 barrettes
Cinq flacons « Etalon - Trastuzumab », (µg/ml). <u>Prêts à l'emploi.</u> <b>TRA CAL n</b> <u>Ils peuvent être utilisés plusieurs fois.</u> <b>La quantité de Trastuzumab est indiquée sur le flacon.</b> <b>Bouchons bleus.</b>	5 x 1,5ml
Flacon « contrôle positif - Trastuzumab », (µg/ml). <u>A diluer.</u> <b>TRA CONTROL +</b> <u>Il peut être utilisé plusieurs fois.</u> <b>Les valeurs attendues (µg/ml) sont indiquées sur le flacon.</b> <b>Bouchon bleu.</b>	1 x 250µl
Flacon de HER2 biotinylé. <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>TRA Ab BIOT</b> <b>Bouchon bleu.</b>	1 x 7,5ml

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

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

## C) Réactifs communs

Flacon de streptavidine conjuguée à la peroxydase. <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>CONJ HRP</b> <b>Bouchon vert.</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 WASH 10x</b>	1 x 100ml
Flacon de Substrat (TMB). <u>Prêt à l'emploi.</u> <b>SUBS TMB</b> <b>Bouchon noir.</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>SOLN STOP</b> <b>Bouchon violet.</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 Trastuzumab** : les diluer au 1/1001 en tampon TDL (exemple : 5µl + 5ml de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.
- **Dosage des anticorps anti-Trastuzumab** : les diluer au 1/2 en tampon TDL (exemple : 130µl + 130µl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

##### b) Contrôles positifs

- **Dosage du Trastuzumab** : le diluer au 1/1001 en tampon TDL (exemple : 5µl + 5ml de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

- **Dosage des anticorps anti-Trastuzumab** : le diluer au 1/2 en tampon TDL (exemple : 130µl + 130µl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

### 3. Utilisation de HER2 biotinylé ou de l'anticorps biotinylé - 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 Trastuzumab** () 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 Trastuzumab** () 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 Trastuzumab puis dosage des anti-Trastuzumab.

### 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 HER2 biotinylé ou de l'anticorps biotinylé

Déposer 100µl de HER2 biotinylé ou d'anticorps biotinylé spécifique, prêts 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 SA-HRP

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 Trastuzumab

- 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 ou de type 4PL* en portant en abscisse (axe des X) la quantité de Trastuzumab ( $\mu\text{g/ml}$ ) de chaque étalon et, en ordonnée (axe des Y), la DO correspondante.
- La quantité de Trastuzumab 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 Trastuzumab. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution.

### B) Dosage des anticorps anti-Trastuzumab

- 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 une *courbe d'étalonnage polynomiale* en portant en abscisse (axe des X) la quantité d'anticorps anti-Trastuzumab ( $\text{ng/ml}$ ) de chaque étalon et, en ordonnée (axe des Y), la DO correspondante.
- La quantité d'anticorps anti-Trastuzumab 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-Trastuzumab. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution.

## CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES DES DOSAGES

### Limite de détection


Estimée à partir de 150 échantillons issus d'une population d'« individus sains ».

Limite de détection Trastuzumab	Limite de détection anti-Trastuzumab
10 $\mu\text{g/ml}$ 99 <sup>ème</sup> percentile	10 $\text{ng/ml}$ > 99 <sup>ème</sup> percentile

### Plage de mesure

Trastuzumab	anti-Trastuzumab
10 $\mu\text{g/ml}$ – 200 $\mu\text{g/ml}$	10 $\text{ng/ml}$ - 120 $\text{ng/ml}$

## Etude des substances interférentes

LISA-TRACKER Duo Trastuzumab () 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 cancers. Aucune interférence n'a été détectée.

### Précision


Paramètres	Intra-essai (30 tests dans le même essai)		Inter-essais (9 essais différents)	
	Valeur moyenne	CV (%)	Valeur moyenne	CV (%)
Trastuzumab ( $\mu\text{g/ml}$ )	39	13,8 %	46	11,5 %
	100	7,9 %	103	9,5 %
	140	9,7 %	157	11,7 %
anti-Trastuzumab ( $\text{ng/ml}$ )	30	12,8 %	35	17,2 %
	40	7,7 %	50	13,9 %
	77	7,4 %	77	11,7 %

### LIMITES

Le dosage du Trastuzumab montre une réaction croisée vis-à-vis de sérums de patients traités par le Pertuzumab qui est un autre anticorps anti-HER2.

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

## BIBLIOGRAPHIE

**Baselga J. & al.**, Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer, *J. Clin. Oncol.*, 1996, 14, p.737-744.

**Baselga J. & al.**, Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for metastatic Breast Cancer, *The New England Journal of Medicine*, 2012, 366, p.109-119.

**Boekhout A. & al.** Trastuzumab, the oncologist, 2011, 16, p.800-810.

**Damen C. & al.**, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of Trastuzumab in human serum and plasma, *Analytical Biochemistry*, 2009, 391, p.114-120.

**Goldenberg MM & al.**, Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer, *Clin. Ther.*, 1999, 21, p.309-318.

**Jamieson D. & al.**, Development and validation of cell-based ELISA for the quantification of Trastuzumab in human plasma, *Journal of immunological methods*, 2009, 345, p. 106-111.

**Levêque & al.**, *Clinical Pharmacology of Trastuzumab, Current clinical Pharmacology*, 2008, 3, 51-55.

**Maple L. & al.**, Development and validation of ELISA for Herceptin detection in human serum, *Journal of immunological methods*, 2004, 295, p. 169-182.

**Molina MA & al.**, Trastuzumab (Herceptin), a humanized Anti-HER2 Receptor Monoclonal Antibody, Inhibits Basal and Activated HER2 Ectodomain Cleavage in Breast Cancer Cells, *Cancer Research*, 2001, 61, p. 4744-4749.

**Pegram MD & al.**, HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy, *Breast Cancer Res Treat.*, 1998, 52, p.65-77.

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

**Sarup JC & al.**, Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth, *Growth Reg.*, 1991, 1, p.72-82.

**Slamon DJ. & al.**, Human Breast Cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science*, 1987, 235, p.177-182.

## SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

### A) Dilution des échantillons :

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

### B) Dilution des contrôles positifs :

Dosage du Trastuzumab	Dosage des anticorps anti-Trastuzumab
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
HER2 biotinylé ou Anticorps secondaire biotinylé	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

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

D) Exemples de configuration de dosage :

a) 42 sérums à doser en Trastuzumab et anti-Trastuzumab

	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 Trastuzumab

Dosage anti-Trastuzumab

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

	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 Trastuzumab      Dosage anti-Trastuzumab

c) 42 sérums à doser en anti-Trastuzumab

	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-Trastuzumab

INDEX DES SYMBOLES



Déclaration de conformité CE



Test ELISA



Référence produit



Numéro de Lot



Date d'expiration



Dispositif de diagnostic *In vitro*



Fabricant



Nombre de tests



Consulter les instructions d'utilisation



Limites de température



Risque biologique



Contient de l'azide de sodium



A reconstituer



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

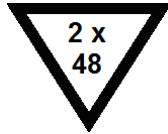
E-mail : [support@theradiag.com](mailto:support@theradiag.com)  
Internet : [www.theradiag.com](http://www.theradiag.com)






# LISA TRACKER

## Duo Trastuzumab


**REF** LTTR 005

**English**

### DEFINITION

**LISA-TRACKER Duo Trastuzumab** () is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for the quantitative determination of Trastuzumab (anti-HER2) and anti-Trastuzumab antibodies in human serum samples. These tests can be separately or simultaneously done by following the standardized assay protocol.

### DIAGNOSTIC VALUE

Trastuzumab is a humanized monoclonal antibody that produces proliferation cell inhibition by inhibiting HER2 (Human epidermal growth factor receptor-2). It is indicated for the treatment of metastatic breast cancer and metastatic gastric cancer whose tumors overexpress HER2. It permits to stop the action of the HER2 responsible for the cell proliferation. During the treatment, some patients can develop antibodies against Trastuzumab.

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

HER2 is coated onto a polystyrene microtiter plate (6 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the HER2 coated well, which allows to bind. After incubation, unbound proteins are removed by washing.
- Biotinylated HER2 is added. After incubation, unbound biotinylated HER2 are removed by washing.
- Then horseradish peroxidase labelled streptavidin is added. The streptavidin binds to the complex formed « HER2 / Trastuzumab / Biotinylated HER2 ». 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' tetramethylbenzidin). The colour intensity is proportional to the amount of Trastuzumab.
- 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 Trastuzumab of each patient sample expressed in µg/mL.

#### B. Dosage of anti-Trastuzumab

The Trastuzumab 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 Trastuzumab 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 Trastuzumab. 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-Trastuzumab 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-Trastuzumab antibodies of each patient samples expressed in ng/mL.

### REAGENTS

3 reagent families :

Color	Trastuzumab reagents	anti-Trastuzumab antibodies reagents	Common reagents
cap of vials	Blue	white	Green, White, Black or Purple
microwells	Blue	colourless	-

## A) Specific reagents for the Trastuzumab determination

Strips of individual breakaway blue wells coated with HER2. <b>MP</b>	6 strips
5 vials of « Trastuzumab » Standards, (µg/mL). <u>Ready to use.</u> <u>The vials can be reused several times.</u> <b>The quantity of Trastuzumab is indicated on the vial label.</b> <b>Blue caps</b> <b>TRA CAL n</b>	5 x 1,5mL
«Positive control - Trastuzumab», (µg/mL). <u>To dilute.</u> <u>The vials can be reused several times.</u> <b>The quantity of Trastuzumab is indicated on the vial label.</b> <b>Blue cap</b> <b>TRA CONTROL +</b>	1 x 250µL
Biotinylated HER2 vial. <u>Ready to use.</u> <b>Blue cap</b> <b>TRA Ab BIOT</b>	1 x 7,5mL

## B) Specific reagents for the anti-Trastuzumab antibodies determination

Strips of individual breakaway colourless wells coated with Trastuzumab. <b>MP</b>	6 strips
5 vials of « anti-Trastuzumab » Standards, (ng/mL). <u>Ready to use.</u> <u>The vials can be reused several times.</u> <b>The quantity of anti-Trastuzumab is indicated on the vial label.</b> <b>White caps</b> <b>A-TRA CAL n</b>	5 x 1,5mL
« Positive control – anti-Trastuzumab », (ng/mL). <u>To dilute.</u> <u>The vial can be reused several times.</u> <b>The quantity of anti-Trastuzumab is indicated on the vial label.</b> <b>White cap</b> <b>A-TRA CONTROL +</b>	1 x 1mL
Biotinylated antibody vial. <u>Ready to use.</u> <b>White cap</b> <b>A-TRA Ab BIOT</b>	1 x 7,5mL

## C) Common reagents

HRP labelled Streptavidin. <u>Ready to use.</u> <b>Green cap</b> <b>CONJ 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 WASH 10x</b>	1 x 100mL
Substrate (TMB). <u>Ready to use.</u> <b>Black cap</b> <b>SUBS 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 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

##### - Trastuzumab determination

- Dilute to 1/1001 in TDL
- Ex : 5µL sample + 5mL TDL
- Vortex vigorously.

##### - Anti-Trastuzumab determination

- Dilute to 1/2 in TDL
- Ex : 130µL sample + 130µL TDL
- Vortex vigorously.

#### b. Positive controls

##### - Trastuzumab determination

- Dilute to 1/1001 in TDL
- Ex : 5µL positive control + 5mL TDL
- Vortex vigorously.

##### - anti-Trastuzumab determination

- Dilute to 1/2 in TDL
- Ex : 130µL positive control + 130µL TDL
- Vortex vigorously.

### 3. Use of ready-to-use biotinylated HER2 or 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 Trastuzumab** () has been developed according to EC regulation n°1272/2008 relating to the classification, labelling and packaging of substances and mixtures.

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

### 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 HER2 or biotinylated antibody

Add 100µL of **specific** biotinylated HER2 or biotinylated antibody 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 Trastuzumab

- 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 *polynomial standard curve or a 4PL* with 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 Trastuzumab 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-Trastuzumab

- 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 *polynomial standard curve* with 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-Trastuzumab 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 150 samples of healthy patient samples.

Limit of detection Trastuzumab	Limit of detection anti-Trastuzumab
10 µg/mL 99 <sup>th</sup> percentile	10 ng/mL >99 <sup>th</sup> percentile

### Assay range

Trastuzumab	anti-Trastuzumab
10 µg/mL - 200 µg/mL	10 ng/ml - 120 ng/mL

### Interfering Substances Study

LISA-TRACKER Duo Trastuzumab (Theradiag) 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 (30 tests in a same assay)		Inter-runs (9 different assays)	
	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)
Trastuzumab (µg/mL)	39	13,8 %	46	11,5 %
	100	7,9 %	103	9,5 %
	140	9,7 %	157	11,7 %
anti- Trastuzumab (ng/mL)	30	12,8 %	35	17,2 %
	40	7,7 %	50	13,9 %
	77	7,4 %	77	11,7 %

## LIMITS

The dosage of Trastuzumab shows cross reactivity with serums of patients treated with the Pertuzumab which is another anti-HER2 antibody.

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**

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

## REFERENCES

**Baselga J. & al.**, Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer, *J. Clin. Oncol.*, 1996, 14, p.737-744.

**Baselga J. & al.**, Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for metastatic Breast Cancer, *The New England Journal of Medicine*, 2012, 366, p.109-119.

**Boekhout A. & al.** Trastuzumab, the oncologist, 2011, 16, p.800-810.

**Damen C. & al.**, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of Trastuzumab in human serum and plasma, *Analytical Biochemistry*, 2009, 391, p.114-120.

**Goldenberg MM & al.**, Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer, *Clin. Ther.*, 1999, 21, p.309-318.

**Jamieson D. & al.**, Development and validation of cell-based ELISA for the quantification of Trastuzumab in human plasma, *Journal of immunological methods*, 2009, 345, p. 106-111.

**Levêque & al.**, Clinical Pharmacology of Trastuzumab, *Current clinical Pharmacology*, 2008, 3, 51-55.

**Maple L. & al.**, Development and validation of ELISA for Herceptin detection in human serum, *Journal of immunological methods*, 2004, 295, p. 169-182.

**Molina MA & al.**, Trastuzumab (Herceptin), a humanized Anti-HER2 Receptor Monoclonal Antibody, Inhibits Basal and Activated HER2 Ectodomain Cleavage in Breast Cancer Cells, *Cancer Research*, 2001, 61, p. 4744-4749.

**Pegram MD & al.**, HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy, *Breast Cancer Res Treat.*, 1998, 52, p.65-77.

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

**Sarup JC & al.**, Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth, *Growth Reg.*, 1991, 1, p.72-82.

**Slamon DJ. & al.**, Human Breast Cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science*, 1987, 235, p.177-182.

## SUMMARY OF METHOD

### A) Sample Dilution

Trastuzumab	anti-Trastuzumab
1/1001	1/2

### B) Positive Control Dilution

Trastuzumab	anti-Trastuzumab
1/1001	1/2

### C) Procedure

Reagents	Procedure
Standards	100µL / wells
Diluted positive controls	
Diluted samples	
Incubation	1 h at room temperature
Washing*	Wash 3 times with TDL buffer : 3 x 300µL / wells
Biotinylated HER2 or biotinylated antibody	100µL / wells ( <b>specific reagents</b> )
Incubation	1 h at room temperature
Washing*	Wash 3 times with TDL buffer : 3 x 300µL / wells
HRP-Streptavidin	100µL / wells
Incubation	30 minutes at room temperature
Washing*	Wash 3 times with TDL buffer : 3 x 300µL / wells
Substrate (TMB)	100µL / wells
Incubation	15 minutes at room temperature. Protect from light.
Stop solution	100µL / wells

\* 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 Trastuzumab and anti-Trastuzumab**

	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 38	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22	Sera 30	Sera 38
<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

Trastuzumab assay

anti-Trastuzumab assay

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

	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										

Trastuzumab assay      anti-Trastuzumab assay

c. 26 sera for anti-Trastuzumab determination

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19								
<b>B</b>	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20								
<b>C</b>	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21								
<b>D</b>	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22								
<b>E</b>	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23								
<b>F</b>	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24								
<b>G</b>	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25								
<b>H</b>	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26								

anti-Trastuzumab 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)