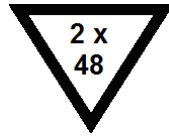



LISA TRACKER

Duo Vedolizumab

REF LTV 005**42 déterminations****Français**

DEFINITION


Le coffret **LISA-TRACKER Duo Vedolizumab** () permet le dosage par méthode ELISA du Vedolizumab (anti-intégrine $\alpha 4\beta 7$) ainsi que des anticorps anti-Vedolizumab, 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 Vedolizumab est un anticorps monoclonal recombinant humanisé dirigé contre l'intégrine $\alpha 4\beta 7$. Il est indiqué pour le traitement des maladies inflammatoires du tube digestif, particulièrement la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC) active.

Il permet de bloquer l'action de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, responsable de l'acheminement des cellules de l'immunité (les lymphocytes) au niveau du tube digestif et ainsi limite l'inflammation intestinale qui apparaît lors de ces pathologies.

Au cours du traitement, certains patients peuvent développer des anticorps dirigés contre le Vedolizumab.

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

L'antigène intégrine $\alpha 4\beta 7$ humaine 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 Vedolizumab, celui-ci va se fixer à l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ adsorbée. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non-fixés.

- On ajoute ensuite un anticorps spécifique anti-vedolizumab biotinyllé. 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 « Intégrine / Vedolizumab / anti-vedolizumab biotinyllé » 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 Vedolizumab présente dans l'échantillon.

- L'addition de H_2SO_4 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 Vedolizumab ($\mu g/ml$) présente dans l'échantillon.

B) Dosage des anticorps anti-Vedolizumab

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

- On ajoute ensuite du Vedolizumab biotinyllé. 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 « Vedolizumab adsorbé / anticorps anti-Vedolizumab / Vedolizumab biotinyllé » 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-Vedolizumab présente dans l'échantillon.

- L'addition de H_2SO_4 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-Vedolizumab (ng/ml) présente dans l'échantillon.

COMPOSITION DU COFFRET

Le coffret est composé de 3 familles de réactifs :

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

A) Réactifs spécifiques au dosage du Vedolizumab

Une microplaque de 6 barrettes bleues amovibles, sensibilisée par de l' intégrine $\alpha 4\beta 7$ humaine. MP	6 barrettes
Cinq flacons « Etalon - Vedolizumab », ($\mu\text{g/ml}$). <u>Prêts à l'emploi.</u> VED CAL n Ils peuvent être utilisés plusieurs fois. La quantité de Vedolizumab est indiquée sur le flacon. Bouchons bleus.	5 x 1,5ml
Flacon « contrôle positif - Vedolizumab », ($\mu\text{g/ml}$). <u>A diluer.</u> VED CONTROL + Il peut être utilisé plusieurs fois. Les valeurs attendues ($\mu\text{g/ml}$) sont indiquées sur le flacon. Bouchon bleu.	1 x 250 μl
Flacon d'anticorps biotinylé. <u>Prêt à l'emploi.</u> VED Ab BIOT Bouchon bleu.	1 x 7,5ml

B) Réactifs spécifiques au dosage des anticorps anti-Vedolizumab

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

C) Réactifs communs

Flacon de streptavidine conjuguée à la peroxydase. <u>Prêt à l'emploi.</u> CONJ HRP Bouchon vert.	1 x 12ml
Flacon de Tampon Phosphate-Tween pH 7,2 (concentré 10x) - A reconstituer en eau distillée. Bouchon blanc. BUF WASH 10x	1 x 100ml
Flacon de Substrat (TMB). <u>Prêt à l'emploi.</u> SUBS TMB Bouchon noir.	1 x 12ml
Flacon de solution d'arrêt H_2SO_4 (0.25 N). <u>Prêt à l'emploi.</u> SOLN STOP Bouchon violet.	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 sensibilisés 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 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 Vedolizumab** : les diluer au 1/401 en tampon TDL (exemple : 5 μl + 2ml de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.
- **Dosage des anticorps anti-Vedolizumab** : les diluer au 1/2 en tampon TDL (exemple : 130 μl + 130 μl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

b) Contrôles positifs

- **Dosage du Vedolizumab** : le diluer au 1/401 en tampon TDL (exemple : 5 μl + 2ml de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

- **Dosage des anticorps anti-Vedolizumab** : le diluer au 1/2 en tampon TDL (exemple : 130µl + 130µl 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 Vedolizumab** () a été élaboré dans le respect des directives européennes 67/548/CEE et 1999/45/CE en ce qui concerne la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses.

- **LISA-TRACKER Duo Vedolizumab** () 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 Vedolizumab puis dosage des anti-Vedolizumab.

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 H₂SO₄ (0.25 M) 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 Vedolizumab

- 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 Vedolizumab ($\mu\text{g/ml}$) de chaque étalon et, en ordonnée (axe des Y), la DO correspondante.
- La quantité de Vedolizumab 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 Vedolizumab. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution.

B) Dosage des anticorps anti-Vedolizumab

- La densité optique (DO) de l'étalon 1 doit être au moins égale à 0,8.
- La valeur (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-Vedolizumab (ng/ml) de chaque étalon et, en ordonnée (axe des Y), la DO correspondante.
- La quantité d'anticorps anti-Vedolizumab 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-Vedolizumab. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution.

CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES DES DOSAGES

Limite de détection

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


- 149 échantillons pour le Vedolizumab.
- 152 échantillons pour l'anti- Vedolizumab.

Limite de détection Vedolizumab	Limite de détection anti-Vedolizumab
2 $\mu\text{g/ml}$ 98 ^{ème} percentile	35 ng/ml >99 ^{ème} percentile

Plage de mesure

Vedolizumab	anti-Vedolizumab
2 $\mu\text{g/ml}$ – 60 $\mu\text{g/ml}$	35 ng/ml - 500 ng/ml


Etude des substances interférentes

LISA-TRACKER Duo Vedolizumab () 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 inflammatoires chroniques de l'intestin. Aucune interférence n'a été détectée.

Précision

Paramètres	Intra-essai (30 tests dans le même essai)		Inter-essais (20 essais différents paramètre Vedolizumab) (11 essais différents paramètre anti-Vedolizumab)	
	Valeur moyenne	CV (%)	Valeur moyenne	CV (%)
Vedolizumab ($\mu\text{g/ml}$)	8,4	8,1 %	4,3	15,2 %
	32,9	16,6 %	29,4	13,2 %
	54,5	7,5 %	46,5	12,4 %
anti-Vedolizumab (ng/ml)	54	15,7 %	61	14,7 %
	230	14,2 %	244	16,2 %
	399	10,5 %	360	11,7 %

CONTROLE DE QUALITE

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

BIBLIOGRAPHIE

Cherry LN and al., *Vedolizumab: an $\alpha 4\beta 7$ integrin antagonist for ulcerative colitis and Crohn's disease*, Therapeutic Advances in Chronic Disease, Vol.6(5), 224-233, 2015.

Feagan BG and al., *Induction and Maintenance Therapy with Vedolizumab, a novel biologic therapy for ulcerative colitis*, Gastroenterology & Hepatology, 10, Issue 1, 2014.

Feagan BG and al., *Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis*, The new England journal of medicine, 369, 699-710, 2013.

McLean LP and al., *Vedolizumab for the treatment of ulcerative colitis and Crohn's disease*, Immunotherapy, 4, 883-898, 2012.

Petrovic A. and al., *LPAM ($\alpha 4\beta 7$ integrin) is an important homing integrin on alloreactive T cells in the development of intestinal graft-versus-host disease*, Blood, 103, 4, 2004.

Rosario M. and al., *Population pharmacokinetics-pharmacodynamics of vedolizumab in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease*, Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 2015.

Sandborn WJ. And al., *Vedolizumab as induction and maintenance therapy for crohn's disease*, The new England journal of medicine, 369, 711-721, 2013.

Soler D. and al., *The binding specificity and selective antagonism of vedolizumab, an anti- $\alpha 4\beta 7$ integrin therapeutic antibody in development for inflammatory bowel diseases*, The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 330, 864-875, 2009.

Yu Jin and al., *Meta-analysis of the effectiveness and safety of vedolizumab for ulcerative colitis*, World Journal of Gastroenterology, 21, issue 20, 2015.

A) Dilution des échantillons :

Dosage du Vedolizumab	Dosage des anticorps anti-Vedolizumab
au 1/401	au 1/2

B) Dilution des contrôles positifs :

Dosage du Vedolizumab	Dosage des anticorps anti-Vedolizumab
au 1/401	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 (réactifs spécifiques)
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 Vedolizumab et anti-Vedolizumab

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	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	Etalon 4	Sérum 4	Sérum 12	Sérum 20	Sérum 28	Sérum 36	Etalon 4	Sérum 4	Sérum 12	Sérum 20	Sérum 28	Sérum 36
C	Etalon 3	Sérum 5	Sérum 13	Sérum 21	Sérum 29	Sérum 37	Etalon 3	Sérum 5	Sérum 13	Sérum 21	Sérum 29	Sérum 37
D	Etalon 2	Sérum 6	Sérum 14	Sérum 22	Sérum 30	Sérum 38	Etalon 2	Sérum 6	Sérum 14	Sérum 22	Sérum 30	Sérum 38
E	Etalon 1	Sérum 7	Sérum 15	Sérum 23	Sérum 31	Sérum 39	Etalon 1	Sérum 7	Sérum 15	Sérum 23	Sérum 31	Sérum 39
F	C+	Sérum 8	Sérum 16	Sérum 24	Sérum 32	Sérum 40	C+	Sérum 8	Sérum 16	Sérum 24	Sérum 32	Sérum 40
G	Sérum 1	Sérum 9	Sérum 17	Sérum 25	Sérum 33	Sérum 41	Sérum 1	Sérum 9	Sérum 17	Sérum 25	Sérum 33	Sérum 41
H	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 Vedolizumab

Dosage anti-Vedolizumab

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

	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 Vedolizumab

Dosage anti-Vedolizumab

c) 26 sérums à doser en anti-Vedolizumab

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

Dosage anti-Vedolizumab

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



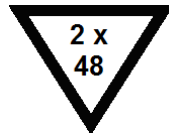
14 rue Ambroise Croizat
CS 90136 CROISSY BEAUBOURG
77435 MARNE LA VALLEE CX2
France

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


E-mail : support@theradiag.com
Internet : www.theradiag.com

LISA TRACKER

Duo Vedolizumab

REF LTV 005

42 determinations
English

DEFINITION


LISA-TRACKER Duo Vedolizumab () is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for the quantitative determination of Vedolizumab (anti- $\alpha 4\beta 7$ integrin) and anti-Vedolizumab antibodies in human serum samples. These quantitative tests can be separately or simultaneously done by following the standardized assay protocol.

DIAGNOSTIC VALUE

Vedolizumab is a humanized monoclonal antibody against $\alpha 4\beta 7$ integrin. It's recommended for the treatment of Inflammatory bowel disease, especially ulcerative colitis and Crohn's disease.

It binds to $\alpha 4\beta 7$ integrin, responsible of the immune cells (lymphocytes) attraction in the digestive tract and limits the intestinal inflammation which appears during these pathologies.

During the treatment, some patients can develop antibodies against Vedolizumab.

LISA-TRACKER Duo Vedolizumab () allows the detection of 2 parameters: Vedolizumab and anti-Vedolizumab 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 serum or on plasma.
- 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 Vedolizumab

The $\alpha 4\beta 7$ integrin is coated onto a polystyrene microtiter plate (6 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the $\alpha 4\beta 7$ integrin coated well, which allows to bind. After incubation, unbound proteins are removed by washing.
- Biotinylated antibody anti-vedolizumab 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-vedolizumab 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 Vedolizumab.
- 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 Vedolizumab of each patient samples expressed in $\mu g/mL$.

B. Dosage of anti-Vedolizumab

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

REAGENTS

3 reagent families :

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

A) Specific reagents for the Vedolizumab determination

Strips of individual breakaway blue wells coated with human $\alpha 4\beta 7$ integrin. MP	6 strips
5 vials of « Vedolizumab » Standards, ($\mu\text{g/mL}$). <u>Ready to use.</u> <u>The vials can be reused several times.</u> The quantity of Vedolizumab is indicated on the vial label. Blue caps VED CAL n	5 x 1.5mL
«Positive control - Vedolizumab», ($\mu\text{g/mL}$). <u>To dilute.</u> VED CONTROL + <u>The vials can be reused several times.</u> The quantity of Vedolizumab is indicated on the vial label. Blue cap	1 x 250 μL
Biotinylated antibody vial. <u>Ready to use.</u> VED Ab BIOT Blue cap	1 x 7.5mL

B) Specific reagents for the anti-Vedolizumab antibodies determination

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

C) Common reagents

HRP labelled Streptavidin. <u>Ready to use.</u> CONJ HRP Green cap	1 x 12mL
Phosphate-Tween Buffer pH 7,2 (10x) – <u>To reconstitute with distilled water.</u> White cap BUF WASH 10x	1 x 100mL
Substrate (TMB). <u>Ready to use.</u> SUBS TMB Black cap	1 x 12mL
Stop solution - H_2SO_4 (0.25 N). <u>Ready to use.</u> SOLN STOP Purple cap	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 $+2^\circ\text{C}/+8^\circ\text{C}$ in their own package.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- Store unused strips into their plastic bag with the desiccant.
- Store all components immediately after use again at $+2^\circ\text{C}/+8^\circ\text{C}$.

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 $+2^\circ\text{C}/+8^\circ\text{C}$ (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 $+37^\circ\text{C}$ for 15 minutes before use.

2. Preparation of samples and positive controls

a. Samples

- Vedolizumab determination

- Dilute to 1/401 in TDL
- Ex : 5 μL sample + 2mL TDL

- Vortex vigorously.

- Anti-Vedolizumab determination

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

b. Positive controls

- Vedolizumab determination

- Dilute to 1/401 in TDL
- Ex : 5 μL sample + 2mL TDL

- Vortex vigorously.

- anti-Vedolizumab determination

- Dilute to 1/2 in TDL
- Ex : 130 μL positive control + 130 μL 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 Vedolizumab () has been developed according CE directives 67/548/EEC and 1999/45/EC relating to the classification, packaging and labeling of dangerous preparations.

LISA-TRACKER Duo Vedolizumab () has been optimized for the use as described 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, unlink 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 Vedolizumab then dosage of anti-Vedolizumab.

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 H₂SO₄ 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 Vedolizumab

- 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*, 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 Vedolizumab 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-Vedolizumab

- 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-Vedolizumab 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.

Limits of detection / threshold values

Estimated on healthy patient population:


- 149 samples for Vedolizumab.
- 152 samples for anti-Vedolizumab.

Limit of detection Vedolizumab	Limit of detection anti-Vedolizumab
2 µg/mL 98 th percentile	35 ng/mL >99 th percentile

Assay range

Vedolizumab	anti-Vedolizumab
2 µg/mL – 60 µg/mL	35 ng/ml – 500 ng/ml


Interfering Substances Study

LISA-TRACKER Duo Vedolizumab () 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) and on a population of patients' serums presenting inflammatory bowel disease. No interference was detected.

Precision

Parameters	Intra-run (30 tests in a same assay)		Inter-runs (20 different assays for parameter Vedolizumab) (11 different assays for parameter anti-Vedolizumab)	
	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)
Vedolizumab (µg/ml)	8.4	8.1 %	4.3	15.2 %
	32.9	16.6 %	29.4	13.2 %
	54.5	7.5 %	46.5	12.4 %
anti-Vedolizumab (ng/ml)	54	15.7 %	61	14.7 %
	230	14.2 %	244	16.2 %
	399	10.5 %	360	11.7 %

QUALITY CONTROL

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

Cherry LN and al., *Vedolizumab: an α4β7 integrin antagonist for ulcerative colitis and Crohn's disease*, Therapeutic Advances in Chronic Disease, Vol.6(5), 224-233, 2015.

Feagan BG and al., *Induction and Maintenance Therapy with Vedolizumab, a novel biologic therapy for ulcerative colitis*, Gastroenterology & Hepatology, 10, Issue 1, 2014.

Feagan BG and al., *Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis*, The new England journal of medicine, 369, 699-710, 2013.

McLean LP and al., *Vedolizumab for the treatment of ulcerative colitis and Crohn's disease*, Immunotherapy, 4, 883-898, 2012.

Petrovic A. and al., *LPAM (α4β7 integrin) is an important homing integrin on alloreactive T cells in the development of intestinal graft-versus-host disease*, Blood, 103, 4, 2004.

Rosario M. and al., *Population pharmacokinetics-pharmacodynamics of vedolizumab in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease*, Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 2015.

Sandborn WJ. And al., *Vedolizumab as induction and maintenance therapy for crohn's disease*, The new England journal of medicine, 369, 711-721, 2013.

Soler D. and al., *The binding specificity and selective antagonism of vedolizumab, an anti- α4β7integrin therapeutic antibody in development for inflammatory bowel diseases*,The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 330, 864-875, 2009.

Yu Jin and al., *Meta-analysis of the effectiveness and safety of vedolizumab for ulcerative colitis*, World Journal of Gastroenterology, 21, issue 20, 2015.

SUMMARY OF METHOD

A) Sample Dilution

Vedolizumab	anti-Vedolizumab
1/401	1/2

B) Positive Control Dilution

Vedolizumab	anti-Vedolizumab
1/401	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 antibodies	100µL / wells (specific reagents)
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 Vedolizumab and anti-Vedolizumab

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

Vedolizumab assay

anti-Vedolizumab assay

b. 2 sera for Vedolizumab and anti-Vedolizumab

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

Vedolizumab assay

anti-Vedolizumab assay

c. 26 sera for anti-Vedolizumab determination

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

anti-Vedolizumab 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
Internet : www.theradiag.com