Arbeitsanleitung / Manual

*IDK*monitor® Adalimumab total ADA ELISA

Zur in-vitro-Bestimmung der gesamten humanen Antikörper gegen Adalimumab (z. B. HUMIRA®) in EDTA-Plasma und Serum

For the in vitro determination of total human antibodies against adalimumab (e. g. HUMIRA®) in EDTA plasma and serum

Gültig ab / Valid from 2017-08-10

REF K 9651





IVD

CE

Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
Tel.: +49 6251 70190-0 Fax: + 49 6251 849430
e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK 2

2. EINLEITUNG 2

3. INHALT DER TESTPACKUNG 2

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL 3

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN 4

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN 4

Lagerung der Proben 4
Vorbereitung von Proben und Kontrollen 5

7. TESTDURCHFÜHRUNG 5

Testprinzip 5
Pipettierschema 6

8. ERGEBNISSE 7

9. EINSCHRÄNKUNGEN 7

10. QUALITÄTSKONTROLLE 7

Referenzwerte 7

11. TESTCHARAKTERISTIKA 8

Präzision und Reproduzierbarkeit 8
Sensitivität 8
Spezifität 8

12. VORSICHTSMASSNAHMEN 8

13. TECHNISCHE MERKMALE 9

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST 9

15. LITERATUR 10

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von humanen Antikörpern gegen den TNFα-Blocker Adalimumab (z. B. HUMIRA®) auch bei Therapieantikörperspiegel in Serum und EDTA-Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie z. B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder rheumatischen Erkrankungen erfolgt immer häufiger mit anti-TNFα-Antikörpern, welche direkt in die zugrundeliegende Entzündungsreaktion eingreifen.

Die Wirksamkeit der anti-TNFα-Therapie korreliert mit der Menge an Therapieantikörper, die kurz vor der nächsten Medikamentengabe im Serum des Patienten nachweisbar ist, dem sogenannten Talspiegel [1, 2, 3]. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Höhe des Talspiegels, neben der Dosis und Frequenz der anti-TNFα-Behandlung zählen dazu die Krankheitsaktivität, individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und die Bildung von Patientenantikörpern gegen die Therapieantikörper (*anti-drug antibodies*, ADA). Es wird davon ausgegangen, dass die Therapieantikörper durch die ADA funktionell neutralisiert oder schneller ausgeschieden werden [4]. Folgen der ADA-Bildung können daher das langfristige Versagen der Therapie wie auch schwere allergische Reaktionen während der anti-TNFα-Antikörper-Applikation sein [1, 5].

Der *IDK*monitor® Adalimumab total ADA ELISA zum Nachweis der Gesamt-Antikörper gegen Adalimumab (z. B. HUMIRA®) misst freie sowie gebundene Antikörper gegen Adalimumab. Der Test erlaubt auch in Anwesenheit von Adalimumab eine zuverlässige ADA-Bestimmung und eignet sich daher besonders für das Therapiemonitoring, wenn ein Adalimumabspiegel zu erwarten ist. Zusammen mit der Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von Adalimumab bietet der *IDK*monitor® Adalimumab total ADA ELISA dem behandelnden Arzt die Möglichkeit, die Therapie zu begleiten und frühzeitig zu optimieren.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Inhalt	Kit-Komponenten	Menge
K 9651	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 wells
K 9651	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 9651	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidasemarkiert	1 x 600 µl
K 9651	TRACER	Tracerkonzentrat, biotinyliert	1 x 600 µl

Art.-Nr.	Inhalt	Kit-Komponenten	Menge
K 9651	CTRL NEG	Negativ-Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9651	CTRL POS	Positiv-Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9651	CTRL CUT-OFF	Cut-off-Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9651	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 9651	ABBUF	Antikörperverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 10 ml
K 9651	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9651	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 *g*
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung der Kontrollen** siehe Kapitel 6.
- **Vorbereitung des Konjugats und des Tracers:** Das **Tracerkonzentrat (TRACER)** und **Konjugatkonzentrat (CONJ)** werden **wenige Minuten vor Gebrauch 1:12** in **Antikörperverdünnungspuffer (ABBUF)** verdünnt (z. B. 3000 µl Antikörperverdünnungspuffer + 300 µl Tracer + 300 µl Konjugat). **TRACER** und **CONJ** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Tracer** (1:12 verdünnter TRACER) **und Konjugat** (1:12 verdünntes CONJ) **sind nicht stabil und können nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Lagerung der Proben

Unverdünnte Proben können **1 Monat bei -20 °C** gelagert werden.

Verdünnte Proben sind **nicht stabil** und können **nicht gelagert** werden.

Vorbereitung von Proben und Kontrollen

1.	Die Proben werden **1:10** in **Assaypuffer** (ASYBUF) verdünnt: **25 µl Probe** in einem Reaktionsgefäß vorlegen, dann **225 µl Assaypuffer** zugeben. Anschließend gut mischen. Die Zugabe des Assaypuffers sollte bei allen Proben möglichst zeitnah erfolgen, da dieser Schritt der Spaltung der Antikörper-Therapieantikörper-Komplexe dient. Die **Kontrollen** werden mit **250 µl Assaypuffer** (ASYBUF) rekonstituiert und gevortext. Dies sollte gleichzeitig mit der Probenverdünnung stattfinden, damit die gleiche Behandlung von Kontrollen und Proben gewährleistet ist.
2.	Die Kontrollen und verdünnten Proben werden in den Reaktionsgefäßen bzw. Fläschchen **20 min unter Schütteln*** auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubiert. **ACHTUNG**: Die Inkubationszeit beginnt **mit der Zugabe des Assaypuffers**.
3.	Zu je **250 µl** Kontrolle/verdünnter Probe werden jeweils **60 µl Tracer/Konjugat/Antikörperverdünnungspuffer-Lösung** (siehe Vorbereitung der Reagenzien) hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen **1 Stunde** bei Raumtemperatur (15–30 °C) **unter Schütteln*** inkubieren.

* Wir empfehlen die Reaktionsgefäße bzw. Fläschchen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung der Antikörper gegen den TNFα-Blocker Adalimumab (z. B. HUMIRA®). Bei der Probenvorbereitung wird der anti-TNFα-Blocker-Antikörper (*anti-drug antibody*, ADA) von dem Therapieantikörper abgespalten, so dass alle ADA frei vorliegen. Durch die Zugabe eines Peroxidase-Konjugats (Peroxidase-markierter Therapieantikörper) und des Tracers (biotinylierter Therapieantikörper) wird der unmarkierte Therapieantikörper verdrängt und die markierten Antikörper bilden einen Komplex mit den ADA. Über das Biotin bindet dieser Komplex an eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte. Der Nachweis erfolgt über das Peroxidase-Konjugat, da die Peroxidase das Substrat TMB zu einem blauen Farbstoff umsetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Der entstandene Farbumschlag wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Auswertung erfolgt über die Cut-off-Kontrolle.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automatenspezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen **vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	**100 µl der vorinkubierten Kontrollen/Proben** in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und **1,5 h unter Schütteln*** bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	**100 µl Substrat** (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	**10–20 min**** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im **Dunkeln** inkubieren.
7.	**100 µl Stopplösung** (STOP) in jede Vertiefung pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus kurz mischen.
8.	**Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer **bei 450 nm** gegen die Referenzwellenlange 620 nm (oder 690 nm) messen.

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Cut-off = 10 AU/ml = OD Cut-off-Kontrolle

Proben, die eine höhere mittlere optische Dichte (OD) haben als die OD der Cut-off-Kontrolle, sind somit positiv.

Zur Auswertung des Tests empfehlen wir lineare Regression mit linearer Ordinate bzw. Abszisse für optische Dichte und Konzentration.

Vor jeder automatischen Auswertung stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchführen. Falls dies nicht durch die verwendete Software erfolgt, die Kontrolle manuell durchführen.

Rechenbeispiel positive Probe

mittlere OD Patientenprobe	0,735
mittlere OD Cut-off-Kontrolle	0,085 = 10 AU/ml
Konzentration Patientenprobe	$\frac{0{,}735 \times 10\,\text{AU/ml}}{0{,}085} = 86{,}47\,\text{AU/ml}$

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Inter-Assay (n = 12)

Probe	AU/ml	VK [%]
1	17,45	7,17
2	48,09	4,83
3	213,44	5,53

Intra-Assay (n = 23)

Probe	AU/ml	VK [%]
1	59,91	3,47
2	290,92	5,92

Sensitivität

Die Leerwert-Obergrenze (*limit of blank*, LoB) wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 bestimmt und ist 2,765 AU/ml.

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu ADA gegen Infliximab gefunden.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK*monitor® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der

Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Afif W, Loftus EV, Jr., Faubion WA, Kane SV, Bruining DH, Hanson KA, Sandborn WJ (2010). Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **105**(5): 1133-1139.
2. Kopylov U, Mazor Y, Yavzori M, Fudim E, Katz L, Coscas D, Picard O, Chowers Y, Eliakim R, Ben-Horin S (2012). Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA for the detection of anti-infliximab antibodies. *Inflamm Bowel Dis* **18**(9): 1628-1633.
3. Tak PP (2012). A personalized medicine approach to biological treatment of rheumatoid arthritis: a preliminary treatment algorithm. *Rheumatology* **51**(4): 600-609.
4. Ordas I, Mould DR, Feagan BG, Sandborn WJ (2012) Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin Pharmacol Ther* **91**(4): 635-646.
5. Bender NK, Heilig CE, Droll B, Wohlgemuth J, Armbruster FP, Heilig B (2007). Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int* **27**(3): 269-274.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung

REF

Bestellnummer

IVD

In-Vitro-Diagnostikum

→REF

Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

LOT

Chargenbezeichnung



Verwendbar bis



Achtung



Gebrauchsanweisung beachten

Manual

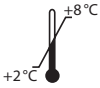
*IDK*monitor® Adalimumab total ADA ELISA

For the in vitro determination of total human antibodies against adalimumab (e. g. HUMIRA®) in EDTA plasma and serum

Valid from 2017-08-10

REF K 9651





IVD CE

Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
Tel.: +49 6251 70190-0 Fax: + 49 6251 849430
e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE 15

2. INTRODUCTION 15

3. MATERIAL SUPPLIED 15

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED 16

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS 16

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES 17

Storage of samples 17
Preparation of samples and controls 17

7. ASSAY PROCEDURE 18

Principle of the test 18
Test procedure 18

8. RESULTS 19

9. LIMITATIONS 19

10. QUALITY CONTROL 20

Reference range 20

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS 20

Precision and reproducibility 20
Analytical Sensitivity 20
Specificity 20

12. PRECAUTIONS 21

13. TECHNICAL HINTS 21

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE 21

15. REFERENCES 22

1. INTENDED USE

This ELISA is intended for the determination of human antibodies against TNFα blocker adalimumab (e. g. HUMIRA®) in the presence of adalimumab in EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Chronic inflammatory diseases like Crohn's disease, ulcerative colitis or rheumatoid arthritis are often treated with anti-TNFα antibodies which target directly the underlying inflammatory processes.

The clinical efficacy of an anti-TNFα therapy correlates with the trough level of the therapeutic antibody, the drug level just before the next application of the anti-TNFα antibody [1–3]. Several factors influence the trough level, among them dosage and frequency of anti-TNFα blocker infusion, disease activity, individual pharmacokinetics and immune reaction (formation of anti-drug antibodies, ADA). It is thought that ADA functionally neutralise the therapeutic antibodies or induce their rapid elimination [4]. Consequences of ADA formation can be therapy failure and allergic reactions during anti-TNFα antibody application [1, 5].

The *IDK*monitor® Adalimumab total ADA ELISA for the detection of total antibodies against adalimumab (e. g. HUMIRA®) measures free and bound antibodies against adalimumab. This assay allows a reliable determination of ADA even in the presence of adalimumab; therefore it is ideal for therapy monitoring when a measurable adalimumab concentration is expected. In combination with the drug level determination, the *IDK*monitor® Adalimumab total ADA ELISA is an opportunity for the treating physician to monitor and optimise the therapy early on.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9651	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 9651	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 9651	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 600 µl
K 9651	TRACER	Tracer concentrate, biotinylated	1 x 600 µl
K 9651	CTRL NEG	Negative control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9651	CTRL POS	Positive control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 9651	CTRL CUT-OFF	Cut-off control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9651	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	2 x 15 ml
K 9651	ABBUF	Antibody dilution buffer, ready-to-use	1 x 10 ml
K 9651	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 9651	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 *g*
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.

- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- **Preparation of controls** see chapter 6.
- **Preparation of the conjugate and tracer: A few minutes before use, tracer concentrate (TRACER)** and **conjugate concentrate (CONJ)** have to be diluted **1:12 in antibody dilution buffer (ABBUF)** (e. g. 3000 µl assay buffer + 300 µl tracer + 300 µl conjugate). TRACER and CONJ are stable at **2–8 °C** until expiry date stated on the label. **Tracer** (1:12 diluted tracer) **and conjugate** (1:12 diluted CONJ) **are not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C.**

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Storage of samples

Undiluted samples can be stored **1 month at -20 °C.**

Diluted samples are **not stable** and **cannot be stored.**

Preparation of samples and controls

1.	Dilute samples **1:10** in **assay buffer** (ASYBUF) by pipetting **25 µl sample** into a reaction tube and adding **225 µl assay buffer**. Mix well. Addition of assay buffer to all the samples should be performed without pause since this step dissociates the antibody–therapeutic antibody complexes. Reconstitute the **controls** with **250 µl** assay buffer and vortex. Carry out this step simultaneously with sample dilution in order to ensure equal treatment of controls and samples.
2.	Incubate controls and diluted samples in reaction tubes for **20 min** with **shaking*** on a horizontal shaker at room temperature (15–30 °C). **CAUTION**: incubation time begins **upon addition of assay buffer**.

3.	Add **60 µl tracer/conjugate/antibody dilution buffer solution** (see preparation of reagents) to **250 µl control/diluted sample.** Vortex and incubate for **1 hour** with **shaking*** at room temperature (15–30 °C).

* We recommend shaking the controls and reaction tubes at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of antibodies against TNFα blocker adalimumab (e. g. HUMIRA®). During sample preparation, the anti-drug antibodies (ADA) are separated from the therapeutic antibody in order to acquire free ADA. By adding the peroxidase conjugate (peroxidase labelled therapeutic antibody) and the tracer (biotinylated therapeutic antibody), the unmarked therapeutic antibodies are replaced and the marked antibodies can form a complex with the ADA. This complex binds via biotin to the streptavidin coated microtiter plate. It is detected via the peroxidase conjugate with the peroxidase converting the substrate TMB to a blue product. The enzymatic reaction is stopped by adding an acidic solution. The samples convert from blue to yellow. The colour change should be measured in a photometer at 450 nm. The interpretation is made using the cut-off control.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of controls/samples on a protocol sheet.

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips in the aluminium bag at 2–8 ° C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	**Before use**, wash the wells **5 times** with **250 µl wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each **100 µl preincubated controls/samples** into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for **1.5 hours shaking*** on a horizontal shaker at room temperature (15–30 °C).

4.	Discard the content of each well and wash **5 times** with **250 µl wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add **100 µl substrate** (SUB) into each well.
6.	Incubate for **10–20 minutes**** at room temperature (15–30 °C) in the **dark**.
7.	Add **100 µl stop solution** (STOP) into each well and mix shortly by using the shake function of the microtiter plate reader.
8.	Determine the **absorption** immediately with the microtiter plate reader at **450 nm** against 620 nm (or 690 nm) as reference wavelength.

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

Cut-off = 10 AU/ml = OD cut-off control

Samples which have a higher average optical density (OD) than the cut-off control are positive.

Immundiagnostik recommends linear regression using a linear ordinate and abscissa to calculate the results.

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a manual control of the paired values should be made.

Sample calculation for a positive sample

Average OD of patient's sample 0.735

Average OD of cut-off control 0.085 = 10 AU/ml

Concentration patient's sample $\frac{0.735 \times 10\ \text{AU/ml}}{0.085} = 86.47\ \text{AU/ml}$

9. LIMITATIONS

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Reference range

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Inter-Assay (n = 12)

Sample	AU/ml	VK [%]
1	17.45	7.17
2	48.09	4.83
3	213.44	5.53

Intra-Assay (n = 23)

Sample	AU/ml	VK [%]
1	59.91	3.47
2	290.92	5.92

Analytical Sensitivity

The LoB (limit of blank) was evaluated according to the guideline CLSI EP17-A2 and resulted in 2.765 AU/ml.

Specificity

No cross reactivity to ADA to infliximab was observed.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDKmonitor*® is a trademark of Immundiagnostik AG.

- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Afif W, Loftus EV, Jr., Faubion WA, Kane SV, Bruining DH, Hanson KA, Sandborn WJ (2010). Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **105**(5): 1133-1139.
2. Kopylov U, Mazor Y, Yavzori M, Fudim E, Katz L, Coscas D, Picard O, Chowers Y, Eliakim R, Ben-Horin S (2012). Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA for the detection of anti-infliximab antibodies. *Inflamm Bowel Dis* **18**(9): 1628-1633.
3. Tak PP (2012). A personalized medicine approach to biological treatment of rheumatoid arthritis: a preliminary treatment algorithm. *Rheumatology* **51**(4): 600-609.
4. Ordas I, Mould DR, Feagan BG, Sandborn WJ (2012) Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin Pharmacol Ther* **91**(4): 635-646.
5. Bender NK, Heilig CE, Droll B, Wohlgemuth J, Armbruster FP, Heilig B (2007). Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int* **27**(3): 269-274.

Used symbols:

 Temperature limitation

REF Catalogue Number

IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

→REF To be used with

 Manufacturer

 Contains sufficient for <n> tests

LOT Lot number

 Use by

 Attention

 Consult instructions for use

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49 (0) 62 51/70 19 00
Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com