Arbeitsanleitung / Manual

*IDK*monitor® Adalimumab free ADA ELISA

Zur in-vitro-Bestimmung von freien humanen Antikörpern gegen Adalimumab (z. B. HUMIRA®) in EDTA-Plasma und Serum

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

Gültig ab / Valid from 2016-09-27

REF **K 9652**

Σ 96

+8 °C
+2 °C

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 3

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL 3

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN 4

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG 4

7. TESTDURCHFÜHRUNG 5

Testprinzip 5

Pipettierschema 5

8. ERGEBNISSE 6

9. EINSCHRÄNKUNGEN 7

10. QUALITÄTSKONTROLLE 7

Referenzwerte 7

11. TESTCHARAKTERISTIKA 7

Präzision und Reproduzierbarkeit 7

12. VORSICHTSMASSNAHMEN 8

13. TECHNISCHE MERKMALE 8

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST 9

15. LITERATUR 9

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von freien *anti-drug antibodies* (ADA) gegen den TNFα-Therapieantikörper Adalimumab (z. B. HUMIRA®) in EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie z. B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, rheumatischen Erkrankungen oder Psoriasis 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 [1–3]. 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 [3]. 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 free ADA ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Adalimumab (z.B. HUMIRA®) misst die freien anti-Adalimumab Antikörper. Zusammen mit der Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von Adalimumab bietet der *IDK*monitor® Adalimumab free ADA ELISA dem behandelnden Arzt die Möglichkeit, die Therapie zu begleiten und frühzeitig zu optimieren.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9652	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet ($F(ab)_2$)	12 x 8 wells
K 9652	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10 x	1 x 100 ml
K 9652	CONJ	Konjugatkonzentrat (Therapie-antikörper, peroxidasemarkiert)	1 x 200 µl
K 9652	CTRL NEG	Positivkontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9652	CTRL POS	Negativkontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9652	CTRL CUT-OFF	Cut-off-Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9652	SAMPLEBUF	Probenpuffer, gebrauchsfertig	1 x 30 ml
K 9652	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9652	STOP	ELISA-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*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Absorptionspapier
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge
- Vortex-Mixer
- 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. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben 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 zentrifugiert 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.
- **Die lyophilisierten Kontrollen** (CTRL NEG, CTRL POS und CTRL CUT-OFF) sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Kontrollen werden mit **300 µl Reinstwasser** rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Kontrollen können nicht gelagert werden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

EDTA-Plasma und Serum

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:10** verdünnt,

z. B. **25 µl** Probe + **225 µl** SAMPLEBUF (Probenpuffer), gut mischen.

Für eine Bestimmung in Doppelwerten werden **2 x je 100 µl** jeder vorbereiteten Probe im Test eingesetzt.

Lagerung

Frisch abgenommenes EDTA-Plasma bzw. Serum kann einen Tag bei Raumtemperatur (15–30 °C) gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) dient zur Bestimmung der freien Antikörper gegen den Therapieantikörper Adalimumab (z. B. HUMIRA®). In diesem Assay bindet der freie Antikörper aus der Probe an auf der Platte fixierte Adalimumab-F(ab)$_2$-Fragmente. Nach einem Waschschritt erfolgt die Detektion des gebundenen anti-Adalimumab-Antikörpers durch Zugabe eines Peroxidase-Konjugats (POD-Therapieantikörper). Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Gehalt der freien ADAs (hier: anti-Adalimumab-Antikörper) direkt proportional. Die Auswertung erfolgt über die Cut-off-Kontrolle.

Pipettierschema

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

Die benötigten **Mikrotiterstreifen** aus dem Kit nehmen, nicht verwendete können abgeklebt 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.	Mikrotiterstreifen **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
2.	**100 µl CTRL NEG, CTRL POS, CTRL CUT-OFF** (Kontrollen) und **vorbereitete Proben** in die Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen mit Folie abdecken und **über Nacht (16–20 h)** bei 2–8 °C unter Schütteln inkubieren.*

4.	Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
5.	**100 µl Konjugat** pro Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen mit Folie abdecken und **1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C)** unter Schütteln inkubieren.
7.	Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8.	**100 µl TMB-Substratlösung** pro Vertiefung pipettieren.
9.	**10–20 Minuten** bei Raumtemperatur **im Dunkeln** inkubieren.**
10.	**100 µl Stopplösung** zusetzen und kurz mischen.
11.	**Extinktion sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei **405 nm** gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Der oben genannte Inkubationsschritt unter Schütteln bei 2–8 °C ist vom Hersteller empfohlen. Besteht keine Möglichkeit bei 2–8 °C zu schütteln, empfehlen wir die Inkubation bei 2–8 °C ohne 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

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Cut-off-Kontrolle. Proben, die eine höhere mittlere optische Dichte (OD) haben als die OD der Cut-off-Kontrolle, sind positiv. Proben, die eine niedrigere mittlere optische Dichte als die OD der Cut-off-Kontrolle haben, sind negativ.

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

Zur Berechnung der Konzentrationen der Proben empfehlen wir lineare Regression mit linearer Ordinate bzw. Abszisse für optische Dichte und Konzentration.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das

verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Rechenbeispiel positive Probe

mittlere OD der Patientenprobe	0,735
mittlere OD der Cut-off-Kontrolle	0,065 = 10 AU/ml
Konzentration der Patientenprobe	$\frac{0{,}735 \times 10\ \text{AU/ml}}{0{,}065} = 113\ \text{AU/ml}$

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren Konzentration den linearen Messbereich des Photometers übersteigen (siehe Spezifikation des verwendeten Photometers), sollten stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Sollte der lineare Messbereich des Photometers unbekannt sein, kann bei den meisten Geräten ein Wert von 2,5 als obere Grenze des linearen Messbereichs angesehen werden.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz die mitgelieferten 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

Intra-Assay (n = 30)

Probe	Adalimumab [AU/ml]	VK [%]
1	87,5	1,7
2	40,8	0,9

Inter-Assay (n = 12)

Probe	Adalimumab [AU/ml]	VK [%]
1	160,8	6
2	86,8	6
3	49,4	5
4	23,3	7
5	77,6	7

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. 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, da schon geöffnete Mikrotiterplatten anderen Bedingungen unterliegen als verschlossene.

- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den 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, zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. W. Afif, E. V Loftus, W. a Faubion, S. V Kane, D. H. Bruining, K. a Hanson, and W. J. Sandborn, "Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease.," *The American journal of gastroenterology*, vol. **105**, no. 5, pp. 1133–9, May 2010.
2. L. L. A. Lecluse, R. J. B. Driessen, P. I. Spuls, E. M. G. J. de Jong, S. O. Stapel, M. B. A.

van Doorn, J. D. Bos, and G.-J. Wolbink, "Extent and clinical consequences of antibody formation against adalimumab in patients with plaque psoriasis.," *Archives of dermatology*, vol. **146**, no. 2, pp. 127–32, Feb. 2010.

3. P. A. van Schouwenburg, T. Rispens, and G. J. Wolbink, "Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis.," *Nature reviews. Rheumatology*, vol. **9**, no. 3, pp. 164–72, Mar. 2013.
4. I. Ordás, D. R. Mould, B. G. Feagan, and W. J. Sandborn, "Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms.," *Clinical pharmacology and therapeutics*, vol. **91**, no. 4, pp. 635–46, Apr. 2012.
5. N. K. Bender, C. E. Heilig, B. Dröll, J. Wohlgemuth, F. P. Armbruster, and B. Heilig, "Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients.," *Rheumatology international*, vol. **27**, no. 3, pp. 269–74, Jan. 2007

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung	REF	Bestellnummer
IVD	*In-Vitro*-Diagnostikum	→REF	Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
LOT	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		

Manual

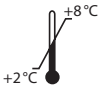
*IDK*monitor® Adalimumab free ADA ELISA

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

Valid from 2016-09-27

REF **K 9652**





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 13

2. INTRODUCTION 13

3. MATERIAL SUPPLIED 13

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED 14

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS 14

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION 15

7. ASSAY PROCEDURE 15

Principle of the test 15

Test procedure 16

8. RESULTS 17

9. LIMITATIONS 17

10. QUALITY CONTROL 18

Reference range 18

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS 18

Precision and reproducibility 18

12. PRECAUTIONS 18

13. TECHNICAL HINTS 19

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE 19

15. REFERENCES 20

1. INTENDED USE

This enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit is intended for the determination of free anti-drug antibodies (ADA) against the therapeutic TNFα antibody adalimumab (e. g. HUMIRA®) in EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

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

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

The *IDK*monitor® Adalimumab free ADA ELISA for the detection of antibodies against Adalimumab (e.g. HUMIRA®) measures free anti-Adalimumab antibodies. In combination with the drug level determination of Adalimumab, the *IDK*monitor® Adalimumab free ADA ELISA is an opportunity for the treating physician to monitor and optimize the therapy early on.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9652	PLATE	Holder with strips, precoated with $(F(ab)_2)$	12 x 8 wells
K 9652	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 9652	CONJ	POD antibody, (therapy antibody, peroxidase labelled), concentrate	1 x 200 µl
K 9652	CTRL NEG	Negative control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9652	CTRL POS	Positive control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9652	CTRL CUT-OFF	Cut-off control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9652	SAMPLEBUF	Sample buffer, ready to use	1 x 30 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9652	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 9652	STOP	ELISA 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*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Absorbent paper
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge
- 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. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at 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**.

- The **lyophilized controls** (CTRL NEG, CTRL POS and CTRL CUT-OFF) must be reconstituted with **300 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes at room temperature, and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. The undiluted controls are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Reconstituted controls cannot be stored.**
- **Preparation of the conjugate:** The **conjugate concentrate (CONJ)** must be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA plasma and serum

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:10** before performing the assay,

e. g. **25 µl** sample + **225 µl** SAMPLEBUF (sample buffer), mix well.

For testing in duplicates, pipet **2 x 100 µl** of each prepared sample.

Sample storage

Freshly collected EDTA plasma or serum can be stored for one day at room temperature (15–30 °C) or for longer storage at -20 °C.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This enzyme immunoassay is a sandwich assay for the determination of free antibodies against adalimumab (e. g. HUMIRA®). In a first incubation step, the free anti-therapeutic antibodies from the sample are bound to the adalimumab $F(ab)_2$ fragments coated on the plate. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a further incubation step, peroxidase-labeled adalimumab is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, Tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stop solution is then added. The colour converts to yellow. The absorbance of the color compound is determined photometrically. The intensity of the color is directly proportional to the amount of bound ADAs (here: anti-adalimumab antibodies) from the sample. The results are evaluated by a cut-off control.

Test procedure

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

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips covered 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.	Wash the microtiter strips **5 x with 250 µl wash buffer before use**. After the final washing step, the inverted microtiter strips should be tapped on absorbent paper.
2.	Add **100 µl of CTRL NEG, CTRL POS, CTRL CUT-OFF** (controls), and **diluted samples** in the wells of the microtiter plate.
3.	Seal the stripes with foil and incubate **over night (16–20 h)**, on a horizontal mixer, at 2–8 °C.*
4.	Aspirate the content of the plate and wash each well **5 x with 250 µl wash buffer**. After the final washing step, the inverted microtiter should be firmly tapped on absorbent paper.
5.	Add **100 µl conjugate** into each well.
6.	Seal the stripes with foil and incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature (15–30 °C).
7.	Aspirate the content of the plate and wash each well **5 x with 250 µl wash buffer**. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8.	Add **100 µl of TMB substrate** solution into each well.
9.	Incubate for **10–20 minutes** at room temperature in the dark. **
10.	Add **100 µl stop solution** into each well and mix shortly.

11.	Determine **absorption immediately** with an ELISA reader at **450 nm**. If the highest extinction of the standards (**STD**) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used.

* The above incubation step at 2–8 °C on a horizontal mixer is recommended by the producer. If there is no possibility to incubate at 2–8 °C, while shaking, we recommend to incubate at 2–8 °C without any shaking.

** The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the procedure of the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The analysis of the results is done using the cut-off control. Samples with a higher optical density (OD) as the OD of the cut-off control are positive. Samples with an OD lower than the OD of the cut-off control are negative.

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

For the calculation of the sample concentrations, linear regression using a linear ordinate and abscissa is recommended.

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 control of the paired values should be done manually.

Sample calculation for a positive sample

average OD of patient's sample	0.735
average OD of cut-off control	0.065 = 10 AU/ml
Concentration of the patient's sample	$\frac{0.735 \times 10\ \text{AU/ml}}{0.065} = 113\ \text{AU/ml}$

9. LIMITATIONS

Samples whose concentration exceeds the linear measurement range of the photometer (see specification of the used photometer) should be further diluted and re-assayed. If the linear measurement range of the photometer is unknown, 2.5 can be assumed to be the upper threshold ot the linear measurement range for most machines.

10. QUALITY CONTROL

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

Provided control samples should be analyzed 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

Intra-Assay (n = 30)

Sample	Adalimumab [AU/ml]	VK [%]
1	87.5	1.7
2	40.8	0.9

Inter-Assay (n = 12)

Sample	Adalimumab [AU/ml]	VK [%]
1	160.8	6
2	86.8	6
3	49.4	5
4	23.3	7
5	77.6	7

12. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Control samples should be analyzed with each run.

- 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 color 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 out 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 to assemble wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch as wells from already opened microtiter plates are exposed to different conditions as sealed ones.
- 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 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.
- Quality control guidelines should be followed.
- *IDK*monitor® 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 wrong use.

- Warranty claims and complaints in respect of 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. W. Afif, E. V Loftus, W. a Faubion, S. V Kane, D. H. Bruining, K. a Hanson, and W. J. Sandborn, "Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease.," *The American journal of gastroenterology*, vol. **105**, no. 5, pp. 1133–9, May 2010.
2. L. L. A. Lecluse, R. J. B. Driessen, P. I. Spuls, E. M. G. J. de Jong, S. O. Stapel, M. B. A. van Doorn, J. D. Bos, and G.-J. Wolbink, "Extent and clinical consequences of antibody formation against adalimumab in patients with plaque psoriasis.," *Archives of dermatology*, vol. **146**, no. 2, pp. 127–32, Feb. 2010.
3. P. A. van Schouwenburg, T. Rispens, and G. J. Wolbink, "Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis.," *Nature reviews. Rheumatology*, vol. **9**, no. 3, pp. 164–72, Mar. 2013.
4. I. Ordás, D. R. Mould, B. G. Feagan, and W. J. Sandborn, "Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms.," *Clinical pharmacology and therapeutics*, vol. **91**, no. 4, pp. 635–46, Apr. 2012.
5. N. K. Bender, C. E. Heilig, B. Dröll, J. Wohlgemuth, F. P. Armbruster, and B. Heilig, "Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients.," *Rheumatology international*, vol. **27**, no. 3, pp. 269–74, Jan. 2007

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		