Arbeitsanleitung / Manual

*IDK*monitor® Etanercept free ADA

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

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

Gültig ab / Valid from 2018-04-26

REF **K 9653**

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 2

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL 3

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN 3

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG 4

7. TESTDURCHFÜHRUNG 4

Testprinzip 4
Pipettierschema 5

8. ERGEBNISSE 6

9. EINSCHRÄNKUNGEN 6

10. QUALITÄTSKONTROLLE 7

11. TESTCHARAKTERISTIKA 7

Genauigkeit – Präzision 7
Linearität 7
Analytische Sensitivität 8
Analytische Spezifität 9

12. VORSICHTSMASSNAHMEN 9

13. TECHNISCHE MERKMALE 10

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST 10

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. EINLEITUNG

Der *IDK*monitor® Etanercept bestimmt zuverlässig die freien ADA gegen Etanercept (z. B. Enbrel®). Anti-TNFα–Therapieantikörper werden zur Suppression bei Rheumapatienten eingesetzt. Während der Therapie ist es möglich, dass die Patienten Antikörper gegen die anti-TNFα–Therapieantikörper entwickeln. Dadurch ist mit erheblichen Komplikationen bis hin zum anaphylaktischen Schock zu rechnen.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9653	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9653	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 9653	CONJ	Konjugatkonzentrat (peroxidasemarkiert)	1 x 200 µl
K 9653	CTRL NEG	Positivkontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9653	CTRL POS	Negativkontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9653	CTRL CUT-OFF	Cut-off-Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9653	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 30 ml
K 9653	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9653	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*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- 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 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.

- Die **lyophilisierten Kontrollen (CTRL POS, CTRL NEG** und **CTRL CUT-OFF)** sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die lyophilisierten Kontrollen werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Kontrollen** (rekonstituierte CTRL POS, CTRL NEG und CTRL CUT-OFF) **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 gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

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.

EDTA-Plasma und Serum

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:10** verdünnt und gut gemischt, z. B.

25 µl Probe **+ 225 µl** Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF), gut mischen

Für den Einsatz im Test werden je **100 µl** jeder verdünnten Probe im Test eingesetzt. Für die Analyse der empfohlenen Doppelwerte werden **2 x je 100 µl** benötigt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung der freien Antikörper gegen Etanercept (z. B. Enbrel®). In diesem Assay bindet der freie Antikörper aus der Probe an auf der Platte fixierte Etanercept-Bindungsdomänen. Nach einem Waschschritt erfolgt die Detektion des gebundenen anti-Etanercept-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 bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Gehalt der freien Antikörper gegen Etanercept (z. B. Enbrel®) 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.

Markieren Sie die Positionen für Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen 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.	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 rekonstituierte CTRL NEG, CTRL POS, CTRL CUT-OFF** und **vorbereitete Proben** in die Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen mit Folie abdecken und **1 Stunde** bei Raumtemperatur (15–30°C) **unter Schütteln*** 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 Konjugat** (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen mit Folie abdecken und **1 Stunde** bei Raumtemperatur (15–30 °C) **unter Schütteln*** inkubieren.
7.	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.
8.	**100 µl Substrat** (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	**5–15 min **** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im **Dunkeln** inkubieren.
10.	**100 µl Stopplösung** (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut 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 gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei **405 nm** gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* 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

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, welche nicht eindeutig interpretierbar sind (z. B. aufgrund hoher Variationskoeffizienten der Replikate), sollten wiederholt 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.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n=28

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter **gleichbleibenden Bedingungen** (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	53,25	2,8
2	26,94	3,9
3	12,66	3,8

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n=42

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter **variablen Bedingungen** (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	192,04	9,5
2	99,29	8,5
3	26,57	8,3

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer seriellen Verdünnung einer Serumprobe nachgewiesen. Dies wurde mit 3 Kitchargen durchgeführt.

Für anti-Etanercept-Antikörper in Serum und Plasma wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 9,98–186,52 AU/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als ±20 %.

Lot	Verdünnung	Erwartet [AU/ml]	Gemessen [AU/ml]	Wieder-findung [%]
1	unverdünnt	186,52	186,52	–
	1:2	93,26	93,61	100,4
	1:4	46,63	47,37	101,6
	1:8	23,31	24,59	105,4
	1:16	11,66	13,19	113,1
2	unverdünnt	159,70	159,70	–
	1:2	79,85	84,20	105,4
	1:4	39,92	44,15	110,6
	1:8	19,96	22,78	114,1
	1:16	9,98	11,13	111,5
3	unverdünnt	179,19	179,19	–
	1:2	89,59	92,74	103,5
	1:4	44,80	46,64	104,1
	1:8	22,40	24,04	107,3
	1:16	11,20	12,65	112,9

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Kalibrationskurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB)	4,549 AU/ml
Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD)	10 AU/ml
Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ)	10 AU/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität zu anti-Infliximab- und anti-Adalimumab-Antikörpern in Patientenproben. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

Getestete Substanz	Probe	Gefundene Konzentration [AU/ml]		Fazit
		Adalimumab ADA ELISA	Etanercept free ADA ELISA	
anti-Adalimumab-Antikörper	1	101	2,115	< LoB
	2	378	2,078	< LoB
	3	152	2,071	< LoB

Getestete Substanz	Probe	Gefundene Konzentration [AU/ml]		Fazit
		Infliximab ADA ELISA	Etanercept free ADA ELISA	
anti-Infliximab Antikörper	4	452	2,310	< LoB
	5	440	2,644	< LoB
	6	450	2,369	< LoB
	7	520	2,403	< LoB

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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

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.

Verwendete Symbole:


Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit


Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung


Verwendbar bis


Achtung


Gebrauchsanweisung beachten

Manual

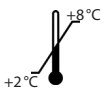
*IDK*monitor® Etanercept free ADA

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

Valid from 2018-04-26

REF **K 9653**





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. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS 16

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES 17

7. ASSAY PROCEDURE 17

Principle of the test 17

Test procedure 17

8. RESULTS 19

9. LIMITATIONS 19

10. QUALITY CONTROL 19

11. PERFORMANCE CHARAKTERISTICS 20

Accuracy – Precision 20

Linearity 20

Analytical sensitivity 21

Analytical specificity 21

12. PRECAUTIONS 22

13. TECHNICAL HINTS 22

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE 23

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of free anti-drug antibodies (ADA) against etanercept (e. g. Enbrel®) in EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

The *IDK*monitor® Etanercept free ADA ELISA for the detection of antibodies against etanercept (e. g. Enbrel®) measures free antibodies against etanercept. Anti-TNFα therapeutic antibodies are used for suppressing therapy in rheumatic patients. There is a possibility that patients under anti-TNFα-antibody therapy develop antibodies against the therapeutic antibodies. This might lead to severe complications, even to a systemic anaphylaxis with possibly lethal outcome.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9653	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 9653	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	1 x 100 ml
K 9653	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 200 µl
K 9653	CTRL NEG	Negative control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9653	CTRL POS	Positive control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9653	CTRL CUT-OFF	Cut-off control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9653	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 30 ml
K 9653	SUB	Substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 9653	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*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- 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 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. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. 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 **lyophilised controls** (**CTRL NEG, CTRL POS** and **CTRL CUT-OFF**) are stable at **2–8°C** until expiry date stated on the label. Before use, the CTRL NEG, CTRL POS and CTRL CUT-OFF have to be reconstituted with **500 µl of ultra pure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Controls** (reconstituted CTRL NEG, CTRL POS and CTRL CUT-OFF) **are not stable and cannot be stored.**
- **Preparation of the conjugate:** The **conjugate concentrate (CONJ)** has to 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 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

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.

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** sample dilution buffer (SAMPLEBUF), mix well.

For analysis, pipet **100 µl** of each diluted sample per well. For the recommended analysis in duplicate, **2 x 100 µl** are required.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of free antibodies against etanercept (e. g. Enbrel®). In a first incubation step, the free anti-therapeutic antibodies from the sample are bound to etanercept binding domains coated on the plate. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a further incubation step, a peroxidase-labelled therapeutic antibody (conjugate) 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 at 450 nm. The intensity of the colour is directly proportional to the amount of bound anti-etanercept (e. g. Enbrel®) 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.

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

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.	**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 reconstituted CTRL NEG, CTRL POS, CTRL CUT-OFF** and **diluted samples** into the wells.
3.	Cover the strips and incubate for **1 hour** at room temperature (15–30 °C) **shaking** on a **horizontal shaker***.
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 conjugate** (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for **1 hour** at room temperature (15–30 °C) **shaking** on a **horizontal shaker***.
7.	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.
8.	Add **100 µl substrate** (SUB) into each well.
9.	Incubate for **5–15 min**** at room temperature (15–30 °C) **in the dark**.
10.	Add **100 µl stop solution** (STOP) into each well and mix well.
11.	Determine **absorption immediately** with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** against 620 nm as a reference.

* 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

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 which cannot be clearly interpreted (e. g. because of high coefficients of variation of replicates) should be measured again.

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.

11. PERFORMANCE CHARAKTERISTICS

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n=28

The repeatability was assessed with 2 serum samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [AU/ml]	CV [%]
1	53.25	2.8
2	26.94	3.9
3	12.66	3.8

Reproducibility (Inter-Assay); n=42

The reproducibility was assessed with 2 serum-samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [AU/ml]	CV [%]
1	53.25	2.8
2	26.94	3.9
3	12.66	3.8

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP06-A with a serial dilution of a serum sample. This was tested with 3 kit lots.

For anti-Etanercept antibodies in serum and plasma, the method has been demonstrated to be linear from 9.98–186.52 AU/ml, showing a non-linear behaviour of less than ±20 % in this interval.

Lot	Dilution	Expected [AU/ml]	Obtained [AU/ml]	Recovery [%]
1	undiluted	186.52	186.52	–
	1:2	93.26	93.61	100.4
	1:4	46.63	47.37	101.6
	1:8	23.31	24.59	105.4
	1:16	11.66	13.19	113.1
2	undiluted	159.70	159.70	–
	1:2	79.85	84.20	105.4
	1:4	39.92	44.15	110.6
	1:8	19.96	22.78	114.1
	1:16	9.98	11.13	111.5
3	undiluted	179.19	179.19	–
	1:2	89.59	92.74	103.5
	1:4	44.80	46.64	104.1
	1:8	22.40	24.04	107.3
	1:16	11.20	12.65	112.9

Analytical sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the calibration curve without considering possibly used sample dilution factors

Limit of blank, LoB	4.549 AU/ml
Limit of detection, LoD	10 AU/ml
Limit of quantitation, LoQ	10 AU/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against anti-Infliximab and anti-Adalimumab antibodies in patient samples. There was no cross-reactivity observed.

Substance tested	Sample	Concentration obtained [AU/ml]		Conclusion
		Adalimumab ADA ELISA	Etanercept free ADA ELISA	
anti-Adalimumab antibodies	1	101	2.115	< LoB
	2	378	2.078	< LoB
	3	152	2.071	< LoB

Substance tested	Sample	Concentration obtained [AU/ml]		Conclusion
		Infliximab ADA ELISA	Etanercept free ADA ELISA	
anti-Infliximab antibodies	4	452	2.310	< LoB
	5	440	2.644	< LoB
	6	450	2.369	< LoB
	7	520	2.403	< LoB

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.
- *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 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.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use