

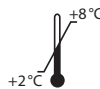
IDKmonitor[®] Adalimumab drug level ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung der Konzentration des freien
Adalimumab (z. B. HUMIRA[®]) in EDTA-Plasma und Serum*

*For the in vitro determination of free adalimumab
concentration (e. g. HUMIRA[®]) in EDTA plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2019-07-12

REF K 9657



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. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzwerte</i>	7
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	8
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	8
<i>Linearität</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Analytische Spezifität</i>	10
<i>High-Dose-Hook-Effekt</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von freiem Adalimumab (gegen TNF α gerichteter Therapieantikörper, z. B. HUMIRA®) aus EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen, welche Entzündungsreaktionen fördern und aufrecht erhalten. Das von Makrophagen und T-Zellen produzierte Zytokin spielt sowohl bei akuten als auch bei chronischen Entzündungen eine zentrale Rolle. Die Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie z. B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, rheumatischen Erkrankungen oder Psoriasis erfolgt daher immer häufiger mit Antikörpern gegen TNF α , die direkt in die zugrundeliegende Entzündungsreaktion eingreifen [1].

Die Wirksamkeit der anti-TNF α -Therapie korreliert in der Regel mit der Menge an Therapieantikörper, die kurz vor der nächsten Medikamentengabe im Serum des Patienten nachweisbar ist, dem sogenannten Talspiegel [2, 3]. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Höhe des Talspiegels. Zu diesen zählen unter anderem die Dosis und die Frequenz der anti-TNF α -Behandlung, die Krankheitsaktivität, individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und das Auftreten von Antikörpern gegen die Therapieantikörper (anti-drug antibodies, ADA) [4, 5].

Der IDKmonitor® Adalimumab drug level ELISA zur Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von Adalimumab (z. B. HUMIRA®) misst quantitativ freies Adalimumab in EDTA-Plasma und Serum. Zusammen mit dem Nachweis von ADA gegen Adalimumab bietet der IDKmonitor® Adalimumab drug level ELISA dem behandelnden Arzt die Möglichkeit, die Therapie zu überwachen und frühzeitig zu optimieren.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9657	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 9657	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert	1 x 200 μ l
K 9657	STD	Standards, lyophilisiert (0; 4,15; 8,3; 25; 75; 225 ng/ml)	2 x 6 vials
K 9657	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9657	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 0004.100	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	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
- Absorptionspapier
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge
- 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 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz 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 Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL 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. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **können 3 Monate bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird 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. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

EDTA-Plasma und Serum

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:200** verdünnt,

z.B. **10 µl** Probe + **1990 µl** SAMPLEBUF (Verdünnungspuffer), 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 sieben Tage bei Raumtemperatur (15–30 °C) gelagert werden [6]. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern.

Verdünnte EDTA-Plasma- bzw. Serumproben sind eine Woche bei 2–8 °C und mindestens 4 Wochen bei -20 °C stabil. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung des freien Adalimumab (gegen TNF α gerichteter Therapieantikörper, z. B. HUMIRA®) im EDTA-Plasma oder Serum. In diesem Assay bindet das freie Adalimumab aus der Probe an den auf der Platte fixierten spezifischen monoklonalen anti-Adalimumab-Antikörper. Nach einem Waschschritt erfolgt die Detektion des gebundenen Adalimumab durch Zugabe eines Peroxidase-Konjugats. 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 direkt proportional zum Gehalt des freien Adalimumab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve lässt sich die Konzentration des freien Adalimumab in den Proben ermitteln.

Pipettierschema

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

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

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische 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.	100 μl STD (Standard), SAMPLE (Probe) und CTRL (Kontrollen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln* inkubieren.
3.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 μl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
4.	100 μl Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren.

5.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7.	100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
8.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
9.	100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, mischen.
10.	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 unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

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.

EDTA-Plasma- und Serumproben

Der ermittelte Adalimumab-Spiegel der EDTA-Plasma- und Serumproben wird mit dem Verdünnungsfaktor **200** multipliziert.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

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

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n=24

Die Wiederholbarkeit wurde mit 3 Serumproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [µg/ml]	CV [%]
1	2,68	1,6
2	8,34	1,6
3	18,02	2,7

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay)

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 6 Serumproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [µg/ml]	CV [%]
1 (n=22)	8,52	4,5
2 (n=20)	4,17	4,7
3 (n=22)	19,10	11,4
4 (n=20)	15,36	7,6
5 (n=20)	10,84	6,1
6 (n=22)	2,77	6,1

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 2 Serum-Proben wurden dafür mit bekannten Adalimumab-Konzentrationen versetzt und gemessen.

Probe [µg/ml]	Spike [µg/ml]	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]	Wiederfindung [%]
< LoB	13,1	13,1	13,17	99,68
	6,7	6,7	7,12	104,16
	3,7	3,7	3,59	94,68

Probe [µg/ml]	Spike [µg/ml]	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]	Wiederfindung [%]
< LoB	29,9	29,9	32,43	108,48
	19,2	19,2	20,90	108,67
	11,2	11,2	10,93	97,44

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 von 5 Serumproben nachgewiesen.

Für Adalimumab in Serum und EDTA-Plasma wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 0,49 bis 19,1 µg/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als ± 20%.

Probe	Verdünnung	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:200	8,55	8,55	100,00
	1:400	4,28	4,24	99,18
	1:800	2,14	1,93	90,29
	1:1600	1,07	0,94	87,58
	1:3200	0,53	0,51	95,44
B	1:200	16,37	16,37	100,00
	1:400	8,18	8,73	106,65
	1:800	4,09	4,38	107,01
	1:1600	2,05	2,04	99,63
	1:3200	1,02	0,97	94,64
	1:6400	0,51	0,53	104,22
C	1:200	19,17	19,17	100,00
	1:400	9,59	10,44	108,92
	1:800	4,79	5,23	109,13
	1:1600	2,40	2,54	105,87
	1:3200	1,20	1,16	96,65
	1:6400	0,60	0,63	105,67

Probe	Verdünnung	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]	Wiederfindung [%]
D	1:200	14,56	14,56	100,00
	1:400	7,28	7,78	106,92
	1:800	3,64	3,88	106,66
	1:1600	1,82	1,81	99,35
	1:3200	0,91	0,90	98,91
	1:6400	0,45	0,49	107,48
E	1:200	10,46	10,462	100,02
	1:400	5,23	5,559	106,29
	1:800	2,62	2,626	100,42
	1:1600	1,31	1,26	96,60
	1:3200	0,65	0,66	100,50

Analytische Sensitivität

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

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 2,256 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 2,909 ng/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 2,909 ng/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 verwandter Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität gefunden.

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration [ng/ml]	Gefundene Konzentration [ng/ml]	Fazit
Infliximab	225	< 2,256	< LoB
Golimumab	225	< 2,256	< LoB

High-Dose-Hook-Effekt

Bis zu einer Wirkstoff-Konzentration von 365 µg/ml konnte kein High-Dose-Hook-Effekt beobachtet werden.

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 dem Kit beigelegten 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.
- *IDKmonitor®* 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. Bradley JR (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* **214**(2): 149-160.
2. Chiu YL, Rubin DT, Vermeire S, Louis E, Robinson AM, Lomax KG, Pollack PF, Paulson SK (2013) Serum adalimumab concentration and clinical remission in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **19**(6): 1112-1122
3. Chaparro M, Guerra I, Muñoz-Linares P, Gisbert JP (2012) Systematic review: antibodies and anti-TNF- α levels in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **35**(9): 971-986
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.
6. Perry, M., Bewshea, C., Brown, R., So, K., Ahmad, T., & McDonald, T. (2015). *Infliximab and adalimumab are stable in whole blood clotted samples for seven days at room temperature. Annals of Clinical Biochemistry.* Epub ahead of print.

Verwendete Symbole:

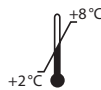
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

IDKmonitor[®] adalimumab drug level ELISA

*For the in vitro determination of free adalimumab
concentration (e. g. HUMIRA[®]) in EDTA plasma and serum*

Valid from 2019-07-12

REF K 9657



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	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	19
7. ASSAY PROCEDURE	19
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Test procedure</i>	20
8. RESULTS	21
9. LIMITATIONS	22
10. QUALITY CONTROL	22
<i>Reference range</i>	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Accuracy – Precision</i>	22
<i>Accuracy – Trueness</i>	23
<i>Linearity</i>	23
<i>Analytical sensitivity</i>	25
<i>Analytical specificity</i>	25
<i>High-Dose-Hook effect</i>	25
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	26

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of free adalimumab (therapeutic antibody against TNF α , e.g. HUMIRA®) in EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) belongs to the proinflammatory cytokines, which promote and sustain inflammatory reactions. It is produced by macrophages and T cells and plays a central role in both acute and chronic inflammations. Consequently, chronic inflammatory diseases like Crohn's disease, ulcerative colitis, rheumatoid arthritis, or psoriasis are increasingly being treated with antibodies against TNF α , which target directly the underlying inflammatory processes [1].

The clinical efficacy of an anti-TNF α therapy usually correlates with the trough level of the therapeutic antibody, meaning the drug level just before the next application of the anti-TNF α antibody [2, 3]. Several factors influence the trough level, among them dosage and frequency of anti-TNF α blocker infusion, disease activity, individual pharmacokinetics and immune reaction (formation of anti-drug antibodies, ADA) [4, 5].

The IDKmonitor® adalimumab drug level ELISA for the determination of the drug level of adalimumab (e.g. HUMIRA®) measures quantitatively free adalimumab in EDTA plasma and serum. In combination with the detection of ADA against adalimumab, the IDKmonitor® adalimumab drug level 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 9657	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 9657	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 200 μ l
K 9657	STD	Calibrators, lyophilised (0; 4.15; 8.3; 25; 75; 225 ng/ml)	2 x 6 vials
K 9657	CTRL 1	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9657	CTRL 2	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 0004.100	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	2 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidin), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	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 single-use tips
- Absorbent paper
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge
- Vortex
- Standard single-use 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. Before dilution, the crystals have to be redis-

solved 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 standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the STD and CTRL 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. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at -20°C for 3 months. Avoid repeated thawing and freezing.**
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in **wash buffer** (100 µl CONJ + 10ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8°C** until the 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. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Sample storage

Freshly collected EDTA plasma or serum can be stored for 7 days at room temperature (15–30°C) [6]. Long term storage is recommended at -20°C.

Diluted EDTA plasma or serum samples can be stored for 7 days at 2–8°C and at least for 4 weeks at -20°C. Repeated freezing and thawing is to be avoided.

EDTA plasma and serum

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:200** before performing the assay, e.g. **10 µl** sample + **1990 µl** SAMPLEBUF (dilution buffer), mix well.

2 x 100 µl of the diluted sample per well are used for testing in duplicates.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed to quantitate free adalimumab (therapeutic antibody against TNFα, e.g. HUMIRA®) in EDTA plasma or serum samples. In a first incubation step, the free adalimumab from the sample is bound to the specific monoclonal anti-adali-

mumab antibody coated on the plate. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a further incubation step, Peroxidase-labelled antibody is added. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of free adalimumab in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. The concentrations of free adalimumab in the samples are determined directly from this curve.

Test procedure

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

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging 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.	Add 100 µl of STD (standard), SAMPLE (sample) or CTRL (controls) into the respective wells.
2.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C) on a horizontal shaker*.
3.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl washbuffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
4.	Add 100 µl conjugate into each well.
5.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C) on a horizontal shaker*.
6.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl washbuffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
7.	Add 100 µl SUB (substrate) into each well.
8.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30°C) in the dark.

9.	Add 100 µl STOP (stop solution) into each well, mix.
10.	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 following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4 parameter algorithm".

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

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.

EDTA plasma and serum samples

The obtained adalimumab levels of EDTA plasma and serum samples have to be multiplied with the dilution factor of **200**.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

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

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

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

LoB × sample dilution factor to be used

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 concentration range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n=24

The repeatability was assessed with 3 serum samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [µg/ml]	CV [%]
1	2.68	1.6
2	8.34	1.6
3	18.02	2.7

Reproducibility (Inter-Assay)

The reproducibility was assessed with 6 serum samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [$\mu\text{g/ml}$]	CV [%]
1 (n=22)	8.52	4.5
2 (n=20)	4.17	4.7
3 (n=22)	19.10	11.4
4 (n=20)	15.36	7.6
5 (n=20)	10.84	6.1
6 (n=22)	2.77	6.1

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, Adalimumab spikes with known concentrations were added to 2 different serum samples.

Sample [$\mu\text{g/ml}$]	Spike [$\mu\text{g/ml}$]	Expected [$\mu\text{g/ml}$]	Obtained [$\mu\text{g/ml}$]	Recovery [%]
< LoB	13,1	13,1	13,17	99,68
	6,7	6,7	7,12	104,16
	3,7	3,7	3,59	94,68
< LoB	29,9	29,9	32,43	108,48
	19,2	19,2	20,90	108,67
	11,2	11,2	10,93	97,44

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 EP6-A by a serial dilution of 5 different serum samples.

For Adalimumab in serum and EDTA plasma, the method has been demonstrated to be linear from 0.49 to 19.1 $\mu\text{g/ml}$, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [µg/ml]	Obtained [µg/ml]	Recovery [%]
A	1:200	8,55	8,55	100,00
	1:400	4,28	4,24	99,18
	1:800	2,14	1,93	90,29
	1:1600	1,07	0,94	87,58
	1:3200	0,53	0,51	95,44
B	1:200	16,37	16,37	100,00
	1:400	8,18	8,73	106,65
	1:800	4,09	4,38	107,01
	1:1600	2,05	2,04	99,63
	1:3200	1,02	0,97	94,64
	1:6400	0,51	0,53	104,22
C	1:200	19,17	19,17	100,00
	1:400	9,59	10,44	108,92
	1:800	4,79	5,23	109,13
	1:1600	2,40	2,54	105,87
	1:3200	1,20	1,16	96,65
	1:6400	0,60	0,63	105,67
D	1:200	14,56	14,56	100,00
	1:400	7,28	7,78	106,92
	1:800	3,64	3,88	106,66
	1:1600	1,82	1,81	99,35
	1:3200	0,91	0,90	98,91
	1:6400	0,45	0,49	107,48
E	1:200	10,46	10,462	100,02
	1:400	5,23	5,559	106,29
	1:800	2,62	2,626	100,42
	1:1600	1,31	1,26	96,60
	1:3200	0,65	0,66	100,50

Analytical sensitivity

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

Limit of blank, LoB	2.256 ng/ml
Limit of detection, LoD	2.909 ng/ml
Limit of quantitation, LoQ	2.909 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP17-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 a range of compounds with structural similarity to adalimumab. There was no cross-reactivity observed.

Substance tested	Concentration added [ng/ml]	Concentration obtained [ng/ml]	Conclusion
Infliximab	225	< 2.256	< LoB
Golimumab	225	< 2.256	< LoB

High-Dose-Hook effect

No High-Dose-Hook effect was observed for drug concentrations up to 365 µg/ml.

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 should 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 the 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. Bradley JR (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214(2): 149-160.

2. Chiu YL, Rubin DT, Vermeire S, Louis E, Robinson AM, Lomax KG, Pollack PF, Paulson SK (2013) Serum adalimumab concentration and clinical remission in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 19(6): 1112-1122
3. Chaparro M, Guerra I, Muñoz-Linares P, Gisbert JP (2012) Systematic review: antibodies and anti-TNF- α levels in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 35(9): 971-986
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.
6. Perry, M., Bewshea, C., Brown, R., So, K., Ahmad, T., & McDonald, T. (2015). *Infliximab and adalimumab are stable in whole blood clotted samples for seven days at room temperature. Annals of Clinical Biochemistry.* Epub ahead of print.

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
	Consult specification data sheet		



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