

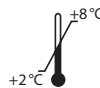
IDKmonitor[®] Vedolizumab drug level ELISA

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

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

Gültig ab / Valid from 2020-06-16

REF **K 9658**



IVD



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

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>Linearität</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	8
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	9
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	9
<i>Analytische Spezifität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von freiem Vedolizumab (gegen $\alpha_4\beta_7$ -Integrin gerichteter Therapieantikörper, z.B. ENTYVIO®) aus EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Patienten mit mittelschweren bis schweren aktiven Formen der Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, die unzureichend auf eine konventionelle Therapie oder einen Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α)-Antagonisten ansprechen, können auch mit Vedolizumab behandelt werden. Vedolizumab, ein humanisierter monoklonaler Therapieantikörper, bindet selektiv $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf aktivierten Lymphozyten und verhindert damit, dass diese in die Darmschleimhaut einwandern. Vedolizumab greift also über einen anderen Wirkmechanismus als die TNF α -Antagonisten in die Entzündungsreaktion ein und unterdrückt gezielt Entzündungen im Gastrointestinaltrakt.

Die Wirksamkeit der Vedolizumab-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. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Höhe des Talspiegels. Zu diesen zählen unter anderem die Dosis, die Krankheitsaktivität, individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und das Auftreten von Antikörpern gegen die Therapieantikörper (anti-drug antibodies, ADA). Der IDKmonitor® Vedolizumab drug level ELISA misst die Wirkstoffkonzentration und bietet dem behandelnden Arzt die Möglichkeit, die Therapie zu begleiten und frühzeitig zu optimieren.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9658	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 9658	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert	1 x 200 μ l
K 9658	STD	Standards, lyophilisiert (0; 15,6; 62,5; 250; 1000 ng/ml)	2 x 5 vials
K 9658	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9658	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 9658	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 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
- 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 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 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. 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** Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF), 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 7 Tage bei Raumtemperatur (15–30 °C) gelagert werden [6]. Die Proben können für 6 Monate bei -20 °C aufbewahrt werden.

Verdünnte EDTA-Plasma- bzw. Serumproben sind 7 Tage 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 Vedolizumab (gegen $\alpha_4\beta_7$ -Integrin gerichteter Therapieantikörper, z. B. ENTYVIO®) im EDTA-Plasma oder Serum. In diesem Assay bindet das freie Vedolizumab aus der Probe an den auf der Platte fixierten spezifischen monoklonalen anti-Vedolizumab-Antikörper. Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion des gebundenen Vedolizumab 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 Vedolizumab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

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 Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
3.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.

4.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung 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 Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
8.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
9.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut 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

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 200** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

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*

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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

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 2 Serumproben nachgewiesen.

Für Vedolizumab in Serum und EDTA-Plasma wurde in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung der Probenverdünnungsfaktoren ein lineares Verhalten im Bereich von 6,43 bis 253,78 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:200	102,89	102,89	100,00
	1:400	51,45	50,79	98,73
	1:800	25,72	30,90	120,12
	1:1600	12,86	14,07	109,43
	1:3200	6,43	6,72	104,57
B	1:200	253,78	253,78	100,00
	1:400	126,89	129,84	102,32
	1:800	63,45	60,82	95,86
	1:1600	31,72	28,06	88,44
	1:3200	15,86	13,00	81,93
	1:6400	7,93	6,20	78,22

Analytische Sensitivität

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

Leerwert (<i>limit of blank</i> , LoB)	3,725 ng/ml
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD)	7,349 ng/ml
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , LoQ)	8,672 ng/ml

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

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 20

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

Probe	Mittelwert [$\mu\text{g/ml}$]	VK [%]
1	9,55	6,8
2	18,95	7,0

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 24

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

Probe	Mittelwert [$\mu\text{g/ml}$]	VK [%]
1	28,53	7,2
2	35,65	8,9

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 2 Serumproben wurden dafür mit bekannten Vedolizumab-Konzentrationen versetzt und mit 2 Kit-Lots gemessen. Die Werte in der folgenden Tabelle entsprechen dem Mittelwert der beiden Messungen.

Probe [$\mu\text{g/ml}$]	Spike [$\mu\text{g/ml}$]	Erwartet [$\mu\text{g/ml}$]	Gemessen [$\mu\text{g/ml}$]	Wiederfindung [%]
< LoB	90,0	90,0	84,27	93,64
	30,0	30,0	29,57	98,57
	10,0	10,0	9,42	94,16
	3,3	3,3	3,10	93,98
	75,0	75,0	71,52	95,35
	25,0	25,0	23,76	95,02
	8,3	8,3	7,68	92,49
	2,8	2,8	2,34	83,61
< LoB	50,0	50,0	52,09	104,18
	25,0	25,0	27,66	110,62
	12,5	12,5	14,29	114,28

Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität gefunden.

Getestete Substanz	Maximale eingesetzte Konzentration [ng/ml]	Gefundene Konzentration [ng/ml]	Fazit
Adalimumab	225	< 3,725	< LoB
Infliximab	225	< 3,725	< LoB
Golimumab	225	< 3,725	< LoB

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- 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 dem 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.
- *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, zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Rosario, M. et al., 2015. DOP040 Relationship between vedolizumab pharmacokinetics and endoscopic outcomes in patients with Ulcerative Colitis. *J Crohn's Colitis*, **9**(S1), p.S1: S46.
2. Roblin, X. et al., 2016. DOP070 The relationship between vedolizumab drug concentrations at or before week 6 and remission at week 14 in ulcerative colitis patients from GEMINI 1. *J Crohn's Colitis*, **10**(S1), pp.S72–73.
3. Gils, A. et al., 2016. Abstract P005: Variability in Vedolizumab Exposure between Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J Crohn's Colitis*, **10**(S1), p.S91.

4. Christ, C. et al., 2015. Development and Validation of a Liquid Chromatographic Tandem Mass Spectrometric (LC-MS / MS) Assay for the Measurement of Vedolizumab (VLZ) Levels in Patient Serum. *J Crohn's Colitis*, **10**(S1), pp.S380–381.

Verwendete Symbole:

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

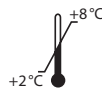
IDKmonitor[®] vedolizumab drug level ELISA

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

Valid from 2020-06-16



K 9658



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
7. ASSAY PROCEDURE	17
<i>Principle of the test</i>	17
<i>Test procedure</i>	18
8. RESULTS	19
9. LIMITATIONS	20
10. QUALITY CONTROL	20
<i>Reference range</i>	20
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
<i>Accuracy – Precision</i>	20
<i>Accuracy – Trueness</i>	21
<i>Analytical sensitivity</i>	21
<i>Linearity</i>	22
<i>Analytical specificity</i>	22
12. PRECAUTIONS	23
13. TECHNICAL HINTS	23
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of free vedolizumab (therapeutic antibody against $\alpha_4\beta_7$ integrin, e.g. ENTYVIO®) in EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Patients with moderately to severely active Colitis ulcerosa and Crohn's disease, who have had an inadequate response to conventional therapy or to anti-tumor necrosis factor alpha (TNF α) agents, can also be treated with vedolizumab. The humanised monoclonal therapeutic antibody vedolizumab binds $\alpha_4\beta_7$ integrin on activated lymphocytes and stops them from migrating into the intestinal mucosa. Thus, vedolizumab suppresses the inflammatory response via a different mechanism than anti-TNF α agents and specifically targets inflammation in the gastrointestinal tract.

The clinical efficacy of vedolizumab therapy correlates with the trough level, that is the drug level just before the next application of vedolizumab. Several factors influence the trough level, among them dosage and frequency of vedolizumab infusion, disease activity, individual pharmacokinetics and immune reaction (formation of anti-drug antibodies, ADA). The IDKmonitor® vedolizumab drug level ELISA measures reliably the effective drug concentration, giving the treating physician an opportunity to monitor and optimise the therapy early on.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9658	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 9658	CONJ	Conjugate, peroxidase-labelled, concentrate	1 x 200 μ l
K 9658	STD	Standards, lyophilised (0; 15.6; 62.5; 250; 1000 ng/ml)	2 x 5 vials
K 9658	CTRL 1	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 9658	CTRL 2	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 9658	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	2 x 100 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
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

- Ultrapure 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 ultrapure 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 ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure 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 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 ultrapure 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 + 10 ml 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

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

2 x 100 µl of the diluted sample are used for testing in duplicate.

Sample storage

Freshly collected EDTA plasma or serum can be stored for 7 days at room temperature (15–30 °C) [6]. The samples can be stored at -20 °C for 6 months.

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.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of free vedolizumab (therapeutic antibody against $\alpha_4\beta_7$ integrin, e.g. ENTYVIO®) in EDTA plasma or serum samples. In a first incubation step, the free vedolizumab from the sample is bound to the specific monoclonal anti-vedolizumab 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 reac-

tion. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of free vedolizumab in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. Free vedolizumab, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

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

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

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 test in duplicate.

1.	Add each 100 µl standards/controls/diluted samples into the respective wells.
2.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
3.	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.
4.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
5.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
6.	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.
7.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
8.	Incubate for 10–20 minutes** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
9.	Add 100 µl stop solution (STOP) and mix well.

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 results have to be multiplied by the **dilution factor of 200** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by 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 higher 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

LoB see chapter "Performance Characteristics".

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG 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 = 20

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

Sample	Mean value [µg/ml]	CV [%]
1	9.55	6.8
2	18.95	7.0

Reproducibility (Inter-Assay); n = 24

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

Sample	Mean value [µg/ml]	CV [%]
1	28.53	7.2
2	35.65	8.9

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, Vedolizumab-spikes with known concentrations were added to 2 different serum-samples und measured using 2 kit lots. The table below shows the mean values of both lots.

Sample [µg/ml]	Spike [µg/ml]	Expected [µg/ml]	Obtained [µg/ml]	Recovery [%]
< LoB	90.0	90.0	84.27	93.64
	30.0	30.0	29.57	98.57
	10.0	10.0	9.42	94.16
	3.3	3.3	3.10	93.98
	75.0	75.0	71.52	95.35
	25.0	25.0	23.76	95.02
	8.3	8.3	7.68	92.49
	2.8	2.8	2.34	83.61
< LoB	50.0	50.0	52.09	104.18
	25.0	25.0	27.66	110.62
	12.5	12.5	14.29	114.28

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	3.725 ng/ml
Limit of detection, LoD	7.349 ng/ml
Limit of quantitation, LoQ	8.672 ng/ml

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

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 by a serial dilution of 2 different serum-samples.

For Vedolizumab in serum and EDTA-plasma, the method has been demonstrated to be linear from 6.43 to 253.78 ng/ml, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval. The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
A	1:200	102.89	102.89	100.00
	1:400	51.45	50.79	98.73
	1:800	25.72	30.90	120.12
	1:1600	12.86	14.07	109.43
	1:3200	6.43	6.72	104.57
B	1:200	253.78	253.78	100.00
	1:400	126.89	129.84	102.32
	1:800	63.45	60.82	95.86
	1:1600	31.72	28.06	88.44
	1:3200	15.86	13.00	81.93
	1:6400	7.93	6.20	78.22

Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to Vedolizumab. There was no cross-reactivity observed.

Substance tested	Concentration added	Concentration obtained [ng/ml]	Conclusion
Adalimumab	225	< 3.725	< LoB
Infliximab	225	< 3.725	< LoB
Golimumab	225	< 3.725	< LoB

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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 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.
- 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 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 sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Rosario, M. et al., 2015. DOP040 Relationship between vedolizumab pharmacokinetics and endoscopic outcomes in patients with Ulcerative Colitis. *J Crohn's Colitis*, **9**(S1), p.S1: S46.
2. Roblin, X. et al., 2016. DOP070 The relationship between vedolizumab drug concentrations at or before week 6 and remission at week 14 in ulcerative colitis patients from GEMINI 1. *J Crohn's Colitis*, **10**(S1), pp.S72–73.
3. Gils, A. et al., 2016. Abstract P005: Variability in Vedolizumab Exposure between Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J Crohn's Colitis*, **10**(S1), p.S91.
4. Christ, C. et al., 2015. Development and Validation of a Liquid Chromatographic Tandem Mass Spectrometric (LC-MS / MS) Assay for the Measurement of Vedolizumab (VLZ) Levels in Patient Serum. *J Crohn's Colitis*, **10**(S1), pp.S380–381.

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		