

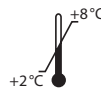
# **IDKmonitor<sup>®</sup> Certolizumab drug level ELISA**

***Zur in-vitro-Bestimmung der Konzentration des freien  
Certolizumab (z. B. Cimzia<sup>®</sup>) in Serum***

***For the in vitro determination of free Certolizumab  
concentration (e. g. Cimzia<sup>®</sup>) in serum***

Gültig ab / Valid from 2022-02-22

**REF** K 9662



**IVD**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>3</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>5</b>
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>6</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>7</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>7</b>
<i>Referenzwerte</i>	7
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>7</b>
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	7
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	8
<i>Linearität</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Interferenzen</i>	10
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>11</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>12</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>12</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>13</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

IDKmonitor® Certolizumab drug level ELISA ist ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für die quantitative Bestimmung des freien anti-TNF $\alpha$ -Therapieantikörpers Certolizumab (z.B. Cimzia®) in humanem Serum. Das Produkt ist ein *in-vitro*-Diagnostikum und für den Gebrauch durch Fachpersonal geeignet. Die Abarbeitung kann manuell erfolgen. Dieser Test dient als Ergänzung des Therapie-Monitorings bei der Behandlung mit Cimzia® (Certolizumab pegol).

## 2. EINLEITUNG

Bei Certolizumab handelt es sich um das Fab'-Fragment eines rekombinanten, humanisierten Antikörpers, der mit Polyethylenglykol (PEG) konjugiert ist. Daher wird dieses auch als Certolizumab pegol bezeichnet.

Certolizumab pegol (Cimzia®) ist ein TNF-alpha-Inhibitor, der zur Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn [1] und der rheumatischen Arthritis [2] eingesetzt wird [3]. Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF $\alpha$ ) gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen, welche Entzündungsreaktionen fördern und aufrechterhalten. Die Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen erfolgt daher immer häufiger mit Antikörpern gegen TNF $\alpha$ , die direkt in die zugrundeliegende Entzündungsreaktion eingreifen. Die Wirksamkeit der Therapie korreliert in der Regel mit der Menge an Therapieantikörpern, 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 und die Frequenz der anti-TNF $\alpha$ -Behandlung, die Krankheitsaktivität, individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und das Auftreten von Antikörpern gegen die Therapieantikörper (anti-drug antibodies, ADA) [4, 5].

Mit dem vorliegenden ELISA-Kit kann der Spiegel des therapeutischen Antikörpers Certolizumab in Serumproben bestimmt werden. Die Resultate helfen dem behandelnden Arzt dabei, die Therapie zu überwachen und frühzeitig zu optimieren.

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Inhalt	Kit-Komponenten	Menge
K 9662	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 9662	CONJ	Konjugat, peroxidase markiert, gebrauchsfertig	1 x 12,5 ml
K 9662	STD	Standards, gebrauchsfertig (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	1 x 6 vials
K 9662	CTRL 1	Kontrolle 1, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 9662	CTRL 2	Kontrolle 2, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 9662	SAMPLE-BUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 80 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 10–1 000 µl
- Absorptionspapier
- Thermoschüttler (25 °C)
- 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. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt** werden. Der Kit kann so bis zu 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 der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Der **WASH-BUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Alle anderen Testreagenzien – mit Ausnahme der Mikrotiterstreifen (PLATE), siehe „Pipettierschema“ im Kapitel „Testdurchführung“ – sind bei 2–8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### Serum

Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:1 000** mit Verdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt, z. B. wie folgt:

- **10 µl** Probe + **490 µl** SAMPLEBUF = **1:50 (Verdünnung I)**
- **20 µl** Verdünnung I + **380 µl** SAMPLEBUF = **1:20 (Verdünnung II)**.  
Diese entspricht nun einer **Gesamtverdünnung von 1:1 000** (= verdünnte Proben).

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

### Lagerung

Frisch abgenommenes Serum kann 7 Tage bei 2–8 °C gelagert werden. Bei -20 °C können die Proben bis zu 6 Monate lang aufbewahrt werden.

Verdünnte Serumproben können nicht gelagert werden.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung des freien Certolizumab (gegen TNF $\alpha$  gerichteter Therapieantikörper) im Serum. In diesem Assay bindet das freie Certolizumab aus der Probe an auf der Platte gebundenes TNF $\alpha$ . Nach einem Waschschritt erfolgt die Detektion des gebundenen Certolizumab durch Zugabe eines Certolizumab-spezifischen 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 dem Gehalt des freien Certolizumab direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve lässt sich die Konzentration des freien Certolizumab in den Proben ermitteln.

### *Pipettierschema*

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (20–30°C) bringen, gut mischen.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen mit beiliegender Abdeckfolie (FOL) abgeklebt, zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der wiederverschlossenen Aluminiumverpackung bei 2–8°C gelagert und innerhalb von 11 Monaten verwendet werden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	<b>100 <math>\mu</math>l Standards, Kontrollen und Proben</b> (verdünnte Proben) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> im Thermoschüttler bei <b>25°C</b> und <b>550 rpm</b> inkubieren.
3.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 <math>\mu</math>l Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
4.	<b>100 <math>\mu</math>l Konjugat (CONJ)</b> in alle Vertiefungen pipettieren.
5.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> im Thermoschüttler bei <b>25°C</b> und <b>550 rpm</b> inkubieren.

6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7.	<b>100 µl Substrat</b> (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
8.	<b>15–20 min*</b> bei Raumtemperatur (20–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.
9.	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, mischen.
10.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

\*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

Das unten beschriebene Modell kann zur Auswertung benutzt werden:

### Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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.

### Serumproben

Der ermittelte Certolizumab-Spiegel der Serumproben wird mit dem Verdünnungsfaktor 1 000 multipliziert. Hierbei erhält man ein Ergebnis in der Einheit ng/ml. Für die Umrechnung in µg/ml wird der Wert durch 1 000 geteilt.

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:

$$\text{höchste Konzentration der Standardkurve} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor: } 300 \text{ ng/ml} * 1000 = 300\,000 \text{ ng/ml} = 300 \mu\text{g/ml}$$

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{LoQ} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor: } 5,1 \text{ ng/ml} * 1000 = 5\,100 \text{ ng/ml} = 5,10 \mu\text{g/ml}$$

## 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=32

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

Probe	Mittelwert [ $\mu\text{g/ml}$ ]	VK [%]
1	82,69	6,0
2	43,09	6,1

**Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n=60**

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 3 Serumproben unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ $\mu\text{g/ml}$ ]	VK [%]
1	69,1	11,5
2	21,3	13,2
3	88,6	6,6

**Genauigkeit – Richtigkeit**

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 3 Serumproben wurden dafür mit bekannten Certolizumab Konzentrationen versetzt und gemessen.

Probe	Spike [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Erwartet [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Gemessen [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Wiederfindung [%]
1	5	5	5,8	116,0
2	5	5	5,2	104,0
3	5	5	4,8	96,0
1	7,5	7,5	8,4	112,0
2	7,5	7,5	7,6	101,3
3	7,5	7,5	7,0	93,3
1	15	15	16,4	109,3
2	15	15	16,7	111,3
3	15	15	17,2	114,7
1	25	25	21,4	85,6
2	25	25	27,9	111,6
3	25	25	24,1	96,4
1	50	50	51,4	102,8
2	50	50	54,7	109,4
3	50	50	51,2	102,4
1	125	125	128,5	102,8
2	125	125	124,5	99,6
3	150	150	164,2	109,5

Probe	Spike [µg/ml]	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]	Wiederfindung [%]
1	250	250	261,8	104,7
2	250	250	266,3	106,5
3	300	300	296,4	98,8

### Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP06-A mittels einer seriellen Verdünnung von 5 Serumproben nachgewiesen.

Für Certolizumab in Serum wurde in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ein lineares Verhalten im Bereich von 14,7 bis 268,9 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als ±20 %.

Probe	Verdünnung	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]	Wiederfindung [%]
1	1:500	198,2	198,2	100
	1:1 000	99,1	82,6	83,4
	1:2 000	49,6	38,6	77,9
	1:4 000	24,8	19,4	78,3
	1:8 000	12,4	11,4	92,0
	1:12 000	8,3	7,3	88,4
	1:16 000	6,2	6,8	109,8
	1:18 000	5,5	6,7	121,7
2	1:500	130,1	130,1	100
	1:1 000	65,1	64,8	99,6
	1:2 000	32,5	29,8	91,6
	1:4 000	16,3	15,6	95,9
	1:8 000	8,1	9,6	118,1
	1:12 000	5,4	8,4	155,0
	1:16 000	4,1	6,9	169,7
	1:18 000	3,6	5,8	160,5

Probe	Verdünnung	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]	Wiederfindung [%]
3	1:250	258,2	258,2	100
	1:500	129,1	105,1	81,4
	1:1 000	62,0	46,5	75,0
	1:2 000	32,3	26,0	80,6
	1:4 000	16,1	13,9	86,1
	1:8 000	8,1	8,0	99,1
4	1:250	268,9	268,9	100
	1:500	134,5	109,4	81,4
	1:1 000	62,0	46,8	75,5
	1:2 000	33,6	25,2	75,0
	1:4 000	16,8	13,8	82,1
	1:8 000	8,4	7,9	94,0
5	1:500	109,5	109,5	100,0
	1:1 000	54,8	44,6	81,5
	1:2 000	27,4	24,1	88,0
	1:4 000	13,7	14,7	107,4
	1:8 000	6,8	10,2	149,0

### Analytische Sensitivität

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

Leerwert (limit of blank, LoB) 3,7 ng/ml

Nachweisgrenze (limit of detection, LoD) 5,1 ng/ml

Bestimmungsgrenze (limit of quantitation, LoQ) 5,1 ng/ml

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

### Interferenzen

Endogene und exogene Störsubstanzen wurden in auf Certolizumab positive und negative Patientenseren gegeben. Dabei wurden mit bis zur angegeben getesteten Interferentenkonzentration keine Interferenzen nachgewiesen.

Getestete Substanz	Getestete Interferenten Konzentration	Gefundene Analyt Konzentration [ng/ml]	Fazit
Hämoglobin	5 mg/ml	< 5,1	< LoQ
Bilirubin	6,25 µg/ml	< 5,1	< LoQ
Lipide	3 %	< 5,1	< LoQ
Methotrexat	6 µg/ml	< 5,1	< LoQ

## 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 gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

**Achtung:** Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- 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. Sandborn WJ, et al., Certolizumab Pegol for the Treatment of Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2007, 357:228-238. DOI: 10.1056/NEJMoa067594
2. Smolen JS, et al. Head-to-head comparison of certolizumab pegol versus adalimumab in rheumatoid arthritis: 2-year efficacy and safety results from the randomised EXXELERATE study. *Lancet* 2016;388:2763–74.OT
3. Niti Goel & Sue Stephens (2010) Certolizumab Pegol, *mAbs*, 2:2, 137-147, DOI: 10.4161/mabs.2.2.11271
4. Vande Casteele N, Gils A. Pharmacokinetics of anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: Adding value to current practice. *Journal of clinical pharmacology*. 2015 Mar;55 Suppl 3(May 2014):S39-50.
5. Gehin, J.E., Goll, G.L., Warren, D.J. et al. Associations between certolizumab pegol serum levels, anti-drug antibodies and treatment response in patients with inflammatory joint diseases: data from the NOR-DMARD study. *Arthritis Res Ther* 1,256 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13075-019-2009-5>

### Verwendete Symbole:

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

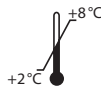




# **IDKmonitor<sup>®</sup> Certolizumab drug level ELISA**

*For the in vitro determination of free Certolizumab  
concentration (e. g. Cimzia<sup>®</sup>) in serum*

Valid from 2022-02-22



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com) [www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>17</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>19</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>19</b>
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>20</b>
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Test procedure</i>	20
<b>8. RESULTS</b>	<b>21</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>22</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>22</b>
<i>Reference range</i>	22
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>22</b>
<i>Accuracy – Precision</i>	22
<i>Accuracy – Trueness</i>	23
<i>Analytical sensitivity</i>	24
<i>Linearity</i>	24
<i>Interferences</i>	26
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>26</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>27</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>27</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>28</b>

## 1. INTENDED USE

IDKmonitor® Certolizumab drug level ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative determination of the free anti-TNF $\alpha$  therapy antibody Certolizumab (e.g. Cimzia®) in human serum. The assay is an in vitro diagnostic medical device and is intended to be used by professional users in a laboratory environment. The test can be performed manually. This test serves as complement to therapy monitoring during treatment with Cimzia® (certolizumab pegol).

## 2. INTRODUCTION

Certolizumab is the Fab' fragment of a recombinant humanized antibody conjugated to polyethylene glycol (PEG). Therefore, this is also called certolizumab pegol.

Certolizumab pegol (Cimzia®) is a TNF-alpha inhibitor used for the treatment of chronic inflammatory diseases, such as Crohn's disease [1] and rheumatoid arthritis [2, 3]. Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) is one of the proinflammatory cytokines that promote and maintain inflammatory responses. Therefore, the treatment of chronic inflammatory diseases is increasingly performed with antibodies against TNF $\alpha$ , which directly interfere with the underlying inflammatory response. The efficacy of the therapy usually correlates with the amount of therapy antibody detectable in the patient's serum shortly before the next drug administration, the so-called trough level. Various factors influence the level of the trough. These include the dose and frequency of anti-TNF $\alpha$  treatment, disease activity, individual differences in pharmacokinetics, and the presence of anti-drug antibodies (ADA) [4, 5].

The present ELISA kit can be used to determine the level of the therapeutic antibody certolizumab in serum samples. The results help the treating physician to monitor and optimize the therapy at an early stage.

### 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 9662	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 9662	CONJ	Conjugate, peroxidase-labeled, ready-to-use	1 x 12.5 ml
K 9662	STD	Calibrators, ready-to-use (see specification for concentrations)	1 x 6 vials
K 9662	CTRL 1	Control 1, ready-to-use (see specification for concentrations)	1 x 1 vial
K 9662	CTRL 2	Control 2, ready-to-use (see specification for concentrations)	1 x 1 vial
K 9662	SAMPLEBUF	Dilution buffer, ready-to-use	1 x 80 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 10–1 000 µl tips
  - Absorbent paper
  - Thermo shaker (25 °C)
  - Multi-channel pipets or repeater pipets
  - Centrifuge
  - Vortex
  - Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
  - Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)
- \* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

## 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solution. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents, except microtiter strips (PLATE) – see “Test procedure” in chapter “Assay Procedure” –, are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at 2–8 °C.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### Serum

Serum samples must be diluted **1:1 000** with dilution buffer (SAMPLEBUF) before performing the assay, e.g.

- **10 µl** sample + **490 µl** SAMPLEBUF = **1:50 (dilution I)**
- **20 µl** dilution I + **380 µl** SAMPLEBUF = **1:20 (dilution II)**.

This results in a **total dilution of 1:1 000** (= diluted SAMPLE).

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

### Sample storage

Freshly collected serum can be stored for 7 days at 2–8 °C. At -20 °C, the samples are stable for 6 months.

Diluted serum samples can't be stored.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This ELISA is designed to determine the quantity of free certolizumab (therapeutic antibody against TNF $\alpha$ ) in serum samples. In a first incubation step, the free certolizumab from the sample is bound TNF $\alpha$  coated on the plate. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a further incubation step, certolizumab-specific peroxidase-labeled 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 certolizumab 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 certolizumab in the samples are determined directly from this curve.

### *Test procedure*

Bring all **reagents and samples to room temperature** (20–30 °C) and mix well.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered with the provided foil (FOL) together with the desiccant bag in the re-closed aluminum packaging at 2–8 °C and use them in the next 11 months.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Add <b>100 <math>\mu</math>l of standards, controls or samples</b> (diluted SAMPLE) into the respective wells.
2:	Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour</b> at 25 °C on a thermo shaker at <b>550 rpm</b> .
3.	Discard the contents of each well. Wash each well <b>5 x</b> by dispensing <b>250 <math>\mu</math>l of wash buffer</b> into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
4.	Add <b>100 <math>\mu</math>l conjugate</b> (CONJ) into each well.
5.	Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour</b> at 25 °C on a thermo shaker at <b>550 rpm</b> .

6.	Discard the contents of each well. Wash each well <b>5 x</b> by dispensing <b>250 µl of wash buffer</b> into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
7.	Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.
8.	Incubate for <b>15–20 min*</b> at room temperature (20–30 °C) <b>in the dark</b> .
9.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well, mix.
10.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> against 620 nm as a reference.

\*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 algorithm can be used to calculate the results.

### Point-to-point calculation

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

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the program used, the duplicate values should be evaluated manually.

### Serum samples

The obtained Certolizumab levels of serum samples have to be multiplied with the dilution factor of 1 000. The resulting value has the unit ng/ml. To convert the value to µg/ml, divide it by 1 000.

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) must 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:

$$\text{highest concentration of the standard curve} \times \text{sample dilution factor to be used} \\ 300 \text{ ng/ml} * 1\,000 = 300\,000 \text{ ng/ml} = 300 \mu\text{g/ml}$$

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

$$\text{LoQ} \times \text{sample dilution factor to be used:} \\ 5.1 \text{ ng/ml} * 1\,000 = 5\,100 \text{ ng/ml} = 5.10 \mu\text{g/ml}$$

## 10. QUALITY CONTROL

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

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

### *Reference range*

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Accuracy – Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n=32**

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

Sample	Mean value [ $\mu\text{g/ml}$ ]	CV [%]
1	82.69	6.0
2	43.09	6.1



**Reproducibility (Inter-Assay); n=60**

The reproducibility was assessed with 3 serum samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [ $\mu\text{g/ml}$ ]	CV [%]
1	69.1	11.5
2	21.3	13.2
3	88.6	6.6

**Accuracy – Trueness**

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, certolizumab spikes with known concentrations were added to 3 different serum samples.

Sample [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Spike [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Expected [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Obtained [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Recovery [%]
1	5	5	5,8	116.0
2	5	5	5.2	104.0
3	5	5	4.8	96.0
1	7.5	7.5	8.4	112.0
2	7.5	7.5	7.6	101.3
3	7.5	7.5	7.0	93.3
1	15	15	16.4	109.3
2	15	15	16.7	111.3
3	15	15	17.2	114.7
1	25	25	21.4	85.6
2	25	25	27.9	111.6
3	25	25	24.1	96.4
1	50	50	51.4	102.8
2	50	50	54.7	109.4
3	50	50	51.2	102.4
1	125	125	128.5	102.8
2	125	125	124.5	99.6
3	150	150	164.2	109.5

Sample [µg/ml]	Spike [µg/ml]	Expected [µg/ml]	Obtained [µg/ml]	Recovery [%]
1	250	250	261.8	104.7
2	250	250	266.3	106.5
3	300	300	296.4	98.8

### *Analytical sensitivity*

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

Limit of blank, LoB 3.7 ng/ml

Limit of detection, LoD 5.1 ng/ml

Limit of quantitation, LoQ 5.1 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP17-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 with a serial dilution of 5 different serum samples.

For certolizumab in serum and plasma, the method has been demonstrated to be linear from 14.7 to 268.9 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 [µg/ml]	Obtained [µg/ml]	Recovery [%]
1	1:500	198.2	198.2	100
	1:1 000	99.1	82.6	83.4
	1:2 000	49.6	38.6	77.9
	1:4 000	24.8	19.4	78.3
	1:8 000	12.4	11.4	92.0
	1:12 000	8.3	7.3	88.4
	1:16 000	6.2	6.8	109.8
	1:18 000	5.5	6.7	121.7

Sample	Dilution	Expected [µg/ml]	Obtained [µg/ml]	Recovery [%]
2	1:500	130.1	130.1	100
	1:1 000	65.1	64.8	99.6
	1:2 000	32.5	29.8	91.6
	1:4 000	16.3	15.6	95.9
	1:8 000	8.1	9.6	118.1
	1:12 000	5.4	8.4	155.0
	1:16 000	4.1	6.9	169.7
	1:18 000	3.6	5.8	160.5
3	1:250	258.2	258.2	100
	1:500	129.1	105.1	81.4
	1:1 000	62.0	46.5	75.0
	1:2 000	32.3	26.0	80.6
	1:4 000	16.1	13.9	86.1
	1:8 000	8.1	8.0	99.1
4	1:250	268.9	268.9	100
	1:500	134.5	109.4	81.4
	1:1 000	62.0	46.8	75.5
	1:2 000	33.6	25.2	75.0
	1:4 000	16.8	13.8	82.1
	1:8 000	8.4	7.9	94.0
5	1:500	109.5	109.5	100.0
	1:1 000	54.8	44.6	81.5
	1:2 000	27.4	24.1	88.0
	1:4 000	13.7	14.7	107.4
	1:8 000	6.8	10.2	149.0

## Interferences

Endogenous and exogenous interferents were added to patient sera positive and negative for certolizumab. No interferences were detected with up to the indicated tested interferent concentration.

Substances tested	Tested interferent concentration	Measured analyte concentration [ng/ml]	Conclusion
Hemoglobin	5 mg/ml	< 5.1	< LoQ
Bilirubin	6.25 µg/ml	< 5.1	< LoQ
Lipids	3 %	< 5.1	< LoQ
Methotrexate	6 µg/ml	< 5.1	< LoQ

## 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 or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

**Warning:** Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- 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. Sandborn WJ, et al., Certolizumab Pegol for the Treatment of Crohn's Disease. N Engl J Med 2007, 357:228-238. DOI: 10.1056/NEJMoa067594
2. Smolen JS, et al. Head-to-head comparison of certolizumab pegol versus adalimumab in rheumatoid arthritis: 2-year efficacy and safety results from the randomised EXXELERATE study. Lancet 2016;388:2763–74.OT
3. Niti Goel & Sue Stephens (2010) Certolizumab Pegol, mAbs, 2:2, 137-147, DOI: 10.4161/mabs.2.2.11271
4. Vande Casteele N, Gils A. Pharmacokinetics of anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: Adding value to current practice. Journal of clinical pharmacology. 2015 Mar;55 Suppl 3(May 2014):S39-50.
5. Gehin, J.E., Goll, G.L., Warren, D.J. et al. Associations between certolizumab pegol serum levels, anti-drug antibodies and treatment response in patients with inflammatory joint diseases: data from the NOR-DMARD study. Arthritis Res Ther 1,256 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13075-019-2009-5>

### 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		Irritant



## **Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

[info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

