

IDKmonitor[®] Ustekinumab total ADA ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung der gesamten humanen
Antikörper gegen Ustekinumab (z. B. STELARA[®])
in EDTA-Plasma und Serum*

*For the in vitro determination of total human antibodies
against ustekinumab (e. g. STELARA[®])
in EDTA plasma and serum*

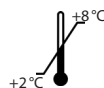
Gültig ab / Valid from 2022-02-17



K 9667



96



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	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. TESTVORBEREITUNG	5
<i>Vorbereitung der Proben und Kontrollen</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
<i>Messbereich</i>	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzwerte</i>	7
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	8
<i>Analytische Spezifität</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von humanen *anti-drug antibodies* (ADA) gegen den Therapieantikörper Ustekinumab (z.B. STELARA®) auch bei Therapieantikörperspiegel in Serum und EDTA-Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Ustekinumab ist ein monoklonaler, humaner Therapieantikörper gegen p40, die gemeinsame Untereinheit der Interleukine 12 und 23 (IL-12/23). Diese beiden Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen, die durch das Immunsystem verursacht werden, so z. B. bei Morbus Crohn, Psoriasis oder Multipler Sklerose. Ustekinumab blockiert die Signalwirkung von IL-12/23 und inhibiert so die T-Zell-basierte Immunantwort [1].

Die Wirksamkeit der anti-IL-12/23-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 und die Frequenz der anti-IL-12/23-Behandlung, die Krankheitsaktivität, individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und das Auftreten von Antikörpern gegen die Therapieantikörper (*anti-drug antibodies*, ADA) [2]. Es wird davon ausgegangen, dass die Therapieantikörper durch die ADA funktionell neutralisiert oder schneller ausgeschieden werden. Folgen der ADA-Bildung können daher das langfristige Versagen der Therapie wie auch schwere allergische Reaktionen während der Applikation des Therapieantikörpers sein [3].

Der IDKmonitor® Ustekinumab total ADA ELISA zum Nachweis der Gesamt-Antikörper gegen Ustekinumab (z. B. STELARA®) misst freie sowie gebundene Antikörper gegen Ustekinumab. Der Test erlaubt auch in Anwesenheit von Ustekinumab eine zuverlässige ADA-Bestimmung und eignet sich daher besonders für das Therapie-monitoring, wenn ein Ustekinumabspiegel zu erwarten ist, z. B. kurz nach einer Infusion. Zusammen mit der Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von Ustekinumab bietet der IDKmonitor® Ustekinumab total ADA ELISA dem behandelnden Arzt die Möglichkeit, die Therapie zu begleiten und frühzeitig zu optimieren.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9667	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 9667	TRACER	Tracerkonzentrat, biotinyliert	1 x 600 µl
K 9667	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidasemarkiert	1 x 600 µl
K 9667	CTRL CUT-OFF	Cut-off-Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9667	CTRL NEG	Negativ-Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9667	CTRL POS	Positiv-Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9667	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 9667	ABBUF	Antikörperverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 10 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*
- Pipetten mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- **Alle Reagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur (15–30 °C) bringen.**
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- **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.
- **Vorbereitung der Kontrollen** siehe Kapitel 6.
- **Vorbereitung des Konjugats und des Tracers:** **Tracerkonzentrat (TRACER)** und **Konjugatkonzentrat (CONJ)** werden **wenige Minuten vor Gebrauch 1:12** in **Antikörperverdünnungspuffer (ABBUF)** verdünnt. Hierzu den **ABBUF** vorlegen, dann nacheinander **TRACER** und **CONJ** dazupipettieren (z. B. 2500 µl Antikörperverdünnungspuffer + 250 µl Tracer + 250 µl Konjugat). **TRACER** und **CONJ** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Tracer** (1:12 verdünnter TRACER) und **Konjugat** (1:12 verdünntes CONJ) **sind nicht stabil und können nicht aufbewahrt werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. TESTVORBEREITUNG

Vorbereitung der Proben und Kontrollen

1.	<p>Die Proben werden 1:10 in Assaypuffer (ASYBUF) verdünnt: 25 µl Probe in einem Reaktionsgefäß vorlegen, dann 225 µl Assaypuffer zugeben. Anschließend gut mischen. Die Zugabe des Assaypuffers sollte bei allen Proben möglichst zeitnah erfolgen, da dieser Schritt der Spaltung der Antikörper-Therapieantikörper-Komplexe dient.</p> <p>Die Kontrollen werden mit 250 µl Assaypuffer (ASYBUF) rekonstituiert und gevortext. Dies sollte gleichzeitig mit der Probenverdünnung stattfinden, damit die gleiche Behandlung von Kontrollen und Proben gewährleistet ist.</p>
2.	<p>Die Kontrollen und verdünnten Proben werden in den Reaktionsgefäßen bzw. Fläschchen 20 min unter Schütteln auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur inkubiert.</p> <p>ACHTUNG: Die Inkubationszeit beginnt mit der Zugabe des Assaypuffers.</p>
3.	<p>Zu je 250 µl Kontrolle/verdünnter Probe werden jeweils 60 µl Tracer/Konjugat/Antikörperverdünnungspuffer-Lösung (siehe Vorbereitung der Reagenzien) hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.</p>

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient der Bestimmung der Antikörper gegen den Therapieantikörper Ustekinumab (z.B. STELARA®). Bei der Probenvorbereitung wird der anti-TNFα-Blocker-Antikörper (*anti-drug antibody*, ADA) von dem Therapieantikörper abgespalten, so dass alle ADA frei vorliegen. Durch die Zugabe eines Peroxidase-Konjugats (Peroxidase-markierter Therapieantikörper) und des Tracers (biotinylierter Therapieantikörper) wird der unmarkierte Therapieantikörper verdrängt und die markierten Antikörper bilden einen Komplex mit den ADA. Über das Biotin bindet dieser Komplex an eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte. Der Nachweis erfolgt über das Peroxidase-Konjugat, da die Peroxidase das Substrat TMB zu einem blauen Farbstoff umsetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Der entstandene Farbumschlag wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Auswertung erfolgt über die Cut-off-Kontrolle.

Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen 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.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl der vorinkubierten Kontrollen/Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1,5 h unter Schütteln* bei Raumtemperatur (15–30°C) inkubieren.
4.	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.
5.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30°C) im Dunkeln inkubieren.
7.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus* kurz mischen.
8.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen.

* 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

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

Proben, die eine höhere mittlere optische Dichte (OD) haben als die OD der Cut-off-Kontrolle, sind somit positiv.

Zur Auswertung des Tests empfehlen wir lineare Regression mit linearer Ordinate bzw. Abszisse für optische Dichte und Konzentration.

Vor jeder automatischen Auswertung stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchführen. Falls dies nicht durch die verwendete Software erfolgt, die Kontrolle manuell durchführen.

Rechenbeispiel positive Probe

mittlere OD Patientenprobe	0,735
mittlere OD Cut-off-Kontrolle	0,085 = 10 AU/ml
Konzentration Patientenprobe	$\frac{0,735 \times 10 \text{ AU/ml}}{0,085} = 86,47 \text{ AU/ml}$

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Messbereich

Die Untergrenze des Messbereichs ist der LoB.

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 20

Die Wiederholbarkeit wurde mit 3 Proben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	39,42	3,5
2	22,28	3,3
3	12,04	8,5

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 10

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 5 Proben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	54,03	17,8
2	93,50	15,8
3	59,03	22,1
4	16,49	20,8
5	11,03	19,6

Analytische Sensitivität

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 4,964 AU/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 7,388 AU/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 10 AU/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 10 % VK.

Analytische Spezifität

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

Hierfür wurde je eine Probe gemessen, die ADAs (anti-drug-Antikörper) gegen das in der Tabelle angegebene Medikament enthalten.

Getestete Substanz	Gemessen mit free ADA Kit [AU/ml]*	Gefundene Konzentration [AU/ml]	Fazit
Adalimumab ADA	> 75	3,574	< LoB
Etanercept ADA	> 75	4,006	< LoB
Golimumab ADA	68-186	3,374	< LoB
Infliximab ADA	> 75	4,217	< LoB
Vedolizumab ADA	> 15	4,183	< LoB

*gemessen mit dem entsprechenden free ADA Kit (IDKmonitor® Adalimumab free ADA ELISA (K 9652), IDKmonitor® Etanercept free ADA ELISA (K 9653), IDKmonitor® Golimumab free ADA ELISA (K 9649), IDKmonitor® Infliximab free ADA ELISA (K 9650) und IDKmonitor® Vedolizumab free ADA ELISA (K 9648))

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 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, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Scherl EJ, Kumar S, Warren RU. Review of the safety and efficacy of ustekinumab. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2010;3(5):321–8.
2. Chiu HY, Chu TW, Cheng YP, Tsai TF. The association between clinical response to ustekinumab and immunogenicity to ustekinumab and prior adalimumab. *PLoS ONE*. 2015;10(11):1–10.
3. Barré A, Colombel JF, Ungaro R. Review article: predictors of response to vedolizumab and ustekinumab in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(7):896–905.
4. Jauregui-Amezaga A, Somers M, De Schepper H, Macken E. Next generation of biologics for the treatment of Crohn's disease: an evidence-based review on ustekinumab. *Clin Exp Gastroenterol*. 2017;10:293–301.
5. Vermeire S, Gils A, Accossato P, Lula S, Marren A. Immunogenicity of biologics in inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2018;11:1756283X17750355.

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[®] Ustekinumab total ADA ELISA

***For the in vitro determination of total human
antibodies against ustekinumab (e. g. STELARA[®])
in EDTA plasma and serum***

Valid from 2022-02-17



K 9667



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. PREPARATION OF THE ASSAY	17
<i>Preparation of samples and controls</i>	17
7. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Test procedure</i>	18
8. RESULTS	19
9. LIMITATIONS	19
<i>Measurement range</i>	19
10. QUALITY CONTROL	20
<i>Reference range</i>	20
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
<i>Accuracy – Precision</i>	20
<i>Analytical Sensitivity</i>	21
<i>Analytical specificity</i>	21
12. PRECAUTIONS	21
13. TECHNICAL HINTS	22
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	22
15. LITERATURE	23

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the determination of human anti-drug antibodies (ADA) against the therapeutic antibody ustekinumab (e.g. STELARA®) in the presence of ustekinumab in EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Ustekinumab is a monoclonal, human therapeutic antibody targeting p40, the common subunit of interleukin 12 and 23 (IL-12/23). Both cytokines play a fundamental role in immune-mediated inflammatory disorders such as Crohn's disease, psoriasis or multiple sclerosis. Ustekinumab blocks IL-12/23 signalling, thus inhibiting the T cell-mediated immune response [1].

The clinical efficacy of anti-IL-12/23 therapy usually correlates with the trough level of the therapeutic antibody, meaning the drug level just before the next application of the drug. Several factors influence the trough level, among them dosage and frequency of anti-IL-12/23 treatment, disease activity, individual pharmacokinetics and immune reaction (formation of anti-drug antibodies, ADA) [2]. It is thought that ADA functionally neutralize the therapeutic antibodies or induce their rapid elimination. Consequences of ADA formation can be therapy failure and allergic reactions during the application of the therapeutic antibody [3].

The IDKmonitor® Ustekinumab total ADA ELISA for the detection of total antibodies against infliximab (e.g. STELARA®) measures free and bound antibodies against ustekinumab. This assay allows a reliable determination of ADA even in the presence of ustekinumab; therefore it is ideal for therapy monitoring when a measurable ustekinumab concentration is expected, for example shortly after the last infusion. In combination with the drug level determination, the IDKmonitor® Ustekinumab total ADA 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 9667	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 9667	TRACER	Tracer concentrate, biotinylated	1 x 600 µl
K 9667	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 600 µl

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9667	CTRL CUT-OFF	Cut-off control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9667	CTRL NEG	Negative control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 9667	CTRL POS	Positive control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 9667	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	2 x 15 ml
K 9667	ABBUF	Antibody dilution buffer, ready-to-use	1 x 10 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), 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 10–1 000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- 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

- **Bring all reagents to room temperature (15–30 °C) prior to use.**
- 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.

- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** should 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. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- **Preparation of controls** see chapter 6.
- **Preparation of the conjugate and tracer:** **A few minutes before use, tracer concentrate (TRACER) and conjugate concentrate (CONJ)** have to be diluted **1:12** in **antibody dilution buffer (ABBUF)**: first put the ABBUF, then add successively TRACER and CONJ (e.g. 2500 µl antibody dilution buffer + 250 µl tracer + 250 µl conjugate). TRACER and CONJ are stable at **2–8 °C** until expiry date stated on the label. **Tracer** (1:12 diluted TRACER) **and conjugate** (1:12 diluted CONJ) **are 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. PREPARATION OF THE ASSAY

Preparation of samples and controls

1.	<p>Dilute samples 1:10 in assay buffer (ASYBUF) by pipetting 25 µl sample into a reaction tube and adding 225 µl assay buffer. Mix well. Addition of assay-buffer to all the samples should be performed without pause since this step dissociates the antibody–therapeutic antibody complexes.</p> <p>Reconstitute the controls with 250 µl assay buffer and vortex. Carry out this step simultaneously with sample dilution in order to ensure equal treatment of controls and samples.</p>
2.	<p>Incubate controls and diluted samples in reaction tubes for 20 min with shaking on a horizontal shaker at room temperature.</p> <p>CAUTION: incubation time begins upon addition of assay buffer.</p>
3.	<p>Add 60 µl tracer/conjugate/antibody dilution buffer solution (see preparation of reagents) to 250 µl control/diluted sample. Vortex and incubate for 1 hour with shaking at room temperature (15–30 °C).</p>

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA serves for the determination of antibodies against TNF therapeutic antibody ustekinumab (e.g. STELARA®). During sample preparation, the anti-drug antibodies (ADA) are separated from the therapeutic antibody in order to acquire free ADA. By adding the peroxidase conjugate (peroxidase labelled therapeutic antibody) and the tracer (biotinylated therapeutic antibody), the unmarked therapeutic antibodies are replaced and the marked antibodies can form a complex with the ADA. This complex binds via biotin to the streptavidin coated microtiter plate. It is detected via the peroxidase conjugate with the peroxidase converting the substrate TMB to a blue product. The enzymatic reaction is stopped by adding an acidic solution. The samples convert from blue to yellow. The colour change should be measured in a photometer at 450 nm. The interpretation is made using the cutoff control.

Test procedure

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

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

Take as many microtiter strips (PLATE) 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 the expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Pipet 100 µl of preincubated controls/samples into the wells of the microtiter plate.
3.	Cover the strips and incubate for 1.5 hours shaking* on a horizontal shaker at room temperature (15–30 °C).
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.

5.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
6.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
7.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix shortly by using the shake function** of the microplate reader.
8.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 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

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

Samples which have a higher average optical density (OD) than the cut-off control are positive.

Immundiagnostik AG recommends linear regression using a linear ordinate and abscissa to calculate the results.

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 manual control of the paired values should be made.

Sample calculation for a positive sample

Average OD of patient's sample 0.735

Average OD of cut-off control 0.085 = 10 AU/ml

Concentration patient's sample $\frac{0.735 \times 10 \text{ AU/ml}}{0.085} = 86.47 \text{ AU/ml}$

9. LIMITATIONS

Measurement range

The lower limit of the measurement range is the LoB.

LoB see chapter "Performance Characteristics".

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

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 range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 20

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

Sample	Mean value [AU/ml]	CV [%]
1	39.42	3.5
2	22.28	3.3
3	12.04	8.5

Reproducibility (Inter-Assay); n = 10

The reproducibility was assessed with 5 samples under **varying** parameters (different operators, instruments, days and kit lots).

Sample	Mean value [AU/ml]	CV [%]
1	54.03	17.8
2	93.50	15.8
3	59.03	22.1
4	16.49	20.8
5	11.03	19.6

Analytical Sensitivity

Limit of blank, LoB	4.964 AU/m
Limit of detection, LoD	7.388 AU/ml
Limit of quantitation, LoQ	10 AU/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 10% CV.

Analytical specificity

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

For this purpose, one sample each containing ADAs (anti-drug antibodies) against the drug indicated in the table was measured.

Substance tested	Measured with free ADA Kit [AU/ml]*	Concentration obtained [AU/ml]	Conclusion
Adalimumab ADA	> 75	3.574	< LoB
Etanercept ADA	> 75	4.006	< LoB
Golimumab ADA	68-186	3.374	< LoB
Infliximab ADA	> 75	4.217	< LoB
Vedolizumab ADA	> 15	4.183	< LoB

*measured with the corresponding free ADA Kit (IDKmonitor® Adalimumab free ADA ELISA (K 9652), IDKmonitor® Etanercept free ADA ELISA (K 9653), IDKmonitor® Golimumab free ADA ELISA (K 9649), IDKmonitor® Infliximab free ADA ELISA (K 9650) and IDKmonitor® Vedolizumab free ADA ELISA (K 9648))

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 harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic color reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should 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

- Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on 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 sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. LITERATURE

1. Scherl EJ, Kumar S, Warren RU. Review of the safety and efficacy of ustekinumab. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2010;3(5):321–8.
2. Chiu HY, Chu TW, Cheng YP, Tsai TF. The association between clinical response to ustekinumab and immunogenicity to ustekinumab and prior adalimumab. *PLoS ONE*. 2015;10(11):1–10.
3. Barré A, Colombel JF, Ungaro R. Review article: predictors of response to vedolizumab and ustekinumab in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(7):896–905.
4. Jauregui-Amezaga A, Somers M, De Schepper H, Macken E. Next generation of biologics for the treatment of Crohn's disease: an evidence-based review on ustekinumab. *Clin Exp Gastroenterol*. 2017;10:293–301.
5. Vermeire S, Gils A, Accossato P, Lula S, Marren A. Immunogenicity of biologics in inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2018;11:1756283X17750355.

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

www.immundiagnostik.com

