

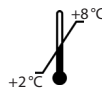
IDKmonitor[®] Vedolizumab free ADA ELISA

***Zur in-vitro-Bestimmung von
freien humanen Antikörpern gegen Vedolizumab
(z. B. ENTYVIO[®]) in EDTA-Plasma und Serum***

***For the in vitro determination of
free human antibodies against Vedolizumab
(e. g. ENTYVIO[®]) in EDTA plasma and serum***

Gültig ab / Valid from 2021-08-30

REF K 9648



IVD **CE**



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	4
<i>Probenvorbereitung</i>	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzwerte</i>	7
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	8
<i>Linearität</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Analytische Spezifität</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene ELISA ist für die Bestimmung von freien humanen Antikörpern gegen Vedolizumab (z. B. ENTYVIO®) in 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 α 4 β 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 free ADA ELISA bestimmt zuverlässig die freien ADA gegen Vedolizumab (z. B. ENTYVIO®). Eine Mitbestimmung von Rheumafaktoren oder irregulären Antikörpern ist ausgeschlossen. Zusammen mit der Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von Vedolizumab bietet der IDKmonitor® Vedolizumab free 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 9648	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 9648	CONJ	Konjugatkonzentrat (peroxidasemarkiertes Streptavidin)	1 x 200 μ l
K 9648	CTRL POS	Positivkontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9648	CTRL NEG	Negativkontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9648	CTRL CUT OFF	Cut-off-Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9648	AB	Detektionsantikörperkonzentrat (Therapieantikörper, biotinyliert)	1 x 200 µl
K 9648	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Absorptionspapier
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- 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 in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an-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.
- **Die lyophilisierten Kontrollen** (CTRL NEG, CTRL POS und CTRL CUT-OFF) sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101** in **Assaypuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml ASYBUF). 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.**
- **Vorbereitung des Detektionsantikörpers:** Das **Detektionsantikörperkonzentrat (AB)** wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101** in **Assaypuffer** verdünnt (100 µl AB + 10 ml ASYBUF). Das AB ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Detektionsantikörper** (1:101 verdünntes AB) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Probenvorbereitung

Die Proben werden **1:10 mit Assaypuffer** (ASYBUF) weiterverdünnt. Zum Beispiel:

- **25 µl** Probe + **225 µl** Assaypuffer, mischen = **1:10**

100 µl der **Verdünnung** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt. Für die Analyse der empfohlenen Doppelwerte werden 2 x je 100 µl benötigt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur Bestimmung der freien Antikörper gegen Vedolizumab (z. B. ENTYVIO®). In diesem Assay bindet der freie Antikörper aus der Probe an auf der Platte fixierte Vedolizumab-F(ab)-Fragmente. Im Anschluss an einen Waschschrift wird ein Detektionsantikörper (biotinylierter Therapieantikörper) zugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt die Detektion der anti-Vedolizumab-Antikörper durch Zugabe eines Streptavidin-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 bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Gehalt der freien Antikörper gegen Vedolizumab (z. B. ENTYVIO®) direkt proportional. Die Auswertung erfolgt über die Cut-off-Kontrolle.

Pipettierschema

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

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 vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
2.	100 µl CTRL NEG, CTRL POS, CTRL CUT-OFF (Kontrollen, negativ, positiv bzw. cut-off) und vorbereitete Proben in die Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen mit Folie abkleben und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.

4.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
5.	100 µl Detektionsantikörper (1:101 verdünntes AB) pro Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen mit Folie abkleben und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.
7.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8.	100 µl Konjugat (1:101 verdünntes CONJ) pro Vertiefung pipettieren.
9.	Streifen mit Folie abkleben und 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
10.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
11.	100 µl TMB-Substratlösung pro Vertiefung pipettieren.
12.	10–20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren*.
13.	100 µl Stopplösung zusetzen und kurz mischen.
14.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm 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

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Cut-off-Kontrolle. Proben, die eine höhere mittlere optische Dichte (OD) haben als die OD der Cut-off-Kontrolle, sind positiv. Proben, die eine niedrigere mittlere optische Dichte als die OD der Cut-off-Kontrolle haben, sind negativ.

$$\text{Cut-off} = 10 \text{ AU/ml} = \text{OD}_{\text{Cut-off-Kontrolle}}$$

Zur Berechnung der Konzentrationen der Proben empfehlen wir lineare Regression mit linearer Ordinate bzw. Abszisse für optische Dichte und Konzentration.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Rechenbeispiel positive Probe

mittlere OD der Patientenprobe	0,735
mittlere OD der Cut-off-Kontrolle	0,065 = 10 AU/ml
Konzentration der Patientenprobe	$\frac{0,735 \times 10 \text{ AU/ml}}{0,065} = 113 \text{ AU/ml}$

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{LoB} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

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

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 20

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

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	26,53	7,8
2	57,26	7,7

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 30

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter variablen Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	59,18	11,8
2	30,79	10,0

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 zweier serieller Verdünnungen einer Serumprobe nachgewiesen.

Für anti-Vedolizumab-Antikörper in Serum und EDTA-Plasma wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 12,49 bis 148,16 AU/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [AU/ml]	Gemessen [AU/ml]	Wiederfindung [%]
A	Unverdünnt	148,16	148,16	100,0
	1:1,5	98,78	107,15	108,5
	1:2,25	65,85	69,62	105,7
	1:3,38	43,90	49,24	112,2
	1:5,06	29,27	33,29	113,7
	1:7,59	19,51	22,34	114,5
	1:11,39	13,01	15,25	117,3

Probe	Verdünnung	Erwartet [AU/ml]	Gemessen [AU/ml]	Wiederfindung [%]
B	Unverdünnt	142,22	142,22	100,0
	1:1,5	94,81	101,90	107,5
	1:2,25	63,21	65,25	103,2
	1:3,38	42,14	47,59	113,0
	1:5,06	28,09	31,71	112,9
	1:7,59	18,73	21,65	115,6
	1:11,39	12,49	14,62	117,1

Analytische Sensitivität

Leerwert (<i>limit of blank</i> , LoB)	4,60 AU/ml
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD)	8,06 AU/ml
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , LoQ)	10,00 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 zu folgenden Therapieantikörpern: anti-Adalimumab, anti-Infliximab, anti-Etanercept, anti-Golimumab und anti-Ustekinumab. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

- 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.

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 Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit 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.
- *IDK*® 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. Afff, W. et al., 2010. Clinical utility of measuring Vedolizumab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*, **105**(5), pp.1133–9.
2. Kopylov, U. et al., 2012. Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA for the detection of anti-Vedolizumab antibodies. *Inflammatory bowel diseases*, **18**(9), pp.1628–33.
3. Tak, P.P., 2012. A personalized medicine approach to biologic treatment of rheumatoid arthritis: a preliminary treatment algorithm. *Rheumatology (Oxford, England)*, **51**(4), pp.600–9.
4. Ordás, I. et al., 2012. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **91**(4), pp.635–46.
5. Bender, N.K. et al., 2007. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatology international*, **27**(3), pp.269–74.

Verwendete Symbole:

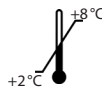
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

IDKmonitor[®] Vedolizumab free ADA ELISA

*For the in vitro determination of
free human antibodies against Vedolizumab
(e. g. ENTYVIO[®]) in EDTA plasma and serum*

Valid from 2021-08-30

REF K 9648



IVD **CE**



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

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the determination of free human antibodies against vedolizumab (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 free ADA ELISA for the detection of antibodies against vedolizumab (e.g. ENTYVIO®) measures free antibodies against vedolizumab. A co-determination of rheuma factors or irregular antibodies can be excluded. In combination with the drug level determination the IDKmonitor® vedolizumab free 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 9648	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 9648	CONJ	Conjugate concentrate (peroxidase-labelled streptavidin)	1 x 200 μ l
K 9648	CTRL POS	Positive control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9648	CTRL NEG	Negative control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9648	CTRL CUT OFF	Cut-off control, lyophilised	4 x 1 vial

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9648	AB	Detection antibody concentrate (therapeutic antibody, biotinylated)	1 x 200 µl
K 9648	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	1 x 50 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 10–1000 µl single-use tips
- Absorbent paper
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- 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 the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with 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 controls** (CTRL NEG, CTRL POS, CTRL CUT-OFF) are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**.
- **Preparation of the conjugate:** The **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in assay buffer (100 µl CONJ + 10 ml ASYUF). The CONJ is stable at **2–8 °C** until expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the detection antibody:** The **detection antibody concentrate (AB)** has to be diluted **1:101** in assay buffer (100 µl AB + 10 ml ASYBUF). The AB is stable at **2–8 °C** until expiry date stated on the label. **Detection antibody** (1:101 diluted AB) **is not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. SAMPLE PREPARATION

Sample preparation

The samples are diluted **1:10 in assay buffer** (ASYBUF). For example:

- **25 µl** sample + **225 µl** assay buffer, mix well = **1:10**

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

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the determination of free antibodies against vedolizumab (e.g. ENTYVIO®). In a first incubation step, the free anti-vedolizumab antibodies from the sample are bound to the vedolizumab F(ab) fragments coated on the plate. After a washing step to remove all unbound substances, the detection antibody (biotinylated therapy antibody) is added. After another washing step, the streptavidine conjugate is added to detect the anti-vedolizumab antibodies. After another washing step, the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stop solution is then added. The colour converts to yellow. The absorbance of the colour compound is determined photometrically at 450 nm. The intensity of the

colour is directly proportional to the amount of bound anti-vedolizumab antibodies (e. g. ENTYVIO®) from the sample. The results are evaluated by a cut-off control.

Test procedure

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

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

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

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash the pre-coated microtiter plate 5 x with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
2.	Add 100 µl of CTRL NEG, CTRL POS, CTRL CUT-OFF (controls, negative, positive or cut-off) and prepared samples in the wells of the microtiter plate.
3.	Seal the strips with foil and incubate 1 hour on a horizontal mixer at room temperature (15–30 °C).
4.	Aspirate the content of the plate and wash each well 5 x with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
5.	Add 100 µl detection antibody (1:101 diluted AB) into each well.
6.	Seal the strips with foil and incubate 1 hour on a horizontal mixer at room temperature (15–30 °C).
7.	Aspirate the content of the plate and wash each well 5 x with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8.	Add 100 µl conjugate (1:101 diluted CONJ) into each well.
9.	Seal the strips with foil and incubate for 1 hour shaking on a horizontal mixer at room temperature.

10.	Aspirate the content of the plate and wash each well 5 x with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
11.	Add 100 µl of TMB substrate solution into each well.
12.	Incubate for 10–20 minutes at room temperature in the dark* .
13.	Add 100 µl of stop solution into each well and mix shortly.
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. 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.

* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend to observe the procedure of the colour change and to stop the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The analysis of the results is done using the cut-off control. Samples with a higher optical density (OD) as the OD of the cut-off control are positive. Samples with an OD lower than the OD of the cut-off control are negative.

$$\text{Cut-off} = 10 \text{ AU/ml} = \text{OD}_{\text{cut-off control}}$$

For the calculation of the sample concentrations, linear regression using a linear ordinate and abscissa is recommended.

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Sample calculation for a positive sample

average OD of patient's sample	0.735
average OD of cut-off control	0.065 = 10 AU/ml
Concentration of the patient's sample	$\frac{0,735 \times 10 \text{ AU/ml}}{0,065} = 113 \text{ AU/ml}$

9. LIMITATIONS

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

$$\text{LoB} \times \text{sample dilution factor to be used}$$

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

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 = 20

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

Sample	Mean value [AU/ml]	CV [%]
1	26.53	7.8
2	57.26	7.7

Reproducibility (Inter-Assay); n = 21

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

Sample	Mean value [AU/ml]	CV [%]
1	59.18	11.8
2	30.79	10.0

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 two serial dilutions of one serum sample.

For anti-vedolizumab antibodies in serum and EDTA plasma, the method has been demonstrated to be linear from 12.49 to 148.16 AU/ml, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [AU/ml]	Obtained [AU/ml]	Recovery [%]
A	Undiluted	148.16	148.16	100.0
	1:1.5	98.78	107.15	108.5
	1:2.25	65.85	69.62	105.7
	1:3.38	43.90	49.24	112.2
	1:5.06	29.27	33.29	113.7
	1:7.59	19.51	22.34	114.5
	1:11.39	13.01	15.25	117.3
B	Undiluted	142.22	142.22	100.0
	1:1.5	94.81	101.90	107.5
	1:2.25	63.21	65.25	103.2
	1:3.38	42.14	47.59	113.0
	1:5.06	28.09	31.71	112.9
	1:7.59	18.73	21.65	115.6
	1:11.39	12.49	14.62	117.1

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	4.60 AU/ml
Limit of detection, LoD	8.06 AU/ml
Limit of quantitation, LoQ	10.00 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 the following therapeutic antibodies: anti-adalimumab, anti-infliximab, anti-etanercept, anti-golimumab and anti-ustekinumab. No cross-reactivity was observed.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The 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 must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.

- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according 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. Afif, W. et al., 2010. Clinical utility of measuring Vedolizumab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*, **105**(5), pp.1133–9.
2. Kopylov, U. et al., 2012. Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA for the detection of anti-Vedolizumab antibodies. *Inflammatory bowel diseases*, **18**(9), pp.1628–33.
3. Tak, P.P., 2012. A personalized medicine approach to biologic treatment of rheumatoid arthritis: a preliminary treatment algorithm. *Rheumatology (Oxford, England)*, **51**(4), pp.600–9.
4. Ordás, I. et al., 2012. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **91**(4), pp.635–46.

5. Bender, N.K. et al., 2007. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatology international*, **27**(3), pp.269–74.

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		