

IDKmonitor[®] Adalimumab total ADA ELISA

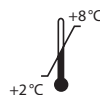
***Zur in-vitro-Bestimmung der gesamten humanen Antikörper
gegen Adalimumab (z. B. HUMIRA[®])
in EDTA-Plasma und Serum***

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

Gültig ab / Valid from 2022-03-31

REF K 9651

Σ 96



IVD

CE

REF K 9651.20

Σ 20 x 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	4
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN	5
<i>Lagerung der Proben</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
<i>Messbereich</i>	8
<i>Biotininterferenz</i>	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	9
<i>Linearität</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Analytische Spezifität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von humanen Antikörpern gegen den TNF α -Blocker Adalimumab (z.B. HUMIRA®) auch bei Therapieantikörperspiegel in Serum und EDTA-Plasma geeignet.

Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie z. B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder rheumatischen Erkrankungen erfolgt immer häufiger mit anti-TNF α -Antikörpern, welche direkt in die zugrundeliegende Entzündungsreaktion eingreifen.

Die Wirksamkeit der anti-TNF α -Therapie korreliert mit der Menge an Therapieantikörper, die kurz vor der nächsten Medikamentengabe im Serum des Patienten nachweisbar ist, dem sogenannten Talspiegel [1, 2, 3]. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Höhe des Talspiegels, neben der Dosis und Frequenz der anti-TNF α -Behandlung zählen dazu die Krankheitsaktivität, individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und die Bildung von Patientenantikörpern gegen die Therapieantikörper (*anti-drug antibodies*, ADA). Es wird davon ausgegangen, dass die Therapieantikörper durch die ADA funktionell neutralisiert oder schneller ausgeschieden werden [4]. Folgen der ADA-Bildung können daher das langfristige Versagen der Therapie wie auch schwere allergische Reaktionen während der anti-TNF α -Antikörper-Applikation sein [1, 5].

Der IDKmonitor® Adalimumab total ADA ELISA zum Nachweis der Gesamt-Antikörper gegen Adalimumab (z. B. HUMIRA®) misst freie sowie gebundene Antikörper gegen Adalimumab. Der Test erlaubt auch in Anwesenheit von Adalimumab eine zuverlässige ADA-Bestimmung und eignet sich daher besonders für das Therapiemonitoring, wenn ein Adalimumabspiegel zu erwarten ist. Zusammen mit der Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von Adalimumab bietet der IDKmonitor® Adalimumab 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 für Art.-Nr.	
			K 9651	K 9651.20
K 9651	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen	20 x 12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpuffer- konzentrat, 10x	1 x 100 ml	15 x 100 ml
K 9651	TRACER	Tracerkonzentrat, biotinyliert	1 x 600 µl	20 x 600 µl
K 9651	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidasemarkiert	1 x 600 µl	20 x 600 µl
K 9651	CTRL CUT OFF	Cut-off-Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial	30 x 1 vial
K 9651	CTRL NEG	Negativ-Kontrolle, lyophilisiert (Bereich dem Spezi- fikationsdatenblatt entnehmen)	4 x 1 vial	30 x 1 vial
K 9651	CTRL POS	Positiv-Kontrolle, lyophilisiert (Bereich dem Spezi- fikationsdatenblatt entnehmen)	4 x 1 vial	30 x 1 vial
K 9651	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	2 x 15 ml	25 x 15 ml
K 9651	ABBUF	Antikörper- verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 10 ml	20 x 10 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetra- methylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml	20 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml	20 x 15 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

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

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Das Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung der Kontrollen** siehe Kapitel 6 und 7.
- **Vorbereitung des Konjugats und des Tracers:** **Tracerkonzentrat (TRACER)** und **Konjugatkonzentrat (CONJ)** werden **wenige Minuten vor Gebrauch 1:12** in **Antikörperverdünnungspuffer (ABBUF)** verdünnt. Den ABBUF in ein Reaktionsgefäß vorlegen, TRACER und CONJ dazu pipettieren (z. B. 3 000 µl ABBUF + 300 µl Tracer + 300 µl Konjugat). **TRACER** und **CONJ** sind bei **2–8 °C**

bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Das **Tracer-Konjugat-Gemisch** (CONJ und TRACER je 1:12 verdünnt) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.

- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwendbar.

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Lagerung der Proben

Unverdünnte Proben können **2 Monate bei -20 °C** sowie **7 Tage bei 2–8 °C oder Raumtemperatur** gelagert werden.

Verdünnte Proben sind **nicht stabil** und können **nicht gelagert** werden. Die **Verdünnung der Proben** erfolgt zeitgleich mit der Vorbereitung der Kontrollen **unmittelbar vor dem Testansatz** (siehe Kapitel 7, Abschnitt „Pipettierschema“).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung der Antikörper gegen den TNF-Blocker Adalimumab (z. B. HUMIRA®).

Bei der Probenvorbereitung wird der anti-TNF-Blocker-Antikörper (*anti-drug antibody*, ADA) von dem Therapieantikörper abgespalten, so dass alle ADA frei vorliegen. Durch die Zugabe eines 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

Achtung: Die vorbereiteten Proben dürfen **nicht aufbewahrt** werden und müssen **sofort im Anschluss im Test analysiert** werden

Probenvorbereitung

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

1.	<p>Je 25 µl Probe in ein Reaktionsgefäß vorlegen und mit 225 µl Assaypuffer (ASYBUF) gründlich vermischen (führt zu Verdünnung 1:10). Achtung: Die Zugabe des Assaypuffers sollte bei allen Proben möglichst zeitnah erfolgen, da dieser Schritt der Spaltung der Antikörper-Therapieantikörper-Komplexe dient.</p> <p>Kontrollen mit 500 µl Assaypuffer (ASYBUF) rekonstituieren und vortexen. Achtung: 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 20 min unter Schütteln* auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur (15–30°C) inkubiert. Achtung: Die Inkubationszeit beginnt mit der Zugabe des Assaypuffers.</p>
3.	<p>Am Ende der Inkubationszeit je 250 µl Kontrolle in ein Reaktionsgefäß überführen.</p>
4.	<p>Zu je 250 µl Kontrolle/verdünnter Probe werden jeweils 60 µl Tracer/Konjugat/Antikörperverdünnungspuffer-Lösung (siehe Kapitel 5 „Lagerung und Vorbereitung der Reagenzien“) hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln* inkubieren.</p>

* Wir empfehlen die Reaktionsgefäße bzw. Fläschchen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

Die Proben sind nun für den Einsatz im Test bereit.

Testdurchführung

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 Gege-

benheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

5.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
6.	100 µl der vorinkubierten Kontrollen/Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
7.	Streifen abdecken und 1,5 h unter Schütteln* bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
8.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
10.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
11.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus kurz mischen.
12.	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 LoQ.

LoQ siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

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

Biotininterferenz

Proben, die Biotin in einer Konzentration von < 100 ng/ml enthalten, zeigen eine Veränderung der Ergebnisse von $\leq 25\%$. Höhere Biotinkonzentrationen können zu falsch niedrigen Ergebnissen führen. Bei Patienten, die > 5 mg/Tag Biotin einnehmen, sollte die Probeentnahme frühestens 24 Stunden nach der letzten Applikation erfolgen. Ergebnisse für Patienten, die Biotinpräparate einnehmen oder eine hochdosierte Biotintherapie erhalten, sollten grundsätzlich vorsichtig und im Zusammenhang mit dem gesamten klinischen Bild interpretiert 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 = 23

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

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	59,91	3,5
2	290,92	5,9

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 14

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 3 Serumproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	17,40	7,1
2	48,11	5,2
3	213,46	5,1

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde mittels serieller Verdünnung einer Serum und einer Plasmaprobe nachgewiesen.

Für anti-Adalimumab Antikörper in Serum und Plasma wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 25,81 bis 273,74 AU/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [AU/ml]	Gemessen [AU/ml]	Wiederfindung [%]
Serum	1:40	169,45	169,45	100,00
	1:80	89,37	90,55	101,33
	1:160	49,32	53,70	108,88
	1:320	29,30	30,36	103,63

Probe	Verdünnung	Erwartet [AU/ml]	Gemessen [AU/ml]	Wiederfindung [%]
Plasma	1:20	273,74	273,74	100,00
	1:40	141,51	155,21	109,68
	1:80	75,39	89,74	119,03
	1:160	42,34	49,50	116,93
	1:320	25,81	30,20	117,00

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 2,643 AU/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 5,067 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 20% VK.

Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität zu anti-Infliximab Antikörpern in Patientenproben. Hierfür wurden 5 Patientenproben, welche zuvor positiv auf Infliximab Antikörper getestet wurden, gemessen. 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 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. Aff W, Loftus EV, Jr., Faubion WA, Kane SV, Bruining DH, Hanson KA, Sandborn WJ (2010). Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **105**(5): 1133-1139.
2. Kopylov U, Mazor Y, Yavzori M, Fudim E, Katz L, Coscas D, Picard O, Chowers Y, Eliakim R, Ben-Horin S (2012). Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA for the detection of anti-infliximab antibodies. *Inflamm Bowel Dis* **18**(9): 1628-1633.
3. Tak PP (2012). A personalized medicine approach to biological treatment of rheumatoid arthritis: a preliminary treatment algorithm. *Rheumatology* **51**(4): 600-609.
4. Ordas I, Mould DR, Feagan BG, Sandborn WJ (2012) Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin Pharmacol Ther* **91**(4): 635-646.
5. Bender NK, Heilig CE, Droll B, Wohlgemuth J, Armbruster FP, Heilig B (2007). Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int* **27**(3): 269-274.

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[®] Adalimumab total ADA ELISA

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

Valid from 2022-03-31

REF K 9651

REF K 9651.20

Σ 96

Σ 20 x 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

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	19
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
<i>Storage of samples</i>	19
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Test principle</i>	20
<i>Test procedure</i>	20
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	22
<i>Measurement range</i>	22
<i>Biotin interference</i>	22
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Accuracy – Precision</i>	23
<i>Linearity</i>	24
<i>Analytical sensitivity</i>	24
<i>Analytical specificity</i>	24
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	25
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	26

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the determination of human antibodies against TNF α blocker adalimumab (e.g. HUMIRA®) in the presence of adalimumab in EDTA plasma and serum.

For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Chronic inflammatory diseases like Crohn's disease, ulcerative colitis or rheumatoid arthritis are often treated with anti-TNF α antibodies which target directly the underlying inflammatory processes.

The clinical efficacy of an anti-TNF α therapy correlates with the trough level of the therapeutic antibody, the drug level just before the next application of the anti-TNF α antibody [1–3]. Several factors influence the trough level, among them dosage and frequency of anti-TNF α blocker infusion, disease activity, individual pharmacokinetics and immune reaction (formation of anti-drug antibodies, ADA). It is thought that ADA functionally neutralise the therapeutic antibodies or induce their rapid elimination [4]. Consequences of ADA formation can be therapy failure and allergic reactions during anti-TNF α antibody application [1, 5].

The IDKmonitor® Adalimumab total ADA ELISA for the detection of total antibodies against adalimumab (e.g. HUMIRA®) measures free and bound antibodies against adalimumab. This assay allows a reliable determination of ADA even in the presence of adalimumab; therefore it is ideal for therapy monitoring when a measurable adalimumab concentration is expected. In combination with the drug level determination, the IDKmonitor® Adalimumab total ADA ELISA offers the opportunity for the treating physician to monitor and optimise the therapy early on.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity for cat. no.	
			K 9651	K 9651.20
K 9651	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells	20 x 12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml	15 x 100 ml
K 9651	TRACER	Tracer concentrate, biotinylated	1 x 600 μ l	20 x 600 μ l

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity for cat. no.	
			K 9651	K 9651.20
K 9651	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 600 µl	20 x 600 µl
K 9651	CTRL CUT OFF	Cut-off control, lyophilised	4 x 1 vial	30 x 1 vial
K 9651	CTRL NEG	Negative control, lyophilised (see specification data sheet for range)	4 x 1 vial	30 x 1 vial
K 9651	CTRL POS	Positive control, lyophilised (see specification data sheet for range)	4 x 1 vial	30 x 1 vial
K 9651	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	2 x 15 ml	25 x 15 ml
K 9651	ABBUF	Antibody dilution buffer, ready-to-use	1 x 10 ml	20 x 10 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml	20 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml	20 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*
- Precision pipettes and pipette tips for single use with variable volumes from 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the amount necessary for the particular 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. Due to the high salt concentration, crystals can occur 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 container at **2–8 °C for 1 month.**
- **Preparation of controls** see chapter 6 and 7.
- **Preparation of the conjugate and tracer: Tracer concentrate (TRACER) and conjugate concentrate (CONJ) are diluted 1:12 in antibody dilution buffer (ABBUF), a few minutes before use.** Prepare ABBUF in a reaction vessel, then add TRACER and CONJ (e.g. 3000 µl antibody dilution buffer + 300 µl tracer + 300 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 and stable until the expiry date stated on the label, when stored at **2–8 °C.**

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Storage of samples

Undiluted samples can be stored for **2 months at -20 °C** or for **7 days at 2–8 °C or room temperature.**

Diluted samples are **not stable** and **cannot be stored.** **Sample dilution** is carried out **simultaneously with the preparation of controls** immediately before starting the test (see chapter 7, section “Test procedure”).

7. ASSAY PROCEDURE

Test principle

This ELISA is designed for the quantitative determination of antibodies against TNF α blocker adalimumab (e.g. HUMIRA®).

During sample preparation, the anti-drug antibodies (ADA) are separated from the therapeutic antibody in order to acquire free ADA. By adding the 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 cut-off control.

Test procedure

Attention: The prepared sample must **not be stored** and **must be analysed immediately afterwards** in the test.

Sample Preparation

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

1.	<p>Pipette 25 μl sample into each reaction tube and mix by adding 225 μl assay buffer (ASYBUF), vortex (sample dilution 1:10). Attention: The addition of the assay buffer should be performed as soon as possible for all samples, as this step serves to cleave the ADAs from the therapeutic antibodies.</p> <p>Reconstitute the controls with 500 μl assay buffer and vortex. Attention: This should be done simultaneously with the sample dilution to ensure equal treatment of controls and samples.</p>
2.	<p>Incubate controls and diluted samples in reaction tubes for 20 min while shaking on a horizontal shaker at room temperature (15–30 °C). Caution: Incubation time begins upon addition of assay buffer.</p>
3.	<p>At the end of the incubation period, transfer 250 μl of each control into a reaction vessel.</p>

4.	Add 60 µl tracer/conjugate/antibody dilution buffer solution (see chapter 5 "Storage and Preparation of Reagents") to 250 µl control/diluted sample. Vortex and incubate for 1 hour while shaking* at room temperature (15–30°C).
----	---

* We recommend shaking the controls and reaction tubes at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

The samples are now ready for testing

Test execution

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

Take as many **microtiter strips** as needed from 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.

5.	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.
6.	Pipet 100 µl preincubated controls/samples into the respective wells.
7.	Cover the strips and incubate for 1.5 hours while shaking* on a horizontal shaker at room temperature (15–30°C).
8.	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.
9.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
10.	Incubate for 10–20 minutes** at room temperature (15–30°C) in the dark .
11.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix shortly by using the shake function of the microtiter plate reader.
12.	Determine the absorption immediately with the microtiter plate reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as reference wavelength.

* 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.

For the evaluation of the test we recommend linear regression with linear ordinate and abscissa for optical density and concentration.

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

LoQ see chapter "Performance Characteristics".

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

Biotin interference

Samples containing a biotin concentration of < 100 ng/ml show a change of the results of ≤ 25%. Higher concentrations of biotin can lead to falsely low results. Patients taking > 5 mg biotin per day should wait at least 24 hours after intake of biotin to have their samples collected. Results of patients taking biotin supplements or receiving a high-dose biotin therapy should generally be interpreted along with the total clinical picture.

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 = 23

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	59.91	3.5
2	290.92	5.9

Reproducibility (Inter-Assay); n = 14

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	17.40	7.1
2	48.11	5.2
3	213.46	5.1

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 with a serial dilution of a serum and a plasma sample.

For anti-adalimumab antibodies in serum and plasma, the method has been demonstrated to be linear from 25.81 to 273.74 AU/ml, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [AU/ml]	Obtained [AU/ml]	Recovery [%]
Serum	1:40	169.45	169.45	100.00
	1:80	89.37	90.55	101.33
	1:160	49.32	53.70	108.88
	1:320	29.30	30.36	103.63
Plasma	1:20	273.74	273.74	100.00
	1:40	141.51	155.21	109.68
	1:80	75.39	89.74	119.03
	1:160	42.34	49.50	116.93
	1:320	25.81	30.20	117.00

Analytical sensitivity

The following value has been estimated without considering possibly used sample dilution factors

Limit of blank, LoB 2.643 AU/ml

Limit of detection, LoD 5.067 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 20% CV.

Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against anti-Infliximab in patient samples. Therefore, 5 patient samples, which have previously been tested positive on anti-Infliximab antibodies, were tested. There was no cross-reactivity 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 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 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 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. REFERENCES

1. Afff W, Loftus EV, Jr., Faubion WA, Kane SV, Bruining DH, Hanson KA, Sandborn WJ (2010). Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **105**(5): 1133-1139.
2. Kopylov U, Mazor Y, Yavzori M, Fudim E, Katz L, Coscas D, Picard O, Chowers Y, Eliakim R, Ben-Horin S (2012). Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA for the detection of anti-infliximab antibodies. *Inflamm Bowel Dis* **18**(9): 1628-1633.
3. Tak PP (2012). A personalized medicine approach to biological treatment of rheumatoid arthritis: a preliminary treatment algorithm. *Rheumatology* **51**(4): 600-609.
4. Ordas I, Mould DR, Feagan BG, Sandborn WJ (2012) Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin Pharmacol Ther* **91**(4): 635-646.
5. Bender NK, Heilig CE, Droll B, Wohlgemuth J, Armbruster FP, Heilig B (2007). Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int* **27**(3): 269-274.

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