

IDKmonitor[®] Adalimumab free ADA ELISA

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

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

Gültig ab / Valid from 2021-10-04

REF K 9652

Σ
96

+2°C +8°C

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	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	5
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>Analytische Spezifität</i>	8
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	8
<i>Linearität</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von freien *anti-drug antibodies* (ADA) gegen den TNF α -Therapieantikörper Adalimumab (z.B. HUMIRA®) in EDTA-Plasma und Serum geeignet.

Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie z. B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, rheumatischen Erkrankungen oder Psoriasis 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 [1–3]. 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 [3]. 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 free ADA ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Adalimumab (z.B. HUMIRA®) misst die freien anti-Adalimumab Antikörper. Zusammen mit der Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von Adalimumab bietet der IDKmonitor® Adalimumab 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 9652	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet (F(ab) ₂)	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10 x	1 x 100 ml
K 9652	CONJ	Konjugatkonzentrat (Therapieantikörper, peroxidasemarkiert)	1 x 200 µl
K 9652	CTRL NEG	Positivkontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9652	CTRL POS	Negativkontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9652	CTRL CUT-OFF	Cut-off-Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9652	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 30 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
- Zentrifuge
- 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 auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Kontrollen** (CTRL NEG, CTRL POS und CTRL CUT-OFF) sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **300 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Rekonstituierte Kontrollen können nicht gelagert werden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das **CONJ** ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

EDTA-Plasma und Serum

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:10** verdünnt,

z. B. **25 µl** Probe + **225 µl** Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF), gut mischen.

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

Lagerung der Proben

Unverdünnte Proben können 1 Monat bei -20°C sowie 7 Tage bei 2–8°C oder Raumtemperatur gelagert werden.

Verdünnte Proben sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) dient zur Bestimmung der freien Antikörper gegen den Therapieantikörper Adalimumab (z.B. HUMIRA®). In diesem Assay bindet der freie Antikörper aus der Probe an auf der Platte fixierte Adalimumab-F(ab)₂-Fragmente. Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion des gebundenen anti-Adalimumab-Antikörpers durch Zugabe eines Konjugats (peroxidsemarkierter Therapieantikörper). Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Gehalt der freien ADAs (hier: anti-Adalimumab-Antikörper) 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.	Mikrotiterstreifen 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
2.	100 µl CTRL NEG, CTRL POS, CTRL CUT-OFF (Kontrollen) und vorbereitete Proben in die Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen mit Folie abdecken und über Nacht (16–20 h) bei 2–8 °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 Konjugat pro Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen mit Folie abdecken 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 TMB-Substratlösung pro Vertiefung pipettieren.
9.	10–20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren***.
10.	100 µl Stopplösung zusetzen und kurz mischen.
11.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen.

* Der oben genannte Inkubationsschritt unter Schütteln bei 2–8 °C ist vom Hersteller empfohlen. Besteht keine Möglichkeit bei 2–8 °C zu schütteln, empfehlen wir die Inkubation bei 2–8 °C ohne Schütteln.

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

*** Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die 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.

Cut-off = 10 AU/ml = OD 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 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 die mitgelieferten 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

Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität zu anti-Infliximab-Antikörpern in Patientenproben. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 30

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

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	87,56	2,0
2	40,81	2,4
3	45,87	2,1

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 18

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

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	87,29	5,2
2	47,83	8,3
3	79,05	7,9

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 serieller Verdünnung zweier Serumproben nachgewiesen.

Für anti-Adalimumab Antikörper in Serum und Plasma wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 18,56 bis 232,05 AU/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [AU/ml]	Gemessen [AU/ml]	Wiederfindung [%]
1	1:640	232,05	232,05	100,00
	1:1000	148,51	151,52	102,02
	1:1280	116,03	129,31	111,45
	1:2000	74,26	87,20	117,43
	1:4000	37,13	43,10	116,08
	1:8000	18,56	21,22	114,32
2	1:160	157,03	157,03	100,00
	1:320	78,51	84,86	108,08
	1:640	39,26	42,86	109,17
	1:1280	19,63	21,26	108,30

Analytische Sensitivität

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

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 1,615 AU/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 3,361 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.

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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.












14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- IDKmonitor® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. W. Aff, E. V Loftus, W. a Faubion, S. V Kane, D. H. Bruining, K. a Hanson, and W. J. Sandborn, "Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease.," *The American journal of gastroenterology*, vol. **105**, no. 5, pp. 1133–9, May 2010.
2. L. L. A. Lecluse, R. J. B. Driessen, P. I. Spuls, E. M. G. J. de Jong, S. O. Stapel, M. B. A. van Doorn, J. D. Bos, and G.-J. Wolbink, "Extent and clinical consequences of antibody formation against adalimumab in patients with plaque psoriasis.," *Archives of dermatology*, vol. **146**, no. 2, pp. 127–32, Feb. 2010.
3. P. A. van Schouwenburg, T. Rispens, and G. J. Wolbink, "Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis.," *Nature reviews. Rheumatology*, vol. **9**, no. 3, pp. 164–72, Mar. 2013.
4. I. Ordás, D. R. Mould, B. G. Feagan, and W. J. Sandborn, "Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms.," *Clinical pharmacology and therapeutics*, vol. **91**, no. 4, pp. 635–46, Apr. 2012.
5. N. K. Bender, C. E. Heilig, B. Dröll, J. Wohlgemuth, F. P. Armbruster, and B. Heilig, "Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients.," *Rheumatology international*, vol. **27**, no. 3, pp. 269–74, Jan. 2007

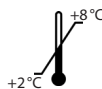
Verwendete Symbole:

	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[®] Adalimumab free ADA ELISA

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

Valid from 2021-10-04



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. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	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>	21
12. PRECAUTIONS	22
13. TECHNICAL HINTS	22
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	23

1. INTENDED USE

This enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit is intended for the determination of free anti-drug antibodies (ADA) against the therapeutic TNF α antibody adalimumab (e.g. HUMIRA®) in EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Chronic inflammatory diseases like Crohn's disease, ulcerative colitis, rheumatoid arthritis or psoriasis 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 anti-drug antibodies, ADA). It is thought that ADA functionally neutralize the therapeutic antibodies or induce their rapid elimination [3]. Consequences of ADA formation can be therapy failure and allergic reactions during anti-TNF α antibody application [1, 5].

The IDKmonitor® Adalimumab free ADA ELISA for the detection of antibodies against Adalimumab (e.g. HUMIRA®) measures free anti-Adalimumab antibodies. In combination with the drug level determination of Adalimumab, the IDKmonitor® Adalimumab 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 9652	PLATE	Microtiter plate, precoated with (F(ab) ₂)	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 9652	CONJ	Antibody concentrate, (therapy antibody, peroxidase-labelled)	1 x 200 μ l
K 9652	CTRL NEG	Negative control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9652	CTRL POS	Positive control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9652	CTRL CUT-OFF	Cut-off control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9652	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 30 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
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
- Centrifuge
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

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

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at 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 and CTRL CUT-OFF)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the CTRL NEG, CTRL POS and CTRL CUT-OFF have to be reconstituted with each **300 µl of ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Controls** (reconstituted CTRL NEG, CTRL POS and CTRL CUT-OFF) **are not stable and cannot be stored.**
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in **wash buffer** (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The **CONJ** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C.**

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

EDTA plasma and serum

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:10** before performing the assay, e.g. **25 µl** sample + **225 µl** sample dilution buffer (SAMPLEBUF), mix well.

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

Sample storage

Undiluted samples can be stored for 1 month at -20 °C and for 7 days at 2–8 °C or room temperature.

Diluted samples are not stable and cannot be stored.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This enzyme immunoassay is a sandwich assay for the determination of free antibodies against adalimumab (e.g. HUMIRA®). In a first incubation step, the free anti-therapeutic antibodies from the sample are bound to the adalimumab F(ab)₂ fragments coated on the plate. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a further incubation step, peroxidase-labelled adalimumab is added. After another washing step, to remove all unbound substances, 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. The intensity of the colour is directly proportional to the amount of bound ADAs (here: anti-adalimumab antibodies) 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 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.	Wash the microtiter strips 5 x with 250 µl wash buffer before use . After the final washing step, the inverted microtiter strips should be tapped on absorbent paper.
2.	Add 100 µl of CTRL NEG, CTRL POS, CTRL CUT-OFF (controls), and diluted samples in the wells of the microtiter plate.
3.	Seal the stripes with foil and incubate over night (16–20 h) shaking on a horizontal mixer** at 2–8 °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 should be firmly tapped on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate into each well.
6.	Seal the stripes with foil and incubate for 1 hour shaking 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 of TMB substrate solution into each well.
9.	Incubate for 10–20 minutes at room temperature in the dark***.
10.	Add 100 µl stop solution into each well and mix shortly.

- | | |
|-----|--|
| 11. | Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. |
|-----|--|

* The above incubation step at 2–8 °C on a horizontal mixer is recommended by the producer. If there is no possibility to incubate at 2–8 °C, while shaking, we recommend to incubate at 2–8 °C without any shaking.

** 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 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.

Cut-off = 10 AU/ml = OD of 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 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.

Provided control samples should be analyzed 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 = 30

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

Sample	Mean value [AU/ml]	CV [%]
1	87.56	2.0
2	40.81	2.4
3	45.87	2.1

Reproducibility (Inter-Assay); n = 18

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

Sample	Mean value [AU/ml]	CV [%]
1	87.29	5.2
2	47.83	8.3
3	79.05	7.9

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 EP6-A by serial dilution of 2 serum samples.

For anti-Adalimumab antibodies in serum and plasma, the method has been demonstrated to be linear from 18.56 to 232.05 AU/ml, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [AU/ml]	Obtained [AU/ml]	Recovery [%]
1	1:640	232.05	232.05	100.00
	1:1000	148.51	151.52	102.02
	1:1280	116.03	129.31	111.45
	1:2000	74.26	87.20	117.43
	1:4000	37.13	43.10	116.08
	1:8000	18.56	21.22	114.32
2	1:160	157.03	157.03	100.00
	1:320	78.51	84.86	108.08
	1:640	39.26	42.86	109.17
	1:1280	19.63	21.26	108.30

Analytical sensitivity

The following values have been estimated without considering possibly used sample dilution factors:

Limit of blank, LoB	1.615 AU/ml
Limit of detection, LoD	3.361 AU/ml
Limit of quantitation, LoQ	10 AU/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-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 antibodies in patient samples. There was no cross-reactivity observed.

12. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Control samples should be analysed with each run.
- 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 out immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not to assemble wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch as wells from already opened microtiter plates are exposed to different conditions as sealed ones.
- 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.
- Quality control guidelines should be followed.
- IDKmonitor® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. W. Aff, E. V Loftus, W. a Faubion, S. V Kane, D. H. Bruining, K. a Hanson, and W. J. Sandborn, "Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease.," *The American journal of gastroenterology*, vol. **105**, no. 5, pp. 1133–9, May 2010.
2. L. L. A. Lecluse, R. J. B. Driessen, P. I. Spuls, E. M. G. J. de Jong, S. O. Stapel, M. B. A. van Doorn, J. D. Bos, and G.-J. Wolbink, "Extent and clinical consequences of antibody formation against adalimumab in patients with plaque psoriasis.," *Archives of dermatology*, vol. **146**, no. 2, pp. 127–32, Feb. 2010.
3. P. A. van Schouwenburg, T. Rispens, and G. J. Wolbink, "Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis.," *Nature reviews. Rheumatology*, vol. **9**, no. 3, pp. 164–72, Mar. 2013.
4. I. Ordás, D. R. Mould, B. G. Feagan, and W. J. Sandborn, "Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms.," *Clinical pharmacology and therapeutics*, vol. **91**, no. 4, pp. 635–46, Apr. 2012.
5. N. K. Bender, C. E. Heilig, B. Dröll, J. Wohlgemuth, F. P. Armbruster, and B. Heilig, "Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients.," *Rheumatology international*, vol. **27**, no. 3, pp. 269–74, Jan. 2007

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		