

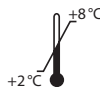
IDKmonitor[®] Ustekinumab free ADA ELISA

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

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

Gültig ab / Valid from 2022-02-17

REF K 9666



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	4
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	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	10
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. EINLEITUNG

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

Die Wirksamkeit der anti-IL-12/23-Therapie korreliert in der Regel mit der Menge an Therapieantikörper, die kurz vor der nächsten Medikamentengabe im Serum des Patienten nachweisbar ist, dem sogenannten Talspiegel. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Höhe des Talspiegels. Zu diesen zählen unter anderem die Dosis und die Frequenz der anti-IL-12/23-Behandlung, die Krankheitsaktivität, individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und das Auftreten von Antikörpern gegen die Therapieantikörper (*anti-drug antibodies*, ADA) [2]. Es wird davon ausgegangen, dass die Therapieantikörper durch die ADA funktionell neutralisiert oder schneller ausgeschieden werden. Folgen der ADA-Bildung können daher das langfristige Versagen der Therapie wie auch schwere allergische Reaktionen während der Applikation des Therapieantikörpers sein [3].

Der IDKmonitor® Ustekinumab free ADA ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Ustekinumab (z.B. Stelara®) misst die freien anti-Ustekinumab-Antikörper. Zusammen mit der Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von Ustekinumab (IDKmonitor® Ustekinumab drug level ELISA, K 9660) bietet der IDKmonitor® Ustekinumab 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 9666	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet (F(ab) ₂)	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10 x	1 x 100 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9666	CONJ	Konjugatkonzentrat (Therapieantikörper, peroxidase markiert)	1 x 200 µl
K 9666	CTRL NEG	Negativkontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9666	CTRL POS	Positivkontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9666	CTRL CUT-OFF	Cut-off-Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 9666	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 10–1 000 µl
- 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 100µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100ml 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. Die **Rekonstitutionsvorgaben** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Kontrollen** (rekonstituierte CTRL CUT-OFF, CTRL POS und CTRL NEG) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden**.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100µl 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** SAMPLEBUF (Probenpuffer), gut mischen.

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

Lagerung

Frisch abgenommenes EDTA-Plasma bzw. Serum kann einen Tag bei Raumtemperatur (15–30 °C) gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) dient zur Bestimmung der freien Antikörper gegen den Therapieantikörper Ustekinumab (z.B. Stelara®). In diesem Assay bindet der freie Antikörper aus der Probe an auf der Platte fixierte Ustekinumab-F(ab)₂-Fragmente. Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion des gebundenen anti-Ustekinumab-Antikörpers durch Zugabe eines Peroxidase-Konjugats (POD-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-Ustekinumab-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.

Markieren Sie die Positionen für Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln bei 550 Upm mit einem Orbit von 2 mm inkubieren.
4.	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.
5.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln bei 550 Upm mit einem Orbit von 2 mm inkubieren.
7.	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.
8.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	10–20 min* bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
11.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 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.

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

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n=20

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

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	25,94	3,7
2	25,92	2,2

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n=30

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	25,74	8,4
2	17,07	6,2

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-Ustekinumab-Antikörper in Serum und EDTA-Plasma wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 10,90 bis 36,88 AU/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Verdünnung	Verdünnung	Erwartet [AU/ml]	Gemessen [AU/ml]	Wiederfindung [%]
1	Unverdünnt	36,88	36,88	100,0
	1:1,5	24,59	29,63	120,5
	1:2,25	16,39	20,00	122,0
	1:3,38	10,93	13,39	122,6

Verdünnung	Verdünnung	Erwartet [AU/ml]	Gemessen [AU/ml]	Wiederfindung [%]
2	Unverdünnt	36,79	36,79	100,0
	1:1,5	24,53	26,51	108,1
	1:2,25	16,35	18,62	113,9
	1:3,38	10,90	12,66	116,1

Analytische Sensitivität

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 4,75 AU/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 7,12 AU/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, 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-Vedolizumab. 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 befundet. 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, da schon geöffnete Mikrotiterplatten anderen Bedingungen unterliegen als verschlossene.
- 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. Scherl EJ, Kumar S, Warren RU. Review of the safety and efficacy of ustekinumab. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2010;**3**(5):321–8.
2. Chiu HY, Chu TW, Cheng YP, Tsai TF. The association between clinical response to ustekinumab and immunogenicity to ustekinumab and prior adalimumab. *PLoS ONE*. 2015;**10**(11):1–10.
3. Ordás I, Mould DR, Feagan BG, Sandborn WJ. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2012/02/24. 2012 Apr;**91**(4):635–46.

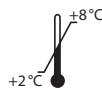
Verwendete Symbole:

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

IDKmonitor[®] ustekinumab free ADA ELISA

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

Valid from 2022-02-17



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. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	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>	20
<i>Analytical sensitivity</i>	21
<i>Analytical specificity</i>	21
12. PRECAUTIONS	21
13. TECHNICAL HINTS	22
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	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 ustekinumab (e.g. Stelara®) in EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

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

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

The IDKmonitor® ustekinumab free ADA ELISA for the detection of antibodies against ustekinumab (e. g. Stelara®) measures free anti-ustekinumab antibodies. In combination with the drug level determination of ustekinumab (IDKmonitor® ustekinumab drug level ELISA, K 9660), the IDKmonitor® ustekinumab free ADA ELISA is an opportunity for the treating physician to monitor and optimize the therapy early on.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9666	PLATE	Microtiter plate, pre-coated with (F(ab) ₂)	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 9666	CONJ	Conjugate concentrate (therapy antibody), peroxidase-labelled	1 x 200 μ l
K 9666	CTRL NEG	Negative control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 9666	CTRL POS	Positive control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9666	CTRL CUT-OFF	Cut-off control, lyophilised	4 x 1 vial
K 9666	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 30 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1 000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- 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 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. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**. **Controls** (reconstituted CTRL CUT-OFF, CTRL POS and CTRL NEG) **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. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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** SAMPLEBUF (sample buffer), mix well.

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

Sample storage

Freshly collected EDTA plasma or serum can be stored for one day at room temperature (15–30 °C) or for longer storage at -20 °C.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This enzyme immunoassay is a sandwich assay for the determination of free antibodies against ustekinumab (e.g. Stelara®). In a first incubation step, the free anti-therapeutic antibodies from the sample are bound to the ustekinumab 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 ustekinumab 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-ustekinumab 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.

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

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.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl controls/diluted samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker at 550 rpm with an orbit of 2 mm.
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker at 550 rpm with an orbit of 2 mm.
7.	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.
8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 10–20 minutes* at room temperature (15–30 °C) in the dark .

10.	Add 100 µl stop solution (STOP) and mix well.
11.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The 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 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, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [AU/ml]	CV [%]
1	25.94	3.7
2	25.92	2.2

Reproducibility (Inter-Assay); n = 21

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

Sample	Mean value [AU/ml]	CV [%]
1	25.74	8.4
2	17.07	6.2

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 two serial dilutions of one serum sample.

For anti-Ustekinumab antibodies in serum and EDTA plasma, the method has been demonstrated to be linear from 10.90 to 36.88 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	36.88	36.88	100.0
	1:1.5	24.59	29.63	120.5
	1:2.25	16.39	20.00	122.0
	1:3.38	10.93	13.39	122.6
B	Undiluted	36.79	36.79	100.0
	1:1.5	24.53	26.51	108.1
	1:2.25	16.35	18.62	113.9
	1:3.38	10.90	12.66	116.1

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 4.75 AU/ml

Limit of detection, LoD 7.12 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 against the following therapeutic antibodies: anti-adalimumab, anti-infliximab, anti-etanercept, anti-golimumab and anti-vedolizumab. No cross-reactivity was observed.

12. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.

- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic color reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immunodiagnostik 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 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.
- 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.
- 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. Scherl EJ, Kumar S, Warren RU. Review of the safety and efficacy of ustekinumab. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2010;**3**(5):321–8.
2. Chiu HY, Chu TW, Cheng YP, Tsai TF. The association between clinical response to ustekinumab and immunogenicity to ustekinumab and prior adalimumab. *PLoS ONE*. 2015;**10**(11):1–10.
3. Ordás I, Mould DR, Feagan BG, Sandborn WJ. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2012/02/24. 2012 Apr;**91**(4):635–46.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

