

IDKmonitor® Infiximab total ADA ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung der gesamten humanen
Antikörper gegen Infiximab (z. B. REMICADE®)
in EDTA-Plasma und Serum*

*For the in vitro determination of total
human antibodies against infiximab (e. g. REMICADE®)
in EDTA plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2022-01-06

REF K 9654

Σ 96



IVD

CE

REF K 9654.20

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. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. TESTVORBEREITUNG	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>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	9
<i>Linearität</i>	10
<i>Analytische Spezifität – Kreuzreaktivität</i>	10
<i>Analytische Spezifität – Interferenzen</i>	10
<i>High-Dose-Hook-Effekt</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von humanen Antikörpern gegen den TNF α -Blocker Infliximab (z.B. REMICADE®) 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® Infliximab total ADA ELISA zum Nachweis der Gesamt-Antikörper gegen Infliximab (z.B. REMICADE®) misst freie sowie gebundene Antikörper gegen Infliximab. Der Test erlaubt auch in Anwesenheit von Infliximab eine zuverlässige ADA-Bestimmung und eignet sich daher besonders für das Therapiemonitoring, wenn ein Infliximabspiegel zu erwarten ist, z. B. kurz nach einer Infusion. Zusammen mit der Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von Infliximab bietet der IDKmonitor® Infliximab 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 9654	K 9654.20
K 9654	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 9654	TRACER	Tracerkonzentrat, biotinyliert	1 x 600 µl	20 x 600 µl
K 9654	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert	1 x 600 µl	20 x 600 µl
K 9654	CTRL CUT- OFF	Cut-off-Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial	30 x 1 vial
K 9654	CTRL NEG	Negativ-Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifi- kation entnehmen)	4 x 1 vial	30 x 1 vial
K 9654	CTRL POS	Positiv-Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifi- kation entnehmen)	4 x 1 vial	30 x 1 vial
K 9654	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	2 x 15 ml	25 x 15 ml
K 9654	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*
- Pipetten mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

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

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- **Alle Reagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur (15–30 °C) bringen.**
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung der Kontrollen** siehe Kapitel 6 und 7.
- **Vorbereitung des Konjugats und des Tracers:** **Tracerkonzentrat (TRACER)** und **Konjugatkonzentrat (CONJ)** werden **wenige Minuten vor Gebrauch 1:12** in **Antikörperverdünnungspuffer (ABBUF)** verdünnt. Hierzu den **ABBUF** vorlegen, dann nacheinander **TRACER** und **CONJ** dazupipettieren (z. B. 3000 µl Antikörperverdünnungspuffer + 300 µl Tracer + 300 µl Konjugat). **TRACER** und **CONJ** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsda-

tum stabil. **Tracer** (1:12 verdünnter TRACER) **und Konjugat** (1:12 verdünntes CONJ) **sind nicht stabil und können nicht aufbewahrt werden.**

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

6. TESTVORBEREITUNG

Lagerung der Proben

Unverdünnte Proben können **2 Monate bei -20 °C** sowie **7 Tage bei 2–8 °C oder Raumtemperatur** gelagert werden. Mehr als 3 Einfrier-Auftau-Zyklen sind zu vermeiden.

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 der Bestimmung der Antikörper gegen den TNF α -Blocker Infliximab (z.B. REMICADE®). Bei der Probenvorbereitung wird der anti-TNF α -Blocker-Antikörper (*anti-drug antibody*, ADA) von dem Therapieantikörper abgespalten, so dass alle ADA frei vorliegen. Durch die Zugabe eines Peroxidasekonjugats (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 streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatte. Der Nachweis erfolgt über das Peroxidasekonjugat, 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 Cutoff-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.	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 ADAs von den Therapieantikörpern dient. 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.
2.	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.
3.	Am Ende der Inkubationszeit je 250 µl Kontrolle in ein Reaktionsgefäß überführen.
4.	Zu je 250 µl Kontrolle/verdünnter Probe werden jeweils 60 µl Tracer/Konjugat/Antikörperverdünnungspuffer-Lösung (siehe Vorbereitung der Reagenzien) hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.

* Wir empfehlen die Streifen 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 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.

5.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5x 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 5x 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 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 = 41

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

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1	54,08	3,2
2	219,54	4,7

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay)

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

Probe	Mittelwert [AU/ml]	VK [%]
1 (n = 32)	56,02	8,8
2 (n = 32)	62,15	9,2
3 (n = 20)	9,49	6,1

Analytische Sensitivität

Leerwert (<i>limit of blank</i> , LoB)	3,12 AU/ml
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD)	6,93 AU/ml
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , LoQ)	10 AU/ml

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

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 4 Serumproben wurden dafür mit bekannten Konzentrationen an anti-Infliximab-Antikörpern versetzt und gemessen. Die Wiederfindung lag im Bereich von 80,01 bis 118,18%.

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 Verdünnung zweier Serumproben nachgewiesen.

Für anti-Infliximab-Antikörper in Serum und Plasma wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 14,23 bis 497,00 AU/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$. Die folgende Tabelle zeigt beispielhaft eine Verdünnungsreihe je Probe:

Probe	Verdünnung	Erwartet [AU/ml]	Gemessen [AU/ml]	Wiederfindung [%]
1	1:2	497,00	497,00	100,00
	1:4	248,50	247,07	99,42
	1:8	124,25	129,74	104,42
	1:16	62,13	63,00	101,41
	1:32	31,06	32,71	105,31
	1:64	15,53	16,35	105,25
2	1:2	370,48	370,48	100,00
	1:4	185,24	199,17	107,52
	1:8	92,62	98,74	106,61
	1:16	46,31	55,37	119,57
	1:32	23,16	28,84	124,56

Analytische Spezifität – Kreuzreaktivität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität zu anti-Adalimumab-Antikörpern in Patientenproben. Hierfür wurden 3 Patientenproben, welche zuvor positiv auf Adalimumab-Antikörper getestet wurden, gemessen. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

Analytische Spezifität – Interferenzen

Es wurden verschiedene Substanzen, welche möglicherweise mit dem IDKmonitor® Infliximab total ADA K 9654 interferieren, getestet. Es wurden hierzu positive sowie negative Proben entweder mit Medikamenten (maximale Tagesdosis) oder Serumbestandteilen (empfohlene Dosen gemäß CLSI-Richtlinie EP7-A2) versetzt und gemessen.

Es wurde keine Interferenz durch folgende Medikamente gefunden: Azathioprin, Pantoprazol, Mesalazin, Clarithromycin, Levofloxacin, Eisenpräparate, Acetylsalicylsäure, Vitamin D, Gabapentin, Multivitaminpräparate oder Ibuprofen.

Es wurde keine Interferenz durch folgende Serumbestandteile gefunden: Hämoglobin, Bilirubin oder Triglyceride.

High-Dose-Hook-Effekt

Bis zu einer Antikörper-Konzentration von 981 AU/ml konnte kein High-Dose-Hook-Effekt beobachtet werden.

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 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. Afif 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, Wohlgenuth 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
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

IDKmonitor[®] Infliximab total ADA ELISA

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

Valid from 2022-01-06

REF K 9654

REF K 9654.20

Σ 96

Σ 20 x 96



IVD

CE



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
6. PREPARATION OF THE ASSAY	19
<i>Sample storage</i>	19
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Principle of the test</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	22
<i>Reference range</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Accuracy – Precision</i>	23
<i>Accuracy – Trueness</i>	23
<i>Analytical sensitivity</i>	24
<i>Linearity</i>	24
<i>Analytical specificity – cross-reactivity</i>	24
<i>Analytical specificity – Interferences</i>	25
<i>High-Dose-Hook effect</i>	25
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. LITERATURE	26

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the determination of human antibodies against TNF α blocker infliximab (e.g. REMICADE®) in the presence of infliximab 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® Infliximab total ADA ELISA for the detection of total antibodies against infliximab (e.g. REMICADE®) measures free and bound antibodies against infliximab. This assay allows a reliable determination of ADA even in the presence of infliximab; therefore it is ideal for therapy monitoring when a measurable infliximab concentration is expected, for example shortly after the last infusion. In combination with the drug level determination, the IDKmonitor® Infliximab total ADA ELISA is an opportunity for the treating physician to monitor and optimise the therapy early on.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity for cat. no.	
			K 9654	K 9654.20
K 9654	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 9654	TRACER	Tracer concentrate, biotinylated	1 x 600 μ l	20 x 600 μ l
K 9654	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 600 μ l	20 x 600 μ l

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity for cat. no.	
			K 9654	K 9654.20
K 9654	CTRL CUT-OFF	Cut-off control, lyophilised	4 x 1 vial	30 x 1 vial
K 9654	CTRL NEG	Negative control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial	30 x 1 vial
K 9654	CTRL POS	Positive control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial	30 x 1 vial
K 9654	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	2 x 15 ml	25 x 15 ml
K 9654	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*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

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

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- **Bring all reagents to room temperature (15–30 °C) prior to use.**
- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** should be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- **Preparation of controls** see chapter 6 and 7.
- **Preparation of the conjugate and tracer: A few minutes before use, tracer concentrate (TRACER) and conjugate concentrate (CONJ)** have to be diluted **1:12** in **antibody dilution buffer (ABBUF)**: first put the ABBUF, then add successively TRACER and CONJ (e.g. 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. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. PREPARATION OF THE ASSAY

Sample storage

Undiluted samples can be stored for **2 months at -20 °C** and for **7 days at 2–8 °C or room temperature**. **Avoid more than 3 freeze-thaw-cycles**.

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

Principle of the test

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

Test procedure

Attention: The prepared samples 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.	Mix 25 μl sample into a reaction tube and adding 225 μl assay buffer (AS-YBUF), vortex. 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. Reconstitute the controls with 500 μl assay buffer and vortex. Attention: This should be done simultaneously with sample dilution to ensure equal treatment of controls and samples.
2.	Incubate controls and diluted samples in reaction tubes for 20 min with shaking on a horizontal shaker at room temperature. Caution: Incubation time begins upon addition of assay buffer.
3.	At the end of the incubation period, transfer 250 μ l of each control into a reaction vessel..
4.	Add 60 μl tracer/conjugate/antibody dilution buffer solution (see preparation of reagents) to 250 μl control/diluted sample. Vortex and incubate for 1 hour with shaking at room temperature (15–30°C).

* We recommend shaking the strips 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 (PLATE) 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 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.

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 of preincubated controls/samples into the wells of the microtiter plate.
7.	Cover the strips and incubate for 1.5 hours 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) until a sufficiently large difference in colour occurs**.
11.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix shortly by using the shake function* of the microplate reader.
12.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference.

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

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

8. RESULTS

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

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

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

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

Sample calculation for a positive sample

Average OD of patient's sample	0.735
Average OD of cut-off control	0.085 = 10 AU/ml
Concentration patient's sample	$\frac{0.735 \times 10 \text{ AU/ml}}{0.085} = 86.47 \text{ AU/ml}$

9. LIMITATIONS

Measurement range

The lower limit of the measurement range is the 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 $\leq 25\%$. Higher concentrations of biotin can lead to falsely low results. Patients taking > 5 mg biotin per day should wait at least 24 hours after taking 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 = 41

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	54.08	3.2
2	219.54	4.7

Reproducibility (Inter-Assay)

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 (n = 32)	56.02	8.8
2 (n = 32)	62.15	9.2
3 (n = 20)	9.49	6.1

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, known amounts of anti-Infliximab antibodies were added to 4 serum samples and measured. The recovery was found between 80.01 and 118.18%.

Analytical sensitivity

Limit of blank, LoB	3.12 AU/ml
Limit of detection, LoD	6.93 AU/ml
Limit of quantitation, LoQ	10 AU/ml

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

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 2 serum samples.

For anti-infliximab antibodies in serum and plasma, the method has been demonstrated to be linear from 14.23 to 497.00 AU/ml, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval. The following table shows one representative example for each sample:

Sample	Dilution	Expected [AU/ml]	Obtained [AU/ml]	Recovery [%]
1	1:2	497.00	497.00	100.00
	1:4	248.50	247.07	99.42
	1:8	124.25	129.74	104.42
	1:16	62.13	63.00	101.41
	1:32	31.06	32.71	105.31
	1:64	15.53	16.35	105.25
2	1:2	370.48	370.48	100.00
	1:4	185.24	199.17	107.52
	1:8	92.62	98.74	106.61
	1:16	46.31	55.37	119.57
	1:32	23.16	28.84	124.56

Analytical specificity – cross-reactivity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against anti-Adalimumab antibodies in patient samples. Therefore, 3 patient samples, which have previously been tested positive on anti-adalimumab antibodies, were tested. There was no cross-reactivity observed.

Analytical specificity – Interferences

Different substances that might interfere when using the IDKmonitor® Infliximab total ADA ELISA K 9654 were tested. Therefore, positive as well as negative serum samples were supplemented with either drugs (maximum daily dose) or serum components (doses according to CLSI guideline EP7-A2) and then measured.

No interferences with the following drugs were found: Azathioprin, Pantoprazol, Me-salazin, Clarithromycin, Levofloxacin, iron supplements, acetylsalicylic acid, vitamin D, Gabapentin, multivitamin preparation or Ibuprofen.

No interferences with the following serum components were found: hemoglobin, bilirubin or triglycerides.

High-Dose-Hook effect

No High-Dose-Hook effect was observed for antibody concentrations up to 981 AU/ml.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

Warning: Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

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

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according 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 send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. LITERATURE

1. Afif 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