

# **IDKmonitor<sup>®</sup> Adalimumab drug level ELISA**

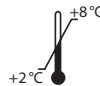
***Zur in-vitro-Bestimmung der Konzentration des freien  
Adalimumab (z. B. HUMIRA<sup>®</sup>) in EDTA-Plasma und Serum***

***For the in vitro determination of free adalimumab  
concentration (e. g. HUMIRA<sup>®</sup>) in EDTA plasma and serum***

Gültig ab / Valid from 2015-08-25



**K 9657**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>3</b>
<b>6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG</b>	<b>4</b>
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>5</b>
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>6</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>7</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>7</b>
<i>Referenzwerte</i>	7
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>8</b>
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Spike-Wiederfindung</i>	8
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Spezifität</i>	10
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>10</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>11</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>11</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>12</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von freiem Adalimumab (gegen TNF $\alpha$  gerichteter Therapieantikörper, z. B. HUMIRA®) aus EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF $\alpha$ ) gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen, welche Entzündungsreaktionen fördern und aufrecht erhalten. Das von Makrophagen und T-Zellen produzierte Zytokin spielt sowohl bei akuten als auch bei chronischen Entzündungen eine zentrale Rolle. Die Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie z. B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, rheumatischen Erkrankungen oder Psoriasis erfolgt daher immer häufiger mit Antikörpern gegen TNF $\alpha$ , die direkt in die zugrundeliegende Entzündungsreaktion eingreifen [1].

Die Wirksamkeit der anti-TNF $\alpha$ -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 [2, 3]. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Höhe des Talspiegels. Zu diesen zählen unter anderem die Dosis und die Frequenz der anti-TNF $\alpha$ -Behandlung, die Krankheitsaktivität, individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und das Auftreten von Antikörpern gegen die Therapieantikörper (anti-drug antibodies, ADA) [4, 5].

Der IDKmonitor® Adalimumab drug level ELISA zur Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von Adalimumab (z. B. HUMIRA®) misst quantitativ freies Adalimumab in EDTA-Plasma und Serum. Zusammen mit dem Nachweis von ADA gegen Adalimumab bietet der IDKmonitor® Adalimumab drug level ELISA dem behandelnden Arzt die Möglichkeit, die Therapie zu überwachen und frühzeitig zu optimieren.

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K9657	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 wells
K9657	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K9657	CONJ	Konjugat, Peroxidase-markiert, Konzentrat	1 x 200 $\mu$ l
K9657	STD	Standards, lyophilisiert (0; 4,15; 8,3; 25; 75; 225 ng/ml)	2 x 6 vials
K9657	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K9657	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K9657	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K9657	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K9657	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

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

#### 5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.

- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Der **WASH-BUF** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Standards und Kontrollen werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können 3 Monate bei -20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird unmittelbar 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 bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung 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 **1:200** verdünnt,

z.B. **10 µl** Probe + **1990 µl** SAMPLEBUF (Verdünnungspuffer), gut mischen.

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

### Lagerung

Frisch abgenommenes EDTA-Plasma bzw. Serum kann sieben Tage bei Raumtemperatur (15–30°C) gelagert werden [6]. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20°C zu lagern.

Verdünnte EDTA-Plasma- bzw. Serumproben sind eine Woche bei 2–8°C und mindestens 4 Wochen bei -20°C stabil.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung des freien Adalimumab (gegen TNF $\alpha$  gerichteter Therapieantikörper, z. B. HUMIRA®) im EDTA-Plasma oder Serum. In diesem Assay bindet das freie Adalimumab aus der Probe an den auf der Platte fixierten spezifischen monoklonalen anti-Adalimumab-Antikörper. Nach einem Waschschritt erfolgt die Detektion des gebundenen Adalimumab durch Zugabe eines Peroxidase-Konjugats. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch gemessen. Die Intensität der Farbe ist direkt proportional zum Gehalt des freien Adalimumab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve lässt sich die Konzentration des freien Adalimumab in den Proben ermitteln.

### Pipettierschema

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

Die benötigten **Mikrotiterstreifen** aus dem Kit nehmen, nicht verwendete können abgeklebt 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.	<b>100 µl STD</b> (Standard), <b>SAMPLE</b> (Probe) und <b>CTRL</b> (Kontrollen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren.
3.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x</b> mit je <b>250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
4.	<b>100 µl Konjugat</b> in alle Vertiefungen pipettieren.
5.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren.

6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x</b> mit je <b>250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7.	<b>100 µl SUB</b> (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
8.	<b>10–20 min*</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
9.	<b>100 µl STOP</b> (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, mischen.
10.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> 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 unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

### 1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

### 2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

### 3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

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.



### EDTA-Plasma- und Serumproben

Der ermittelte Adalimumab-Spiegel der EDTA-Plasma- und Serumproben wird mit dem Verdünnungsfaktor **200** multipliziert.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*höchste Konzentration der Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*LoB × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

### Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Präzision und Reproduzierbarkeit

#### Intra-Assay (n = 24)

Probe	Adalimumab [µg/ml]	VK [%]
1	2,7	1,5
2	8,3	1,5
3	18,0	2,6

#### Inter-Assay (n = 10)

Probe	Adalimumab [µg/ml]	VK [%]
1	8,3	8
2	4,1	4
3	19,4	13
4	15,7	5
5	10,6	6
6	2,8	4

### Spike-Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen Adalimumabmengen versetzt und gemessen (n = 2).

Probe	Probe ungespikt [µg/ml]	Spike [µg/ml]	Adalimumab gemessen [µg/ml]
1	< LoB	13,0	13,1
	< LoB	6,0	7,1
	< LoB	3,0	3,5
2	< LoB	30,0	32,4
	< LoB	19,0	20,8
	< LoB	11,0	11,0

*Wiederfindung in der Verdünnung*

Fünf Patientenproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n= 5)

<b>Probe</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Erwartet [µg/ml]</b>	<b>Gemessen [µg/ml]</b>
1	1:200		8,55
	1:400	4,28	4,24
	1:800	2,14	1,93
	1:1600	1,07	0,93
	1:3200	0,53	0,51
2	1:200		19,57
	1:400	9,59	10,44
	1:800	4,79	5,23
	1:1600	2,40	2,53
	1:3200	1,20	1,15
	1:6400	0,60	0,63
	1:12800	0,30	0,37
3	1:200		10,46
	1:400	5,23	5,55
	1:800	2,62	2,62
	1:1600	1,31	1,26
	1:3200	0,65	0,66
4	1:200		16,36
	1:400	8,18	8,72
	1:800	4,09	4,37
	1:1600	2,05	2,03
	1:3200	1,02	0,96
	1:6400	0,51	0,53

Probe	Verdünnung	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]
5	1:200		14,55
	1:400	7,28	7,78
	1:800	3,64	3,88
	1:1600	1,82	1,80
	1:3200	0,91	0,90
	1:6400	0,45	0,49

### Analytische Sensitivität

Die Leerwert-Obergrenze (*limit of blank*, LoB) wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 bestimmt und ist 2,3 ng/ml.

### Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Serumproteinen, Infliximab- oder Golimumab-Antikörpern gefunden.

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- 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.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

### 13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden, da schon geöffnete Mikrotiterplatten anderen Bedingungen unterliegen als verschlossene.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit 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, zurück zu senden.

## 15. LITERATUR

1. Bradley JR (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* **214**(2): 149-160.
2. Chiu YL, Rubin DT, Vermeire S, Louis E, Robinson AM, Lomax KG, Pollack PF, Paulson SK (2013) Serum adalimumab concentration and clinical remission in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **19**(6): 1112-1122
3. Chaparro M, Guerra I, Muñoz-Linares P, Gisbert JP (2012) Systematic review: antibodies and anti-TNF- $\alpha$  levels in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **35**(9): 971-986
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.
6. Perry, M., Bewshea, C., Brown, R., So, K., Ahmad, T., & McDonald, T. (2015). *Infliximab and adalimumab are stable in whole blood clotted samples for seven days at room temperature. Annals of Clinical Biochemistry.* Epub ahead of print.

### Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis

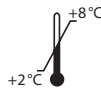
# **IDKmonitor<sup>®</sup> adalimumab drug level ELISA**

***For the in vitro determination of free adalimumab  
concentration (e. g. HUMIRA<sup>®</sup>) in EDTA plasma and serum***

Valid from 2015-08-25



**K 9657**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>15</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>16</b>
<b>5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>16</b>
<b>6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>17</b>
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>17</b>
<i>Principle of the test</i>	17
<i>Test procedure</i>	18
<b>8. RESULTS</b>	<b>19</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>20</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>20</b>
<i>Reference range</i>	20
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>20</b>
<i>Analytical Sensitivity</i>	20
<i>Specificity</i>	20
<i>Precision and reproducibility</i>	21
<i>Spiking Recovery</i>	21
<i>Dilution recovery</i>	22
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>23</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>23</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>23</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>24</b>



## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of free adalimumab (therapeutic antibody against TNF $\alpha$ , e.g. HUMIRA®) in EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) belongs to the proinflammatory cytokines, which promote and sustain inflammatory reactions. It is produced by macrophages and T cells and plays a central role in both acute and chronic inflammations. Consequently, chronic inflammatory diseases like Crohn's disease, ulcerative colitis, rheumatoid arthritis, or psoriasis are increasingly being treated with antibodies against TNF $\alpha$ , which target directly the underlying inflammatory processes [1].

The clinical efficacy of an anti-TNF $\alpha$  therapy usually correlates with the trough level of the therapeutic antibody, meaning the drug level just before the next application of the anti-TNF $\alpha$  antibody [2, 3]. Several factors influence the trough level, among them dosage and frequency of anti-TNF $\alpha$  blocker infusion, disease activity, individual pharmacokinetics and immune reaction (formation of anti-drug antibodies, ADA) [4, 5].

The IDKmonitor® adalimumab drug level ELISA for the determination of the drug level of adalimumab (e.g. HUMIRA®) measures quantitatively free adalimumab in EDTA plasma and serum. In combination with the detection of ADA against adalimumab, the IDKmonitor® adalimumab drug level 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
K9657	PLATE	Holder with strips, precoated	12 x 8 wells
K9657	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K9657	CONJ	Conjugate, Peroxidase-labeled, concentrate	1 x 200 $\mu$ l
K9657	STD	Calibrators, lyophilized (0; 4.15; 8.3; 25; 75; 225 ng/ml)	2 x 6 vials
K9657	CTRL 1	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K9657	CTRL 2	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K9657	SAMPLEBUF	Dilution buffer, ready to use	2 x 100 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K9657	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidin), ready to use	1 x 15 ml
K9657	STOP	ELISA 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

- Ultra pure water\*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Absorbent paper
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

\* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure 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 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 ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. 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 one month.**

- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (controls) are stable at 2–8°C until expiry date stated on the label. Before use, the standards and controls have to be reconstituted with **500 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes at room temperature (15–30°C), and mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls can be stored at -20°C for 3 months. Avoid repeated thawing and freezing.**
- **Preparation of the conjugate:** 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 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 of test package) when stored at **2–8°C**.

## 6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### EDTA plasma and serum

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:200** before performing the assay, e.g. **10 µl** sample + **1990 µl** SAMPLEBUF (dilution buffer), mix well.

**2 x 100 µl** of the diluted sample per well are used for testing in duplicates.

### Sample storage

Freshly collected EDTA plasma or serum can be stored for seven days at room temperature (15–30°C) [6] or for longer storage at -20°C.

Diluted EDTA plasma or serum samples can be stored for two weeks at 2–8°C and at -20°C for at least four weeks.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This ELISA is designed to quantitate free adalimumab (therapeutic antibody against TNFα, e.g. HUMIRA®) in EDTA plasma or serum samples. In a first incubation step, the free adalimumab from the sample is bound to the specific monoclonal anti-adalimumab antibody coated on the plate. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a further incubation step, Peroxidase-labeled antibody is added. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue

to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of free adalimumab in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. The concentrations of free adalimumab in the samples are determined directly from this curve.

### Test procedure

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

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips covered 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.	Add <b>100 µl of STD</b> (standard), <b>SAMPLE</b> (sample) or <b>CTRL</b> (controls) into the respective wells.
2.	Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker.
3.	Discard the contents of each well. Wash each well <b>5 x</b> by dispensing <b>250 µl washbuffer</b> into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
4.	Add <b>100 µl conjugate</b> into each well.
5.	Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker.
6.	Discard the contents of each well. Wash each well <b>5 x</b> by dispensing <b>250 µl washbuffer</b> into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
7.	Add <b>100 µl SUB</b> (substrate) into each well.
8.	Incubate for <b>10–20 min*</b> at room temperature (15–30 °C) in the dark.
9.	Add <b>100 µl STOP</b> (stop solution) into each well, mix.

10.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> against 620 nm as a reference.
-----	---

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

## 8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4 parameter algorithm".

### 1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

### 2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

### 3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

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

### EDTA plasma and serum samples

The obtained adalimumab levels of EDTA plasma and serum samples have to be multiplied with the dilution factor of **200**.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

## 9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

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

*highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used*

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

*LoB × sample dilution factor to be used*

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

### *Reference range*

We recommend each laboratory to establish its own reference concentration range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Analytical Sensitivity*

The LoB (limit of blank) was evaluated according to the CLSI guideline EP-17-A2 and resulted in 2.3 ng/ml.

### *Specificity*

No cross reactivity to other plasma proteins, infliximab or golimumab antibodies was observed.

### Precision and reproducibility

#### Intra-assay (n = 24)

Sample	Adalimumab [µg/ml]	CV [%]
1	2.7	1.5
2	8.3	1.5
3	18.0	2.6

#### Inter-assay (n = 10)

Sample	Adalimumab [µg/ml]	CV [%]
1	8.3	8
2	4.1	4
3	19.4	13
4	15.7	5
5	10.6	6
6	2.8	4

### Spiking Recovery

Two samples were spiked with different adalimumab concentrations and measured using this assay.

Sample	Unspiked sample [µg/ml]	Spike [µg/ml]	Measured adalimumab [µg/ml]
1	< LoB	13.0	13.1
	< LoB	6.0	7.1
	< LoB	3.0	3.5
2	< LoB	30.0	32.4
	< LoB	19.0	20.8
	< LoB	11.0	11.0

*Dilution recovery*

Five samples were diluted and analyzed. The results are shown below (n = 5):

Sample	Dilution	Expected [µg/ml]	Measured [µg/ml]
1	1:200		8.55
	1:400	4.28	4.24
	1:800	2.14	1.93
	1:1600	1.07	0.93
	1:3200	0.53	0.51
2	1:200		19.57
	1:400	9.59	10.44
	1:800	4.79	5.23
	1:1600	2.40	2.53
	1:3200	1.20	1.15
	1:6400	0.60	0.63
	1:12800	0.30	0.37
3	1:200		10.46
	1:400	5.23	5.55
	1:800	2.62	2.62
	1:1600	1.31	1.26
	1:3200	0.65	0.66
4	1:200		16.36
	1:400	8.18	8.72
	1:800	4.09	4.37
	1:1600	2.05	2.03
	1:3200	1.02	0.96
	1:6400	0.51	0.53
5	1:200		14.55
	1:400	7.28	7.78
	1:800	3.64	3.88
	1:1600	1.82	1.80
	1:3200	0.91	0.90
	1:6400	0.45	0.49



## 12. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Kit reagents contain sodium azide or Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- 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.
- 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 sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

## 15. REFERENCES

1. Bradley JR (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214(2): 149-160.
2. Chiu YL, Rubin DT, Vermeire S, Louis E, Robinson AM, Lomax KG, Pollack PF, Paulson SK (2013) Serum adalimumab concentration and clinical remission in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 19(6): 1112-1122
3. Chaparro M, Guerra I, Muñoz-Linares P, Gisbert JP (2012) Systematic review: antibodies and anti-TNF- $\alpha$  levels in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 35(9): 971-986
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.
6. Perry, M., Bewshea, C., Brown, R., So, K., Ahmad, T., & McDonald, T. (2015). *Infliximab and adalimumab are stable in whole blood clotted samples for seven days at room temperature. Annals of Clinical Biochemistry.* Epub ahead of print.

### 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