

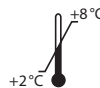
IDKmonitor[®] Infliximab drug level ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung der Konzentration des freien
Infliximab (z. B. REMICADE[®]) in EDTA-Plasma und Serum*

*For the in vitro determination of free infliximab
concentration (e. g. REMICADE[®]) in EDTA plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2015-08-25

REF K 9655



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

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. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzwerte</i>	7
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	8
<i>Spezifität</i>	8
<i>Linearität</i>	9
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung des freien chimären TNF α -Therapieantikörper Infliximab (z. B. REMICADE®) aus EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) 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 α , die direkt in die zugrundeliegende Entzündungsreaktion eingreifen [5].

Die Wirksamkeit der anti-TNF α -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-TNF α -Behandlung, die Krankheitsaktivität, individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und das Auftreten von Antikörpern gegen die Therapieantikörper (anti-drug antibodies, ADA) [1, 13].

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

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Inhalt	Kit-Komponenten	Menge
K9655	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 wells
K9655	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K9655	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert	1 x 200 μ l
K9655	STD	Standards, lyophilisiert (0; 4,15; 8,3; 25; 75; 225 ng/ml)	2 x 6 vials
K9655	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial

Art.-Nr.	Inhalt	Kit-Komponenten	Menge
K9655	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K9655	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K9655	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K9655	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. LAGERUNG UND VORBEREITUNG 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 4 x 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 **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) werden mit **500 µl** Reinstwasser rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten unter gelegentlichem Schwenken bei Raumtemperatur (15–30°C) 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 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. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

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 die 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 [14]. 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 Infliximab (gegen TNF α gerichteter Therapieantikörper, z. B. REMICADE®) im EDTA-Plasma oder Serum. In diesem Assay bindet das freie Infliximab aus der Probe an den auf der Platte fixierten spezifischen monoklonalen anti-Infliximab-Antikörper. Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion des gebundenen Infliximab 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 dem Gehalt des freien Infliximab direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve lässt sich die Konzentration des freien Infliximab 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.	100 µl STD (Standard), SAMPLE (Probe) und CTRL (Kontrollen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren.
3.	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.
4.	100 µl Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
5.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren.

6.	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.
7.	100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
8.	10–20 min* bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
9.	100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, mischen.
10.	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 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 Infliximab-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-Variation

Die Reproduzierbarkeit von drei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft (n = 24).

Probe	Infliximab (z. B. REMICADE®) [µg/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	4,1	1,8
2	7,9	2,5
3	24,2	9,7

Inter-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von sechs Proben an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft (n= 10).

Probe	Infliximab (z. B. REMICADE®) [µg/ml]	Inter-Assay Vk [%]
1	19,7	11
2	7,7	4
3	17,3	10
4	9,6	4
5	5,0	4
6	2,7	6

Analytische Sensitivität

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 2,68 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 3,52 ng/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 3,52 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie:EP-17-A durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20% VK.

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu Adalimumab, Golimumab oder anderen Serumproteinen gefunden.

Linearität

Vier Patientenproben wurden mit SAMPLEBUF verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt. (n=4)

Probe	Verdünnung	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]
1	1:200		22,79
	1:400	11,40	11,83
	1:800	5,70	6,19
	1:1600	2,85	3,25
	1:3200	1,42	1,77
	1:6400	0,71	1,00
	1:128000	0,36	0,61
2	1:200		19,43
	1:400	9,72	11,44
	1:800	4,86	6,22
	1:1600	2,43	3,26
	1:3200	1,21	1,76
	1:6400	0,61	1,05
	1:128000	0,30	0,56
3	1:200		8,39
	1:400	4,20	4,85
	1:800	2,10	2,57
	1:1600	1,05	1,40
	1:3200	0,52	0,77
4	1:200		17,09
	1:400	8,55	10,08
	1:800	4,27	5,56
	1:1600	2,14	2,95
	1:3200	1,07	1,55
	1:6400	0,53	0,88
	1:128000	0,27	0,42

Spike-Wiederfindung

Drei Proben wurden mit unterschiedlichen Infiximab-Mengen versetzt und gemessen (n = 3).

Probe	Ungespikete Probe [µg/ml]	Spike [µg/ml]	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]
A	< NWG	14,0	14,0	14,0
	< NWG	7,0	7,0	8,8
	< NWG	3,0	3,0	3,5
B	< NWG	19,0	19,0	18,2
	< NWG	10,0	10,0	9,0
	< NWG	5,0	5,0	4,6
C	< NWG	5,0	5,0	6,1
	< NWG	3,0	3,0	2,7
	< NWG	1,5	1,5	1,4

NWG = Nachweisgrenze

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.
- 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.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- 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, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Afif W, Loftus EJ, Faubion W, et al. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2010;**105**(5):1133–9.
2. Beglinger C, Binek J, Braegger C, Michetti P, Rogler G, Sauter B, Seibold F, Straumann A (2008) Monotherapie versus Kombinationstherapie mit Immunmodulatoren. *TMI* **1**:32-34
3. Bender NK, Heilig CE, Dröll B, Wohlgemuth J, Armbruster FP, Heilig B (2007) Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int.* **Jan**;27(3):269-74
4. Bendtzen K, Geborek P, Svenson M, Larsson L, Kapetanovic MC, Saxne T (2006) Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum.* Dec;54(12):3782-9
5. Bradley JR. (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology.* **214**:149–160.
6. St Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, Wang B, Schaible T, Kavanaugh A, Keystone EC (2002) The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* Jun;46(6):1451-9
7. Chang JT, Lichtenstein GR (2006) Drug insight: antagonists of tumor-necrosis factor-alpha in the treatment of inflammatory bowel disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* Apr;3(4):220-8. Review
8. Colombel JF, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Egan LJ, Harmsen WS, Schleck CD, Zinsmeister AR, Sandborn WJ (2004) The safety profile of infliximab in patients with Crohn's disease: the Mayo clinic experience in 500 patients. *Gastroenterology.* Jan;126(1):19-31
9. Cominelli F (2004) Cytokine-based therapies for Crohn's disease--new paradigms. *N Engl J Med.* Nov 11;351(20):2045-8
10. Cornillie F, Shealy D, D'Haens G, Geboes K, Van Assche G, Ceuppens J, Wagner C, Schaible T, Plevy SE, Targan SR, Rutgeerts P (2001) Infliximab induces potent anti-inflammatory and local immunomodulatory activity but no systemic immune suppression in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* Apr;15(4):463-73
11. Maser EA, Vilella R, Silverberg MS, Greenberg GR (2006) Association of trough serum infliximab to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* Oct;4(10):1248-54

12. Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S (2004) Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. May;126(6):1593-610. Review
13. Vande Casteele N, Gils A. Pharmacokinetics of anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: Adding value to current practice. *Journal of clinical pharmacology*. 2015;**55 Suppl 3**:S39–50. doi:10.1002/jcph.374.
14. 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:

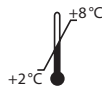
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis

IDKmonitor[®] infliximab drug level ELISA

***For the in vitro determination of free infliximab
concentration (e.g. REMICADE[®]) in EDTA plasma and serum***

Valid from 2015-08-25

REF K 9655



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
7. ASSAY PROCEDURE	19
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Test procedure</i>	20
8. RESULTS	21
9. LIMITATIONS	22
10. QUALITY CONTROL	22
<i>Reference range</i>	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Analytical Sensitivity</i>	22
<i>Specificity</i>	22
<i>Linearity</i>	23
<i>Spiking Recovery</i>	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	25
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	26

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of free therapeutic TNF α antibodies infliximab (e. g. REMICADE®) in EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) 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 α , which target directly the underlying inflammatory processes [5].

The clinical efficacy of an anti-TNF α therapy usually correlates with the trough level of the therapeutic antibody, meaning the drug level just before the next application of the anti-TNF α antibody. 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) [1, 13].

The IDKmonitor® infliximab drug level ELISA for the determination of the drug level of infliximab (e. g. REMICADE®) measures quantitatively free infliximab in EDTA plasma and serum. In combination with the detection of ADA against infliximab, the IDKmonitor® infliximab 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
K9655	PLATE	Holder with strips, pre-coated	12 x 8 wells
K9655	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K9655	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labeled	1 x 200 μ l
K9655	STD	Calibrators, lyophilized (0; 4.15; 8.3; 25; 75; 225 ng/ml)	2 x 6 vials
K9655	CTRL 1	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K9655	CTRL 2	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K9655	SAMPLEBUF	Dilution buffer, ready to use	2 x 100 ml

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K9655	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidin), ready to use	1 x 15 ml
K9655	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. STORAGE AND PREPARATION 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 three months. Avoid repeated thawing and freezing.**
- **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 of test package) when stored at 2–8 °C.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

EDTA plasma and serum

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:200** before performing the assay, e.g.

10 µl sample + **1990 µl** SAMPLEBUF (dilution buffer), mix well.

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

Sample storage

Freshly collected EDTA plasma or serum can be stored for seven days at room temperature (15–30 °C) [14] 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 determine the quantity of free infliximab (therapeutic antibody against TNFα, e.g. REMICADE®) in EDTA plasma or serum samples. In a first incubation step, the free infliximab from the sample is bound to the specific monoclonal anti-infliximab 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 infliximab 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 infliximab 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 100 µl of STD (standard), SAMPLE (sample) or CTRL (controls) into the respective wells.
2.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C) on a horizontal shaker.
3.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of wash buffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
4.	Add 100 µl conjugate into each well.
5.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C) on a horizontal shaker.
6.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of wash buffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
7.	Add 100 µl SUB (substrate) into each well.
8.	Incubate for 10–20 min* at room temperature (15–30°C) in the dark .
9.	Add 100 µl STOP (stop solution) into each well, mix.

10.	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 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 standard 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 duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

EDTA-plasma and serum samples

The obtained infliximab 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 range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Sensitivity

Limit of blank, LoB	2.68 ng/ml
Limit of detection, LoD	3.52 ng/ml
Limit of quantitation, LoQ	3,52 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI-Guideline:EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20% CV.

Specificity

No cross reactivity to adalimumab, golimumab other plasma proteins was observed.

Linearity

Four patient samples were diluted with SAMPLEBUF and analyzed. The results are shown below (n = 4):

Probe	Dilution	Expected [µg/ml]	Measured [µg/ml]
1	1:200		22.79
	1:400	11.40	11.83
	1:800	5.70	6.19
	1:1600	2.85	3.25
	1:3200	1.42	1.77
	1:6400	0.71	1.00
	1:128000	0.36	0.61
2	1:200		19.43
	1:400	9.72	11.44
	1:800	4.86	6.22
	1:1600	2.43	3.26
	1:3200	1.21	1.76
	1:6400	0.61	1.05
	1:128000	0.30	0.56
3	1:200		8.39
	1:400	4.20	4.85
	1:800	2.10	2.57
	1:1600	1.05	1.40
	1:3200	0.52	0.77
4	1:200		17.09
	1:400	8.55	10.08
	1:800	4.27	5.56
	1:1600	2.14	2.95
	1:3200	1.07	1.55
	1:6400	0.53	0.88
	1:128000	0.27	0.42

Spiking Recovery

Three samples were spiked with different infliximab concentrations and measured using this assay (n = 3).

Probe	Unspiked Probe [µg/ml]	Spike [µg/ml]	Expected [µg/ml]	Measured [µg/ml]
A	< LoB	14.0	14.0	14.0
	< LoB	7.0	7.0	8.8
	< LoB	3.0	3.0	3.5
B	< LoB	19.0	19.0	18.2
	< LoB	10.0	10.0	9.0
	< LoB	5.0	5.0	4.6
C	< LoB	5.0	5.0	6.1
	< LoB	3.0	3.0	2.7
	< LoB	1.5	1.5	1.4

Precision and reproducibility

Intra-Assay

The precision (intra-assay variation) was calculated from 24 replicate determinations on three samples (n = 24).

Sample	Infliximab (e. g. REMICADE®) [µg/ml]	Intra-Assay CV [%]
1	4.1	1.8
2	7.9	2.5
3	24.2	9.7

Inter-Assay

The total precision (inter-assay variation) of was calculated from data on six sample obtained in 10 different assays (n = 10).

Sample	Infliximab (e. g. REMICADE®) [µg/ml]	Inter-Assay CV [%]
1	19.7	11
2	7.7	4
3	17.3	10
4	9.6	4
5	5.0	4
6	2.7	6

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 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 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 analyzed 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 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. REFERENCES

1. Afif W, Loftus EJ, Faubion W, et al. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2010;**105**(5):1133–9.
2. Beglinger C, Binek J, Braegger C, Michetti P, Rogler G, Sauter B, Seibold F, Straumann A (2008) Monotherapie versus Kombinationstherapie mit Immunmodulatoren. *TMI* **1**:32-34
3. Bender NK, Heilig CE, Dröll B, Wohlgemuth J, Armbruster FP, Heilig B (2007) Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int. Jan*;**27**(3):269-74
4. Bendtzen K, Geborek P, Svenson M, Larsson L, Kapetanovic MC, Saxne T (2006) Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheu-

- matoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum.* Dec;54(12):3782-9
5. Bradley JR. (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology.* **214**:149–160.
 6. St Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, Wang B, Schaible T, Kavanaugh A, Keystone EC (2002) The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* Jun;46(6):1451-9
 7. Chang JT, Lichtenstein GR (2006) Drug insight: antagonists of tumor-necrosis factor-alpha in the treatment of inflammatory bowel disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* Apr;3(4):220-8. Review
 8. Colombel JF, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Egan LJ, Harmsen WS, Schleck CD, Zinsmeister AR, Sandborn WJ (2004) The safety profile of infliximab in patients with Crohn's disease: the Mayo clinic experience in 500 patients. *Gastroenterology.* Jan;126(1):19-31
 9. Cominelli F (2004) Cytokine-based therapies for Crohn's disease--new paradigms. *N Engl J Med.* Nov 11;351(20):2045-8
 10. Cornillie F, Shealy D, D'Haens G, Geboes K, Van Assche G, Ceuppens J, Wagner C, Schaible T, Plevy SE, Targan SR, Rutgeerts P (2001) Infliximab induces potent anti-inflammatory and local immunomodulatory activity but no systemic immune suppression in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* Apr;15(4):463-73
 11. Maser EA, Vilella R, Silverberg MS, Greenberg GR (2006) Association of trough serum infliximab to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* Oct;4(10):1248-54
 12. Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S (2004) Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* May;126(6):1593-610. Review
 13. Vande Casteele N, Gils A. Pharmacokinetics of anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: Adding value to current practice. *Journal of clinical pharmacology.* 2015;**55 Suppl 3**:S39–50. doi:10.1002/jcph.374.
 14. 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