

Arbeitsanleitung

Antikörper gegen TNF α -Blocker (ADA) ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung von freien humanen Antikörpern gegen
den Wirkstoff (z. B. HUMIRA) in Serum*

Antibodies against TNF α -Blocker (ADA) ELISA Kit

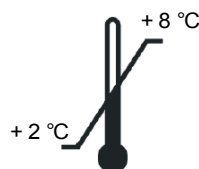
*For the in vitro determination of free human antibodies against
the drug (e.g. HUMIRA) in serum*

Nur zu wissenschaftlichen Zwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 25.10.2010



K 9652



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	6
8. PROBENVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
HINWEISE	6
PIPETTIERSHEMA	7
10. ERGEBNISSE	8
11. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	8

Table of Content	Page
1. INTENDED USE	11
2. CLINICAL RELEVANCE	11
3. PRINCIPLE OF THE TEST	11
4. MATERIAL SUPPLIED	12
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	12
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	13
7. PRECAUTIONS	14
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	14
9. ASSAY PROCEDURE	14
PROCEDURAL NOTES	14
TEST PROCEDURE	15
10. RESULTS	16
11. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	16

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von freien humanen Antikörpern gegen anti-TNF α Therapieantikörper in der Reumatherapie (z. B. Antikörper gegen HUMIRA) in Serum geeignet. Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.

2. EINLEITUNG

Mit diesem ELISA werden freie Antikörper gegen den Therapieantikörper (anti-TNF α Therapieantikörper, z. B. HUMIRA) in Serum bestimmt. Anti-TNF α Therapieantikörper werden zur Suppression bei Rheumapatienten eingesetzt. Während der Therapie ist es möglich, dass die Patienten Antikörper gegen die anti-TNF α Therapieantikörper entwickeln. Dadurch ist mit erheblichen Komplikationen bis hin zum anaphylaktischen Schock zu rechnen.

Unser ELISA eignet sich sehr gut für das Therapiemonitoring und bietet dem betreuenden Arzt die Möglichkeit frühzeitig zu reagieren.

3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur qualitativen Bestimmung der freien Antikörper gegen die Therapieantikörper (anti-TNF α Therapieantikörper, z. B. HUMIRA). In diesem Assay bindet der freie Antikörper aus der Probe an den auf der Platte fixierten Therapieantikörper (z. B. HUMIRA). Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion des gebundenen anti-Therapieantikörpers durch Zugabe eines Peroxidase-Konjugats (POD-Therapieantikörper). Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Gehalt der freien Antikörper gegen den Therapieantikörper (z. B. anti-HUMIRA) direkt proportional. Die Auswertung erfolgt über den Cut-off-Wert.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 9652MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet (F(ab) ₂)	12 x 8 wells
K 9652WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 9652K	CONJ	Konjugat (Therapieantikörper, Peroxidase-markiert), Konzentrat	1 x 150 µl
K 9652KO1	CTRL POS	Positiv Kontrolle	4 x 1 vial
K 9652KO2	CTRL NEG	Negativ Kontrolle	4 x 1 vial
K 9652PV	SAMPLEBUF	Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 9652TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9652AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 5 - 1000 µl
- Absorptionspapier
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 oder 405 nm

*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 0,055µS/cm bei 25°C (≤18,2MΩ cm).

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte 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.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 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. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten CTRLNEG und CTRLPOS** (Kontrollen, negativ bzw. positiv) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Kontrollen werden mit **250 µl** Reinstwasser rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Kontrollen können nicht gelagert werden.**
- Das **Konjugat** (CONJ) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:100** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes Konjugat ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat 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.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.
- Kontrollen sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Serum

Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:10** verdünnt, z. B.

25 µl Probe + **225 µl** SAMPLEBUF (Verdünnungspuffer), gut mischen.

100 µl der Verdünnung wird im Test eingesetzt.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Pipettierschema

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte **vor Gebrauch 5x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. 100 µl CTRLNEG, CTRLPOS (Kontrollen) und vorbereitete Proben in die Vertiefungen pipettieren.
2. Über Nacht (16 - 20 h) bei 2 – 8 °C unter Schütteln inkubieren.*
3. Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. 100 µl verdünnten CONJ (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.
5. 1 Std. bei Raumtemperatur (18–26°C) unter Schütteln inkubieren.
6. Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. 100 µl TMB-Substratlösung pro Vertiefung pipettieren.
8. 10 – 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren.**
9. 50 µl Stopplösung zusetzen und kurz mischen.
10. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von 450 nm messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (STD) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von 405 nm wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

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

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

10. ERGEBNISSE

Über cut off. Der cut off ist die zweifache optische Dichte der Negativ Kontrolle.

11. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanseren verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid / Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik 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 zurück zu senden.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

Antibodies against TNF α -Blocker (ADA) ELISA Kit

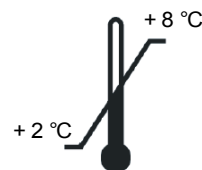
***For the in vitro determination of free human antibodies against
the drug (e.g. HUMIRA) in serum***

For research use only

Valid from 25.10.2010



K 9652



1. INTENDED USE

The here described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit is intended for the qualitative determination of free human antibodies against therapeutic anti-TNF α antibodies in the rheumatism therapy (e.g. antibodies against HUMIRA) in serum. It is for research use only.

2. CLINICAL RELEVANCE

With our ELISA test, free antibodies against therapeutic antibodies (anti-TNF α therapeutic antibodies, e.g. HUMIRA) in the rheumatism therapy can be detected. Anti-TNF α therapeutic antibodies are used for suppressing therapy in rheumatic patients. There is a possibility that patients under anti-TNF α -antibody therapy develop antibodies against the therapeutic antibodies. This might lead to severe complications, even to a systemic anaphylaxis with possibly lethal outcome.

Our ELISA kit can be used for therapy monitoring and offers the doctor a tool for decision on possible preventive measures.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme Immuno Assay is a sandwich assay for the determination of free antibodies against therapeutic antibodies (anti-TNF α therapeutic antibodies, e.g. HUMIRA) in serum samples. In a first incubation step, the free anti-therapeutic antibodies from the sample are bound to the therapeutic antibodies (e.g. HUMIRA) coated on the plate. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a further incubation step, Peroxidase-labeled therapy antibody is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, Tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stop solution is then added. The colour converts to yellow. The absorbance of the color compound is determined photometrically at 450 nm. The intensity of the color is directly proportional to the amount of bound anti-therapeutic antibodies (e.g. anti-HUMIRA) from the sample. The results are evaluated by a cut off value.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 9652MTP	PLATE	One holder with strips, precoated with (F(ab) ₂)	12 x 8 wells
K 9652WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 9652K	CONJ	POD antibody, (therapy antibody, peroxidase labelled), concentrate	1 x 150 µl
K 9652KO1	CTRL POS	Control, positive	4 x 1 vial
K 9652KO2	CTRL NEG	Control, negative	4 x 1 vial
K 9652PV	SAMPLEBUF	Dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 9652TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 9652AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 5-1000 µl
- Absorbent paper
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 or 405 nm

*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 0,055µS/cm at 25°C (≤18,2MΩ cm).

6. 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 assay.** 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.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be dissolved at room temperature or at 37°C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- The lyophilized **CTRLNEG and CTRLPOS** (controls, negative and positive) must be reconstituted with **250 µl** of ultra pure water. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes at room temperature, and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. The undiluted controls are stable at **2-8 °C** until expiry date stated on the label. **Reconstituted controls are not stable and cannot be stored.**
- The **conjugate** (CONJ) must be diluted **1:100** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The undiluted conjugate is stable at **2-8 °C** until expiry date stated on the label. **Diluted conjugate 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**.

7. PRECAUTIONS

- For research use only.
- The calibrators and controls contain human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, HCV or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- 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.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum

Serum samples must be diluted **1:10** before performing the assay, e.g.

25 µl serum + **225 µl** SAMPLEBUF (sample dilution buffer), mix well.

100 µl of the diluted sample per well are used in the test.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not mix different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Carry out the assay with the actual manual delivered with the kit.

Test procedure

Wash the precoated microtiter plate **5 x with 250 µl ELISA wash buffer**. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper. Carry out the tests in duplicate.

1.	Add 100 µl of CTRLNEG, CTRLPOS (controls) and diluted samples in the wells of the microtiter plate.
2.	Incubate over night (16-20 h) , on a horizontal mixer, at 2 – 8 °C.*
3.	Aspirate the content of the plate and wash each well 5 x with 250 µl ELISA wash buffer. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
4.	Add 100 µl of diluted CONJ (conjugate) into each well.
5.	Incubate for 1 hour shaking on a horizontal mixer at room temperature (18–26°C).
6.	Aspirate the content of the plate and wash each well 5 x with 250 µl ELISA wash buffer. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
7.	Add 100 µl of TMB substrate solution into each well.
8.	Incubate for 10-20 minutes at room temperature in the dark. **
9.	Add 50 µl stop solution into each well and mix shortly.
10.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm . If the highest extinction of the standards (STD) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used.

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

**The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the procedure of the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

10. RESULTS

The results are to determine by cut off. The cut off is twice the OD of the negative control.

11. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- The test components which are made of human serum are tested for HVB and HIV and found to be negative. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these reagents should be handled as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen. The normal precautions for laboratory working should be observed.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- All reagents in the test package are for research use only.
- The reagents should not be used after the date of expiry (see label on the test package). Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components have been defined by the producer. Any alterations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number