

TNF α -Blocker-Monitoring (Wirkstoffkonz. z.B. Humira) ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung der freien anti-TNF α -
Therapieantikörper-Konzentration (z. B. Humira) in Serum*

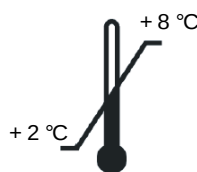
TNF α -Blocker-Monitoring (drug-level e.g. Humira) ELISA Kit

*For the in vitro determination of free therapeutic anti-TNF α
antibody concentration (e.g. Humira) in serum*

Nur zu wissenschaftlichen Zwecken/For research use only

Gültig ab/valid from 06.06.2011

K 9657



RUO



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
Table of Content	2
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	6
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	7
8. PROBENVORBEREITUNG	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
HINWEISE	7
PIPETTIERSHEMA	8
10. ERGEBNISSE	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	9
12. QUALITÄTSKONTROLLE	9
ERWARTETE ERGEBNISSE	10
13. TESTCHARAKTERISTIKA	10
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	10
SENSITIVITÄT	10
KREUZREAKTIVITÄT	10
14. LITERATUR	10
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12

1. INTENDED USE	14
2. CLINICAL RELEVANCE	14
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	15
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
7. PRECAUTIONS	17
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	18
9. ASSAY PROCEDURE	18
PROCEDURAL NOTES	18
TEST PROCEDURE	19
10. RESULTS	20
11. LIMITATIONS	20
12. QUALITY CONTROL	20
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	21
SENSITIVITY	21
CROSS REACTIVITY	21
14. REFERENCES	21
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von freien anti-TNF α Therapieantikörper (z.B. Adalimumab/Humira) aus Serum geeignet. Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.

2. EINLEITUNG

Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen, die Entzündungsreaktionen fördern und aufrecht halten. Das von Makrophagen und T-Zellen produzierte Zytokin spielt sowohl bei akuten als auch bei chronischen Entzündungen eine zentrale Rolle. Die TNF α -Konzentration ist bei vielen rheumatischen Erkrankungen (rheumatoide Arthritis, chronische Polyarthrit, Spondylitis ankylosans [M. Bechterew], und Psoriasis) in den betroffenen Gelenken stark erhöht und spielt eine wesentliche Rolle bei der Gelenkzerstörung und anderen Krankheitsabläufen. Auch beim Morbus Crohn trägt TNF α offenbar zum Krankheitsgeschehen mit bei.

Die Überproduktion von TNF α kann durch anti TNF α -Antikörper medikamentös gezielt gehemmt werden. Folgende Präparate werden therapeutisch eingesetzt:

- Infliximab (Remicade®)
- Adalimumab (Humira®).

Die zwei TNF α Blocker sind für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis zugelassen. Infliximab ist zudem für die Behandlung von M. Crohn sowie der ankylosierenden Spondylitis, der Psoriasis und der psoriatischen Arthritis zugelassen.

Obwohl sich die TNF α -Blocker hinsichtlich ihrer chemischen Struktur und ihrer Wirkungsweise unterscheiden, ist der pharmakologische Effekt dieser Substanzen gleich. In ihrer Effektivität in Bezug auf eine Besserung der klinischen Symptome der rheumatoiden Arthritis sind alle vergleichbar, beim M. Crohn hat sich Infliximab als wirksamer TNF α -Blocker erwiesen.

Die Therapiewirkung von anti TNF α -Antikörpern bei chronischen Entzündungen, z.B. bei Morbus Crohn oder bei rheumatoider Arthritis, hängt von der Serum-Konzentration des Wirkstoffes ab. Bei vielen Patienten schlägt die Behandlung nicht an, weil der Organismus das Therapeutikum schnell abbaut oder Antikörper gegen den Therapieantikörper bildet. Eine Überwachung des Wirkstoffspiegels zur Kontrolle des Therapieerfolges ist daher sinnvoll.

Mit diesem ELISA werden freie anti-TNF α -Therapieantikörper wie z. B. Adalimumab/Humira bestimmt. Anti-TNF α -Therapieantikörper werden zunehmend bei Rheumapatienten zur spezifischen Suppression eingesetzt. Während der Therapie ist es möglich, dass der Patientenstoffwechsel diese Antikörper zu schnell abbaut. Dadurch ist mit erheblichen Komplikationen bis zum Therapieversagen 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 quantitativen Bestimmung der freien anti-TNF α -Therapieantikörper im Serum. In diesem Assay bindet der freie anti-TNF α -Therapieantikörper (Adalimumab/Humira) aus der Probe an das auf der Platte fixierte TNF α . Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion des gebundenen anti-TNF α -Therapieantikörpers (Adalimumab/Humira) 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 bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Gehalt des freien anti-TNF α -Therapieantikörpers (Adalimumab/Humira) direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve lässt sich die Konzentration des freien anti-TNF α -Therapieantikörpers (Adalimumab/Humira) in den Proben ermitteln.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K9657MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 wells
K9657WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K9657K	CONJ	Konjugat, Peroxidase-markiert, Konzentrat	1 x 200 μ l
K9657ST	STD	Standards, lyophilisiert (0;0,625;1,25;2,5;5;10;20 μ g/ml)	4 x 7 vials
K9657KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K9657KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K9657PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K9657TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K9657AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 μ l
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

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 μ l** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.), 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 STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Standards und Kontrollen werden mit **500 μ l aqua bidest.** rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können nicht gelagert werden.**
- Das **Konjugat** (CONJ) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:100** in **Waschpuffer** verdünnt (100 μ l 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.
- Kalibratoren sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H₂SO₄. H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H₂SO₄ 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 **1:200** vorverdünnt,

z. B. **5 µl** Probe + **995 µl** SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer).

100 µl der Verdünnung werden pro Well 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 beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Pipettierschema

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen
2.	Die Positionen für STD (Standards), CTRL (Kontrollen) und SAMPLE (Probe) im Protokollblatt markieren
3.	Die benötigten Streifen der PLATE (Mikrotiterplatte) aus dem Kit nehmen. Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch 5 x mit je 250 μ l verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
4.	je 100 μl STD (Standards), CTRL (Kontrollen) und SAMPLE (Probe) in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterplattenstreifen pipettieren
5.	Streifen luftdicht abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 μl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
7.	100 μl verdünntes CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
8.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren
9.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 μl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
10.	100 μl SUB (TMB-Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
11.	10-20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren*
12.	50 μl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen
13.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. 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.

10. 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. 0.01).

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 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. 0.01).

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.

Serumproben

Der Verdünnungsfaktor der Serumproben (1:200) darf nicht mit dem Ergebnis der Proben multipliziert werden, da er bereits über die Konzentrationsangaben der Standards berücksichtigt wurde.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer Konzentration des Analyten größer dem größten Standard sollten stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

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 Proben nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von einer Probe innerhalb einer Messserie wurde geprüft.

Intra-Assay VK n= 20

Probe	Anti TNF α Antikörper [μ g/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	0,6	8,8

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,04 μ g/ml.

Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Serumproteinen gefunden.

14. LITERATUR

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

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

Bendtsen 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

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

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

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

Cominelli F (2004) Cytokine-based therapies for Crohn's disease--new paradigms. *N Engl J Med.* Nov 11;**351(20)**:2045-8

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

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

Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S (2004) Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* May;**126(6)**:1593-610. Review

15. 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 als Vorsichtsmaßnahme 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

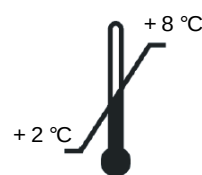
TNF α -Blocker-Monitoring (drug-level e.g. Humira) ELISA Kit

*For the in vitro determination of free therapeutic anti-TNF α
antibody concentration (e.g. Humira) in serum*

For research use only

Gültig ab / valid from 06.06.2011

K 9657



1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is a Enzyme Immuno Assay intended for the qualitative determination of free therapeutic anti-TNF α antibodies (Adalimumab/ Humira) in serum. For research use only.

2. CLINICAL RELEVANCE

Tumour Necrosis Factor alpha (TNF α) belongs to the pro-inflammatory cytokines that establish and sustain inflammation reactions. Cytokines, produced by macrophages and T-cells, play a central role in both acute and chronic inflammations.

The TNF α concentration is elevated in the affected joints in many rheumatic diseases (rheumatoid arthritis, chronic poly-arthritis, ankylosing spondylitis i.e. M. Bechterew disease, psoriasis) and plays a significant role in joint destruction as well as in other manifestations of the diseases. Even in Crohn's disease, an overproduction of TNF α has been observed, obviously affecting the activity of the disease.

In the 1990's, pharmaceutical companies developed biotechnologically produced drugs that are aimed to neutralize TNF α ("TNF α blockers") and expected to have a positive effect on the various symptoms of the diseases.

In 1998, the first TNF α blockers were approved for use in the therapy of rheumatoid arthritis. Since then other TNF α blockers have been marketed:

- Infliximab (Remicade®),
- Adalimumab (Humira®).

The two TNF α blockers are approved for treatment of rheumatoid arthritis as well as ankylosing spondylitis and psoriasis.

Although the TNF α blockers differ in respect to their chemical structures and mechanisms of action, the pharmacological effects are the same for both substances. They are comparable in their effectiveness in facilitating improvement in clinical symptoms of rheumatoid arthritis, but in Crohn's disease, Infliximab has proved to be the most effective one.

The therapeutic effect of the anti TNF α antibodies on chronic inflammations, i.e. Crohn's disease or rheumatoid arthritis, depends on the serum concentration of the corresponding pharmaceutical. In many patients, the treatment is of limited value, because of a fast degradation of the pharmaceutical or generation of antibodies against it. For a better control of the therapy, drug level monitoring is necessary.

With our ELISA test, free anti-TNF α -therapeutic antibodies (e. g. Adalimumab/Humira) can be detected. Anti-TNF α -therapeutic antibodies are used for specific suppression in rheumatic patients. Beside TNF α blocker degradation during therapy, patients under anti-TNF α -antibody therapy could develop antibodies against the therapeutic antibodies. This might lead to severe complications, even systemic anaphylaxis with possibly lethal outcome.

Our ELISA test can be used for monitoring of free therapeutic anti-TNF α antibodies (Adalimumab/Humira) and provides a basis for possible preventive strategies.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme Immunoassay is designed to determine the quantitative of free therapeutic anti-TNF α antibodies (Adalimumab/Humira) in serum samples. In a first incubation step, the free therapeutic anti-TNF α antibodies (Adalimumab/Humira) from the sample are bound to the TNF α 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 therapeutic anti-TNF α antibodies (Adalimumab/Humira) in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. The concentrations of free therapeutic anti-TNF α antibodies (Adalimumab/Humira) in the samples are determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. Nr.	Label	Kit Components	Quantity
K9657MTP	PLATE	One holder with strips, precoated	12 x 8 wells
K9657WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K9657K	CONJ	Conjugate, Peroxidase-labeled, concentrate	1 x 200 μ l
K9657ST	STD	Calibrators, lyophilized (0;0,625;1,25;2,5;5;10;20 μ g/ml)	4 x 7 vials
K9657KO1	CTRL	Control, lyophilized	4 x 1 vial
K9657KO2	CTRL	Control, lyophilized	4 x 1 vial
K9657PV	SAMPLEBUF	Dilution buffer, ready-to-use	2 x 100 ml
K9657TMB	SUB	TMB Substrate (Tetramethylbenzidin), ready-to-use	1 x 15 ml
K9657AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled (aqua bidest.) and sterile water
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 5-1000 μ l
- 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
(reference wave length 620 or 690 nm)

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 μ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved 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 **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 μ l** of **aqua bidest**. 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 standards and controls are not stable and cannot be stored.**
- The **conjugate** (CONJ) must be diluted **1:100** in wash buffer (100 μ l 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 **1:200** before performing the assay, e.g.

5 μ l serum + **995 μ l** SAMPLEBUF (sample dilution buffer), mix well.

100 μ l 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

1.	Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well
2.	Mark the positions of STD (standards), CTRL (controls) and SAMPLE (sample) on a protocol sheet
3.	Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Wash the precoated microtiter plate 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
4.	For the analysis in duplicate, pipette 100 µl of STD (standards), CTRL (controls) and SAMPLE (samples) into the respective well of the microtiter plate
5.	Cover plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26 °C) while shaking
6.	Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
7.	Add 100 µl of diluted CONJ (conjugate) into each well
8.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) while shaking
9.	Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
10.	Add 100 µl of SUB (TMB substrate) into each well
11.	Incubate for 10-20 min at room temperature in the dark*
12.	Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly
13.	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 to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

10. 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. 0.01).

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 logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

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.

Serum samples

Do not multiply concentration of serum sample with dilution factor (1:200). Dilution factor is already included in concentration of standards.

11. LIMITATIONS

Samples with analyte levels greater than the highest calibrator should be further diluted and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed 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.

Expected values

Normal range

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

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay

The precision (intra-assay variation) was calculated from 20 replicate determinations on one sample.

Intra-Assay CV n=20

Sample	Anti TNF α antibodies [μ g/ml]	Intra-Assay CV [%]
1	4,8	3,6

Sensitivity

The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 0,04 μ g/l. The Zero-standard was measured 20 times.

Cross reactivity

No cross reactivity to other plasma proteins was observed.

14. REFERENCES

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

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

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

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

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

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

Cominelli F (2004) Cytokine-based therapies for Crohn's disease--new paradigms. *N Engl J Med.* Nov 11;**351(20)**:2045-8

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

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

Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S (2004) Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* May;**126(6)**:1593-610. Review

15. 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.
- Reagents of the test package contain sodium azide as a bactericide. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- 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.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number