

# Anti-TNF $\alpha$ Blocker ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung von humanen Antikörpern gegen voll humane anti-TNF $\alpha$  Antikörpern (wie z. B. HUMIRA) in Serum*

# Anti-TNF $\alpha$ blocker ELISA Kit

*For the in vitro determination of human antibody against completely human anti-TNF $\alpha$  antibody (e.g. HUMIRA) in serum*

Nur zu wissenschaftlichen Zwecken / For research use only

Gültig ab/valid from 07.04.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 9652

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C

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

Tel.: ++49 6251 70190-0

Fax: ++ 49 6251 849430

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

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

Inhaltsverzeichnis	Seite
Table of Content	2
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>3</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>4</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>5</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>5</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMABNAHMEN</b>	<b>6</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>6</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>7</b>
HINWEISE	7
PIPETTIERSHEMA	7
<b>10. ERGEBNISSE</b>	<b>9</b>
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>9</b>
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	9
<b>12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>10</b>

Table of Content	Page
	2
<b>1. INTENDED USE</b>	<b>12</b>
<b>2. CLINICAL RELEVANCE</b>	<b>12</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>12</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>13</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>14</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>14</b>
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>15</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>15</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>16</b>
PROCEDURAL NOTES	16
TEST PROCEDURE	16
<b>10. RESULTS</b>	<b>18</b>
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>18</b>
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	18
<b>12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>19</b>

## **1. VERWENDUNGSZWECK**

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von humanen Antikörpern gegen voll humane anti-TNF $\alpha$  Therapieantikörper (z.B. HUMIRA) aus Serum geeignet.

## **2. EINLEITUNG**

Mit diesem ELISA werden Antikörper gegen anti-TNF $\alpha$  Therapieantikörper bestimmt. Anti-TNF $\alpha$  Antikörper werden z. B. bei Rheumapatienten in der Therapie zur Suppression eingesetzt. Während der Therapie ist es möglich, dass Patienten Antikörper gegen den 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 anti-TNF $\alpha$  Antikörper (Antikörper gegen den Therapieantikörper). In diesem Assay bindet der Antikörper aus der Probe an den auf der Platte fixierten Therapieantikörper (F(ab)<sub>2</sub>). Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion des gebundenen anti-TNF $\alpha$  Antikörpers durch Zugabe eines Konjugats (Therapie-POD-AK). Die gebundene Enzymmenge ist dem anti-TNF $\alpha$  Antikörpergehalt direkt proportional. Die Auswertung erfolgt über Positiv/Negativ Kontrolle.

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
K 9652MTP	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet (F(ab) <sub>2</sub> )	96
K 9652WP	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 9652K	Konjugat (Therapieantikörper, Peroxidase-markiert), Konzentrat	1 vial
K 9652KO1	Positiv Kontrolle	4 x 1 vial
K 9652KO2	Negativ Kontrolle	4 x 1 vial
K 9652PV	Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 9652TMB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9652AC	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

## 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 1,5 ml Reaktionsgefäße (z.B. Eppendorf)
- Div. Pipetten. Beim Arbeiten mit kleinen Volumina ist auf die Verwendung geeichter Pipetten und auf besonders sorgsamem Umgang zu achten (z. B. Pipettenspitze nach der Entnahme abstreifen).
- Zentrifuge
- ELISA-Reader
- Mikrotiterplattenschüttler

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100  $\mu$ l** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** muss vor Gebrauch **1:10** in aqua dest. verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua dest). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C 1 Monat** (in einem geschlossenen Gefäß) haltbar.
- **Kontrollen** werden mit **250  $\mu$ l** aqua dest. rekonstituiert, vorsichtig mischen und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen lassen. Rekonstituierte Kontrollen können nicht gelagert werden.
- Das **Konjugat** (Peroxidase markiert) Vial wird unmittelbar vor Gebrauch 1:100 mit Waschpuffer verdünnt (z.B. 100  $\mu$ l Konjugat + 10 ml Waschpuffer). Unverdünnter Antikörper ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Etikett). Verdünnter Antikörper kann **nicht** aufbewahrt werden.

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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  $\mu$ l Probe + 995  $\mu$ l Verdünnungspuffer).

100  $\mu$ l 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 Pipettiervolumen sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.

### *Pipettierschema*

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch 5x mit je 250  $\mu$ l Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100  $\mu$ l** Kontrolle und 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  $\mu$ l** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. **100  $\mu$ l** Konjugatlösung (POD - Antikörper) pro Vertiefung pipettieren.
5. **1 Std.** bei Raumtemperatur unter Schütteln, im Dunklen inkubieren.
6. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250  $\mu$ l** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. **100  $\mu$ l** TMB-Substrat pro Vertiefung pipettieren.
8. **5 - 10 Minuten** (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur inkubieren.

9. **50  $\mu$ l** Stopplösung zusetzen und kurz mischen.
10. Die Extinktion wird **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) gemessen. Sollte die Extinktion der hohen Kontrolle den Messbereich des Photometers übersteigen, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

## 10. ERGEBNISSE

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

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

Es wird die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie geprüft. Eine positive Probe wurde 10 mal in einem anti-TNF $\alpha$  Antikörper ELISA von einer Person angesetzt.

Tabelle1: Intra-Assay VK n= 10

Probe	Mittelwert OD	Intra-Assay Vk [%]
1	0.340	6

## 12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humansenen 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 oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik 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.

# Anti-TNF $\alpha$ blocker ELISA Kit

*For the in vitro determination of human antibody against completely human anti-TNF $\alpha$  antibody (e.g. HUMIRA) in serum*

For research use only

Valid from 06.10.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 9651

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C

## 1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is a sandwich Enzyme Immuno Assay intended for the qualitative determination of human antibody against completely human anti-TNF $\alpha$  antibody (e.g. HUMIRA) in serum.

## 2. CLINICAL RELEVANCE

With our ELISA test, antibodies against anti-TNF $\alpha$ -therapeutic antibodies can be detected.

Anti-TNF $\alpha$ -antibodies are for example used for suppressing therapy in rheumatic patients. There is a possibility that patients under anti-TNF $\alpha$ -antibodies therapy 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 anti-TNF $\alpha$ -antibodies therapy and offers the doctor an instrument for deciding on possible preventive measures.

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme Immuno Assay is a sandwich assay for the determination of anti-TNF $\alpha$  antibodies in serum samples. In a first incubation step, the antibodies from the sample are bound to the on the plate coated therapy antibody (F(ab)<sub>2</sub>). To remove all unbound substances, a washing step is carried out.

In a further incubation step, Peroxidase-labelled 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 stopping solution is then added. The colour converts to yellow. The results are to determine by cut off.

**4. MATERIAL SUPPLIED**

Catalogue No.	Kit Components	Quantity
K 9652MTP	one holder with strips, precoated (F(ab) <sub>2</sub> )	96
K 9652WP	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 9652K	POD antibody, (therapy antibody, peroxidase labelled), concentrate	1 vial
K 9652KO1	Control, positive	4 x 1 vial
K 9652KO2	Control, negative	4 x 1 vial
K 9652VP	Dilution buffer, ready-to-use	2 x 100 ml
K 9652TMB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 9652AC	ELISA stop solution, ready to use	1 x 7 ml

## 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Distilled or deionized water
- Precision pipettes calibrated to deliver 10-1000  $\mu$ l and disposable tips
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Absorbent paper
- Vortex-Mixer
- Horizontal mixer
- Microplate reader 450 nm

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- The **ELISA wash buffer concentrate** should be diluted with aqua dest. **1:10** before use (add 900 ml aqua dest. to 100 ml ELISA wash buffer concentrate). Crystals may be formed due to high salt concentration. The crystals have to be dissolved **before dilution of the buffer concentrate** using a water bath (37°C). The buffer concentrates are stable at 2-8°C up to the expiry date stated on the label. Diluted solutions could be stored at 2-8°C for 1 month.
- The **Controls** have to be reconstituted with 250  $\mu$ l aqua dest. **Reconstituted controls are not stable and could not be stored.** Allow the vial to stand for minimum 10 minutes and then mix thoroughly by gentle conversion to insure complete reconstitution.
- The **Conjugate** (POD labelled antibody) vial has to be diluted 1:100 with wash buffer (100  $\mu$ l Conjugate + 10 ml wash buffer) and mixed well. The antibody is stable at 2 -4 °C up to the expiry date stated on the label. **Diluted antibody solution is not stable and could not be stored.**

## 7. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic 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, plasma

Collection and storage of serum: Collect sufficient blood (at least 1 ml) by venipuncture into a tube or a plastic syringe, avoid hemolysis, centrifuge for 15 minutes at 1,000 x g and 4°C and collect the serum.

**Serum samples have to be diluted 1:200 before performing the assay.**

Add 5  $\mu$ l serum to 995  $\mu$ l dilution buffer, mix well. (1:200)

## 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.
- Carry out the assay with the actual manual delivered with the kit.

### *Test procedure*

Wash the precoated microtiter plate 5 x with 250  $\mu$ l ELISA wash buffer. Carry out the tests in duplicate.

1. Add **100  $\mu$ l** samples and controls.
2. Incubate **over night (16-20 h)**, on a horizontal mixer, at 2 – 8 °C.
3. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250  $\mu$ l** ELISA wash buffer.
4. Add **100  $\mu$ l** prediluted Peroxidase-labelled antibody.
5. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
6. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250  $\mu$ l** ELISA wash buffer.
7. Add **100  $\mu$ l** TMB substrate solution into each well.
8. Incubate for **5 - 10 minutes** at room temperature in the dark.
9. Add **50  $\mu$ l** stop solution into each well and mix shortly.

10. Determine absorption with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as reference.

## 10. RESULTS

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

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik anti-TNF $\alpha$  antibody ELISA test was calculated from 10 replicate determinations on one positive sample.

Intra-Assay CV n= 10

Sample	Mean value OD	Intra-Assay CV [%]
1	0.340	6

## 12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- 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 to be used for in-vitro diagnostics 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.

06/10/2005 06.10.2005 \_antiTNFa.DOC