

Anti-TNF α Blocker ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung von humanen Antikörpern gegen
Medikamente in der Reumatherapie (wie z. B. Enbrel®) in Serum*

*For the in vitro determination of human antibodies against
drugs in the rheumatism therapy (e.g. Enbrel®) in serum*

Nur zu wissenschaftlichen Zwecken / For research use only

Gültig ab / valid from 01.05.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 9653

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

www.immundiagnostik.com

	Seite
Inhaltsverzeichnis	1
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
PIPETTIERSCHEMA	7
10. Ergebnisse	8
12. Allgemeine Hinweise zum Test	8

	Page
Table of Content	2
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
12. General notes on the test and test procedure	16

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von humanen Antikörpern gegen Medikamente in der Reumatherapie (wie z. B. Enbrel®) in Serum geeignet. Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.

2. EINLEITUNG

Mit diesem ELISA werden Antikörper gegen Medikamente in der Reumatherapie (wie z. B. Enbrel®) in Serum bestimmt. Enbrel® wird z. B. bei Rheumapatienten in der Therapie zur Suppression eingesetzt. Während der Therapie ist es möglich, dass Patienten Antikörper gegen das Medikament entwickeln. Dabei 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 Antikörper gegen das Medikament. In diesem Assay bindet der Antikörper aus der Patientenprobe an das auf der Platte fixierte Medikament. Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion des gebundenen Antikörpers durch Zugabe eines Peroxidase- markierten 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 an Antikörpern gegen das Medikament direkt proportional.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
K 9653MTP	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9653WP	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 9653K	Konjugat (Peroxidase-markiert), Konzentrat	1 vial
K 9653PV	Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 9653TMB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9653AC	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 5 - 1000 μ l
- 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 (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.
- Das **Konjugat** (CONJ) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:100** in **Waschpuffer** (WASHBUF) verdünnt (100 μ l CONJ + 10 ml WASHBUF). 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 VORSICHTSMABNAHMEN

- Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H₂SO₄ verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure 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 μ l** Probe + **995 μ l** Verdünnungspuffer).

100 μ 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 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.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Pipettierschema

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

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 μ l** 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 μ l** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. **100 μ l** Konjugatlösung (POD-markiert) 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 μ l** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. **100 μ l** TMB-Substratlösung pro Vertiefung pipettieren.
8. **5 - 10 Minuten** (entsprechend der Farbentwicklung) bei Raumtemperatur inkubieren.
9. **50 μ l** Stopplösung zusetzen und kurz mischen.
10. Die Extinktion **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Falls die Extinktion den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

10. ERGEBNISSE

11. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal 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 (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H₂SO₄ verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

12. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt 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.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet 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 AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller - der Immundiagnostik AG zurück zu senden.

Anti-TNF α blocker ELISA Kit

For the in vitro determination of human antibodies against drugs in the rheumatism therapy (e.g. Enbrel®) in serum

For research use only

Valid from 01.05.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 9653

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C

1. INTENDED USE

The here described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit is intended for the qualitative determination of human antibodies against drugs in the rheumatism therapy (e.g. Enbrel®) in serum.

2. CLINICAL RELEVANCE

With our ELISA test, antibodies against drugs in the rheumatism therapy (e.g. Enbrel®) can be detected.

Drugs in the rheumatism therapy (e.g. Enbrel®) are used to suppress inflammation in rheumatic patients. During the therapy with drugs (e.g. Enbrel®), some patients can develop antibodies against the drug itself. This might lead to severe complications, even a systemic anaphylaxis with possibly lethal outcome.

Our ELISA kit can be used for monitoring anti-drug (e.g. Enbrel®) antibodies during therapy and offers the doctor a tool for decision on possible preventive measures.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme-Immuno-test is a sandwich assay for the determination of anti-drug (e.g. Enbrel®) antibodies in serum samples. During the first incubation step, the drug immobilized on the wall of the microtiter wells captures the anti-drug antibodies in the patient samples. After washing away the unbound components from samples, a Peroxidase-labelled conjugate is added to each well. After a second washing step, tetramethylbenzidine (TMB), a peroxidase substrate, is added. Finally, the reaction is terminated with an acidic stop solution. The intensity of the yellow color is directly proportional to the anti-drug antibody concentration of sample.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No.	Kit Components	Quantity
K 9653MTP	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 9653WP	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 9653K	Conjugate, (peroxidase-labelled), concentrate	1 vial
K 9653VP	Dilution buffer, ready-to-use	2 x 100 ml
K 9653TMB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 9653AC	ELISA stop solution, ready to use	1 x 7 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 5-1000 μ l
- 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
(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 **conjugate** (CONJ) must be diluted **1:100** in wash buffer (WASHBUF) (100 μ l CONJ + 10 ml WASHBUF). The undiluted conjugate is stable at **2-8 °C** until expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not 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.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum

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

Add **5 μ l** serum to **995 μ l** dilution buffer, mix well.

Use **100 μ l** of the diluted sample in the assay.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Wash the precoated microtiter plate **5 x with 250 μ l ELISA wash buffer**.
Carry out the tests in duplicate.

1. Add **100 μ l** of samples.
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 μ l ELISA wash buffer**.
4. Add **100 μ l** prediluted Peroxidase-labelled conjugate.
5. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer at room temperature.
6. Aspirate the content of the plate and wash each well **5 x with 250 μ l ELISA wash buffer**.
7. Add **100 μ l** TMB substrate solution into each well.
8. Incubate for **5 - 10 minutes** at room temperature in the dark.
9. Add **50 μ l** stop solution into each well and mix shortly.
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.

10. RESULTS

11. PRECAUTIONS

- For *research* use only.
- Quality control guidelines should be observed.
- 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 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.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.

12. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the 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.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

13. 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.
- All reagents in the kit package are for research use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.