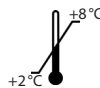


IDKmonitor[®] Ustekinumab drug level ELISA

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

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

Gültig ab / Valid from 2018-09-27



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	4
<i>Testprinzip</i>	4
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzwerte</i>	7
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	8
<i>Analytische Spezifität</i>	8
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Linearität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	12

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. EINLEITUNG

Ustekinumab ist ein monoklonaler, humaner Therapieantikörper gegen p40, die gemeinsame Untereinheit der Interleukine 12 und 23 (IL-12/23). Diese beiden Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen, die durch das Immunsystem verursacht werden, so z.B. bei Morbus Crohn, Psoriasis oder Multipler Sklerose. Ustekinumab blockiert die Signalwirkung von IL-12/23 und inhibiert so die T-Zell-basierte Immunantwort [1].

Die Wirksamkeit der anti-IL-12/23-Therapie korreliert in der Regel mit der Menge an Therapieantikörper, die kurz vor der nächsten Medikamentengabe im Serum des Patienten nachweisbar ist, dem sogenannten Talspiegel. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Höhe des Talspiegels. Zu diesen zählen unter anderem die Dosis und die Frequenz der anti-IL-12/23-Behandlung, die Krankheitsaktivität, individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und das Auftreten von Antikörpern gegen die Therapieantikörper (anti-drug antibodies, ADA) [2].

Der IDKmonitor® ELISA zur Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von Ustekinumab (z.B. STELARA®) misst quantitativ freies Ustekinumab und bietet dem behandelnden Arzt die Möglichkeit, die Therapie zu begleiten und frühzeitig zu optimieren.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Inhalt	Kit-Komponenten	Menge
K 9660	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 wells
K 9660	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 9660	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert	1 x 200 µl
K 9660	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	4 x 6 vials
K 9660	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial

Art.-Nr.	Inhalt	Kit-Komponenten	Menge
K 9660	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 9660	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 9660	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9660	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Absorptionspapier
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.

- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

EDTA-Plasma und Serum

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:200** verdünnt,

z.B. **10 µl** Probe + **1990 µl** Verdünnungspuffer (SAMPLEBUF), gut mischen.

Für die Bestimmung in Doppelwerten werden **2 x je 100 µl** jeder vorbereiteten Probe im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung des freien Ustekinumab (gegen die Interleukine 12 und 23 gerichteter Therapieantikörper) im EDTA-Plasma oder Serum. In diesem Assay bindet das freie Ustekinumab aus der Probe an den auf der Platte fixierten spezifischen monoklonalen anti-Ustekinumab-Antikörper. Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion des gebundenen Ustekinumab durch Zugabe

eines peroxidasemarkierten anti-Ustekinumab-Antikörpers. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Gehalt des freien Ustekinumab direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve lässt sich die Konzentration des freien Ustekinumab in den Proben ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.

7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
11.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Wir empfehlen, die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu 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.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z.B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

EDTA-Plasma- und Serumproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 200** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n=23

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter gleichbleibenden Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	CV [%]
1	24,36	9,5
2	5,51	8,1

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n=20

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 3 Serumproben unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	CV [%]
1	5,96	7,0
2	66,61	9,1

Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration [ng/ml]	Gefundene Konzentration [ng/ml]	Fazit
Infliximab	4,2–225	< 0,703	< LoB
Adalimumab	4,2–225	< 0,703	< LoB
Golimumab	4,2–225	< 0,703	< LoB
Etanercept	4,2–225	< 0,703	< LoB
Vedolizumab	15,6–1000	< 0,703	< LoB

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 2 Serumproben wurden dafür mit bekannten Ustekinumab-Konzentrationen versetzt und gemessen.

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wieder- findung [%]
5,90	20	25,68	22,68	88,34
	30	35,57	30,29	85,16
	40	45,47	37,11	81,63
	50	55,37	61,80	111,62
	60	65,27	66,37	101,68
	70	75,18	70,58	93,88
	80	85,09	101,00	118,69
5,68	20	25,46	21,52	84,51
	30	35,36	29,80	84,28
	40	45,26	38,01	83,98
	50	55,16	51,04	92,52
	60	65,07	62,09	95,42
	70	74,98	70,45	93,95
	80	84,90	85,81	101,08

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (limit of blank, LoB) 0,520 ng/ml

Nachweisgrenze (limit of detection, LoD) 0,789 ng/ml

Bestimmungsgrenze (limit of quantitation, LoQ) 0,953 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer seriellen Verdünnung von 2 Serumproben nachgewiesen.

Für Ustekinumab in Serum und Plasma wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 1,10 bis 37,35 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:200	37,35	37,35	100,00
	1:400	18,68	18,79	100,59
	1:600	12,45	12,33	99,06
	1:1000	7,47	7,68	102,81
	1:1400	5,34	5,61	105,09
	1:1800	4,15	4,04	97,40
	1:2000	3,74	4,04	108,03
	1:3000	2,49	2,73	109,53
	1:4000	1,87	1,86	99,68
	1:5000	1,49	1,55	103,83
	1:6000	1,25	1,40	112,71
	1:7000	1,07	1,21	113,44
B	1:200	35,33	35,33	100,00
	1:400	17,67	18,12	102,55
	1:600	11,78	12,18	103,40
	1:1000	7,07	7,86	111,21
	1:1400	5,05	5,88	116,50
	1:1800	3,93	4,39	111,89
	1:2000	3,53	3,75	106,14
	1:3000	2,36	2,56	108,72
	1:4000	1,77	1,74	98,64
	1:5000	1,41	1,65	116,93
	1:6000	1,18	1,11	94,34
	1:7000	1,01	1,10	108,89

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- IDKmonitor® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Scherl EJ, Kumar S & Warren RU (2010) Review of the safety and efficacy of ustekinumab. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **3**: 321–328.
2. Chiu HY, Chu TW, Cheng YP & Tsai TF (2015) The association between clinical response to ustekinumab and immunogenicity to ustekinumab and prior adalimumab. *PLoS One* **10**: 1–10.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer

*In-Vitro*-Diagnostikum

Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Chargenbezeichnung



Verwendbar bis



Achtung



Gebrauchsanweisung beachten



Spezifikationsdatenblatt beachten

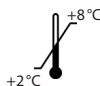
IDKmonitor[®] ustekinumab drug level ELISA

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

Valid from 2018-09-27



K 9660



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE 17

2. INTRODUCTION 17

3. MATERIAL SUPPLIED 17

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED 18

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS 18

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES 19

7. ASSAY PROCEDURE 19

Principle of the test 19

Test procedure 19

8. RESULTS 21

9. LIMITATIONS 21

10. QUALITY CONTROL 22

Reference range 22

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS 22

Accuracy – Precision 22

Accuracy – Trueness 23

Analytical sensitivity 23

Linearity 24

Analytical specificity 25

12. PRECAUTIONS 25

13. TECHNICAL HINTS 25

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE 26

15. REFERENCES 26

1. INTENDED USE

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

2. INTRODUCTION

Ustekinumab is a monoclonal, human therapeutic antibody targeting p40, the common subunit of interleukin 12 and 23 (IL-12/23). Both cytokines play a fundamental role in immune-mediated inflammatory disorders such as Crohn's disease, psoriasis or multiple sclerosis. Ustekinumab blocks IL-12/23 signaling, thus inhibiting the t-cell mediated immune response [1].

The clinical efficacy of anti-IL-12/23 therapy usually correlates with the trough level of the therapeutic antibody, meaning the drug level just before the next application of the drug. Several factors influence the trough level, among them dosage and frequency of anti-IL-12/23 treatment, disease activity, individual pharmacokinetics and immune reaction (formation of anti-drug antibodies, ADA) [2].

The IDKmonitor® ELISA for the determination of the drug level of ustekinumab (e.g. STELARA®) measures quantitatively free ustekinumab, giving the treating physician an opportunity to monitor and optimise the therapy early on.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 9660	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 9660	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 9660	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 200 µl
K 9660	STD	Standards, lyophilised (see specification for concentrations)	4 x 6 vials
K 9660	CTRL 1	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 9660	CTRL 2	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 9660	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	2 x 100 ml



Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 9660	SUB	Substrate (tetramethylbenzidin), ready-to-use	1 x 15 ml
K 9660	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.

- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet. Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **are not stable and cannot be stored.**
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate (1:101 diluted CONJ) is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C.**

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

EDTA plasma and serum

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

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

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

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed to determine the quantity of free ustekinumab (therapeutic antibody against interleukins 12 and 23) in EDTA plasma or serum samples. In a first incubation step, the free ustekinumab from the sample is bound to the specific monoclonal anti-ustekinumab antibody coated on the plate. After a washing step, ustekinumab bound to the plate is detected by adding a peroxidase-labelled anti-ustekinumab antibody. 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 ustekinumab in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. The concentrations of free ustekinumab in the samples are determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl standards/controls/diluted samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
11.	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.

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the 4 parameter algorithm.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

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

EDTA-plasma and serum samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 200** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the calibration curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

LoB see chapter "Performance Characteristics".

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Reference range

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n=23

The repeatability was assessed with 2 serum samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	24.36	9.5
2	5.51	8.1

Reproducibility (Inter-Assay); n=20

The reproducibility was assessed with 2 serum samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	5.96	7.0
2	66.61	9.1

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, Ustekinumab spikes with known concentrations were added to 2 different serum samples.

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
5.90	20	25.68	22.68	88.34
	30	35.57	30.29	85.16
	40	45.47	37.11	81.63
	50	55.37	61.80	111.62
	60	65.27	66.37	101.68
	70	75.18	70.58	93.88
	80	85.09	101.00	118.69
5.68	20	25.46	21.52	84.51
	30	35.36	29.80	84.28
	40	45.26	38.01	83.98
	50	55.16	51.04	92.52
	60	65.07	62.09	95.42
	70	74.98	70.45	93.95
	80	84.90	85.81	101.08

Analytical sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB 0.520 ng/ml

Limit of detection, LoD 0.789 ng/ml

Limit of quantitation, LoQ 0.953 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20% CV.

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP06-A with a serial dilution of 2 different serum samples.

For Ustekinumab in serum and plasma, the method has been demonstrated to be linear from 1.10 to 37.35 ng/ml, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
A	1:200	37.35	37.35	100.00
	1:400	18.68	18.79	100.59
	1:600	12.45	12.33	99.06
	1:1000	7.47	7.68	102.81
	1:1400	5.34	5.61	105.09
	1:1800	4.15	4.04	97.40
	1:2000	3.74	4.04	108.03
	1:3000	2.49	2.73	109.53
	1:4000	1.87	1.86	99.68
	1:5000	1.49	1.55	103.83
	1:6000	1.25	1.40	112.71
	1:7000	1.07	1.21	113.44
B	1:200	35.33	35.33	100.00
	1:400	17.67	18.12	102.55
	1:600	11.78	12.18	103.40
	1:1000	7.07	7.86	111.21
	1:1400	5.05	5.88	116.50
	1:1800	3.93	4.39	111.89
	1:2000	3.53	3.75	106.14
	1:3000	2.36	2.56	108.72
	1:4000	1.77	1.74	98.64
	1:5000	1.41	1.65	116.93
	1:6000	1.18	1.11	94.34
	1:7000	1.01	1.10	108.89

Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to Ustekinumab. There was no cross-reactivity observed.

Substance tested	Concentration added [ng/ml]	Concentration obtained [ng/ml]	Conclusion
Infliximab	4.2–225	< 0.703	< LoB
Adalimumab	4.2–225	< 0.703	< LoB
Golimumab	4.2–225	< 0.703	< LoB
Etanercept	4.2–225	< 0.703	< LoB
Vedolizumab	15.6–1000	< 0.703	< LoB

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated 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.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDKmonitor*® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Scherl EJ, Kumar S & Warren RU (2010) Review of the safety and efficacy of ustekinumab. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **3**: 321–328.
2. Chiu HY, Chu TW, Cheng YP & Tsai TF (2015) The association between clinical response to ustekinumab and immunogenicity to ustekinumab and prior adalimumab. *PLoS One* **10**: 1–10.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		