

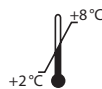
# **IDKmonitor<sup>®</sup> Etanercept drug level ELISA**

***Zur in vitro Bestimmung der Konzentration des freien  
Etanercept (z.B. ENBREL<sup>®</sup>) in EDTA-Plasma und Serum***

***For the in vitro determination of free etanercept  
concentration (e.g. ENBREL<sup>®</sup>) in EDTA-plasma and serum***

Gültig ab / Valid from 2023-01-23

**REF K 9646**



**IVD CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

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

# Inhalt

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

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung des freien chimären TNF $\alpha$ -Therapieantikörper Etanercept (z. B. ENBREL®) aus EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF $\alpha$ ) gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen, welche Entzündungsreaktionen fördern und aufrecht erhalten. Das von Makrophagen und T-Zellen produzierte Zytokin spielt sowohl bei akuten als auch bei chronischen Entzündungen eine zentrale Rolle. Die Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie z. B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, rheumatischen Erkrankungen oder Psoriasis erfolgt daher immer häufiger mit Antikörpern gegen TNF $\alpha$ , die direkt in die zugrundeliegende Entzündungsreaktion eingreifen [5].

Die Wirksamkeit der anti-TNF $\alpha$ -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-TNF $\alpha$ -Behandlung, die Krankheitsaktivität, individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und das Auftreten von Antikörpern gegen die Therapieantikörper (anti-drug antibodies, ADA) [1, 13].

Der IDKmonitor® Etanercept drug level ELISA zur Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von Etanercept (z. B. ENBREL®) misst quantitativ freies Etanercept in EDTA-Plasma und Serum. Zusammen mit dem Nachweis von ADA gegen Etanercept bietet der IDKmonitor® Etanercept drug level ELISA dem behandelnden Arzt die Möglichkeit, die Therapie zu überwachen und frühzeitig zu optimieren.

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

| Art.-Nr.     | Inhalt  | Kit-Komponenten  | Menge           |
|--------------|---------|--|-----------------|
| K 9646       | PLATE   | Mikrotitermodul, vorbeschichtet                                | 12 x 8 wells    |
| K 0001.C.100 | WASHBUF | Waschpufferkonzentrat, 10x                                     | 2 x 100 ml      |
| K 9646       | CONJ    | Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert                        | 2 x 100 $\mu$ l |
| K 9646       | STD     | Standards, lyophilisiert (0; 4,15; 8,3; 25; 75; 225 ng/ml)     | 2 x 6 vials     |
| K 9646       | CTRL 1  | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 2 x 1 vial      |

| Art.-Nr.   | Inhalt    | Kit-Komponenten  | Menge      |
|------------|-----------|--|------------|
| K 9646     | CTRL 2    | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 2 x 1 vial |
| K 0004.100 | SAMPLEBUF | Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig                       | 2 x 100 ml |
| K 0002.15  | SUB       | Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig                | 1 x 15 ml  |
| K 0003.15  | 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
- 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 (≥ 18,2 MΩ·cm).

#### 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

**Achtung:** Bitte nehmen Sie die Kit-Komponente **CONJ** (Konjugat) sofort nach Erhalt aus der Transportverpackung und beachten Sie den auf dem Produktetikett aufgedruckten Hinweis zu den Lagerbedingungen. Bei **-20 °C** gelagert ist das **CONJ mit maximal 2 Einfrier-Auftauzyklen** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Alternativ kann das **CONJ** für **bis zu 3 Monate ab dem Versanddatum** bei **2–8 °C** gelagert werden und **muss** danach bei **-20 °C** gelagert werden.

- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (z. B. 30 µl CONJ + 3 ml Waschpuffer). **Konjugat (1:101 verdünntes CONJ) ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**

- 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 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **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. STD und CTRL werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **können 3 Monate bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.**
- 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*

#### **Probenlagerung**

Frisch abgenommenes EDTA-Plasma bzw. Serum kann sieben Tage bei Raumtemperatur (15–30 °C) gelagert werden [6]. Die Proben können für 6 Monate bei -20 °C aufbewahrt werden.

Verdünnte EDTA-Plasma- bzw. Serumproben sind eine Woche bei 2–8 °C und mindestens 4 Wochen bei -20 °C stabil. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

## Probenverdünnung

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:50** in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt,

z.B. **10 µl** Probe + **490 µl** 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 Etanercept (gegen TNFa gerichteter Therapieantikörper, z.B. ENBREL®) im EDTA-Plasma oder Serum. In diesem Assay bindet das freie Etanercept aus der Probe an den auf der Platte fixierten spezifischen monoklonalen anti-Etanercept-Antikörper. Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion des gebundenen Etanercept 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 gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Gehalt des freien Etanercept direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

### Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

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 <b>vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.   |
| 2.  | <b>100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben</b> in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.  |
| 3.  | Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.  |
| 4.  | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.  |
| 5.  | <b>100 µl Konjugat</b> (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.   |
| 6.  | Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.  |
| 7.  | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.  |
| 8.  | <b>100 µl Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.   |
| 9.  | <b>10–20 min**</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.   |
| 10. | <b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.  |
| 11. | <b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden. |

\* Wir empfehlen die Streifen bei 550rpm (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 50** 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:

$$LoB \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Genauigkeit - Präzision

#### Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 40

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Serum-Proben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

| Probe | Mittelwert [ $\mu\text{g/ml}$ ] | VK [%] |
|-------|---------------------------------|--------|
| 1     | 1,66                            | 7,4    |
| 2     | 5,54                            | 9,2    |

#### Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 14

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Serum-Proben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

| Probe | Mittelwert [ $\mu\text{g/ml}$ ] | VK [%] |
|-------|---------------------------------|--------|
| 1     | 2,26                            | 5,5    |
| 2     | 6,68                            | 9,7    |

### Genauigkeit - Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 8 Serum-Proben wurden dafür mit bekannten Etanercept-Konzentrationen versetzt gemessen. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ermittelt:

| Probe [ng/ml] | Spike [ng/ml] | Erwartet [ng/ml] | Gemessen [ng/ml] | Wiederfindung [%] |
|---------------|---------------|------------------|------------------|-------------------|
| 0             | 150           | 150,00           | 152,94           | 101,96            |
|               | 100           | 100,00           | 106,46           | 106,46            |
|               | 50            | 50,00            | 47,81            | 95,61             |
|               | 10            | 10,00            | 10,10            | 101,00            |
|               | 5             | 5,00             | 5,82             | 116,38            |
| 0             | 150           | 150,00           | 139,42           | 92,95             |
|               | 100           | 100,00           | 90,97            | 90,97             |
|               | 50            | 50,00            | 53,25            | 106,50            |
|               | 10            | 10,00            | 12,10            | 120,98            |
| 0,35          | 5             | 5,35             | 5,48             | 102,50            |
| 0,16          | 5             | 5,16             | 4,66             | 90,39             |
| 0,60          | 5             | 5,60             | 5,51             | 98,48             |
| 0,40          | 5             | 5,40             | 5,48             | 101,57            |
| 11,75         | 5             | 16,75            | 18,91            | 112,83            |
|               | 10            | 21,75            | 23,23            | 106,77            |
|               | 20            | 31,75            | 36,06            | 113,56            |
| 17,90         | 5             | 22,90            | 21,71            | 94,78             |
|               | 10            | 27,90            | 27,36            | 98,07             |
|               | 20            | 37,90            | 42,56            | 112,28            |
|               | 40            | 57,90            | 61,14            | 105,59            |

### 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 4 Serum-Proben nachgewiesen.

Für Etanercept in Serum und EDTA-Plasma wurde in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung der Probenverdünnungsfaktoren ein lineares Verhalten im Bereich von 3,63 bis 168,32 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als  $\pm 20\%$ .

| Probe | Verdünnung | Erwartet [ng/ml] | Gemessen [ng/ml] | Wiederfindung [%] |
|-------|------------|------------------|------------------|-------------------|
| A     | 1:50       | 58,06            | 58,06            | 100,00            |
|       | 1:100      | 29,03            | 26,95            | 92,82             |
|       | 1:200      | 14,52            | 12,33            | 84,94             |
|       | 1:400      | 7,26             | 6,01             | 82,84             |
|       | 1:800      | 3,63             | 3,02             | 83,32             |
| B     | 1:50       | 80,39            | 80,39            | 100,00            |
|       | 1:100      | 40,19            | 37,85            | 94,16             |
|       | 1:200      | 20,10            | 19,27            | 95,90             |
|       | 1:400      | 10,05            | 9,97             | 99,18             |
|       | 1:800      | 5,02             | 3,78             | 75,22             |
| C     | 1:50       | 168,32           | 168,32           | 100,00            |
|       | 1:100      | 84,16            | 78,69            | 93,50             |
|       | 1:200      | 42,08            | 38,59            | 91,71             |
|       | 1:400      | 21,04            | 19,10            | 90,78             |
|       | 1:800      | 10,52            | 9,77             | 92,85             |
|       | 1:1 600    | 5,26             | 4,69             | 89,09             |
| D     | 1:50       | 53,75            | 53,75            | 100,00            |
|       | 1:100      | 26,88            | 27,39            | 101,92            |
|       | 1:200      | 13,44            | 14,52            | 108,06            |
|       | 1:400      | 6,72             | 7,64             | 113,65            |

### Analytische Sensitivität

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

|   |             |
|---|-------------|
| Leerwert ( <i>limit of blank</i> , LoB)                 | 1,438 ng/ml |
| Nachweisgrenze ( <i>limit of detection</i> , LoD)       | 2,570 ng/ml |
| Bestimmungsgrenze ( <i>limit of quantitation</i> , LoQ) | 2,841 ng/ml |

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

### Analytische Spezifität

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

| Getestete Substanz | Maximale eingesetzte Konzentration [ng/ml] | Gefundene Konzentration [ng/ml] | Fazit |
|--------------------|--|---------------------------------|-------|
| Adalimumab         | 225,0                                      | < 1,438                         | < LoB |
| Golimumab          | 225,0                                      | < 1,438                         | < LoB |
| Infliximab         | 225,0                                      | < 1,438                         | < LoB |

## 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 gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.

- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

**Achtung:** Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- 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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

### 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 beigefügten 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. Aff W, Loftus EJ, Faubion W, et al. Clinical utility of measuring Etanercept and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2010;**105**(5):1133–9.
2. 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
3. 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
4. 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 Etanercept. *Arthritis Rheum. Dec*;**54**(12):3782-9
5. Bradley JR. (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*. **214**:149–160.
6. St Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, Wang B, Schaible T, Kavanaugh A, Keystone EC (2002) The relationship of serum Etanercept 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
7. 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
  8. Colombel JF, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Egan LJ, Harmsen WS, Schleck CD, Zinsmeister AR, Sandborn WJ (2004) The safety profile of Etanercept in patients with Crohn's disease: the Mayo clinic experience in 500 patients. *Gastroenterology.* Jan;**126**(1):19-31
  9. Cominelli F (2004) Cytokine-based therapies for Crohn's disease--new paradigms. *N Engl J Med.* Nov **11**;351(20):2045-8
  10. 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) Etanercept 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
  11. Maser EA, Villela R, Silverberg MS, Greenberg GR (2006) Association of trough serum Etanercept to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* Oct;**4**(10):1248-54
  12. Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S (2004) Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* May;**126**(6):1593-610. Review
  13. Vande Castele N, Gils A. Pharmacokinetics of anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: Adding value to current practice. *Journal of clinical pharmacology.* 2015;**55 Suppl 3**:S39-50. doi:10.1002/jcph.374.
  14. Perry, M., Bewshea, C., Brown, R., So, K., Ahmad, T., & McDonald, T. (2015). *Etanercept and adalimumab are stable in whole blood clotted samples for seven days at room temperature.* *Annals of Clinical Biochemistry.* Epub ahead of print.

**Verwendete Symbole:**

|   |                                   |   |                                      |
|---|-----------------------------------|---|--------------------------------------|
|  | Temperaturbegrenzung              |  | Bestellnummer                        |
|  | In-Vitro-Diagnostikum             |  | Zu verwenden mit                     |
|  | Hersteller                        |  | Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen |
|  | Chargenbezeichnung                |  | Verwendbar bis                       |
|  | Achtung                           |  | Gebrauchsanweisung beachten          |
|  | Spezifikationsdatenblatt beachten |  | Reizend                              |



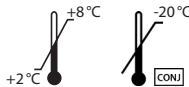


# **IDKmonitor<sup>®</sup> Etanercept drug level ELISA**

***For the in vitro determination of free etanercept  
concentration (e. g. ENBREL<sup>®</sup>) in EDTA-plasma and serum***

Valid from 2023-01-23

**REF** K 9646



**IVD**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

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

# Table of Contents

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTENDED USE</b>                                  | <b>19</b> |
| <b>2. INTRODUCTION</b>                                  | <b>19</b> |
| <b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>                             | <b>19</b> |
| <b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>            | <b>20</b> |
| <b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>           | <b>20</b> |
| <b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>            | <b>21</b> |
| <i>EDTA plasma and serum</i>                            | 21        |
| <b>7. ASSAY PROCEDURE</b>                               | <b>22</b> |
| <i>Principle of the test</i>                            | 22        |
| <i>Test procedure</i>                                   | 22        |
| <b>8. RESULTS</b>                                       | <b>23</b> |
| <b>9. LIMITATIONS</b>                                   | <b>24</b> |
| <b>10. QUALITY CONTROL</b>                              | <b>24</b> |
| <i>Reference range</i>                                  | 24        |
| <b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>                  | <b>25</b> |
| <i>Accuracy – Precision</i>                             | 25        |
| <i>Accuracy – Trueness</i>                              | 25        |
| <i>Linearity</i>  | 26        |
| <i>Analytical sensitivity</i>                           | 27        |
| <i>Analytical specificity</i>                           | 28        |
| <b>12. PRECAUTIONS</b>                                  | <b>28</b> |
| <b>13. TECHNICAL HINTS</b>                              | <b>29</b> |
| <b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b> | <b>29</b> |
| <b>15. REFERENCES</b>                                   | <b>30</b> |

## 1. INTENDED USE

The Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of free therapeutic TNF $\alpha$  antibodies Etanercept (e. g. ENBREL®) in EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) belongs to the proinflammatory cytokines, which promote and sustain inflammatory reactions. It is produced by macrophages and T cells and plays a central role in both acute and chronic inflammations. Consequently, chronic inflammatory diseases like Crohn's disease, ulcerative colitis, rheumatoid arthritis, or psoriasis are increasingly being treated with antibodies against TNF $\alpha$ , which target directly the underlying inflammatory processes [5].

The clinical efficacy of an anti-TNF $\alpha$  therapy usually correlates with the trough level of the therapeutic antibody, meaning the drug level just before the next application of the anti-TNF $\alpha$  antibody. Several factors influence the trough level, among them dosage and frequency of anti-TNF $\alpha$  blocker infusion, disease activity, individual pharmacokinetics and immune reaction (formation of anti-drug antibodies, ADA) [1, 13].

The IDKmonitor® Etanercept drug level ELISA for the determination of the drug level of Etanercept (e. g. ENBREL®) measures quantitatively free Etanercept in EDTA plasma and serum. In combination with the detection of ADA against Etanercept, the IDKmonitor® Etanercept drug level ELISA is an opportunity for the treating physician to monitor and optimise the therapy early on.

## 3. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No.     | Label   | Kit Components   | Quantity        |
|--------------|---------|--|-----------------|
| K 9646       | PLATE   | Microtiter plate, pre-coated                               | 12 x 8 wells    |
| K 0001.C.100 | WASHBUF | Wash buffer concentrate, 10x                               | 2 x 100 ml      |
| K 9646       | CONJ    | Conjugate concentrate, peroxidase-labelled                 | 2 x 100 $\mu$ l |
| K 9646       | STD     | Calibrators, lyophilised (0; 4.15; 8.3; 25; 75; 225 ng/ml) | 2 x 6 vials     |
| K 9646       | CTRL 1  | Control, lyophilised (see specification for range)         | 2 x 1 vial      |
| K 9646       | CTRL 2  | Control, lyophilised (see specification for range)         | 2 x 1 vial      |

| Cat. No.   | Label     | Kit Components                                | Quantity   |
|------------|-----------|---|------------|
| K 0004.100 | SAMPLEBUF | Sample dilution buffer, ready-to-use          | 2 x 100 ml |
| K 0002.15  | SUB       | Substrate (tetramethylbenzidin), ready-to-use | 1 x 15 ml  |
| K 0003.15  | 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

- Ultrapure 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 ultrapure 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 MΩcm).

#### 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

**Attention:** Please unpack the kit component **CONJ** (conjugate concentrate) from the transport packaging immediately upon receipt and follow the instructions for storage conditions printed on the product label. Alternatively, the **CONJ** can be stored at **2–8 °C** for **up to 3 months from the date of shipment** and **must** be stored at **-20 °C** thereafter.

- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (e.g. 30 µl CONJ + 3 ml wash buffer). Stored at **-20 °C**, the **CONJ** is stable with a maximum of 2 freeze-thaw cycles until the expiry date stated on the label. **Conjugate (1:101 diluted CONJ) is not stable and cannot be stored.**
- 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 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 ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure 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. Before use, the STD and CTRL have to be reconstituted with **500 µl of ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at -20 °C for 3 months. Avoid repeated thawing and freezing.**
- 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*

#### **Sample storage**

Freshly collected EDTA plasma or serum can be stored for 7 days at room temperature (15–30 °C) [6]. The samples can be stored at -20 °C for 6 months.

Diluted EDTA plasma or serum samples can be stored for 7 days at 2–8 °C and at least for 4 weeks at -20 °C. Repeated freezing and thawing is to be avoided.

#### **Sample dilution**

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:50** in sample dilution buffer (SAMPLEBUF) before performing the assay, e.g.

**10 µl** sample + **490 µl** SAMPLEBUF, mix well.

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

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This ELISA is designed to determine the quantity of free Etanercept (therapeutic antibody against TNF $\alpha$ , e.g. ENBREL®) in EDTA plasma or serum samples. In a first incubation step, the free Etanercept from the sample is bound to the specific monoclonal anti-Etanercept antibody coated on the plate. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a further incubation step, peroxidase-labelled antibody is added. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of free Etanercept 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 the standard. Free Etanercept, present in the samples, is determined directly from this curve.

### *Test procedure*

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

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

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. | <b>Before use</b> , wash the wells <b>5 times</b> with <b>250 <math>\mu</math>l wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.        |
| 2. | Add each <b>100 <math>\mu</math>l standards/controls/diluted samples</b> into the respective wells.  |
| 3. | Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .  |
| 4. | Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 <math>\mu</math>l wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper. |

|     |   |
|-----|---|
| 5.  | Add <b>100 µl conjugate</b> (diluted CONJ) into each well.  |
| 6.  | Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .   |
| 7.  | Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.   |
| 8.  | Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.   |
| 9.  | Incubate for <b>10–20 min**</b> at room temperature (15–30 °C) in the <b>dark</b> .   |
| 10. | Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.   |
| 11. | Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> 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 50** 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 higher 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 standard 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 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 = 40**

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

| Sample | Mean value [µg/ml] | CV [%] |
|--------|--------------------|--------|
| 1      | 1.66               | 7.4    |
| 2      | 5.54               | 9.2    |

#### **Reproducibility (Inter-Assay); n = 14**

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

| Sample | Mean value [µg/ml] | CV [%] |
|--------|--------------------|--------|
| 1      | 2.26               | 5.5    |
| 2      | 6.68               | 9.7    |

### *Accuracy – Trueness*

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, Etanercept-spikes with known concentrations were added to 8 different serum-samples and measured. The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

| Sample [ng/ml] | Spike [ng/ml] | Expected [ng/ml] | Obtained [ng/ml] | Recovery [%] |
|----------------|---------------|------------------|------------------|--------------|
| 0              | 150           | 150.00           | 152.94           | 101.96       |
|                | 100           | 100.00           | 106.46           | 106.46       |
|                | 50            | 50.00            | 47.81            | 95.61        |
|                | 10            | 10.00            | 10.10            | 101.00       |
|                | 5             | 5.00             | 5.82             | 116.38       |

| Sample [ng/ml] | Spike [ng/ml] | Expected [ng/ml] | Obtained [ng/ml] | Recovery [%] |
|----------------|---------------|------------------|------------------|--------------|
| 0              | 150           | 150.00           | 139.42           | 92.95        |
|                | 100           | 100.00           | 90.97            | 90.97        |
|                | 50            | 50.00            | 53.25            | 106.50       |
|                | 10            | 10.00            | 12.10            | 120.98       |
| 0.35           | 5             | 5.35             | 5.48             | 102.50       |
| 0.16           | 5             | 5.16             | 4.66             | 90.39        |
| 0.60           | 5             | 5.60             | 5.51             | 98.48        |
| 0.40           | 5             | 5.40             | 5.48             | 101.57       |
| 11.75          | 5             | 16.75            | 18.91            | 112.83       |
|                | 10            | 21.75            | 23.23            | 106.77       |
|                | 20            | 31.75            | 36.06            | 113.56       |
| 17.90          | 5             | 22.90            | 21.71            | 94.78        |
|                | 10            | 27.90            | 27.36            | 98.07        |
|                | 20            | 37.90            | 42.56            | 112.28       |
|                | 40            | 57.90            | 61.14            | 105.59       |

### 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 by a serial dilution of 4 different serum samples.

For Etanercept in serum and EDTA-plasma, the method has been demonstrated to be linear from 3.63 to 168.32 ng/ml, showing a non-linear behaviour of less than  $\pm 20\%$  in this interval. The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

| Sample | Dilution | Expected [ng/ml] | Obtained [ng/ml] | Recovery [%] |
|--------|----------|------------------|------------------|--------------|
| A      | 1:50     | 58.06            | 58.06            | 100.00       |
|        | 1:100    | 29.03            | 26.95            | 92.82        |
|        | 1:200    | 14.52            | 12.33            | 84.94        |
|        | 1:400    | 7.26             | 6.01             | 82.84        |
|        | 1:800    | 3.63             | 3.02             | 83.32        |
| B      | 1:50     | 80.39            | 80.39            | 100.00       |
|        | 1:100    | 40.19            | 37.85            | 94.16        |
|        | 1:200    | 20.10            | 19.27            | 95.90        |
|        | 1:400    | 10.05            | 9.97             | 99.18        |
|        | 1:800    | 5.02             | 3.78             | 75.22        |
| C      | 1:50     | 168.32           | 168.32           | 100.00       |
|        | 1:100    | 84.16            | 78.69            | 93.50        |
|        | 1:200    | 42.08            | 38.59            | 91.71        |
|        | 1:400    | 21.04            | 19.10            | 90.78        |
|        | 1:800    | 10.52            | 9.77             | 92.85        |
|        | 1:1 600  | 5.26             | 4.69             | 89.09        |
| D      | 1:50     | 53.75            | 53.75            | 100.00       |
|        | 1:100    | 26.88            | 27.39            | 101.92       |
|        | 1:200    | 13.44            | 14.52            | 108.06       |
|        | 1:400    | 6.72             | 7.64             | 113.65       |

### Analytical sensitivity

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

|                            |             |
|----------------------------|-------------|
| Limit of blank, LoB        | 1.438 ng/ml |
| Limit of detection, LoD    | 2.570 ng/ml |
| Limit of quantitation, LoQ | 2.841 ng/ml |

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

### Analytical specificity

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

| Substance tested | Concentration added | Concentration obtained [ng/ml] | Conclusion |
|------------------|---------------------|--------------------------------|------------|
| Adalimumab       | 225.0               | < 1.438                        | < LoB      |
| Golimumab        | 225.0               | < 1.438                        | < LoB      |
| Infliximab       | 225.0               | < 1.438                        | < LoB      |

## 12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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 ProClin as bactericides. Sodium azide or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

**Warning:** Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- 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 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 send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

## 15. REFERENCES

1. Afif W, Loftus EJ, Faubion W, et al. Clinical utility of measuring Etanercept and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2010;**105**(5):1133–9.
2. 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
3. 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
4. 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 Etanercept. *Arthritis Rheum. Dec*; **54**(12):3782-9
5. Bradley JR. (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*. **214**:149–160.
6. St Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, Wang B, Schaible T, Kavanaugh A, Keystone EC (2002) The relationship of serum Etanercept 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
7. 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
8. Colombel JF, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Egan LJ, Harmsen WS, Schleck CD, Zinsmeister AR, Sandborn WJ (2004) The safety profile of Etanercept in patients with Crohn's disease: the Mayo clinic experience in 500 patients. *Gastroenterology. Jan*; **126**(1):19-31
9. Cominelli F (2004) Cytokine-based therapies for Crohn's disease--new paradigms. *N Engl J Med. Nov* **11**; **351**(20):2045-8
10. 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) Etanercept 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

11. Maser EA, Vilella R, Silverberg MS, Greenberg GR (2006) Association of trough serum Etanercept to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. Oct;**4**(10):1248-54
12. Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S (2004) Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. May;**126**(6):1593-610. Review
13. Vande Castele N, Gils A. Pharmacokinetics of anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: Adding value to current practice. *Journal of clinical pharmacology*. 2015;**55 Suppl 3**:S39–50. doi:10.1002/jcph.374.
14. Perry, M., Bewshea, C., Brown, R., So, K., Ahmad, T., & McDonald, T. (2015). *Etanercept and adalimumab are stable in whole blood clotted samples for seven days at room temperature*. *Annals of Clinical Biochemistry*. Epub ahead of print.

**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   |  | Irritant                          |