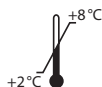


IDKmonitor® Rituximab drug level ELISA

***Zur In-vitro-Bestimmung der Konzentration des freien
Rituximab (z. B. MabThera®, Rituxan®)
in EDTA-Plasma und Serum***

***For the in vitro determination of free rituximab
concentration (e. g. MabThera®, Rituxan®)
in EDTA plasma and serum***

Gültig ab / Valid from 2025-03-13



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<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>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	8
<i>Linearität</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung des freien chimären anti-CD20-Therapieantikörpers Rituximab (z.B. MabThera®, Rituxan®) aus EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Rituximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper gegen das B-Zell-Oberflächenantigen CD20. Er wird zur Therapie maligner Lymphome [1] sowie bei der Behandlung verschiedener Autoimmunkrankheiten verwendet (z. B. Rheumatoide Arthritis [2], Granulomatose mit Polyangiitis [3], Immunthrombozytopenie [4], Myasthenia gravis [5] u. a.).

CD20 (auch: *human B-lymphocyte-restricted differentiation antigen*, Bp35) ist ein Oberflächenantigen auf sowohl normalen als auch malignen Prä-B-Lymphozyten und reifen B-Lymphozyten, nicht jedoch hämatopoietischen Stammzellen, Pro-B-Lymphozyten, Plasmazellen oder den Zellen anderer Gewebe. CD20 dient zur Optimierung der B-Zell-Immunantwort gegen insbesondere T-Zell-unabhängige Antigene [6] und funktioniert möglicherweise als Kalziumkanal.

Rituximab verbessert durch seine Bindung an CD20 unter anderem die Wirkung der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die bei den durch Rituximab markierten B-Lymphozyten den Zelltod auslösen [7]. Hierdurch wird die Zahl lebender B-Lymphozyten deutlich gesenkt. Dies ist eines der Ziele der Lymphomtherapie. Bei der Therapie von Autoimmunkrankheiten wird durch die Verringerung der Anzahl der B-Lymphozyten auch die Anzahl der Autoantikörper reduziert, was zu einer Verbesserung der Symptome führt.

Mit dem vorliegenden ELISA-Kit kann der Spiegel des therapeutischen Antikörpers Rituximab in Serumproben bestimmt werden. Die Resultate helfen dem behandelnden Arzt dabei, die Therapie zu überwachen und frühzeitig zu optimieren.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Inhalt	Kit-Komponenten	Menge
K 9661	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 9661	CONJ	Konjugat, peroxidasemarkiert, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Art.-Nr.	Inhalt	Kit-Komponenten	Menge
K 9661	STD	Standards, gebrauchsfertig (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	1 x 6 vials
K 9661	CTRL 1	Kontrolle 1, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 9661	CTRL 2	Kontrolle 2, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 9661	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 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 10–1 000 µl
- Absorptionspapier
- Thermoschüttler (25 °C)
- 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

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt** werden. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (z. B. 100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Der **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Alle anderen Testreagenzien – mit Ausnahme der Mikrotiterstreifen (PLATE), siehe „Pipettierschema“ im Kapitel „Testdurchführung“ – sind bei 2–8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Lagerung

Frisch abgenommenes EDTA-Plasma bzw. Serum kann 7 Tage bei 2–8 °C gelagert werden. Bei -20 °C können die Proben bis zu 6 Monate lang aufbewahrt werden.

Verdünnte EDTA-Plasma- bzw. Serumproben sind 7 Tage bei 2–8 °C stabil.

EDTA-Plasma und Serum

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:2 000** mit Verdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt, z. B. wie folgt:

- **10 µl** Probe + **490 µl** SAMPLEBUF = **1:50 (Verdünnung I)**
- **10 µl** Verdünnung I + **390 µl** SAMPLEBUF = **1:40 (Verdünnung II)**.

Diese entspricht nun einer **Gesamtverdünnung von 1:2 000** (= verdünnte SAMPLE).

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

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung des freien Rituximab (gegen CD20 gerichteter Therapieantikörper) im EDTA-Plasma oder Serum. In diesem Assay bindet das freie Rituximab aus der Probe an den auf der Platte fixierten spezifischen monoklonalen anti-Rituximab-Antikörper. Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion des gebundenen Rituximab 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 Rituximab direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve lässt sich die Konzentration des freien Rituximab in den Proben ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (20–30°C) bringen, gut mischen.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen mit beiliegender Abdeckfolie (FOL) abgeklebt, zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der wiederverschlossenen Aluminiumverpackung bei 2–8°C gelagert und innerhalb von 4 Monaten verwendet 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.	100 µl Standards, Kontrollen und Proben (verdünnte SAMPLE) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und 1 Stunde im Thermoschüttler bei 25°C und 300 rpm inkubieren.
3.	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.
4.	100 µl Konjugat (CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.

5.	Streifen abdecken und 1 Stunde im Thermoschüttler bei 25°C und 300 rpm inkubieren.
6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7.	100 µl Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
8.	10–15 min* bei Raumtemperatur (20–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
9.	100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, mischen.
10.	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.

* 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

Der ermittelte Rituximab-Spiegel der EDTA-Plasma- und Serumproben wird mit dem Verdünnungsfaktor 2 000 multipliziert. Hierbei erhält man ein Ergebnis in der Einheit ng/ml. Für die Umrechnung in µg/ml wird der Wert durch 1 000 geteilt.

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: $250 \text{ ng/ml} * 2\,000 = 500\,000 \text{ ng/ml} = 500 \text{ µg/ml}$*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*LoQ × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor:
 $2,54 \text{ ng/ml} * 2\,000 = 5\,080 \text{ ng/ml} = 5,080 \text{ µg/ml}$*

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 = 32

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

Probe	Mittelwert [µg/ml]	VK [%]
1	38,96	2,9
2	210,15	7,2

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 24

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

Probe	Mittelwert [µg/ml]	VK [%]
1	38,99	9,4
2	231,42	9,6

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 4 Serumproben wurden dafür mit bekannten Rituximab-Konzentrationen versetzt und gemessen.

Probe [µg/ml]	Spike [µg/ml]	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]	Wiederfindung [%]
0,8	10,0	10,8	13,3	123,1
	50,0	50,8	60,6	119,3
	100,0	100,8	119,2	118,3
	300,0	300,8	255,2	84,8
1,4	7,5	8,9	8,4	94,4
	15,0	16,4	16,4	100,0
	30,0	31,4	30,0	95,5

Probe [µg/ml]	Spike [µg/ml]	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]	Wieder- findung [%]
Negativ	10,0	10,0	12,4	124,0
	50,0	50,0	50,0	100,0
	100,0	100,0	98,6	98,6
	300,0	300,0	228,4	76,1
Negativ	5,0	5,0	5,6	112,0
	7,5	7,5	8,6	114,7
	10,0	10,0	11,2	112,0

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 3 Serumproben nachgewiesen.

Für Rituximab in Serum und Plasma wurde in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ein lineares Verhalten im Bereich von 3,6 bis 91,2 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wieder- findung [%]
1	1:500	91,2	91,2	100,00
	1:1 000	43,6	43,5	99,89
	1:2 000	21,8	21,1	96,90
	1:4 000	10,9	9,4	86,34
	1:6 000	7,3	7,1	97,82
	1:8 000	5,4	5,6	102,87
	1:10 000	4,4	4,5	103,33
	1:12 000	3,6	4,2	115,73

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
2	1:4 000	76,6	76,6	100,00
	1:8 000	36,4	33,3	91,48
	1:12 000	24,3	22,0	90,66
	1:16 000	18,2	16,3	89,56
	1:20 000	14,6	13,5	92,72
	1:24 000	12,1	11,8	97,25
	1:30 000	9,7	9,4	96,84
	1:32 000	9,1	9,0	98,90
3	1:1 000	62,8	62,8	100,00
	1:2 000	30,3	30,6	101,16
	1:4 000	15,1	15,9	105,12
	1:6 000	10,1	10,1	100,17
	1:8 000	7,6	7,7	101,82
	1:10 000	6,1	6,2	102,48
	1:16 000	3,8	4,3	113,72

Analytische Sensitivität

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

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 1,59 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 2,54 ng/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 2,54 ng/ml

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

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.
- Die Standards (STD) und Kontrollen (CTRL) sowie der Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) enthalten Borsäure. **Gefahr:** Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen (H360FD). Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

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. Falchi L, Ferrajoli A, Jacobs I, Nava-Parada P. An Evidence-based Review of Anti-CD20 Antibody-containing Regimens for the Treatment of Patients With Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia, Diffuse Large B-cell Lymphoma, or Follicular Lymphoma. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2018 Aug;**18**(8):508–518.e14.
2. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis and rheumatism*. 2006 Sep 1;**54**(9):2793–806.
3. Singer O, McCune WJ. Update on maintenance therapy for granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Current opinion in rheumatology*. 2017 May;**29**(3):248–53.
4. Bohn J-P, Steurer M. Current and evolving treatment strategies in adult immune thrombocytopenia. *Memo*. 2018 Sep 15;**11**(3):241–6.
5. Tandan R, Hehir MK, Waheed W, Howard DB. Rituximab treatment of myasthenia gravis: A systematic review. *Muscle & nerve*. 2017 Aug;**56**(2):185–96.
6. Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IAM, Dolman KM, et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Jan;**120**(1):214–22.
7. Rudnicka D, Oszmiana A, Finch DK, Strickland I, Schofield DJ, Lowe DC, et al. Rituximab causes a polarization of B cells that augments its therapeutic function in NK-cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Blood*. 2013 Jun 6;**121**(23):4694–702.

Verwendete Symbole:

Chargenbezeichnung



Bestellnummer

*In-vitro*-Diagnostikum

Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für
<n> Prüfungen

Temperaturbegrenzung



Verwendbar bis

Produktspezifikationsdatenblatt
beachtenGebrauchsanweisung
beachten

Europäische Konformität



Reizend



Eindeutige Produktidentifizierung



Gesundheitsgefahr

IDKmonitor[®] Rituximab drug level ELISA

***For the in vitro determination of free rituximab
concentration (e. g. MabThera[®], Rituxan[®])
in EDTA plasma and serum***

Valid from 2025-03-13



K 9661



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Test procedure</i>	20
8. RESULTS	21
9. LIMITATIONS	21
10. QUALITY CONTROL	22
<i>Reference range</i>	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Accuracy – Precision</i>	22
<i>Accuracy – Trueness</i>	23
<i>Analytical sensitivity</i>	23
<i>Linearity</i>	24
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	27

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of free chimeric anti-CD20 therapeutic antibody rituximab (e.g. MabThera®, Rituxan®) in EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Rituximab is a chimeric monoclonal antibody against the B cell surface antigen CD20. It is used for the therapy of malign lymphomas [1] and different autoimmune diseases (e.g. rheumatoid arthritis [2], granulomatosis with polyangiitis [3], immune thrombocytopenia [4], myasthenia gravis [5]).

CD20 (also known as human B-lymphocyte-restricted differentiation antigen or Bp35) is a surface antigen on normal and malign pre-B-lymphocytes and mature B-lymphocytes, but it is not expressed on hematopoietic stem cells, pro-B-lymphocytes, plasma cells or cells of other tissues. CD20 supports the B-cell immune response, in particular against T-cell-independent antigens [6] and maybe works as a calcium channel.

By binding to CD20, rituximab improves i. a. the effect of natural killer (NK) cells which induce cell death in the B-lymphocytes marked with rituximab [7]. Hereby the number of alive B-lymphocytes is clearly reduced. This is one of the aims of lymphoma therapy. In autoimmune disease therapy, the reduction of B-lymphocytes results in a reduction of autoantibodies, leading to a reduction of the symptoms.

Using this IDKmonitor® rituximab drug level ELISA kit, you can determine the serum or plasma level of the therapeutic antibody rituximab. The results help the treating physician to monitor and optimise the therapy early on.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 9661	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 9661	CONJ	Conjugate, peroxidase-labelled, ready-to-use	1 x 15 ml
K 9661	STD	Calibrators, ready-to-use (see specification for concentrations)	1 x 6 vials
K 9661	CTRL 1	Control 1, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 vial

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 9661	CTRL 2	Control 2, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 vial
K 9661	SAMPLEBUF	Dilution buffer, ready-to-use	1 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 10–1 000 µl single-use tips
- Absorbent paper
- Thermo shaker (25 °C)
- 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 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each 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 (e.g. 100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solution. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions.

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 one month**.

- All other test reagents are ready-to-use, except microtiter strips (PLATE) - see "Test procedure" in chapter "Assay Procedure". Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at 2–8 °C.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Freshly collected EDTA plasma or serum can be stored for 7 days at 2–8 °C. At -20 °C, the samples are stable for 6 months.

Diluted EDTA plasma or serum samples can be stored for 7 days at 2–8 °C.

EDTA plasma and serum

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:2 000** with dilution buffer (SAMPLEBUF) before performing the assay, e.g.

- **10 µl** sample + **490 µl** SAMPLEBUF = **1:50 (dilution I)**
- **10 µl** dilution I + **390 µl** SAMPLEBUF = **1:40 (dilution II)**.

This results in a **total dilution of 1:2 000** (= diluted SAMPLE).

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 rituximab (therapeutic antibody against CD20) in EDTA plasma or serum samples. In a first incubation step, the free rituximab from the sample is bound to the specific monoclonal anti-rituximab antibody coated on the plate. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a further incubation step, peroxidase-labeled antibody is added. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of free rituximab 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 rituximab in the samples are determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (20–30 °C) and mix well.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered with the provided foil (FOL) together with the desiccant bag in the re-closed aluminium packaging at 2–8 °C and use them in the next 4 months.

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.	Add 100 µl of standards, controls or samples (diluted SAMPLE) into the respective wells.
2.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 25 °C on a thermo shaker at 300 rpm .
3.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of wash buffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
4.	Add 100 µl conjugate (CONJ) into each well.
5.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 25 °C on a thermo shaker at 300 rpm .
6.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of wash buffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
7.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
8.	Incubate for 10–15 min* at room temperature (20–30 °C) in the dark .
9.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well, mix.
10.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* 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 rituximab levels of EDTA plasma and serum samples have to be multiplied by the dilution factor of 2 000. The resulting value has the unit ng/ml. To convert the value to µg/ml, divide it by 1 000.

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:

$$\text{highest concentration of the standard curve} \times \text{sample dilution factor to be used} \\ 250 \text{ ng/ml} \times 2\,000 = 500\,000 \text{ ng/ml} = 500 \mu\text{g/ml}$$

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

LoQ × sample dilution factor to be used:

$$2,54 \text{ ng/ml} * 2\,000 = 5\,080 \text{ ng/ml} = 5,080 \mu\text{g/ml}$$

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 = 32

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	38.96	2.9
2	210.15	7.2

Reproducibility (Inter-Assay); n = 24

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	38.99	9.4
2	231.42	9.6

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, rituximab spikes with known concentrations were added to 4 different serum samples.

Sample [µg/ml]	Spike [µg/ml]	Expected [µg/ml]	Obtained [µg/ml]	Recovery [%]
0.8	10.0	10.8	13.3	123.1
	50.0	50.8	60.6	119.3
	100.0	100.8	119.2	118.3
	300.0	300.8	255.2	84.8
1.4	7.5	8.9	8.4	94.4
	15.0	16.4	16.4	100.0
	30.0	31.4	30.0	95.5
Negative	10.0	10.0	12.4	124.0
	50.0	50.0	50.0	100.0
	100.0	100.0	98.6	98.6
	300.0	300.0	228.4	76.1
Negative	5.0	5.0	5.6	112.0
	7.5	7.5	8.6	114.7
	10.0	10.0	11.2	112.0

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 1.59 ng/ml

Limit of detection, LoD 2.54 ng/ml

Limit of quantitation, LoQ 2.54 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 EP6-A with a serial dilution of 3 different serum samples.

For rituximab in serum and plasma, the method has been demonstrated to be linear from 3.6 to 91.2 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 [µg/ml]	Obtained [µg/ml]	Recovery [%]
1	1:500	91.2	91.2	100.00
	1:1 000	43.6	43.5	99.89
	1:2 000	21.8	21.1	96.90
	1:4 000	10.9	9.4	86.34
	1:6 000	7.3	7.1	97.82
	1:8 000	5.4	5.6	102.87
	1:10 000	4.4	4.5	103.33
	1:12 000	3.6	4.2	115.73
2	1:4 000	76.6	76.6	100.00
	1:8 000	36.4	33.3	91.48
	1:12 000	24.3	22.0	90.66
	1:16 000	18.2	16.3	89.56
	1:20 000	14.6	13.5	92.72
	1:24 000	12.1	11.8	97.25
	1:30 000	9.7	9.4	96.84
	1:32 000	9.1	9.0	98.90
3	1:1 000	62.8	62.8	100.00
	1:2 000	30.3	30.6	101.16
	1:4 000	15.1	15.9	105.12
	1:6 000	10.1	10.1	100.17
	1:8 000	7.6	7.7	101.82
	1:10 000	6.1	6.2	102.48
	1:16 000	3.8	4.3	113.72

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 and ProClin are harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic color reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immunodiagnostik 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 should 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.
- The standards (STD) and controls (CTRL) as well as the sample dilution buffer (SAMPLEBUF) contains boric acid. **Danger:** May damage fertility. May damage the unborn child (H360FD). Therefore, protective gloves, protective clothing and safety goggles should be worn. If exposed or concerned: Get medical advice/attention.

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 send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Falchi L, Ferrajoli A, Jacobs I, Nava-Parada P. An Evidence-based Review of Anti-CD20 Antibody-containing Regimens for the Treatment of Patients With Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia, Diffuse Large B-cell Lymphoma, or Follicular Lymphoma. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2018 Aug;**18**(8):508–518.e14.
2. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis and rheumatism*. 2006 Sep 1;**54**(9):2793–806.
3. Singer O, McCune WJ. Update on maintenance therapy for granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Current opinion in rheumatology*. 2017 May;**29**(3):248–53.
4. Bohn J-P, Steurer M. Current and evolving treatment strategies in adult immune thrombocytopenia. *Memo*. 2018 Sep 15;**11**(3):241–6.
5. Tandan R, Hehir MK, Waheed W, Howard DB. Rituximab treatment of myasthenia gravis: A systematic review. *Muscle & nerve*. 2017 Aug;**56**(2):185–96.
6. Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IAM, Dolman KM, et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Jan;**120**(1):214–22.
7. Rudnicka D, Oszmiana A, Finch DK, Strickland I, Schofield DJ, Lowe DC, et al. Rituximab causes a polarization of B cells that augments its therapeutic function in NK-cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Blood*. 2013 Jun 6;**121**(23):4694–702.

Used symbols:



Lot number



Catalogue number



In Vitro Diagnostic Medical Device



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for
<n> tests



Temperature limitation



Use by



Consult product specification
data sheet



Consult instructions
for use



European Conformity



Irritant



Unique Device Identification



Systemic health hazards