

阿狄科®总抗英夫利昔单抗抗体检测试剂盒（酶联免疫法）说明书

货号：K9654

【产品名称】

通用名称：阿狄科®总抗英夫利昔单抗抗体检测试剂盒（酶联免疫法）

英文名称：IDKmonitor® Infliximab total ADA ELISA

【包装规格】96人份/盒

【预期用途】

用于体外测定人血清和EDTA血浆中的总抗英夫利昔单抗抗体（如类克®）。仅供科研使用。

【背景知识】

克罗恩病、溃疡性结肠炎或类风湿关节炎等慢性炎症性疾病通常使用抗TNF α 抗体进行治疗，直接针对潜在炎症过程。

抗TNF α 治疗的临床疗效通常与治疗性抗体的谷浓度相关，即下一次应用抗TNF α 抗体之前的药物浓度[1-3]。有几个因素影响谷浓度，其中包括抗TNF α 拮抗剂输注的剂量和频率、疾病活动度、个体药代动力学和免疫反应（形成抗药物抗体，ADA）。人们认为，ADA在功能性上中和了治疗性抗体或诱导其快速消除[4]。ADA形成的后果可能是治疗失败和抗TNF α 抗体应用期间的过敏反应[1,5]。

用于测定总抗英夫利昔单抗抗体的阿狄科®总抗英夫利昔单抗抗体检测试剂盒（酶联免疫法）可测定游离抗英夫利昔单抗和结合抗英夫利昔单抗。即使在英夫利昔单抗存在的情况下，该检测方法可靠地测定ADA，因此，当预计有可测量的英夫利昔单抗浓度时，例如在最后一次输注后不久，它是理想的治疗监测。结合药物浓度测定，阿狄科®总抗英夫利昔单抗抗体检测试剂盒（酶联免疫法）为主治医师提供了早期监测和优化治疗的机会。

【检验原理】

本试剂盒用于测定总抗英夫利昔单抗抗体（如类克®）。样本制备时，使得抗药物抗体(ADA)与治疗性抗体分离，从而获得游离抗药物抗体。加入过氧化物酶结合物（过氧化物酶标记的治疗性抗体）与示踪剂（生物素化治疗性抗体），取代未标记的治疗性抗体，标记的抗体与ADA形成复合物。该复合物通过生物素与预包被于微孔内的链霉亲和素结合。过氧化物酶将TMB底物转换为蓝色产物，加入终止液终止反应，颜色由蓝色变为黄色。在酶标仪450nm波长处测量颜色的强度，根据临界质控对结果进行解读。

【主要组成成分】

组分货号	组分标签	组分构成	数量
K 9654	PLATE	预包被微孔板	12 x 8 孔
K 0001.C.100	WASHBUF	10x 浓缩洗液	1 x 100ml
K 9654	TRACER	浓缩示踪剂，生物素化	1 x 600 μ l
K 9654	CONJ	浓缩酶结合物，过	1 x 600 μ l

组分货号	组分标签	组分构成	数量
K 9654	CTRL CUT-OFF	氧化物酶标记 临界质控，冻干粉	4 x 1 瓶
K 9654	CTRL NEG	阴性质控，冻干粉 （范围详见规格表）	4 x 1 瓶
K 9654	CTRL POS	阳性质控，冻干粉 （范围详见规格表）	4 x 1 瓶
K 9654	ASYBUF	检测缓冲液，即用型	2 x 15ml
K 9654	ABBUF	抗体稀释缓冲液，即用型	1 x 10ml
K 0002.15	SUB	底物（四甲基联苯胺溶液），即用型	1 x 15ml
K 0003.15	STOP	终止液，即用型	1 x 15ml

注：不同批号的组分不能混用。详见试剂盒标签。

【储存条件及有效期】

试剂在 2-8 $^{\circ}$ C 下保存可稳定至所标示的有效期。生产日期及失效日期见试剂盒标签。

【适用仪器】

适用于具有 450nm、620nm 波长的酶标仪。

【样本要求】

样本保存

未稀释的样本可在-20 $^{\circ}$ C 保存 2 个月，在 2-8 $^{\circ}$ C 或室温下可保存 7 天。应避免反复冻融，冻融次数不超过 3 次。已稀释的样本不稳定，无法保存。实验前，样本稀释与质控品制备应同时进行。

【检验方法】

1. 自备材料

- 超纯水
- 校准过的高精度移液器和 10-1000 μ l 一次性枪头
- 多道高精度移液器或连续加样枪
- 吸水纸
- 微孔板封板膜
- 水平微孔板振荡器
- 漩涡仪
- 标准实验室用的玻璃杯或者塑料瓶、杯子等
- 酶标仪（波长 450nm、620nm 或 690nm）

注：推荐使用超纯水（水类型 1; ISO 3696），不含未溶解的胶体离子和有机分子（不含 $>0.2\mu$ m 的颗粒）25 $^{\circ}$ C 时的电导率为 0.055 μ S/cm (≥ 18.2 M Ω cm)。

2. 试剂准备

- 实验前将所有试剂和样本平衡至室温（15-30 $^{\circ}$ C），混匀；
- 确定实验所需微孔板条数量，将未使用的微孔板条放回含有干燥剂的铝箔袋中，密封保存于 2-8 $^{\circ}$ C，可保存至所标示的有效期；
- 若试剂使用超过 1 次，确保按照标签标示的条件贮存，每次实验仅制备需要的量。试剂在有效期内可使用 4 次；
- 制备工作洗液：**浓缩洗液必须用超纯水按 1:10 的比例稀释（100ml 浓缩洗液+900ml 超纯水），混匀。由于盐浓度较高，可能会出现结晶。稀释前，必须在室温或者 37 $^{\circ}$ C 水浴将晶体溶解。浓缩洗液在 2-8 $^{\circ}$ C

可保存至标示的有效期。工作洗液（1:10 稀释）储存于密封的容器，在 2-8℃可保存一个月；

• 制备样本和质控品：

a. 往稀释管中加入 25μl 样本，再加入 225μl 检测缓冲液，漩涡。应尽快为所有样本添加检测缓冲液，因为此步骤的目的是从治疗性抗体中分离出 ADAs。同时用 500μl 检测缓冲液复溶质控品，漩涡。

注意：样本稀释与质控品制备应同时进行，确保质控品和样本是同等处理的。

b. 反应管中复溶的质控品和已稀释的样本，放在水平振荡器上，室温下震荡孵育 20 分钟。

注意：加入检测缓冲液后开始计时。

c. 孵育结束，将 250μl 复溶的质控品转移到反应容器中。

d. 往 250μl 复溶的质控品和已稀释的样本中加入 60μl 示踪剂/酶结合物/抗体缓冲液，漩涡后，室温（15-30℃）震荡孵育 1 小时。

*建议震荡频率为 550 rpm，轨道为 2mm。

注意：已稀释的样本无法保存，必须在实验中立即检测。

• 制备酶结合物和示踪剂：使用前几分钟，浓缩示踪剂和浓缩酶结合物必须用抗体稀释缓冲液按 1:1:10 的比例稀释：先加入抗体稀释缓冲液，然后依次添加示踪剂和酶结合物（例如：3000μl 抗体稀释缓冲液+300μl 示踪剂+300μl 酶结合物）。浓缩示踪剂和浓缩酶结合物在 2-8℃可保存至标示的有效期。已稀释的示踪剂和酶结合物不稳定，不能保存；

• 其他所有组分可直接使用，在 2-8℃可保存至标示的有效期。

3. 操作步骤

在方案表上标记质控品和样本的位置。

若使用全自动酶标仪检测，以下操作步骤需要根据全自动酶标仪的特性进行调整。

建议所有样本进行复孔检测。

1) 使用前，微孔板条需用 250μl/孔的工作洗液，洗板 5 次，在进入下一步前，在吸水纸上用力拍打倒置的板以除去多余的洗液。

2) 加入预孵育的质控品和样本各 100μl 至相应微孔中。

3) 用封板膜将微孔板孔封好，室温（15-30℃）下在水平微孔板振荡器上震荡孵育 1.5 小时*。

4) 倒掉孔内液体，用工作洗液 250μl/孔，洗板 5 次，在进入下一步前，在吸水纸上用力拍打倒置的板以除去多余的洗液。

5) 每孔加入底物 100μl。

6) 室温（15-30℃）下孵育 10-20 分钟，直到有明显颜色差异**。

7) 每孔加入终止液 100μl，用酶标仪的震动功能快速混匀*。

8) 立刻读取 450nm（参考波长 620nm 或 690nm）波长处的吸光度。

*建议震荡频率为 550 rpm，轨道为 2mm。

**颜色强度的变化对温度敏感，建议观察颜色变化，在有明显区别时终止反应。

【技术要点】

• 同一实验，不同批号的组分不能混用。此外，建议不要混用不同微孔板的微孔，即使是同一个批号，因为已开封的微孔与未开封的微孔暴露在不同的环境下；

• 每次实验都要分析质控品；

- 不能使用超过有效期的试剂；
- 使用前，底物液必须是无色的；
- 孵育时，贴上封板膜以确保结果的准确性；
- 混匀试剂时，避免产生气泡；
- 不同试剂的瓶塞、瓶盖不可混用；
- 按照说明书操作实验。

【参考区间】

目前尚未明确参考范围，各实验室应根据情况确定自己的参考范围。

【检验结果的解释】

Cut-off = 10 AU/ml = 临界质控的OD值

样本平均OD值高于临界质控的为阳性。

建议使用线性纵坐标和横坐标进行线性回归来计算结果。

计算结果前，需要对双孔的两个OD值的合理性进行评估。如果软件无法自动计算，需手动计算。

阳性样本的计算：

患者样本的平均OD值：0.735

临界质控的平均OD值：0.085 = 10 AU/ml

患者样本的浓度： $\frac{0.735 \times 10 \text{ AU/ml}}{0.085} = 86.47 \text{ AU/ml}$

质量控制

如可能，建议使用外部质控作为内部质控。

每次实验都应分析质控品。分析质控品后，得出的结果应当使用适当的统计学方法，评估其可接受性。如果质控品的值超出范围，样本结果可能无效。

【检验方法的局限性】

测量范围

测量范围的下限是 LoB。（LoB 详见【产品性能指标】）

样本浓度低于测量范围的，无法明确量化。

生物素干扰

生物素浓度 < 100ng/ml 的样本，其结果变化 ≤ 25%。较高浓度的生物素可能导致错误的低结果。每天服用 > 5mg 生物素的患者应在服用生物素后至少等待 24 小时才能采集样本。患者服用生物素补充剂或接受高剂量生物素治疗的结果通常应与总临床图一起解释。

【产品性能指标】

准确度——精密度

重复性（批内测定）；n=41

重复性在恒定参数下采用 2 个血清样本进行评估（同一操作员、仪器、日期和同一批号的试剂盒）。

样本	均值 (AU/ml)	CV (%)
1	54.08	3.2
2	219.54	4.7

可重现性（批间测定）

可重现性在不同参数下采用 3 个血清样本进行评估（不同操作员、仪器、日期和不同批号的试剂盒）。

样本	均值 (AU/ml)	CV (%)
1(n = 32)	56.02	8.8
2(n = 32)	62.15	9.2
3(n = 20)	9.49	6.1

准确度——真实性

真实性表示检测结果之间的一致性和被测量的真实值。因此，在 4 个血清样本中加入已知数量的抗英夫利昔单抗抗体并进行测量。回收率在 80.01-118.18%之间。

灵敏度分析

（空白限）LoB=3.12 AU/ml

（检测限）LoD=6.93 AU/ml

（定量限）LoQ=10 AU/ml

根据 CLSI 指南 EP-17-A2 进行评估。LoQ 的特定精度目标是 10% CV。

线性

线性表示的是一种方法的能力，在给定区间的检测样本中，分析物的浓度和结果成正比。根据 CLSI 指南 EP06-A，对 2 个血清样本进行连续稀释，以评估线性。

对于血清和血浆中的抗英夫利昔单抗抗体，已证明该方法在 14.23-497.00 AU/ml 之间呈线性关系，该区间内非线性行为小于 ±20%。下表是每个样本的一个典型示例：

样本	稀释比例	预期值 (AU/ml)	测量值 (AU/ml)	回收率 (%)
1	1:2	497.00	497.00	100.00
	1:4	248.50	247.07	99.42
	1:8	124.25	129.74	104.42
	1:16	62.13	63.00	101.41
	1:32	31.06	32.71	105.31
	1:64	15.53	16.35	105.25
2	1:2	370.48	370.48	100.00
	1:4	185.24	199.17	107.52
	1:8	92.62	98.74	106.61
	1:16	46.31	55.37	119.57
	1:32	23.16	28.84	124.56

特异性分析——交叉反应

通过测量患者样本中抗阿达木单抗抗体的交叉反应性来检测抗体的特异性。因此，检测了 3 个既往抗阿达木单抗抗体检测呈阳性的患者样本，没有观察到交叉反应。

特异性分析——干扰

采用阿狄科®总抗英夫利昔单抗抗体检测试剂盒时可能会受不同物质干扰。因此，对阳性和阴性血清样本分别添加药物（每日最大剂量）或血清成分（剂量根据 CLSI 指南 EP7-A2），然后进行检测。

未发现以下药物产生干扰：硫唑嘌呤、泮托拉唑、美沙拉嗪、克拉霉素、左氧氟沙星、铁补充剂、乙酰水杨酸、维生素 D、加巴喷丁、复合维生素制剂或布洛芬。

未发现对以下血清成分有干扰：血红蛋白、胆红素或甘油三酯。

高剂量胡克效应

对于高达 981 AU/ml 的抗体浓度，未观察到高剂量胡克效应。

【注意事项】

1. 试剂盒中的所有试剂仅用于体外；
2. 试剂盒组分的人源性材料均被检测，其 HIV、乙型肝炎、丙型肝炎为阴性。然而，为了安全起见，所有试剂组分应当做潜在传染源对待；
3. 试剂包含叠氮化钠或者 Proclin 作为杀菌剂。叠氮化钠和 Proclin 具有毒性。用于酶显色反应的底物具有毒性和致癌性，避免接触皮肤或粘膜；
4. 10x 浓缩洗液 (WASHBUF) 含有表面活性剂，接触眼睛可能会引起严重的眼睛刺激。

注意：引起严重的眼睛刺激。如果不慎入眼：用水小心冲洗几分钟。取出隐形眼镜（如果有且容易的话），继续冲洗。如果眼睛刺激持续存在：遵医嘱。

5. 终止液包含稀释的硫酸（强酸的一种）。尽管已经稀释，仍需要小心处理。它可能引起灼伤，处理时，应该戴手套、护目用具和适当的防护服。任何液体溢出，必须用大量的水清洗；不要吸入蒸汽，避免吸入。

6. 本试剂盒依据 98/79/EC 的 IVD 指南生产和销售；
7. 请遵守实验室准则；
8. **IDKmonitor®** 是 Immundiagnostik AG 的商标；
9. 孵育时间、孵育温度以及加样量由生产商制定，任何与生产商规定不一致的变化，可能会影响检测结果。因此，本公司不承担任何由错误操作引起的后果；
10. 若有索赔和投诉，必须在收到货后 14 天内，将产品和书面投诉寄到本公司（Immundiagnostik AG）。

【参考文献】

1. Afif W, Loftus EV, Jr., Faubion WA, Kane SV, Bruining DH, Hanson KA, Sandborn WJ (2010). Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 105(5): 1133-1139.
2. Kopylov U, Mazor Y, Yavzori M, Fudim E, Katz L, Coscas D, Picard O, Chowers Y, Eliakim R, Ben-Horin S (2012). Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA for the detection of anti-infliximab antibodies. *Inflamm Bowel Dis* 18(9): 1628-1633.
3. Tak PP (2012). A personalized medicine approach to biological treatment of rheumatoid arthritis: a preliminary treatment algorithm. *Rheumatology* 51(4): 600-609.
4. Ordas I, Mould DR, Feagan BG, Sandborn WJ (2012) Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin Pharmacol Ther* 91(4): 635-646.
5. Bender NK, Heilig CE, Droll B, Wohlgemuth J, Armbruster FP, Heilig B (2007). Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int* 27(3): 269-274.

【标识的解释】

	温度极限	REF	货号
IVD	体外诊断医疗器械	→REF	与...一起使用
	制造商		含量足够测试 <math>n> 次
LOT	批号		有效期
	注意事项		查阅使用说明
	查阅技术数据表		

【基本信息】

生产企业名称：Immundiagnostik AG
 住所：Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
 生产地址：Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
 电话：+49 6251 70190-0 传真：+49 6251 70190-363
 邮箱：info@immundiagnostik.com
 网址：www.immundiagnostik.com
 中国总代理商及售后服务单位名称：
 广东固康生物科技有限公司
 住所：广州市黄埔区开源大道 11 号加速器 B4 栋 405-410 室
 电话：020-32293176 18927505895（微信同号）
 传真：020-32293177
 邮箱：sales@gucon.com
 网址：www.gucon.com

仅供参考，请以原版英文说明书为准！