

# 阿狄科®游离抗英夫利昔单抗抗体检测试剂盒（酶联免疫法）说明书

货号：K9650

## 【产品名称】

通用名称：阿狄科®游离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 free ADA ELISA

【包装规格】96人份/盒

## 【预期用途】

用于体外定性测定人血清和EDTA血浆中的游离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性关节炎等慢性炎症性疾病越来越多地使用抗TNFα抗体进行治疗，直接针对潜在的炎症过程。

抗TNFα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TNFα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TNFα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TNFα抗体应用期间的过敏反应[1,5]。

用于测定抗英夫利昔单抗抗体（如类克®）的阿狄科®游离抗英夫利昔单抗抗体检测试剂盒可测定游离抗英夫利昔单抗抗体。风湿因子或不规则抗体的共同测定可以排除。结合药物浓度测定，阿狄科®游离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】

本试剂盒用于测定游离抗英夫利昔单抗抗体（例如类克®）。在第一个孵育步骤，样本中的游离抗英夫利昔单抗抗体与预包被于微孔内的英夫利昔单抗 F(ab)<sub>2</sub> 片段结合。洗板后，所有未结合的物质被清除。在第二个孵育步骤，加入过氧化物酶标记的治疗抗体。洗板后，所有未结合的物质被清除。固相与底物（四甲基联苯胺溶液）一起孵育。最终，加入终止液终止反应，颜色变为黄色。在 450nm 处光度测定有色混合物的吸光度。颜色的强度与样本中结合抗英夫利昔单抗抗体（例如类克®）的数量成正比。结果根据临界质控进行评估。

## 【主要组成成分】

组分货号	组分标签	组分构成	数量
K 9650	PLATE	预包被(F(ab) <sub>2</sub> )微孔板	12 x 8 孔
K 0001.C.100	WASHBUF	10x 浓缩洗液	1 x 100ml
K 9650	CONJ	浓缩酶结合物（治疗抗体、过氧化物酶标记）	1 x 200μl
K 9650	CTRL POS	阳性质控，冻干粉（范围详见规格表）	4 x 1 瓶

K 9650	CTRL NEG	阴性质控，冻干粉（范围详见规格表）	4 x 1 瓶
K 9650	CTRL CUT-OFF	临界质控，冻干粉	4 x 1 瓶
K 9650	SAMPLEBUF	样本稀释缓冲液，即用型	1 x 30ml
K 9650	ASYBUF	检测缓冲液，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℃ 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】

### 样本稀释：

- 1) 样本稀释管内加入样本 50μl，再加入样本稀释缓冲液 250μl，混匀；
  - 2) 室温（15-30℃）下震荡孵育 15 分钟；
  - 3) 加入检测缓冲液 50μl，混匀；
  - 4) 室温（15-30℃）下震荡孵育 15 分钟；
- 为了进行分析，移取已稀释的样本 100μl 至每个微孔中，如复孔检测样本，移取 2 x 100μl 至待测孔中。

### 样本保存

未稀释的样本在-20℃下可保存 2 个月，在 2-8℃或室温下可保存 7 天。最多只能冻融 3 次。

已稀释的样本不稳定，不能保存。

## 【检验方法】

### 1. 自备材料

- 超纯水
- 校准过的高精度移液器和 10-1000μl 一次性枪头
- 吸水纸
- 微孔板封板膜
- 水平微孔板振荡器
- 多道移液器或者连续加样枪
- 离心机
- 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>0.2μm 的颗粒）25℃ 时的电导率为 0.055μS/cm (≥18.2MΩcm)。

### 2. 试剂准备

- 实验前将所有试剂和样本平衡至室温（15-30℃），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℃，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；

- 少于 100 $\mu$ l 的试剂在使用前必须离心，避免容积减少；
- **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 $^{\circ}$ C 可保存一个月；
- **制备质控品：**冻干的质控品（阴性质控、阳性质控、临界质控）需用 300 $\mu$ l 超纯水复溶。室温下溶解 10 分钟，轻轻倒转彻底混匀，确保完全复溶。未复溶的质控品，在 2-8 $^{\circ}$ C 可保存至标示的有效期。复溶后的质控品不稳定，不能保存；
- **制备酶结合物：**浓缩酶结合物必须用工作洗液按 1:101 的比例稀释（100 $\mu$ l 浓缩酶+10ml 工作洗液）。浓缩酶结合物在 2-8 $^{\circ}$ C 可保存至标示的有效期。稀释后的酶结合物不稳定，不能保存；
- 其他所有组分可直接使用，在 2-8 $^{\circ}$ C 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，用工作洗液 250 $\mu$ l/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。
- 2) 加入阴性质控、阳性质控、临界质控和已稀释的样本各 100 $\mu$ l 至相应微孔中。
- 3) 用封板膜将微孔板孔封好，2-8 $^{\circ}$ C 下在水平微孔板振荡器上震荡孵育过夜（16-20 小时）\*。
- 4) 倒掉孔内液体，用工作洗液 250 $\mu$ l/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) 每孔加入已稀释的酶结合物 100 $\mu$ l。
- 6) 用封板膜将微孔板孔封好，室温（15-30 $^{\circ}$ C）下在水平微孔板振荡器上震荡孵育 1 小时\*\*。
- 7) 倒掉孔内液体，用工作洗液 250 $\mu$ l/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。
- 8) 每孔加入底物 100 $\mu$ l。
- 9) 室温（15-30 $^{\circ}$ C）下避光孵育 10-20 分钟\*\*\*。
- 10) 每孔加入终止液 100 $\mu$ l，混匀。
- 11) 立刻读取 450nm（参考波长 620nm 或者 690nm）波长的吸光度。

\*建议孵育时在 2-8 $^{\circ}$ C 下进行，震荡频率为 550 rpm，轨道为 2mm。如果无法在 2-8 $^{\circ}$ C 下震荡孵育，建议在 2-8 $^{\circ}$ C 下孵育，无需震荡。

\*\*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。

#### 注意：

- 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】

使用临界质控对结果进行分析。样本 OD 值高于临界质控 OD 值的为阳性，低于临界质控 OD 值的为阴性。

Cut-off = 10AU/ml = 临界质控的 OD 值

建议使用线性纵坐标和横坐标进行线性回归来计算样本浓度。

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：0.065 = 10 AU/ml

患者样本的浓度： $\frac{0.735 \times 10 \text{ AU/ml}}{0.065} = 113 \text{ AU/ml}$

#### 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。

#### 【产品性能指标】

##### 准确度——精密度

重复性（批内测定）；n=40

重复性在恒定参数下采用 3 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	69.45	3.0
2	167.58	3.3
3	118.86	3.2

可重现性（批间测定）；n=11

可重现性在不同参数下采用 5 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	174.56	10.2
2	107.64	12.5
3	47.28	10.5
4	67.24	10.4
5	73.07	11.4

#### 灵敏度分析

根据 CLSI 指南 EP17-A2 评估。

LoB（空白限）= 5.751 AU/ml。

#### 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 19.83-353.83 AU/ml 之间呈线性关系，该区间内非线性行为小于  $\pm 20\%$ 。

样本	稀释比例	预期值 (AU/ml)	测量值 (AU/ml)	回收率 (%)
1	1:20	353.83	353.83	100.00
	1:40	176.92	213.08	120.44
	1:80	88.46	98.50	111.35
	1:160	44.23	40.17	90.81
	1:320	22.11	19.83	89.68
2	1:40	324.00	324.00	100.00
	1:80	162.00	162.33	100.21
	1:160	81.00	68.83	84.98
	1:320	40.50	30.83	76.13

### 【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污染源对待；
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 浓缩洗液含有表面活性剂，接触到眼睛可能导致严重的眼睛刺激。如不慎入眼：用水小心冲洗几分钟。取出隐形眼镜（如果有并且容易取出的话）。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. et al., 2010. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory

- bowel disease. The American journal of gastroenterology, 105(5), pp.1133-9.
2. Kopylov, U. et al., 2012. Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA for the detection of anti-infliximab antibodies. Inflammatory bowel diseases, 18(9), pp.1628-33.
3. Tak, P.P., 2012. A personalized medicine approach to biologic treatment of rheumatoid arthritis: a preliminary treatment algorithm. Rheumatology (Oxford, England), 51(4), pp.600-9.
4. Ordás, I. et al., 2012. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. Clinical pharmacology and therapeutics, 91(4), pp.635-46.
5. Bender, N.K. et al., 2007. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. Rheumatology international, 27(3), pp.269-74.

### 【标识的解释】

	温度极限	<b>REF</b>	货号
<b>IVD</b>	体外诊断医疗器械	<b>→REF</b>	与...一起使用
	制造商		含量足够测试 <n> 次
<b>LOT</b>	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：+49625170190-0 传真：+496251849430  
 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！