

# 阿狄科®利妥昔单抗药物浓度检测试剂盒（酶联免疫法）说明书

货号：K9661

## 【产品名称】

通用名称：阿狄科®利妥昔单抗药物浓度检测试剂盒（酶联免疫法）

英文名称：IDKmonitor® Rituximab drug level ELISA

【包装规格】96人份/盒

## 【预期用途】

用于体外定量测定人血清和EDTA血浆中的游离嵌合抗CD20治疗性抗体利妥昔单抗（如MabThera®、美罗华®）。仅供科研使用。

## 【背景知识】

利妥昔单抗是一种抗B细胞表面抗原CD20的嵌合单克隆抗体。用于治疗恶性淋巴瘤[1]和各种自身免疫性疾病（如类风湿性关节炎[2]、肉芽肿性多血管炎[3]、免疫性血小板减少[4]、重症肌无力[5]）。

CD20（也称为人类B淋巴细胞限制性分化抗原或Bp35）是正常或恶性前B淋巴细胞和成熟B淋巴细胞上的表面抗原，但在造血干细胞、前B淋巴细胞、浆细胞或其他组织细胞上不表达。CD20支持B细胞免疫反应，特别是针对T细胞非依赖性抗原[6]，可能作为钙离子通道。

通过与CD20结合，利妥昔单抗可改善i.a.自然杀伤(NK)细胞的作用，NK细胞可诱导利妥昔标记的B淋巴细胞中的细胞死亡[7]。因此，活B淋巴细胞的数量明显减少。这是淋巴治疗的目的之一。在自身免疫性疾病治疗中，B淋巴细胞的减少导致自身抗体的减少，从而导致症状的减轻。

阿狄科®利妥昔单抗药物浓度检测试剂盒（酶联免疫法）可用于确定治疗性抗体利妥昔单抗的血清或血浆水平，可协助主治医生早期药效监测和优化治疗方案。

## 【检验原理】

本试剂盒用于定量测定 EDTA 血浆或血清样本中的游离利妥昔单抗（抗 CD20 治疗性抗体）。在第一个孵育步骤，样本中的游离利妥昔单抗与预包被于微孔内的特异性单克隆抗利妥昔单抗抗体结合。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抗体，四甲基联苯胺(TMB)作为过氧化物酶的底物。最终，加入终止液终止反应，颜色由蓝色变为黄色。黄色的强度与样本中游离利妥昔单抗的浓度成正比。根据读取的校准品的 OD 值，生成一个吸光度单位（OD 值）VS 浓度的剂量反应曲线，根据该曲线确定样本中游离利妥昔单抗的浓度。

## 【主要组成成分】

组分货号	组分标签	组分构成	数量
K 9661	PLATE	预包被微孔板	12 x 8孔
K 0001.C.100	WASHBUF	10x 浓缩洗液	2 x 100ml
K 9661	CONJ	结合物，过氧化物酶标记，即用型	1 x 15ml
K 9661	STD	校准品，即用型	1 x 6瓶

货号	组分标签	组分构成	数量
K 9661	CTRL 1	质控品 1，即用型（范围详见规格表）	1 x 1瓶
K 9661	CTRL 2	质控品 2，即用型（范围详见规格表）	1 x 1瓶
K 9661	SAMPLEB UF	样本稀释缓冲液，即用型	1 x 100ml
K 0002.15	SUB	底物（四甲基联苯胺），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】

### 样本保存

新鲜采集的 EDTA 血浆或血清在 2-8℃ 可保存 7 天，在 -20℃ 下可保存 6 个月。

稀释后的 EDTA 血浆或血清样本在 2-8℃ 可保存 7 天。

### EDTA 血浆和血清

实验前，EDTA 血浆或血清样本必须按 1:2000 的比例稀释，例如：

10μl 样本+490μl 样本稀释缓冲液=1:50（稀释 I）

10μl 样本+390μl 样本稀释缓冲液=1:40（稀释 II）

总稀释为 1:2000（=稀释后的样本）

若复孔操作，取每种制备好的样本每孔 2 x 100μl。

## 【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
- 多道高精度移液器或连续加样枪
- 吸水纸
- 微孔板封板膜
- 恒温混合仪（25℃）
- 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（20-30℃），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 100µl 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℃ 水浴将晶体溶解。浓缩洗液在 2-8℃ 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；
- 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

在方案表上标记校准品、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) 加入校准品、质控品和已稀释的样本各 100µl 至相应微孔中。
- 2) 用封板膜将微孔板孔封好，在 25℃ 恒温混合仪上以 300 rpm 的频率孵育 1 小时。
- 3) 倒掉孔内液体，用工作洗液 250µl/孔，洗板 5 次，在进入下一步前，在吸水纸上拍打倒置的板以除去多余的洗液。
- 4) 每孔加入酶结合物 100µl。
- 5) 用封板膜将微孔板孔封好，在 25℃ 恒温混合仪上以 300 rpm 的频率孵育 1 小时。
- 6) 倒掉孔内液体，用工作洗液 250µl/孔，洗板 5 次，在进入下一步前，在吸水纸上拍打倒置的板以除去多余的洗液。
- 7) 每孔加入底物 100µl。
- 8) 室温（20-30℃）下避光孵育 10-15 分钟\*。
- 9) 每孔加入终止液 100µl，混匀。
- 10) 立刻读取 450nm（参考波长 620nm 或 690nm）波长处的吸光度。如果没有合适的参考波长，仅读取 450nm 波长处的吸光度。如果最高校准品的 OD 值超出酶标仪的测量范围，立刻读取 405nm（参考波长 620nm）处的吸光度。

\*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；
- 不同试剂的瓶盖或瓶塞不可混用；
- 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】

以下计算方法可用于计算结果，建议使用“4参数”计算。

##### 1. 4参数

建议以OD值作为线性纵坐标，浓度作为对数横坐标。如

采用对数横坐标，0校准品必须指定一个小于1的值（例如0.001）。

##### 2. 点对点

建议以OD值作为线性纵坐标，浓度作为线性横坐标。

##### 3. Spline曲线

建议以OD值作为线性纵坐标，浓度作为线性横坐标。

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，需手动计算重复值。

#### EDTA血浆和血清样本

获得的EDTA血浆和血清样本中的利妥昔浓度必须乘以稀释因子2000才能得到实际浓度。结果值的单位为ng/ml。除以1000，转换为µg/ml。

如果使用了其他稀释因子，获得的结果必须乘以使用的稀释因子。

#### 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】

样本浓度超过测量范围的，需进一步稀释后重新实验。

计算结果时，请考虑更高的稀释比例。

样本浓度低于测量范围的，无法明确量化。

测量范围上限：

校准曲线的最高浓度 x 使用的样本稀释因子

$250\text{ng/ml} * 2000 = 500000\text{ng/ml} = 500\mu\text{g/ml}$

测量范围下限：

（定量限）LoQ x 使用的样本稀释因子

$2.54\text{ng/ml} * 2000 = 5080\text{ng/ml} = 5.080\mu\text{g/ml}$

#### 【产品性能指标】

##### 灵敏度分析

以下值是根据校准曲线估算的，没有考虑可能使用的样本稀释因子。

（空白限）LoB=1.59ng/ml

（检测限）LoD=2.54ng/ml

（定量限）LoQ=2.54ng/ml

根据 CLSI 指南 EP-17-A2 进行评估。LoQ 的特定精度目标是 20% CV。

##### 准确度——精密度

重复性（批内测定）；n=32

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[µg/ml]	CV[%]
1	38.96	2.9
2	210.15	7.2

可重现性（批间测定）；n=24

可重现性在不同参数下采用 2 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[µg/ml]	CV[%]
1	38.99	9.4
2	231.42	9.6

##### 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，将已知浓度的利妥昔单抗添加到 4 种不同的血清样本中。

样本 [µg/ml]	加标 [µg/ml]	预期值 [µg/ml]	测量值 [µg/ml]	回收率 [%]
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
阴性	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
阴性	5.0	5.0	5.6	112.0
	7.5	7.5	8.6	114.7
	10.0	10.0	11.2	112.0

### 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 个不同的血清样本进行连续稀释，以评估线性。

对于血清和血浆中的利妥昔单抗，已证明该方法在 3.6-91.2ng/ml 之间呈线性关系，该区间内非线性行为小于 ±20%。以下值是根据校准曲线的浓度估算的，不考虑可能使用的稀释因子。

样本	稀释比例	预期值 (µg/ml)	测量值 (µg/ml)	回收率 (%)
1	1:500	91.2	91.2	100.00
	1:1000	43.6	43.5	99.89
	1:2000	21.8	21.1	96.90
	1:4000	10.9	9.4	86.34
	1:6000	7.3	7.1	97.82
	1:8000	5.4	5.6	102.87
	1:10000	4.4	4.5	103.33
	1:12000	3.6	4.2	115.73
2	1:4000	76.6	76.6	100.00
	1:8000	36.4	33.3	91.48
	1:12000	24.3	22.0	90.66
	1:16000	18.2	16.3	89.56
	1:20000	14.6	13.5	92.72
	1:24000	12.1	11.8	97.25
	1:30000	9.7	9.4	96.84
	1:32000	9.1	9.0	98.90
3	1:1000	62.8	62.8	100.00
	1:2000	30.3	30.6	101.16
	1:4000	15.1	15.9	105.12
	1:6000	10.1	10.1	100.17
	1:8000	7.6	7.7	101.82
	1:10000	6.1	6.2	102.48
	1:16000	3.8	4.3	113.72

### 【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. 试剂含有叠氮化钠或者 ProClin 做为杀菌剂。叠氮化钠和 ProClin 对健康和环境有害。用于酶显色反应的底物也会引起皮肤和/或呼吸道刺激。应避免与物质接触。
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*®是本公司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. 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.

### 【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		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: +49 6251 70190-0 传真: +49 6251 70190-363  
 邮箱: info@immundiagnostik.com  
 网址: [www.immundiagnostik.com](http://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!**