






KRIBIOLISA™ Anti-Alemtuzumab ELISA

REF : KBI2012

Ver 3.0

IVD

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Anti-Alemtuzumab in serum, plasma and cell culture supernatant

IVD	For In-Vitro Diagnostic Use	REF	Catalog Number
	Store At	LOT	Batch Code
	Manufactured By		Biological Risk
	Expiry Date		Consult Operating Instructions

For In-Vitro Diagnostic Use Only. Purchase does not include or carry the right to resell or transfer this product either as a stand-alone product or as a component of another product. Any use of this product other than the permitted use without the express written authorization of KRISHGEN BioSystems is strictly prohibited.



REF KBI2012

 96 tests



KRISHGEN BioSystems

Unit Nos#318/319, Shah & Nahar,
Off Dr E Moses Road, Worli, Mumbai 400018.
Tel: 91 (22) 49198700 | Email: sales@krishgen.com
<http://www.krishgen.com>

EC REP

MDSS GmbH, Schiffgraben 41, 30175 Hannover, Germany
www.krishgen.com

English Instructions	Pages 3 - 9
French Instructions	Pages 10 - 17
German Instructions	Pages 18 - 25
Spanish Instructions	Pages 26 - 33

Introduction:

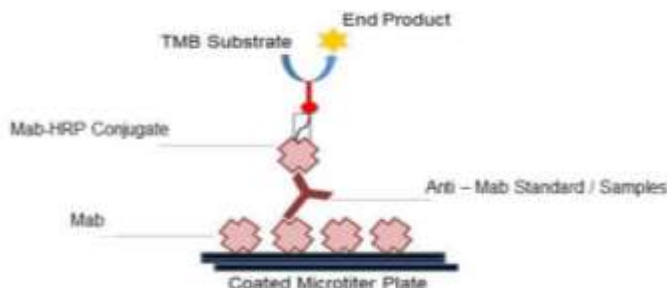
Alemtuzumab is a fusion protein produced by recombinant DNA. It fuses the TNF receptor to the constant end of the IgG1 antibody. First, the developers isolated the DNA sequence that codes the human gene for soluble TNF receptor 2, which is a receptor that binds to TNF α . Second, they isolated the DNA sequence that codes the human gene for the Fc end of immunoglobulin G1 (IgG1). Third, they linked the DNA for TNF receptor 2 to the DNA for IgG1 Fc. Finally, they expressed the linked DNA to produce a protein that links the protein for TNF receptor 2 to the protein for IgG1 Fc. It has U.S. F.D.A. approval to treat rheumatoid, juvenile rheumatoid and psoriatic arthritis, plaque psoriasis and ankylosing spondylitis. TNF α is the "master regulator" of the inflammatory (immune) response in many organ systems. Anti-Drug Antibodies (ADA) may induce unwanted side effects in biopharmaceuticals. Hence, ADA has been subjected to increase in scrutiny by the regulatory authorities using immunogenicity safety studies. ADA has been observed in pre-clinical and clinical studies, resulting in significant changes in toxicology, pharmacokinetics and efficacy. These effects result from the generation of drug-induced (neutralizing) autoantibodies against Alemtuzumab and can be responsible for allergic reaction, or even anaphylactic shock. This ELISA kit detects antibodies for Anti-Alemtuzumab and may be used for monitoring immunogenicity.

Intended Use:

The KRIBIOLISA™ Anti-Alemtuzumab ELISA is used as an analytical tool for quantitative determination of Anti-Alemtuzumab in serum, plasma and cell culture supernatant.

Principle:

The method employs the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. Alemtuzumab is pre-coated onto microwells. Samples and standards are pipetted into microwells and antibodies to Alemtuzumab present in the sample are bound by the capture antibody. Then, a HRP (horseradish peroxidase) conjugated Alemtuzumab is pipetted and incubated. After washing microwells in order to remove any non-specific binding, the ready to use substrate solution (TMB) is added to microwells and color develops proportionally to the amount of Anti-Alemtuzumab in the sample. Color development is then stopped by addition of stop solution. Absorbance is measured at 450 nm.

**Materials Provided:**

1. Alemtuzumab Coated Microtiter Plate (12x8 wells) – 1 no
2. Anti-Alemtuzumab Standard, (0.5 ml/vial) – 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 and 640 ng/ml
3. Alemtuzumab:HRP Conjugate – 12 ml
4. Assay Diluent – 6 ml
5. Sample Diluent – 50 ml
6. Wash Buffer (20X) – 25 ml
7. TMB Substrate – 12 ml
8. Stop Solution – 12 ml
9. Instruction Manual

Materials to be provided by the End-User:

1. Microtiter Plate Reader able to measure absorbance at 450 nm.
2. Adjustable pipettes and multichannel pipettor to measure volumes ranging from 25 μ l to 1000 μ l
3. Deionized (DI) water
4. Wash bottle or automated microplate washer

5. Semi-Log graph paper or software for data analysis
6. Timer
7. Absorbent Paper

Handling/Storage:

1. All reagents should be stored at 2°C to 8°C for stability.
2. All the reagents and wash solutions should be used within 12 months from manufacturing date.
3. Before using, bring all components to room temperature (18-25°C). Upon assay completion ensure all components of the kit are returned to appropriate storage conditions.
4. The Substrate is light-sensitive and should be protected from direct sunlight or UV sources.

Health Hazard Warnings:

1. Reagents that contain preservatives may be harmful if ingested, inhaled or absorbed through the skin.
2. For In-Vitro Diagnostic Use Only.

**Sample Preparation and Storage:**

Blood is taken by venipuncture. Serum is separated after clotting by centrifugation. Plasma can be used, too. Lipaemic, hemolytic or contaminated samples should not be run. Repeated freezing and thawing should be avoided. If samples are to be used for several assays, initially aliquot samples and keep at -20°C.

For Cell Culture Supernatant – If necessary, centrifuge to remove debris prior to analysis. Samples can be stored at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Preparation Before Use:

Allow samples to reach room temperature prior to assay. Take care to agitate patient samples gently in order to ensure homogeneity.

Test Sample preparation - Samples have to be diluted 1:10 to 1:100 (v/v), e.g. for 1:100 (5 µl sample + 495 µl sample diluent) prior to assay. The samples may be kept at 2 - 8°C for up to three days. Long-term storage requires -20°C.

Reagent Preparation (all reagents should be diluted immediately prior to use):

1. Label any aliquots made with the kit Lot No and Expiration date and store it at appropriate conditions mentioned.
2. Bring all reagents to Room temperature before use.
3. To make Wash Buffer (1X); dilute 50 ml of 20X Wash Buffer in 950 ml of DI water.

Procedural Notes:

1. In order to achieve good assay reproducibility and sensitivity, proper washing of the plates to remove excess un-reacted reagents is essential.
2. High Dose Hook Effect may be observed in samples with very high concentrations of Anti-Alemtuzumab. High Dose Hook Effect is due to excess of antibody for very high concentrations of Anti-Alemtuzumab present in the sample. High Dose Hook effect is most likely encountered from samples early in the purification process. If Hook Effect is possible, the samples to be assayed should be diluted with a compatible diluent. Thus if the Anti-Alemtuzumab concentration of the undiluted sample is less than the diluted sample, this may be indicative of the Hook Effect.
3. Avoid assay of Samples containing sodium azide (NaN_3), as it could destroy the HRP activity resulting in under-estimation of the amount of Anti-Alemtuzumab.
4. It is recommended that all Standards and Samples be assayed in duplicates.
5. Maintain a repetitive timing sequence from well to well for all the steps to ensure that the incubation timings are same for each well.
6. If the Substrate has a distinct blue color prior to use it may have been contaminated and use of such substrate can lead to compromisation of the sensitivity of the assay.

7. The plates should be read within 30 minutes after adding the Stop Solution.
8. Make a work list in order to identify the location of Standards and Samples.

Assay Procedure:

1. It is strongly recommended that all Controls and Samples be run in duplicates or triplicates. A standard curve is required for each assay. All steps must be performed at 37°C.
2. Pipette out **50 µl** of **Assay Diluent** in each well.
3. Add **100 µl** of **Standards** or **Samples** into the respective wells.
4. Cover the plate and incubate for 60 minutes at 37°C.
5. Aspirate and wash plate 4 times with **Wash Buffer (1X)** and blot residual buffer by firmly tapping plate upside down on absorbent paper. Wipe of any liquid from the bottom outside of the microtiter wells as any residue can interfere in the reading step.
6. Pipette without delay in the same order **100 µl** of **Alemtuzumab: HRP Conjugate** into each well.
7. Cover the plate and incubate for 60 minutes at 37°C.
8. Aspirate and wash plate 4 times with **Wash Buffer (1X)** and blot residual buffer by firmly tapping plate upside down on absorbent paper. Wipe of any liquid from the bottom outside of the microtiter wells as any residue can interfere in the reading step.
9. Add **100 µl** of **TMB Substrate** in each well.
10. Incubate the plate at **37°C** for 15 minutes in dark. DO NOT SHAKE or else it may result in higher backgrounds and worse precision. Positive wells should turn bluish in color.
11. Pipette out **100 µl** of **Stop Solution**. Wells should turn from blue to yellow in color.
12. Read the absorbance at 450 nm with a microplate reader.

Calculation of Results:

Determine the Mean Absorbance for each set of duplicate or triplicate Standards and Samples. Using Semi-Log graph paper, plot the average value (absorbance 450nm) of each standard on the Y-axis versus the corresponding concentration of the standards on the X-axis. Draw the best fit curve through the standard points. To determine the unknown Anti- Alemtuzumab concentrations, find the unknown's Mean Absorbance value on the Y-axis and draw a horizontal line to the standard curve. At the point of intersection, draw a vertical line to the X-axis and read the Anti-Alemtuzumab Concentration. If samples were diluted, multiply by the appropriate dilution factor. Software which is able to generate a cubic spline curve-fit is best recommended for automated results.

Note:

It is recommended to repeat the assay at a different dilution factor in the following cases:

- If the sample absorbance value is below the first standard.
- If the absorbance value is equivalent or higher than the 640 ng/ml standard.

Quality Control:

It is recommended that for each laboratory assay appropriate quality control samples in each run to be used to ensure that all reagents and procedures are correct.

Performance Characteristics of the Kit:

This kit has been validated as per EMA/FDA guidelines in line with ICH Code for Harmonization of Biological Assays.

Sensitivity:

Limit Of Detection: It is defined as the lowest detectable concentration corresponding to a signal of Mean of '0' standard plus 2* SD.
10 replicates of '0' standards were evaluated and the LOD was found to be less than 10 ng/ml

Linearity:

Standards provided in the kit will be used for measuring the linearity range of Anti-Alemtuzumab present in matrix.

Precision:

Precision is defined as the percent coefficient of variation (%CV) i.e. standard deviation divided by the mean and multiplied by 100. Assay precision was determined by both intra (n=5 assays) and inter assay (n=5 assays) reproducibility on two pools with low (10ng/ml), medium (80ng/ml) and high (640ng/ml) concentrations. While actual precision may vary from laboratory to laboratory and technician to technician, it is recommended that all operators achieve precision below these design goals before reporting results.

Pool	Intra Assay %CV	Inter Assay %CV
Low	<10%	<10%
Medium	<5%	<5%
High	<5%	<5%

Limitations of Method

Healthy individuals should be tested negative by the Anti-Alemtuzumab. Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. Physicians are suggested to consider all clinical and laboratory findings possible to state a diagnosis.

Safety Precautions:

- **This kit is for in vitro use only.** Follow the working instructions carefully.
- The expiration dates stated on the kit are to be observed. The same relates to the stability stated for reagents
- Do not use or mix reagents from different lots.
- Do not use reagents from other manufacturers.
- Avoid time shift during pipetting of reagents.
- All reagents should be kept in the original shipping container.
- Some of the reagents contain small amount of sodium azide (< 0.1 % w/w) as preservative. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucosa.
- Source materials maybe derived from human body fluids or organs used in the preparation of this kit were tested and found negative for HBsAg and HIV as well as for HCV antibodies. However, no known test guarantees the absence of such viral agents. Therefore, handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.
- Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should be observed
 - Do not smoke, eat or drink while handling kit material
 - Always use protective gloves
 - Never pipette material by mouth
 - Wipe up spills promptly, washing the affected surface thoroughly with a decontaminant.
- In any case GLP should be applied with all general and individual regulations to the use of this kit.



References:

Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia P Hillmen, AB Skotnicki, T Robak, B Jaksic... - Journal of Clinical ..., 2007 - ascopubs.org

Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. MJ Keating, I Flinn, V Jain, JL Binet, P Hillmen, J Byrd... - Blood, 2002 - Am Soc Hematology.

Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. CAMMS223 Trial Investigators - New England Journal of ..., 2008 - Mass Medical Soc.

Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia ... J Lundin, E Kimby, M Björkholm, PA Broliden... - Blood, 2002 - Am Soc Hematology

Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomized controlled phase 3 trial. JA Cohen, AJ Coles, DL Arnold, C Confavreux, EJ Fox... - The Lancet, 2012 - Elsevier

Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. AJ Coles, CL Twyman, DL Arnold, JA Cohen... - The Lancet, 2012 - Elsevier.

Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. G Lozanski, NA Heerema, IW Flinn, L Smith... - Blood, 2004 - Am Soc Hematology

Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the ...S Stilgenbauer, T Zenz, D Winkler, A Bühler... - Journal of Clinical ..., 2009 - ascopubs.org

Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival ... P Moreton, B Kennedy, G Lucas, M Leach... - Journal of Clinical ..., 2005 - journal.9med.net

Results from a human renal allograft tolerance trial evaluating the humanized CD52-specific monoclonal antibody alemtuzumab (CAMPATH-1H). AD Kirk, DA Hale, RB Mannon, DE Kleiner... - ..., 2003 - journals.lww.com

SCHEMATIC ASSAY PROCEDURE

1. Remove all components, 30 minutes before adding into the assay plate.

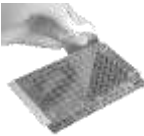




2. Avoid repeated cool-thaw of the components as there will be a loss of activity and this can affect the results.




3.  Pipette **50 µl Assay Diluent** into each well.


4.  Pipette **100 µl Standards / Samples** into the respective wells.

5.  Cover plate and incubate for  at 37°C.



6.  Aspirate and wash wells 4 times with **Wash Buffer (1X)**.

7.  Pipette **100 µl Alemtuzumab:HRP** into each well.

8.  Cover plate and incubate for  at 37°C.

9.  Aspirate and wash wells 4 times with **Wash Buffer (1X)**.

10.  Pipette **100 µl TMB Substrate** into each well.

11.  Cover plate and incubate for  at 37°C.

12.  Pipette **100 µl Stop Solution** into each well.

13. Read absorbance at 450nm with a  microplate reader within  of stopping reaction.

Typical Example of a Work List

Well #	Contents	Absorbance at 450nm	Mean Absorbance	ng/ml Anti-Alemtuzumab equivalent
1A 2A	zero std zero std			
1B 2B	10 ng/ml 10 ng/ml			
1C 2C	20 ng/ml 20 ng/ml			
1D 2D	40 ng/ml 40 ng/ml			
1E 2E	80 ng/ml 80 ng/ml			
1F 2F	160 ng/ml 160 ng/ml			
1G 2G	320 ng/ml 320 ng/ml			
1H 2H	640 ng/ml 640 ng/ml			
3A 4A	Sample			
3B 4B	Sample			

LIMITED WARRANTY

Krishgen Biosystems does not warrant against damages or defects arising in shipping or handling, or out of accident or improper or abnormal use of the Products; against defects in products or components not manufactured by Krishgen Biosystems, or against damages resulting from such non-Krishgen Biosystems made products or components. Krishgen Biosystems passes on to customer the warranty it received (if any) from the maker thereof of such non Krishgen made products or components. This warranty also does not apply to Products to which changes or modifications have been made or attempted by persons other than pursuant to written authorization by Krishgen Biosystems.

THIS WARRANTY IS EXCLUSIVE. The sole and exclusive obligation of Krishgen Biosystems shall be to repair or replace the defective Products in the manner and for the period provided above. Krishgen Biosystems shall not have any other obligation with respect to the Products or any part thereof, whether based on contract, tort, and strict liability or otherwise. Under no circumstances, whether based on this Limited Warranty or otherwise, shall Krishgen Biosystems be liable for incidental, special, or consequential damages.

This Limited Warranty states the entire obligation of Krishgen Biosystems with respect to the Products. If any part of this Limited Warranty is determined to be void or illegal, the remainder shall remain in full force and effect.

Krishgen Biosystems. 2018

THANK YOU FOR USING KRISHGEN PRODUCT!






KRIBIOLISA™ Anti-Alemtuzumab ELISA

REF : KBI2012

Ver 3.0

IVD

Dosage immuno-enzymatique pour la détermination quantitative de l'Anti- Alemtuzumab dans le surnageant de cultures de sérum, de plasma et de cellules

IVD	Pour l'usage Diagnostic In Vitro	REF	Numéro de catalogue
	Conserver à la	LOT	Code du lot
	Fabriqué par		Risque biologique
	Date d'Expiration		Consulter le mode d'emploi

Réservé à l'usage Diagnostique In Vitro. L'achat n'inclut ni ne confère le droit de revendre ou de transférer ce produit, en tant que produit autonome ou en tant que composant d'un autre produit. Toute utilisation de ce produit autre que celle autorisée sans l'autorisation écrite expresse de KRISHGEN BioSystems est strictement interdite.



REF KBI2012

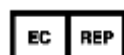


96 tests



KRISHGEN BioSystems

Unit Nos#318/319, Shah & Nahar,
Off Dr E Moses Road, Worli, Mumbai 400018.
Tel: 91 (22) 49198700 | Email: sales@krishgen.com
<http://www.krishgen.com>



MDSS GmbH, Schiffgraben 41, 30175 Hannover, Germany

Introduction:

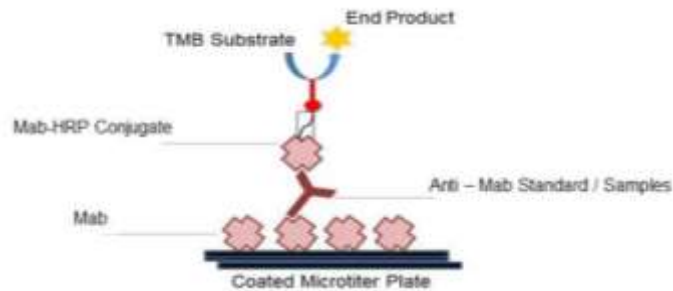
L'Alemtuzumab est un médicament utilisé dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), du lymphome cutané à cellules T (CTCL) et du lymphome à cellules T sous les dénominations commerciales Campath, MabCampath et Campath-1H, ainsi que dans le traitement de la sclérose en plaques comme Lemtrada. Il est également utilisé dans certains schémas thérapeutiques pour la greffe de moelle osseuse, la greffe de rein et la greffe de cellules d'îlots. C'est un anticorps monoclonal qui se lie à CD52, une protéine présente à la surface des lymphocytes matures, mais pas aux cellules souches à partir desquelles ces lymphocytes sont dérivés. Après traitement par alemtuzumab, ces lymphocytes porteurs de CD52 sont ciblés pour être détruits. MabCampath a été retiré des marchés américain et européen en 2012 pour se préparer à une relance plus onéreuse de Lemtrada destinée à lutter contre la sclérose en plaques. Des anticorps anti-médicament (ADA) ont été observés dans des études précliniques et cliniques, entraînant des modifications significatives de la toxicologie, de la pharmacocinétique et de l'efficacité. Ces effets résultent de la génération d'auto-anticorps (neutralisants) induits par le médicament anti-Alemtuzumab et peuvent être responsables de réactions allergiques, voire de choc anaphylactique. Ce kit ELISA détecte les anticorps anti-Alemtuzumab et peut être utilisé pour surveiller l'immunogénicité.

Utilisation prévue:

Le test KRIBIOLISA™ Anti-Alemtuzumab ELISA est utilisé comme outil d'analyse pour la détermination quantitative de l'Anti-Alemtuzumab dans le surnageant de cultures de sérum, de plasma et de cellules.

Principe:

Le procédé utilise la technique de dosage immunoenzymatique en sandwich quantitative. L'Alemtuzumab est pré-enduit sur des micropuits. Les échantillons et les standards sont introduits à la pipette dans des micropuits et les anticorps anti-Alemtuzumab présents dans l'échantillon sont liés par l'anticorps de capture. Ensuite, un Alemtuzumab conjugué à la HRP (peroxydase de raifort) est pipeté et incubé. Après avoir lavé les micropuits pour éliminer toute liaison non spécifique, la solution de substrat prête à l'emploi (TMB) est ajoutée aux micropuits et la couleur se développe proportionnellement à la quantité d'Anti-Alemtuzumab présente dans l'échantillon. Le développement de la couleur est ensuite arrêté par addition de solution d'arrêt. L'absorbance est mesurée à 450 nm.

**Matériaux fournis:**

1. Plaque de microtitration enrobée Alemtuzumab (12 x 8 puits) - 1
2. Anti-Alemtuzumab Standard, (0,5 ml / flacon) - 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 et 640 ng/ml
3. Alemtuzumab: Conjugué HRP - 12 ml
4. Diluant de dosage - 6 ml
5. Diluant d'échantillon - 50 ml
6. Tampon de lavage (20X) - 25 ml
7. Substrat TMB - 12 ml
8. Solution d'arrêt - 12 ml
9. Manuel d'instructions

Matériel à fournir par l'utilisateur final:

1. Lecteur de microplaques capable de mesurer l'absorbance à 450 nm.
2. Pipettes réglables et pipettes multicanaux pour mesurer des volumes allant de 25 µl à 1000 µl

3. Eau déminéralisée (DI)
4. Laver le flacon ou le lave-linge automatique
5. Papier graphique semi-log ou logiciel pour l'analyse de données
6. Minuterie
7. Papier absorbant

Traitement / Conservation:

1. Tous les réactifs doivent être conservés entre 2°C et 8°C pour la stabilité.
2. Tous les réactifs et solutions de lavage doivent être utilisés dans les 12 mois suivant la date de fabrication.
3. Avant utilisation, amener tous les composants à la température ambiante (18-25°C). Une fois le test terminé, assurez-vous que tous les composants du kit sont remis dans des conditions de conservations appropriées.
4. Le substrat est sensible à la lumière et doit être protégé de la lumière directe du soleil ou des sources UV.

Avertissements de danger pour la santé:

1. Les réactifs contenant des conservateurs peuvent être nocifs s'ils sont ingérés, inhalés ou absorbés par la peau.
2. Réservé à l'usage diagnostique in vitro.

**Préparation et conservation des échantillons:**

Le sang est prélevé par ponction veineuse. Le sérum est séparé après coagulation par centrifugation. Le plasma peut aussi être utilisé. Les échantillons lipémiques, hémolytiques ou contaminés ne doivent pas être analysés. Les congélations et décongélations répétées doivent être évitées. Si des échantillons doivent être utilisés pour plusieurs tests, commencez par des aliquotes et maintenez-les à -20°C.

Pour le surnageant de culture cellulaire - Si nécessaire, centrifuger pour éliminer les débris avant l'analyse. Les échantillons peuvent être conservés à -20°C ou -80°C. Évitez les cycles répétés de congélation / décongélation.

Préparation avant utilisation:

Laisser les échantillons atteindre la température ambiante avant le dosage. Veillez à agiter doucement les échantillons de patients afin d'assurer leur homogénéité.

Préparation des échantillons de test - Les échantillons doivent être dilués au 1 :10 à 1 :100e (v/v), par ex. Pour 1 :100 (5 µl d'échantillon + 495 µl de diluant pour échantillon) avant le dosage. Les échantillons peuvent être conservés entre 2 et 8°C pendant trois jours maximum. La conservation à long terme nécessite -20°C.

Préparation des réactifs (tous les réactifs doivent être dilués immédiatement avant utilisation):

1. Étiquetez toutes les parties aliquotes faites avec le numéro de lot et la date de péremption du kit et conservez-la dans les conditions appropriées mentionnées.
2. Amenez tous les réactifs à la température ambiante avant utilisation.
3. Préparer le tampon de lavage (1X); diluer 50 ml de tampon de lavage 20X dans 950 ml d'eau désionisée.

Notes de procédure:

1. Pour obtenir une bonne reproductibilité et sensibilité du test, il est essentiel de bien laver les plaques afin d'enlever les réactifs en excès qui n'ont pas réagi.
2. Des effets de crochet à forte dose peuvent être observés dans des échantillons contenant de très fortes concentrations d'Anti-Alemtuzumab. L'effet crochet à haute dose est dû à un excès d'anticorps pour de très fortes concentrations d'Anti-Alemtuzumab présent dans l'échantillon. L'effet Crochet à forte dose est très probablement rencontré dans les échantillons au début du processus de purification. Si l'effet crochet est possible, les échantillons à analyser doivent être dilués avec un diluant compatible. Ainsi, si la concentration en Anti-Alemtuzumab de l'échantillon non dilué est inférieure à celle de l'échantillon dilué, cela peut indiquer l'effet Crochet.
3. Évitez de doser des échantillons contenant de l'azide de sodium (NaN₃), car cela pourrait détruire l'activité de la HRP et entraîner une sous-estimation de la quantité d'Anti-Alemtuzumab.
4. Il est recommandé que tous les étalons et échantillons soient analysés en double.
5. Maintenez une séquence de synchronisation répétitive de puits en puits pour toutes les étapes afin de vous assurer que les périodes d'incubation sont les mêmes pour chaque puits.

6. Si le substrat a une couleur bleue distincte avant utilisation, il peut avoir été contaminé et l'utilisation de ce substrat peut compromettre la sensibilité du test.
7. Les plaques doivent être lues dans les 30 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt.
8. Faites une liste de travail afin d'identifier l'emplacement des normes et des échantillons.

Procédure de dosage:

1. Il est fortement recommandé que tous les contrôles et échantillons soient exécutés en double ou en triple. Une courbe standard est requise pour chaque test. Toutes les étapes doivent être effectuées à la 37°C.
2. Pipeter **50 µl** de **diluant de dosage** dans chaque puits.
3. Ajouter **100 µl** d'**étalons** ou d'**échantillons** dans les puits respectifs.
4. Couvrir la plaque et incubé pendant 60 minutes à la 37°C.
5. Aspirer et laver la plaque 4 fois avec le **tampon de lavage (1X)** et éponger le tampon résiduel en tapotant fermement la plaque à l'envers sur du papier absorbant. Essuyez tout liquide du fond à l'extérieur des puits de la microtitration, car tout résidu peut interférer dans l'étape de lecture.
6. Pipeter sans délai, dans le même ordre, **100 µl** de **conjugué Alemtuzumab: HRP** dans chaque puits.
7. Couvrir la plaque et incubé pendant 60 minutes à 37°C.
8. Aspirer et laver la plaque 4 fois avec le **tampon de lavage (1X)** et éponger le tampon résiduel en tapotant fermement la plaque à l'envers sur du papier absorbant. Essuyez tout liquide du fond à l'extérieur des puits de la microtitration, car tout résidu peut interférer dans l'étape de lecture.
9. Ajouter **100 µl** de **substrat TMB** dans chaque puits.
10. Incuber la plaque à 37°C pendant 15 minutes dans l'obscurité. NE PAS AGITER, sinon cela pourrait entraîner des arrières-plans plus grands et une moins bonne précision Les puits positifs doivent virer au bleuâtre.
11. Pipeter **100 µl** de **solution d'arrêt**. Les puits devraient passer du bleu au jaune.
12. Lire l'absorbance à 450 nm avec un lecteur de microplaques.

Calcul des résultats:

Déterminez l'absorbance moyenne pour chaque ensemble d'étalons et d'échantillons en double ou en triple. En utilisant du papier quadrillé Semi-Log, tracez la valeur moyenne (absorbance 450 nm) de chaque standard sur l'axe des Y par rapport à la concentration correspondante des standards sur l'axe des X. Tracez la courbe de meilleur ajustement à travers les points standard. Pour déterminer les concentrations inconnues d'Anti-Alemtuzumab, recherchez la valeur d'absorbance moyenne de l'inconnue sur l'axe des Y et tracez une ligne horizontale vers la courbe standard. Au point d'intersection, tracez une ligne verticale sur l'axe des X et lisez la concentration en Anti-Alemtuzumab. Si les échantillons ont été dilués, multiplier par le facteur de dilution approprié. Un logiciel capable de générer une courbe de spline cubique est le mieux recommandé pour obtenir des résultats automatisés.

Remarque:

Il est recommandé de répéter le test à un facteur de dilution différent dans les cas suivants:

- Si la valeur de l'absorbance de l'échantillon est inférieure au premier standard.
- Si la valeur d'absorbance est équivalente ou supérieure au standard de 640 ng/ml.

Contrôle de qualité:

Il est recommandé que, pour chaque test de laboratoire, des échantillons de contrôle de la qualité appropriés soient utilisés lors de chaque analyse pour garantir que tous les réactifs et procédures sont corrects.

Caractéristiques de performance du kit:

Ce kit a été validé conformément aux directives EMA / FDA et au code d'harmonisation des tests biologiques de l'ICH.

Sensibilité:

Limite de détection: Elle est définie comme la concentration détectable la plus basse correspondant à un signal de moyenne égale à «0» standard plus 2 * SD.

10 répétitions d'étalons «0» ont été évaluées et la limite de détection était inférieure à 10 ng / ml

Linéarité:

Les normes fournies dans le kit seront utilisées pour mesurer la plage de linéarité de l'Anti-Alemtuzumab présent dans la matrice.

Précision:

La précision est définie comme le coefficient de variation en pourcentage (% CV), c'est-à-dire l'écart type divisé par la moyenne et multiplié par 100. La précision du test a été déterminée à la fois par la reproductibilité intra (n = 5 tests) et entre les tests (n = 5 tests) sur deux pools (mares) avec des concentrations faibles (10 ng/ml), moyennes (80 ng/ml) et élevées (640 ng/ml). Bien que la précision réelle puisse varier d'un laboratoire à l'autre et d'un technicien à l'autre, il est recommandé à tous les opérateurs d'atteindre une précision inférieure à ces objectifs de conception avant de communiquer les résultats.

Pool	Test Intra %CV	Test Inter %CV
Faible	<10%	<10%
Moyen	<5%	<5%
Haute	<5%	<5%

Limites de la méthode

Les personnes en bonne santé doivent être testées négatives par l'Anti-Alemtuzumab. Tout diagnostic clinique ne doit pas être basé sur les résultats de méthodes de diagnostic in vitro uniquement. Les médecins sont invités à prendre en compte toutes les découvertes cliniques et de laboratoire permettant d'établir un diagnostic.

Précautions de sécurité:

- **Ce kit est uniquement destiné à une utilisation in vitro.** Suivez attentivement les instructions de travail.
- Les dates de péremption indiquées sur le kit doivent être respectées. La même chose concerne la stabilité indiquée pour les réactifs.
- Ne pas utiliser ou mélanger les réactifs de lots différents.
- N'utilisez pas de réactifs d'autres fabricants.
- Évitez les décalages horaires lors du pipetage des réactifs.
- Tous les réactifs doivent être conservés dans le conteneur d'expédition original.
- Certains réactifs contiennent une petite quantité d'azoture de sodium (<0,1% p/p) comme conservateur. Ils ne doivent pas être avalés ou autorisés à entrer en contact avec la peau ou les muqueuses.
- Les matériaux sources pouvant provenir de fluides corporels humains ou d'organes utilisés dans la préparation de ce kit ont été testés et se sont révélés négatifs pour HBsAg et VIH ainsi que pour les anticorps anti-VHC. Cependant, aucun test connu ne garantit l'absence de tels agents viraux. Par conséquent, manipulez tous les composants et tous les échantillons de patients comme s'ils étaient potentiellement dangereux.
- Étant donné que le kit contient des matériaux potentiellement dangereux, les précautions suivantes doivent être observées :
 - Ne pas fumer, manger ou boire pendant la manipulation du matériel
 - Toujours utiliser des gants de protection
 - Ne jamais pipeter le produit à la bouche
 - Essuyez rapidement les éclaboussures en lavant soigneusement la surface affectée avec un décontaminant.



- Dans tous les cas, les BPL doivent être appliqués à toutes les réglementations générales et individuelles relatives à l'utilisation de ce kit.

Références:

Un traitement anti-TNF et le risque d'infections graves chez une cohorte de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde : Comparaison de l'adalimumab, étanercept et l'Alemtuzumab dans le GISEA... Atzeni F P Sarzi-Puttini, C Botsios, un Carletto... - auto-immunité..., 2012 - Elsevier.

Harmonisation des essais de l'Alemtuzumab et de l'Anti-Alemtuzumab facilite la comparaison entre les initiateurs et les biosimilaires dans des échantillons cliniques

La E correspondant à un Gils, T Van Stappen, Dreesen... - inflammatoires de l'intestin..., 2016 - academic.oup.com.

Prémédication hydrocortisone intraveineuse réduit les anticorps Anti-Alemtuzumab dans la maladie de Crohn : une épreuve commandée randomisée procès RJ Farrell, M Alsahli, YT Jeen, KR Falchuk... - gastroentérologie, 2003 - Elsevier

Mesure d'ATI et l'Alemtuzumab. ATI et l'Alemtuzumab ELISA quantitative tests immunologiques. (Prometheus Laboratories, Inc., San Diego, Californie) a eu lieu aveuglement en double sur les sérums et mesurée comme décrit plus haut. 9 chercheurs.

Augmente l'efficacité de l'Alemtuzumab associé au méthotrexate dans la spondylarthrite ankylosante VC Pérez-Guijo, AR Cravo, M del Carmen Castro... - Joint Bone Spine, 2007 - Elsevier.

Utilité clinique du lambda anti axée sur la chaîne-immuno enzymatique (ELISA) versus double antigène ELISA pour la détection des Anti-Alemtuzumab... U Kopylov, Y Mazor, M Yavzori, E Fudim... - inflammatoires de l'intestin..., 2012 - academic.oup.com

Thérapie (TNF) dans la polyarthrite rhumatoïde : corrélation entre niveau de sérum de TNF-alpha à la réponse clinique et de prestations de modifier la dose ou la fréquence de l'Anti-Alemtuzumab. AF el jaouhari, SN Misra, NI Abdou - cliniques et..., 2005 - pdfs.semanticscholar.org

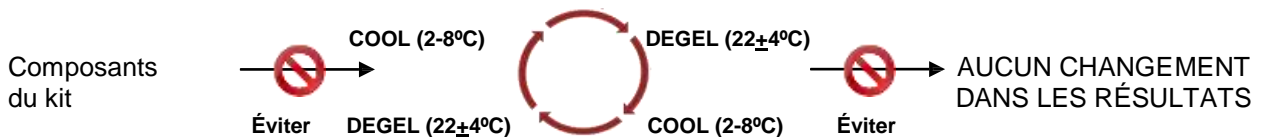
Détection de l'Alemtuzumab dans le lait maternel des mères allaitantes avec maladies inflammatoires de l'intestin. S Ben-Horin, M Yavzori, U Kopylov... - Journal du Crohn..., 2012 - academic.oup.com

MODE OPERATOIRE SCHÉMATIQUE

1. Retirez tous les composants, 30 minutes avant de les ajouter à la plaque de dosage.

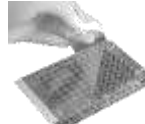




2. Évitez les cycles répétés de décongélation à froid des composants car il y aurait une perte d'activité et cela pourrait affecter les résultats.



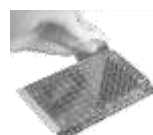

3.  Pipetter **50 µl diluant de dosage** dans chaque puit.


4.  Pipeter **100 µl de standards / échantillons** dans les puits respectifs.

5. Couvrir la plaque  et **Incuber** pendant  à 37°C.

6.  Aspirer et laver les puits 4 fois avec le **Tampon de Lavage (1X)**.

7.  Pipetter **100 µl Alemtuzumab:HRP** dans chaque puits.

8. Couvrir la plaque  et **Incuber** pendant  à 37°C.

9.  Aspirer et laver les puits 4 fois avec le **Tampon de Lavage (1X)**.

10.  Pipetter **100 µl Substrat TMB** dans chaque puits.

11. Couvrir la plaque  et **Incuber** pendant  à 37°C.

12.  Pipetter **100 µl de Solution d'arrêt** dans chaque puits.

13. Lire l'absorbance à 450 nm avec un lecteur  dans les  de la réaction d'arrêt.

Exemple typique d'une liste de travail

Puits#	Contenu	Absorbance à 450 nm	Absorbance moyenne	équivalent d'Anti-Alemtuzumab ng/ml
1A 2A	zero std zero std			
1B 2B	10 ng/ml 10 ng/ml			
1C 2C	20 ng/ml 20 ng/ml			
1D 2D	40 ng/ml 40 ng/ml			
1E 2E	80 ng/ml 80 ng/ml			
1F 2F	160 ng/ml 160 ng/ml			
1G 2G	320 ng/ml 320 ng/ml			
1H 2H	640 ng/ml 640 ng/ml			
3A 4A	Échantillon			
3B 4B	Échantillon			

GARANTIE LIMITÉE

Krishgen Biosystems ne garantit pas les dommages ou défauts résultant de l'expédition ou de la manutention, ou résultant d'un accident ou d'une utilisation inappropriée ou anormale des Produits; contre les défauts des produits ou composants non fabriqués par Krishgen Biosystems, ou contre les dommages résultant de tels produits ou composants non fabriqués par Krishgen Biosystems. Krishgen Biosystems transmet au client la garantie (le cas échéant) reçue de son fabricant de tels produits ou composants non fabriqués par Krishgen. Cette garantie ne s'applique pas non plus aux produits sur lesquels des modifications ont été apportées ou tentées par des personnes autres que celles soumises à l'autorisation écrite de Krishgen Biosystems.

CETTE GARANTIE EST EXCLUSIVE. La seule et unique obligation de Krishgen Biosystems est de réparer ou de remplacer les produits défectueux de la manière et pour la période indiquées ci-dessus. Krishgen Biosystems n'a aucune autre obligation à l'égard des produits, en tout ou en partie, que ce soit sur la base d'un contrat, d'une responsabilité délictuelle, de la responsabilité sans faute ou autrement. En aucun cas, que ce soit sur la base de cette garantie limitée ou autrement, Krishgen Biosystems ne pourra être tenu responsable des dommages accessoires, spéciaux ou consécutifs.

Cette garantie limitée stipule l'entière obligation de Krishgen Biosystems en ce qui concerne les produits. Si une partie de cette garantie limitée est considérée comme nulle ou illégale, le reste restera en vigueur et de plein effet.

Biosystèmes de Krishgen. 2018

MERCI D'UTILISER LE PRODUIT KRISHGEN!






KRIBIOLISA™ Anti-Alemtuzumab ELISA

REF : KBI2012

Ver 3.0

IVD

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Anti-Alemtuzumab in Serum, Plasma und Zellkulturüberstand

IVD	Für die In-Vitro-Diagnostik	REF	Katalognummer
	Speichern bei	LOT	Batch-Code
	Hergestellt von		Biologisches Risiko
	Verfallsdatum		Konsultieren Sie die Bedienungsanleitung

Nur zur In-Vitro-Diagnostik. Der Kauf beinhaltet nicht das Recht, dieses Produkt weiterzuverkaufen oder zu übertragen, weder als eigenständiges Produkt noch als Bestandteil eines anderen Produkts. Jegliche Verwendung dieses Produkts außer der erlaubten Verwendung ohne die ausdrückliche schriftliche Genehmigung von KRISHGEN BioSystems ist strengstens untersagt.



REF KBI2012

Σ 96 tests



KRISHGEN BioSystems Unit Nos#318/319, Shah & Nahar,
Off Dr E Moses Road, Worli, Mumbai 400018.
Tel: 91 (22) 49198700 | Email: sales@krishgen.com
<http://www.krishgen.com>

EC REP

MDSS GmbH, Schiffgraben 41, 30175 Hannover, Germany

Einführung:

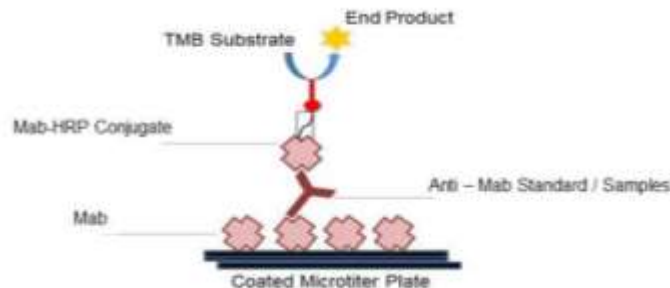
Alemtuzumab ist ein Medikament zur Behandlung von chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), kutanem T-Zell-Lymphom (CTCL) und T-Zell-Lymphom unter den Handelsnamen Campath, MabCampath und Campath-1H sowie zur Behandlung von Multipler Sklerose wie Lemtrada . Es wird auch in einigen Konditionierungsregimen für Knochenmarktransplantation, Nierentransplantation und Inselzelltransplantation verwendet. Es ist ein monoklonaler Antikörper, der an CD52 bindet, ein Protein, das auf der Oberfläche von reifen Lymphozyten vorhanden ist, jedoch nicht auf den Stammzellen, von denen diese Lymphozyten stammen. Nach der Behandlung mit Alemtuzumab sind diese CD52-tragenden Lymphozyten auf Zerstörung gerichtet. MabCampath wurde 2012 aus den Märkten in den USA und Europa zurückgezogen, um sich auf einen teureren Relaunch von Lemtrada für Multiple Sklerose vorzubereiten. Anti-Drug-Antikörper (ADA) wurden in präklinischen und klinischen Studien beobachtet, was zu signifikanten Veränderungen in der Toxikologie, Pharmakokinetik und Wirksamkeit führte. Diese Wirkungen resultieren aus der Erzeugung von Arzneimittel-induzierten (neutralisierenden) Autoantikörpern gegen Alemtuzumab und können für eine allergische Reaktion oder sogar einen anaphylaktischen Schock verantwortlich sein. Dieser ELISA-Kit erkennt Antikörper für Alemtuzumab und kann zur Überwachung der Immunogenität verwendet werden.

Verwendungszweck:

Der KRIBIOLISA™ Anti-Alemtuzumab ELISA wird als analytisches Werkzeug zur quantitativen Bestimmung von Anti-Alemtuzumab in Serum, Plasma und Zellkulturüberstand verwendet.

Prinzip:

Das Verfahren verwendet die quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik. Alemtuzumab ist auf Mikrowells vorbeschichtet. Proben und Standards werden in Mikrowells pipettiert und Antikörper gegen Alemtuzumab, die in der Probe vorhanden sind, werden durch den Fängerantikörper gebunden. Dann wird ein mit HRP (Meerrettichperoxidase) konjugiertes Alemtuzumab pipettiert und inkubiert. Nach dem Waschen der Mikroküvetten zur Entfernung von nicht-spezifischer Bindung wird die gebrauchsfertige Substratlösung (TMB) in die Mikrokavitäten gegeben und die Farbe entwickelt sich proportional zur Menge an Anti-Alemtuzumab in der Probe. Die Farbentwicklung wird dann durch Zugabe von Stopplösung gestoppt. Die Extinktion wird bei 450 nm gemessen.



Materialien zur Verfügung gestellt:

1. Alemtuzumab-beschichtete Mikrotiterplatte (12x8 Wells) - 1 Stück
2. Anti-Alemtuzumab Standard, (0,5 ml / Fläschchen) - 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 und 640 ng/ml
3. Alemtuzumab: HRP-Konjugat - 12 ml
4. Testverdünnungsmittel - 6 ml
5. Probenverdünnungsmittel - 50 ml
6. Waschpuffer (20X) - 25 ml
7. TMB Substrat - 12 ml
8. Stopplösung - 12 ml
9. Bedienungsanleitung

Vom Endnutzer bereitzustellende Materialien:

1. Mikrotiterplattenleser zur Messung der Absorption bei 450 nm.
2. Einstellbare Pipetten und Mehrkanalpipetten zur Messung von Volumina zwischen 25µl und 1000µl
3. Deionisiertes (DI) Wasser
4. Waschflasche oder automatische Mikrotiterplattenwaschmaschine

5. Semi-Log-Papier oder Software für die Datenanalyse
6. Timer
7. Absorbierendes Papier

Handhabung / Lagerung:

1. Alle Reagenzien sollten zur Stabilisierung bei 2°C bis 8°C gelagert werden.
2. Alle Reagenzien und Waschlösungen sollten innerhalb von 12 Monaten ab Herstellungsdatum verwendet werden.
3. Bringen Sie alle Komponenten vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C). Stellen Sie nach Abschluss des Tests sicher, dass alle Komponenten des Kits zu geeigneten Lagerungsbedingungen zurückgebracht werden.
4. Das Substrat ist lichtempfindlich und sollte vor direkter Sonneneinstrahlung oder UV-Strahlen geschützt werden.

Warnungen vor Gesundheitsgefahren:

1. Reagenzien, die Konservierungsstoffe enthalten, können schädlich sein, wenn sie über die Haut aufgenommen, inhaliert oder absorbiert werden.
2. Nur für die In-Vitro-Diagnostik.

**Probenvorbereitung und Lagerung:**

Blut wird durch Venenpunktion entnommen. Das Serum wird nach der Gerinnung durch Zentrifugation getrennt. Plasma kann auch verwendet werden. Lipämische, hämolytische oder kontaminierte Proben sollten nicht verwendet werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Wenn Proben für mehrere Assays verwendet werden sollen, aliquotieren Sie zunächst Proben und bleiben bei -20°C.

Für Zellkulturüberstand - Falls erforderlich, vor der Analyse zur Entfernung von Rückständen zentrifugieren. Proben können bei -20°C oder -80°C gelagert werden. Vermeiden Sie wiederholte Frost-Tau-Zyklen.

Vorbereitung vor dem Gebrauch:

Lassen Sie die Proben vor dem Test Raumtemperatur erreichen. Passen Sie vorsichtig auf Patientenproben auf, um Homogenität zu gewährleisten.

Test Probenvorbereitung - Die Proben müssen 1:10 bis 1:100 (v/v) verdünnt werden, z. für 1:100 (5 µl Probe + 495 µl Probenverdünnung) vor dem Test. Die Proben können bis zu drei Tage bei 2 - 8°C aufbewahrt werden. Langzeitlagerung benötigt -20°C.

Vorbereitung der Reagenzien (alle Reagenzien sollten unmittelbar vor Gebrauch verdünnt werden):

1. Beschriften Sie Aliquote, die mit dem Kit-Chargen-Nr. Und dem Verfallsdatum hergestellt wurden, und lagern Sie sie unter den angegebenen Bedingungen.
2. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.
3. Waschpuffer (1X) herzustellen; verdünne 50 ml 20X Waschpuffer in 950 ml entionisiertem Wasser.

Verfahrenshinweise:

1. Um eine gute Assay-Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit zu erreichen, ist ein richtiges Waschen der Platten, um überschüssige nicht umgesetzte Reagenzien zu entfernen, wesentlich.
2. Der High-Dose-Hook-Effekt kann in Proben mit sehr hohen Konzentrationen von Anti-Alemtuzumab beobachtet werden. Der High-Dose-Hook-Effekt beruht auf einem Antikörperüberschuss bei sehr hohen Anti-Alemtuzumab-Konzentrationen in der Probe. Der High-Dose-Hook-Effekt tritt am ehesten bei Proben zu Beginn des Reinigungsprozesses auf. Wenn Hook-Effekt möglich ist, sollten die zu untersuchenden Proben mit einem kompatiblen Verdünnungsmittel verdünnt werden. Wenn also die Anti-Alemtuzumab-

Konzentration der unverdünnten Probe geringer ist als die der verdünnten Probe, kann dies auf den Hook-Effekt hinweisen.

3. Vermeiden Sie die Untersuchung von Proben, die Natriumazid (NaN_3) enthalten, da dies die HRP-Aktivität zerstören könnte, was zu einer Unterschätzung der Anti-Alemtuzumab-Menge führt.
4. Es wird empfohlen, alle Standards und Proben doppelt zu testen.
5. Pflegen Sie für alle Schritte eine sich wiederholende Timing-Sequenz von gut bis gut, um sicherzustellen, dass die Inkubationszeiten für jede Vertiefung gleich sind.
6. Wenn das Substrat vor der Verwendung eine deutliche blaue Farbe aufweist, ist es möglicherweise kontaminiert und die Verwendung eines solchen Substrats kann zu einer Beeinträchtigung der Empfindlichkeit des Assays führen.
7. Die Platten sollten innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung gelesen werden.
8. Erstellen Sie eine Arbeitsliste, um den Speicherort von Standards und Proben zu identifizieren.

Testverfahren:

1. Es wird dringend empfohlen, alle Kontrollen und Proben in Duplikaten oder Triplikaten auszuführen. Eine Standardkurve ist für jeden Test erforderlich. Alle Schritte müssen bei 37°C durchgeführt werden.
2. Pipettieren Sie **50 µl Assay Diluent** in jede Vertiefung.
3. **100 µl Standards** oder **Proben** in die entsprechenden Vertiefungen geben.
4. Decken Sie die Platte ab und inkubieren Sie für 60 Minuten bei 37°C.
5. Saugen und waschen Sie die Platte 4-mal mit **Waschpuffer (1X)** und tupfen Sie den Restpuffer ab, indem Sie die Platte mit der Oberseite nach unten auf saugfähiges Papier klopfen. Wischen Sie jegliche Flüssigkeit von der Unterseite der Mikrotitervertiefungen ab, da Rückstände den Leseschritt beeinträchtigen können.
6. Ohne Verzögerung in der gleichen Reihenfolge **100 µl Alemtuzumab: HRP-Konjugat** in jede Vertiefung pipettieren.
7. Decken Sie die Platte ab und inkubieren Sie für 60 Minuten bei 37°C.
8. Saugen und waschen Sie die Platte 4 Mal mit **Waschpuffer (1X)** und tupfen Sie den Restpuffer ab, indem Sie die Platte mit der Oberseite nach unten auf saugfähiges Papier klopfen. Wischen Sie jegliche Flüssigkeit von der Unterseite der Mikrotitervertiefungen ab, da Rückstände den Leseschritt beeinträchtigen können.
9. **100 µl TMB-Substrat** in jede Vertiefung geben.
10. Inkubiere die Platte 15 Minuten bei 37°C im Dunkeln. NICHT SCHÜTTELN, da dies zu höheren Hintergründen und schlechterer Präzision führen kann. Positive Vertiefungen sollten bläulich sein.
11. Pipettieren Sie **100 µl Stopplösung**. Die Wells sollten sich von blau nach gelb verfärben.
12. Lesen Sie die Extinktion bei 450 nm mit einem Mikroplattenleser ab.

Berechnung der Ergebnisse:

Bestimmen Sie die mittlere Extinktion für jeden Satz von doppelten oder dreifachen Standards und Proben. Unter Verwendung von Semi-Log-Papier wird der Durchschnittswert (Extinktion 450 nm) jedes Standards auf der Y-Achse gegen die entsprechende Konzentration der Standards auf der X-Achse aufgetragen. Zeichne die beste Fitkurve durch die Standardpunkte. Um die unbekanntes Anti-Alemtuzumab-Konzentrationen zu bestimmen, ermitteln Sie den Mittelwert der mittleren Absorption des Unbekannten auf der Y-Achse und zeichnen Sie eine horizontale Linie zur Standardkurve. Zeichnen Sie am Schnittpunkt eine vertikale Linie zur X-Achse und lesen Sie die Anti-Alemtuzumab-Konzentration. Wenn die Proben verdünnt wurden, multiplizieren Sie sie mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor. Software, die in der Lage ist, eine kubische Spline-Kurvenanpassung zu erzeugen, wird am besten für automatisierte Ergebnisse empfohlen.

Hinweis:

Es wird empfohlen, den Test in folgenden Fällen mit einem anderen Verdünnungsfaktor zu wiederholen:
- Wenn der Extinktionswert der Probe unter dem ersten Standard liegt.

- Wenn der Absorptionswert gleich oder höher als der Standard von 640 ng/ml ist.

Qualitätskontrolle:

Es wird empfohlen, für jeden Labortest geeignete Qualitätskontrollproben in jedem Lauf zu verwenden, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien und Verfahren korrekt sind.

Leistungsmerkmale des Kits:

Dieses Kit wurde gemäß den EMA / FDA-Richtlinien gemäß dem ICH-Code für die Harmonisierung biologischer Assays validiert.

Empfindlichkeit:

Nachweisgrenze: Es ist definiert als die niedrigste nachweisbare Konzentration, die einem Signal von Mittelwert von '0' Standard plus 2 * SD entspricht.
10 Replikate von "0" -Standards wurden ausgewertet und die LOD wurde als weniger als 10 ng/ml gefunden

Linearität:

Die im Kit enthaltenen Standards werden zur Messung des Linearitätsbereichs von Anti-Alemtuzumab in der Matrix verwendet.

Präzision:

Die Präzision ist definiert als der prozentuale Variationskoeffizient (% CV), dh die Standardabweichung dividiert durch den Mittelwert und multipliziert mit 100. Die Assay-Präzision wurde mit zwei Intra- (n = 5 Assays) und Inter-Assay-Reproduzierbarkeit (n = 5 Assays) bestimmt Pools mit niedrigen (10 ng/ml), mittleren (80 ng/ml) und hohen (640 ng/ml) Konzentrationen. Während die tatsächliche Genauigkeit von Labor zu Labor und Techniker zu Techniker variieren kann, wird empfohlen, dass alle Bediener eine Genauigkeit erreichen, die unter diesen Designzielen liegt, bevor Ergebnisse gemeldet werden.

Pool	Intra Assay %CV	Inter Assay %CV
Niedrig	<10%	<10%
Mittel	<5%	<5%
Hoch	<5%	<5%

Einschränkungen der Methode

Gesunde Personen sollten von Anti-Alemtuzumab negativ getestet werden. Jede klinische Diagnose sollte nicht allein auf den Ergebnissen von In-vitro-Diagnosemethoden basieren. Ärzten wird empfohlen, alle klinischen und labordiagnostischen Befunde zu berücksichtigen, um eine Diagnose zu stellen.

Sicherheitsvorkehrungen:

- **Dieses Kit ist nur für In-vitro-Anwendungen vorgesehen.** Befolgen Sie die Arbeitsanweisungen sorgfältig.
- Die im Kit angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Gleiches gilt für die für Reagenzien angegebene Stabilität.
- Verwenden oder mischen Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen.
- Verwenden Sie keine Reagenzien von anderen Herstellern.
- Vermeiden Sie eine Zeitverschiebung beim Pipettieren von Reagenzien.
- Alle Reagenzien sollten in der Originalverpackung aufbewahrt werden.
- Einige der Reagenzien enthalten eine kleine Menge Natriumazid (<0,1% w/w) als Konservierungsmittel. Sie dürfen nicht verschluckt oder mit Haut oder Schleimhäuten in Berührung kommen.
- Ausgangsmaterialien, die aus menschlichen Körperflüssigkeiten stammen oder Organe, die bei der Herstellung dieses Kits verwendet wurden, wurden getestet und als negativ für HBsAg und HIV sowie für HCV-Antikörper befunden. Kein bekannter Test garantiert jedoch die Abwesenheit solcher viraler Mittel. Behandeln Sie daher alle Komponenten und alle Patientenproben als potenziell gefährlich.
- Da das Kit potenziell gefährliche Materialien enthält, sollten die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden
- Beim Umgang mit dem Kit-Material nicht rauchen, essen oder trinken



- Verwenden Sie immer Schutzhandschuhe
- Pipettieren Sie das Material niemals mit dem Mund
- Verschüttetes Material sofort abwischen und die betroffene Oberfläche gründlich mit einem Dekontaminationsmittel waschen.
- In jedem Fall sollte GLP mit allen allgemeinen und individuellen Vorschriften zur Verwendung dieses Kits angewendet werden.

Verweise:

Anti-TNF-Therapie und das Risiko von schwerwiegenden Infektionen in einer Kohorte von Patienten mit rheumatoider Arthritis: Vergleich von Humira, Etanercept und Alemtuzumab in der GISEA... F Atzeni, P Sarzi-Puttini, C Botsios, C Carletto... - Autoimmunität..., 2012 - Elsevier.

Harmonisierung von Anti-Alemtuzumab und Alemtuzumab Assays erleichtert den Vergleich zwischen Urhebers- und Biosimilars in klinischen Proben Ein Gils, T Van Stappen, E Dreesen... - Entzündliche Darm..., 2016 - academic.oup.com.

Intravenöse Hydrocortison-Prämedikation reduziert Antikörper Alemtuzumab bei Morbus Crohn: eine randomisierte kontrollierte Studie RJ Farrell, M Alshali, YT Jeon, KR Falchuk... - Gastroenterologie, 2003 - Elsevier

ATI und Alemtuzumab-Messung. Quantitative ATI und Alemtuzumab-ELISA-Immunoassays. (Prometheus Laboratories, Inc., San Diego, CA) wurden blind in zweifacher Ausfertigung auf Sera durchgeführt und gemessen, wie zuvor beschrieben. 9 die Ermittler.

Erhöhte Wirksamkeit von Alemtuzumab verbunden mit Methotrexat bei Morbus Bechterew VC Pérez-Guijo, AR Cravo M del Carmen Castro... - gemeinsame Knochen Wirbelsäule 2007 - Elsevier.

Klinischen Nutzen von antihuman Lambda-Kette-basierter Enzym-linked Immunosorbentprobe Assay (ELISA) im Vergleich zu Doppel-Antigen-ELISA zum Nachweis von Anti-Alemtuzumab... U Kopylov, Y Mazor, M Yavzori, E Fudim... - Entzündliche Darm..., 2012 - academic.oup.com

(TNF) Therapie bei rheumatoider Arthritis: Korrelation von TNF-Alpha-Serumspiegel mit klinischem und profitieren Sie von wechselnden Dosis oder Häufigkeit von Alemtuzumab. AF Edrees, SN Misra, NI Abdou - klinische und..., 2005 - pdfs.semanticscholar.org

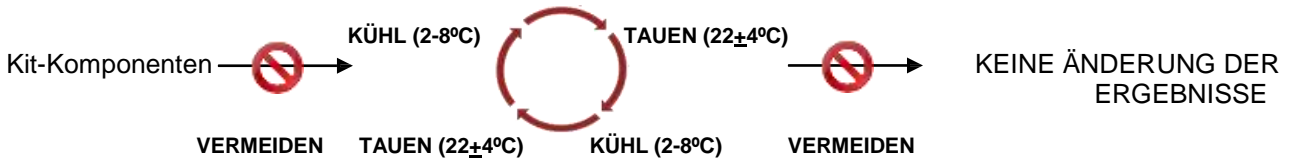
Erkennung von Anti-Alemtuzumab in der Muttermilch von stillenden Müttern mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. S Ben-Horin, M Yavzori, U Kopylov... - Journal von Morbus Crohn..., 2012 - academic.oup.com

SCHEMATISCHES TESTVERFAHREN


1. Entfernen Sie alle Komponenten, 30 Minuten vor Zugabe in die Testplatte.




2. Vermeiden Sie wiederholtes Abkühlen und Auftauen der Komponenten, da es zu einem Aktivitätsverlust kommen kann und dies die Ergebnisse beeinträchtigen kann.



3.  Pipettieren Sie **50 µl Testverdünnungsmittel** in jede Vertiefung.


4.  **100 µl Standards / Proben** in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.


5. Decken Sie die Platte  und inkubieren Sie für  bei 37°C.

6.  Saugen und waschen Sie die Wells 4 mal mit **Wash Buffer (1X)**.


7.  **100 µl Alemtuzumab: HRP** in jede Vertiefung pipettieren.



8. Decken Sie die Platte  und inkubieren Sie für  bei 37°C.

9.  Saugen und waschen Sie die Wells 4 mal mit **Wash Buffer (1X)**.

10.  **100 µl TMB-Substrat** in jede Vertiefung pipettieren.

11. Decken Sie die Platte  und inkubieren Sie für  bei 37°C.

12.  **100 µl Stopplösung** in jede Vertiefung pipettieren.

13. Die Extinktion bei 450 nm mit  einem Mikroplattenleser innerhalb  der Stoppreaktion ablesen.

Typisches Beispiel für eine Arbeitsliste

Well #	Inhalt	Extinktion bei 450 nm	Mittlere Extinktion	ng / ml Anti-Alemtuzumab-Äquivalent
1A 2A	Nullstd Nullstd			
1B 2B	10 ng/ml 10 ng/ml			
1C 2C	20 ng/ml 20 ng/ml			
1D 2D	40 ng/ml 40 ng/ml			
1E 2E	80 ng/ml 80 ng / ml			
1F 2F	160 ng/ml 160 ng/ml			
1G 2G	320 ng/ml 320 ng/ml			
1H 2H	640 ng/ml 640 ng/ml			
3A 4A	Probe			
3B 4B	Probe			

EINGESCHRÄNKTE GARANTIE

Krishgen Biosystems übernimmt keine Garantie für Schäden oder Mängel, die sich aus dem Versand oder der Handhabung oder aus einem Unfall oder einer unsachgemäßen oder abnormalen Verwendung der Produkte ergeben; gegen Defekte in Produkten oder Komponenten, die nicht von Krishgen Biosystems hergestellt wurden, oder gegen Schäden, die durch solche von Krishgen Biosystems hergestellten Produkte oder Komponenten entstehen. Krishgen Biosystems gibt dem Kunden die Garantie, die er (falls vorhanden) vom Hersteller solcher nicht von Krishgen hergestellten Produkte oder Komponenten erhalten hat. Diese Garantie gilt auch nicht für Produkte, an denen Änderungen oder Modifikationen vorgenommen oder versucht wurden, die nicht von Krishgen Biosystems schriftlich genehmigt wurden.

DIESE GARANTIE IST EXKLUSIV. Die einzige und ausschließliche Verpflichtung von Krishgen Biosystems besteht darin, die fehlerhaften Produkte in der oben beschriebenen Art und Weise zu reparieren oder zu ersetzen. Krishgen Biosystems hat keine weiteren Verpflichtungen in Bezug auf die Produkte oder Teile davon, sei es auf Vertragsbasis, unerlaubter Handlung und verschuldensunabhängige Haftung oder anderweitig. In keinem Fall, unabhängig davon, ob aufgrund dieser beschränkten Garantie oder anderweitig, haftet Krishgen Biosystems für zufällige, spezielle oder Folgeschäden.

Diese beschränkte Garantie enthält die gesamte Verpflichtung von Krishgen Biosystems in Bezug auf die Produkte. Wenn ein Teil dieser eingeschränkten Garantie für ungültig oder rechtswidrig erklärt wird, bleibt der Rest in voller Kraft und Wirkung.

Krishgen Biosystems. 2018

DANKE FÜR DAS KRISHGEN PRODUKT!






KRIBIOLISA™ Anti-Alemtuzumab ELISA

REF : KBI2012

Ver 3.0

IVD

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de Anti-Alemtuzumab en suero, plasma y sobrenadante de cultivo celular

IVD	Para uso diagnóstico in vitro	REF	Numero de catalogo
	Almacenado en	LOT	Código de lote
	Fabricado por		Riesgo biologico
	Fecha de caducidad		Consultar las instrucciones de funcionamiento

Sólo para uso diagnóstico in vitro. La compra no incluye ni tiene el derecho de revender o transferir este producto como un producto independiente o como un componente de otro producto. Cualquier uso de este producto que no sea el uso permitido sin la autorización expresa por escrito de KRISHGEN BioSystems está estrictamente prohibido.



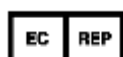
REF KBI2012

 96 tests



KRISHGEN BioSystems

Unit Nos#318/319, Shah & Nahar,
Off Dr E Moses Road, Worli, Mumbai 400018.
Tel: 91 (22) 49198700 | Email: sales@krishgen.com
<http://www.krishgen.com>



MDSS GmbH, Schiffgraben 41, 30175 Hannover, Germany

Introducción:

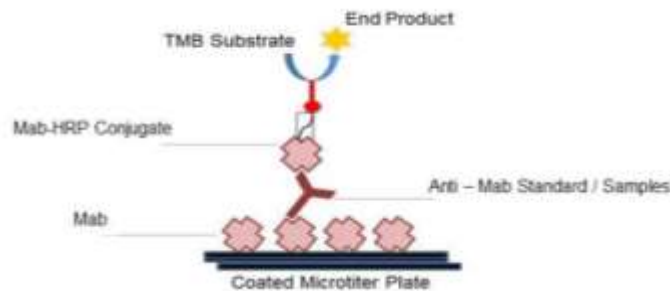
Alemtuzumab es un fármaco utilizado en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL), el linfoma cutáneo de células T (CTCL) y el linfoma de células T con los nombres comerciales Campath, MabCampath y Campath-1H, y en el tratamiento de la esclerosis múltiple como Lemtrada. También se utiliza en algunos regímenes de acondicionamiento para el trasplante de médula ósea, el trasplante de riñón y el trasplante de células de los islotes. Es un anticuerpo monoclonal que se une a CD52, una proteína presente en la superficie de los linfocitos maduros, pero no en las células madre de las que se derivan estos linfocitos. Después del tratamiento con alemtuzumab, estos linfocitos que llevan CD52 son el objetivo de su destrucción. MabCampath se retiró de los mercados en los EE. UU. Y Europa en 2012 para prepararse para un relanzamiento más elevado de Lemtrada dirigido a la esclerosis múltiple. Se han observado anticuerpos antidrogas (ADA, por sus siglas en inglés) en estudios preclínicos y clínicos, lo que produce cambios significativos en la toxicología, la farmacocinética y la eficacia. Estos efectos son el resultado de la generación de autoanticuerpos inducidos por fármacos (neutralizantes) contra el Alemtuzumab y pueden ser responsables de reacciones alérgicas o incluso de choques anafilácticos. Este kit ELISA detecta anticuerpos para Alemtuzumab y puede usarse para monitorear la inmunogenicidad.

Uso previsto:

El KRIBIOLISA™ Anti-Alemtuzumab ELISA se utiliza como herramienta analítica para la determinación cuantitativa de Anti-Alemtuzumab en suero, plasma y sobrenadante de cultivo celular.

Principio:

El método emplea la técnica de inmunoensayo enzimático cuantitativo sándwich. Alemtuzumab se cubre previamente en micropocillos. Las muestras y los estándares se pipetea en micropocillos y los anticuerpos contra el Alemtuzumab presentes en la muestra están unidos por el anticuerpo de captura. Luego, se pipetea y se incuba un Alemtuzumab conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante). Después de lavar los micropocillos para eliminar cualquier enlace no específico, la solución de sustrato lista para usar (TMB) se agrega a los micropocillos y el color se desarrolla proporcionalmente a la cantidad de Anti-Alemtuzumab en la muestra. El desarrollo del color se detiene luego mediante la adición de una solución de parada. La absorbancia se mide a 450 nm.

**Materiales provistos:**

1. Placa de microtitulación recubierta con Alemtuzumab (12x8 pocillos) - 1 no
2. Anti-Alemtuzumab Standard, (0.5 ml/vial) - 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 y 640 ng/ml
3. Alemtuzumab: conjugado HRP - 12 ml
4. Diluyente de ensayo - 6 ml
5. Diluyente de muestra - 50 ml
6. Tampón de lavado (20X) - 25 ml
7. Sustrato TMB - 12 ml
8. Solución de parada - 12 ml
9. Manual de instrucciones

Materiales a ser provistos por el usuario final:

1. Lector de placas de microtitulación capaz de medir la absorbancia a 450 nm.
2. Pipetas ajustables y pipeteador multicanal para medir volúmenes que van desde 25 µl hasta 1000 µl
3. Agua desionizada (DI)
4. Lavado de botellas o lavadoras automáticas de microplacas.

5. Papel o software para el análisis de datos de semi-registro.
6. temporizador
7. Papel absorbente

Manipulación / Almacenamiento:

1. Todos los reactivos deben almacenarse entre 2°C y 8°C para su estabilidad.
2. Todos los reactivos y soluciones de lavado deben usarse dentro de los 12 meses posteriores a la fecha de fabricación.
3. Antes de usar, lleve todos los componentes a temperatura ambiente (18-25°C). Al finalizar el ensayo, asegúrese de que todos los componentes del kit regresen a las condiciones de almacenamiento apropiadas.
4. El sustrato es sensible a la luz y debe protegerse de la luz solar directa o de las fuentes UV.

Advertencias de peligro para la salud:

1. Los reactivos que contienen conservantes pueden ser dañinos si se ingieren, se inhalan o se absorben a través de la piel.
2. Para uso diagnóstico in vitro solamente.

**Preparación y almacenamiento de muestras:**

La sangre se toma por venopunción. El suero se separa después de la coagulación por centrifugación. También se puede usar plasma. No se deben analizar muestras tubérmicas, hemolíticas o contaminadas. Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas. Si las muestras se van a utilizar para varios ensayos, alicuete inicialmente las muestras y manténgalas a -20°C.

Para el sobrenadante de cultivo celular: si es necesario, centrifugue para eliminar los residuos antes del análisis. Las muestras se pueden almacenar a -20°C o -80°C. Evite los ciclos repetidos de congelación y descongelación.

Preparación antes del uso:

Permita que las muestras alcancen la temperatura ambiente antes del ensayo. Tenga cuidado de agitar las muestras del paciente con suavidad para garantizar la homogeneidad.

Prueba Preparación de la muestra: las muestras deben diluirse de 1:10 a 1:100 (v/v), p. para 1:100 (5 µl de muestra + 495 µl de diluyente de muestra) antes del ensayo. Las muestras pueden conservarse a 2 - 8°C durante hasta tres días. El almacenamiento a largo plazo requiere -20°C.

Preparación de los reactivos (todos los reactivos deben diluirse inmediatamente antes de su uso):

1. Etiquete todas las alícuotas hechas con el lote del lote y la fecha de vencimiento y guárdelas en las condiciones apropiadas mencionadas.
2. Lleve todos los reactivos a temperatura ambiente antes de usarlos.
3. Para hacer un tampón de lavado (1X); diluir 50 ml de tampón de lavado 20X en 950 ml de agua DI.

Notas de procedimiento:

1. Para lograr una buena reproducibilidad y sensibilidad del ensayo, es esencial el lavado adecuado de las placas para eliminar el exceso de reactivos sin reaccionar.
2. El efecto de gancho de alta dosis se puede observar en muestras con concentraciones muy altas de Anti-Alemtuzumab. El efecto de gancho de alta dosis se debe al exceso de anticuerpos para concentraciones muy altas de Anti-Alemtuzumab presente en la muestra. El efecto Gancho de alta dosis es más probable que se encuentre en las muestras al principio del proceso de purificación. Si es posible el efecto de gancho, las muestras a analizar deben diluirse con un diluyente compatible. Por lo tanto, si la concentración de Anti-Alemtuzumab de la muestra no diluida es menor que la muestra diluida, esto puede ser indicativo del efecto gancho.
3. Evite el análisis de muestras que contengan azida sódica (NaN₃), ya que podría destruir la actividad de HRP, lo que resultaría en una subestimación de la cantidad de Anti-Alemtuzumab.

4. Se recomienda que todas las normas y muestras se analicen por duplicado.
5. Mantenga una secuencia de tiempo repetitiva de bien a bien para todos los pasos para asegurarse de que los tiempos de incubación sean iguales para cada pozo.
6. Si el sustrato tiene un color azul distinto antes de su uso, puede haber estado contaminado y el uso de dicho sustrato puede comprometer la sensibilidad del ensayo.
7. Las placas deben leerse dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.
8. Haga una lista de trabajo para identificar la ubicación de los estándares y las muestras.

Procedimiento de ensayo:

1. Se recomienda encarecidamente que todos los controles y muestras se ejecuten por duplicado o triplicado. Se requiere una curva estándar para cada ensayo. Todos los pasos deben realizarse a 37°C.
2. Pipetee **50 µl de diluyente** de ensayo en cada pocillo.
3. Agregue **100 µl de estándares o muestras** en los pocillos respectivos.
4. Cubra la placa e incube durante 60 minutos a 37°C.
5. Aspire y lave la placa 4 veces con **tampón de lavado (1X)** y borre el tampón residual golpeando firmemente la placa boca abajo sobre papel absorbente. Limpie cualquier líquido del fondo fuera de los pocillos de microtitulación, ya que cualquier residuo puede interferir en el paso de lectura.
6. Pipetee sin demora en el mismo orden **100 µl de Alemtuzumab: HRP Conjugado** en cada pocillo.
7. Cubra la placa e incube durante 60 minutos a 37°C.
8. Aspire y lave la placa 4 veces con **tampón de lavado (1X)** y borre el tampón residual golpeando firmemente la placa boca abajo sobre papel absorbente. Limpie cualquier líquido del fondo fuera de los pocillos de microtitulación, ya que cualquier residuo puede interferir en el paso de lectura.
9. Agregue **100 µl de Sustrato TMB** en cada pozo.
10. Incubar la placa a 37°C durante 15 minutos en la oscuridad. NO LO AGITE o, de lo contrario, se pueden producir fondos más altos y peor precisión. Los pozos positivos deben volverse de color azulado.
11. Pipetear **100 µl de Solución de Paro**. Los pozos deben cambiar de azul a amarillo.
12. Lea la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas.

Calculo de resultados:

Determine la Absorción media para cada conjunto de muestras y estándares duplicados o triplicados. Usando el papel gráfico Semi-Log, trace el valor promedio (absorbancia 450nm) de cada estándar en el eje Y frente a la concentración correspondiente de los estándares en el eje X. Dibuja la curva de mejor ajuste a través de los puntos estándar. Para determinar las concentraciones desconocidas de Anti-Alemtuzumab, encuentre el valor de Absorción media de la incógnita en el eje Y y trace una línea horizontal hacia la curva estándar. En el punto de intersección, dibuje una línea vertical hacia el eje X y lea la Concentración de Anti-Alemtuzumab. Si las muestras se diluyeron, multiplique por el factor de dilución apropiado. El software que puede generar un ajuste de curva de spline cúbico se recomienda para resultados automatizados.

Nota:

Se recomienda repetir el ensayo a un factor de dilución diferente en los siguientes casos:

- Si el valor de absorbancia de la muestra está por debajo del primer estándar.
- Si el valor de absorbancia es equivalente o superior al estándar de 640 ng/ml.

Control de calidad:

Se recomienda que, para cada ensayo de laboratorio, se usen muestras de control de calidad apropiadas en cada ejecución para garantizar que todos los reactivos y procedimientos sean correctos.

Características de rendimiento del kit:

Este kit ha sido validado según las pautas de EMA / FDA en línea con el Código ICH para la Armonización de Ensayos Biológicos.

Sensibilidad:

Límite de detección: Se define como la concentración detectable más baja correspondiente a una señal de la media de "0" estándar más 2 * SD.

Se evaluaron 10 réplicas de estándares '0' y se encontró que el LOD era inferior a 10 ng/ml

Linealidad:

Los estándares proporcionados en el kit se utilizarán para medir el rango de linealidad del Anti-Alemtuzumab presente en la matriz.

Precisión:

La precisión se define como el porcentaje de coeficiente de variación (% CV), es decir, la desviación estándar dividida por la media y multiplicada por 100. La precisión del ensayo se determinó mediante la reproducibilidad intra (n = 5) y entre ensayos (n = 5) en dos piscinas con concentraciones bajas (10 ng/ml), medias (80 ng/ml) y altas (640 ng/ml). Si bien la precisión real puede variar de un laboratorio a otro y de un técnico a otro, se recomienda que todos los operadores alcancen una precisión por debajo de estos objetivos de diseño antes de informar los resultados.

Resultado	Ensayo Intra %CV	Ensayo Inter %CV
Bajo	<10%	<10%
Medio	<5%	<5%
Alto	<5%	<5%

Limitaciones del método

Los individuos sanos deben tener un resultado negativo con el Anti-Alemtuzumab. Cualquier diagnóstico clínico no debe basarse solo en los resultados de los métodos de diagnóstico in vitro. Se sugiere a los médicos que consideren todos los hallazgos clínicos y de laboratorio posibles para establecer un diagnóstico.

Precauciones de seguridad:

- Este kit es solo para uso in vitro. Siga cuidadosamente las instrucciones de trabajo.
- Se deben respetar las fechas de caducidad indicadas en el kit. Lo mismo se refiere a la estabilidad indicada para los reactivos.
- No utilice ni mezcle reactivos de lotes diferentes.
- No utilice reactivos de otros fabricantes.
- Evite el cambio de tiempo durante el pipeteo de reactivos.
- Todos los reactivos deben mantenerse en el contenedor de envío original.
- Algunos de los reactivos contienen una pequeña cantidad de azida de sodio (<0.1% p/p) como conservante. No se deben tragar ni permitir que entren en contacto con la piel o la mucosa.
- Los materiales de origen derivados de los fluidos del cuerpo humano u órganos utilizados en la preparación de este kit se analizaron y se encontraron negativos para HBsAg y VIH, así como para anticuerpos contra el VHC. Sin embargo, ninguna prueba conocida garantiza la ausencia de tales agentes virales. Por lo tanto, manipule todos los componentes y todas las muestras de pacientes como si fueran potencialmente peligrosos.
- Dado que el kit contiene materiales potencialmente peligrosos, se deben observar las siguientes precauciones
 - No fume, coma o beba mientras manipula el material del kit.
 - Usar siempre guantes de protección.
 - Nunca pipetear el material con la boca.
 - Limpie los derrames rápidamente, lavando la superficie afectada a fondo con un descontaminante.
- En cualquier caso, el GLP debe aplicarse con todas las regulaciones generales e individuales para el uso de este kit.



Referencias:

Terapia anti-TNF y el riesgo de infecciones graves en una cohorte de pacientes con artritis reumatoide: comparación de adalimumab, etanercept y el Alemtuzumab en el GISEA... F Atzeni, P Sarzi-Puttini, C Botsios, un Carletto... - autoinmunidad..., 2012 - Elsevier.

Armonización de ensayos Anti-Alemtuzumab y Anti-Alemtuzumab facilita la comparación entre creadores y biosimilares en muestras clínicas ... El Dreesen E de un Gils, T Van Stappen,... - inflamatoria intestinal..., 2016 - academic.oup.com.

Premedicación de hidrocortisona intravenosa reduce los anticuerpos a Alemtuzumab en enfermedad de Crohn: un controlado Ensayo Farrell RJ, M Alsahli, YT ahora, Falchuk KR... - gastroenterología, 2003 - Elsevier

Medición de ATI y el Alemtuzumab. Cuantitativa ATI y Alemtuzumab ELISA inmunoensayos. (Prometheus Laboratories, Inc., San Diego, CA) realizaron ciegamente por duplicado en sueros y medido como se ha descrito anteriormente. 9 investigadores.

Mayor eficacia de Alemtuzumab asociado a metotrexato en espondilitis anquilosante VC Pérez-Guijo, Cravo de AR, M del Carmen Castro... - conjunto columna vertebral ósea, 2007 - Elsevier.

Utilidad clínica del análisis de la cadena-basado enzima-ligado del inmutosorbente de la lambda antihumano (ELISA) versus doble antígeno ELISA para la detección de Anti-Alemtuzumab... U Kopylov, Y Mazor, M Yavzori, E Fudim... - inflamatoria intestinal..., 2012 - academic.oup.com

Terapia (TNF) en artritis reumatoide: correlación del nivel de TNF-alfa del suero con la respuesta clínica y el beneficio de cambiar la dosis o frecuencia de Alemtuzumab. AF Edrees, SN Misra, NI Abdou - clínica y..., 2005 - pdfs.semanticscholar.org

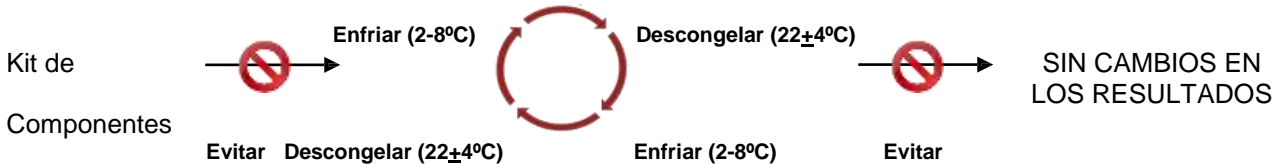
Detección de Alemtuzumab en la leche materna de las madres de lactantes con enfermedad inflamatoria intestinal. S Ben-Horin, Yavzori M, U Kopylov... - diario de Crohn..., 2012 - academic.oup.com


PROCEDIMIENTO DE ENSAYO ESQUEMATICO

1. Retire todos los componentes, 30 minutos antes de agregarlos a la placa de ensayo.

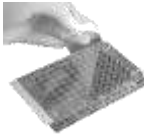



2. Evite el enfriamiento y descongelamiento repetido de los componentes ya que habrá una pérdida de actividad y esto puede afectar los resultados.



3.  Pipetear **50 µl de diluyente** de ensayo en cada pocillo.


4.  Pipetear **100 µl de estándares / muestras** en los pocillos respectivos.

5.  Cubrir la placa e incubar a  37°C.

6.  Aspire y lave los pocillos 4 veces con **tampón de lavado (1X)**.


7.  Pipetee **100 µl de Alemtuzumab: HRP** en cada pocillo.



8.  Cubrir la placa e incubar a  37°C.

9.  Aspire y lave los pocillos 4 veces con **tampón de lavado (1X)**.

10.  Pipetear **100 µl de sustrato TMB** en cada pozo.

11.  Cubrir la placa e incubar a  37°C.

12.  Pipetee 100 µl de solución de parada en cada pocillo.

13.  Lea la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas  dentro de la reacción de parada.

Ejemplo típico de una lista de trabajo

Bien #	Contenido	Absorbancia a 450nm	Absorbancia media	ng / ml Anti-Alemtuzumab equivalente
1A 2A	cero std cero std			
1B 2B	10 ng/ml 10 ng/ml			
1C 2C	20 ng/ml 20 ng/ml			
1D 2D	40 ng/ml 40 ng/ml			
1E 2E	80 ng/ml 80 ng/ml			
1F 2F	160 ng/ml 160 ng/ml			
1G 2G	320 ng/ml 320 ng/ml			
1H 2H	640 ng/ml 640 ng/ml			
3A 4A	Muestra			
3B 4B	Muestra			

GARANTÍA LIMITADA

Krishgen Biosystems no garantiza los daños o defectos que surjan durante el envío o la manipulación, o por accidente o uso inapropiado o anormal de los Productos; contra defectos en productos o componentes no fabricados por Krishgen Biosystems, o contra daños que resulten de productos o componentes que no sean Krishgen Biosystems. Krishgen Biosystems transmite al cliente la garantía que recibió (si la hubiera) del fabricante de dichos productos o componentes no hechos por Krishgen. Esta garantía tampoco se aplica a los Productos en los cuales los cambios o modificaciones hayan sido realizados o intentados por personas distintas a las autorizadas por escrito por Krishgen Biosystems.

ESTA GARANTÍA ES EXCLUSIVA. La única y exclusiva obligación de Krishgen Biosystems será reparar o reemplazar los Productos defectuosos en la forma y por el período mencionado anteriormente. Krishgen Biosystems no tendrá ninguna otra obligación con respecto a los Productos o cualquier parte de los mismos, ya sea por contrato, responsabilidad extracontractual y responsabilidad estricta o de otro tipo. Bajo ninguna circunstancia, ya sea que se basen en esta Garantía Limitada o de otra manera, Krishgen Biosystems será responsable por daños incidentales, especiales o consecuentes.

Esta Garantía Limitada establece la obligación total de Krishgen Biosystems con respecto a los Productos. Si se determina que alguna parte de esta Garantía Limitada es nula o ilegal, el resto permanecerá en pleno vigor y efecto.

Krishgen Biosystems. 2018

¡GRACIAS POR EL USO DEL PRODUCTO KRISHGEN!