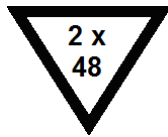



LISA TRACKER Duo Etanercept

REF LTE 005

Français


42 déterminations

DEFINITION

Le coffret **LISA-TRACKER Duo Etanercept** () permet le dosage par méthode ELISA de l'Etanercept (anti-TNF α) ainsi que des anticorps anti-Etanercept, dans le sérum. Ces tests sont quantitatifs et peuvent s'effectuer de manière individuelle ou de manière simultanée grâce à un protocole de dosage uniformisé.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les anti-TNF α sont des agents thérapeutiques largement utilisés pour traiter des patients atteints par diverses maladies inflammatoires. L'Etanercept est l'un des anti-TNF α préconisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, etc. Constitué de 2 récepteurs solubles p75 du TNF α fusionnés au fragment Fc d'une IgG1 humaine, l'Etanercept est capable de se fixer au TNF α . L'Etanercept permet de bloquer l'action du TNF α responsable de l'état inflammatoire. Cependant, au cours du traitement, certains patients peuvent développer des anticorps dirigés contre l'Etanercept. Il en résulte une diminution du taux plasmatique de l'anti-TNF α ainsi qu'une réapparition ou une augmentation des symptômes de la maladie.

Le coffret **LISA-TRACKER Duo Etanercept** () permet le dosage de 2 paramètres : Etanercept et anticorps anti-Etanercept. Ce coffret permet aux praticiens de suivre au cours du temps l'évolution du taux plasmatique de ces 2 paramètres chez un patient.

ECHANTILLONS

- Les dosages peuvent être effectués sur plasma (tubes de prélèvement : EDTA, Héparine ou Citrate) ou sérum.
- Eviter d'utiliser des sérums lipémiques, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus de 1 fois.
- Afin de limiter toutes fixations non spécifiques, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

PRINCIPE DES TESTS

A) Dosage de l'Etanercept

L'antigène TNF α humain est adsorbé sur un support solide constitué de 6 barrettes de 8 micropuits (microplaque).

- Dans un premier temps, l'échantillon dilué est distribué dans un puits de la microplaque. S'il contient de l'Etanercept, celui-ci va se fixer au TNF α adsorbé. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non-fixés.

- On ajoute ensuite un anticorps anti-IgG humaines biotinylé. Après incubation, un deuxième lavage permet d'éliminer l'excès d'anticorps.

- Ensuite, la streptavidine conjuguée à la peroxydase de Raifort est ajoutée. Elle se fixe au complexe « TNF α / Etanercept / anti-IgGh biotinylé » précédemment formé. Après incubation, un troisième lavage permet d'éliminer l'excès de conjugué.

- L'étape de chromogénèse est réalisée en déposant le substrat de l'enzyme: TMB (3,3',5,5' tétraméthylbenzidine). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité d'Etanercept présente dans l'échantillon.

- L'addition de H₂SO₄ permet de bloquer la réaction enzymatique.

- La lecture des densités optiques à 450 nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.

- Une gamme étalon permet de définir la quantité d'Etanercept (μ g/ml) présente dans l'échantillon.

B) Dosage des anticorps anti-Etanercept

L'Etanercept est adsorbé sur un support solide constitué de 6 barrettes de 8 micropuits (microplaque).

- Dans un premier temps, l'échantillon dilué est distribué dans un puits de la microplaque. S'il contient des anticorps anti-Etanercept, ceux-ci vont se fixer à l'Etanercept adsorbé. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non-fixés.

- On ajoute ensuite de l'Etanercept biotinylé. Après incubation, un deuxième lavage permet d'éliminer l'excès d'anticorps.

- Ensuite, la streptavidine conjuguée à la peroxydase de Raifort est ajoutée. Elle se fixe au complexe « Etanercept adsorbé / anticorps anti-Etanercept / Etanercept biotinylé » précédemment formé. Après incubation, un troisième lavage permet d'éliminer l'excès de conjugué.

- L'étape de chromogénèse est réalisée en déposant le substrat de l'enzyme : TMB (3,3',5,5' tétraméthylbenzidine). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-Etanercept présente dans l'échantillon.

- L'addition de H₂SO₄ permet de bloquer la réaction enzymatique.

- La lecture des densités optiques à 450 nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.

- Une gamme étalon permet de définir la quantité d'anticorps anti-Etanercept (ng/ml) présente dans l'échantillon.

COMPOSITION DU COFFRET

Le coffret est composé de 3 familles de réactifs :

Couleur	Réactifs « dosage Etanercept »	Réactifs « dosage anticorps anti-Etanercept »	Réactifs « communs »
bouchons des flacons de réactifs	Bleu	Blanc	Vert, Blanc, Noir ou Violet
micropuits	Bleu	Blanc	-

A) Réactifs spécifiques au dosage de l'Etanercept

Une microplaque de barrettes bleues amovibles, sensibilisée par du TNF α humain. MP	6 barrettes
Cinq flacons « Etalon - Etanercept », ($\mu\text{g/ml}$). <u>Prêts à l'emploi.</u> <u>Ils peuvent être utilisés plusieurs fois.</u> La quantité d'Etanercept est indiquée sur le flacon. ETA CAL n Bouchons bleus.	5 x 1,5ml
Flacon « contrôle positif - Etanercept », ($\mu\text{g/ml}$). <u>A diluer.</u> <u>Il peut être utilisé plusieurs fois.</u> Les valeurs attendues ($\mu\text{g/ml}$) sont indiquées sur le flacon. ETA CONTROL + Bouchon bleu.	1 x 250 μl
Flacon d'anticorps biotinylé. <u>Prêt à l'emploi.</u> ETA Ab BIOT Bouchon bleu.	1 x 7,5ml

B) Réactifs spécifiques au dosage des anticorps anti-Etanercept

Une microplaque de 4 barrettes blanches amovibles, sensibilisée par de l'Etanercept. MP	6 barrettes
Cinq flacons « Etalon - anti-Etanercept », (ng/ml). <u>Prêts à l'emploi.</u> <u>Ils peuvent être utilisés plusieurs fois.</u> La quantité en anticorps anti-Etanercept est indiquée sur le flacon. A-ETA CAL n Bouchons blancs.	5 x 1,5ml
Flacon « contrôle positif - anti-Etanercept », (ng/ml). A-ETA CONTROL + <u>A diluer.</u> <u>Il peut être utilisé plusieurs fois.</u> Les valeurs attendues (ng/ml) sont indiquées sur le flacon. Bouchon blanc.	1 x 1ml
Flacon d'anticorps biotinylé <u>Prêt à l'emploi.</u> A-ETA Ab BIOT Bouchon blanc.	1 x 7,5ml

C) Réactifs communs

Flacon de streptavidine conjuguée à la peroxydase. <u>Prêt à l'emploi.</u> CONJ HRP Bouchon vert.	1 x 12ml
Flacon de Tampon Phosphate-Tween pH 7,2 (concentré 10x) - <u>A reconstituer en eau distillée.</u> Bouchon blanc. BUF WASH 10x	1 x 100ml
Flacon de Substrat (TMB). <u>Prêt à l'emploi.</u> SUBS TMB Bouchon noir.	1 x 12ml
Flacon de solution d'arrêt H ₂ SO ₄ (0.25 N). <u>Prêt à l'emploi.</u> SOLN STOP Bouchon violet.	1 x 15ml

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Eau distillée
- Pipettes de précision
- Lecteur muni d'un filtre 450 nm
- Peigne de lavage 8 canaux.

STABILITE ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Tous les réactifs et les barrettes de puits sensibilisées doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas utiliser un coffret dont les dates de péremption sont dépassées.
- Après la première ouverture, conserver les barrettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet déshydratant, correctement refermée et les remettre immédiatement entre +2°C et +8°C.

PREPARATION DES REACTIFS

A l'exception du TDL, qui peut être préparé à l'avance, les réactifs doivent être préparés de manière extemporanée.

1. Tampon de dilution et de lavage (TDL)

- Diluer le Tampon Phosphate-Tween concentré au 1/10 en eau distillée. **BUF WASH 10x**

- Durée de conservation : 3 mois entre +2°C et +8°C (ne plus utiliser si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent)

Remarque : en présence de cristaux dans la solution concentrée, placer le flacon 15 min. à +37°C avant utilisation.

2. Préparation des échantillons et des contrôles positifs

a) Echantillons

- **Dosage de l'Etanercept** : les diluer au 1/101 en tampon TDL (exemple : 10 μl + 1ml de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.
- **Dosage des anticorps anti-Etanercept** : les diluer au 1/2 en tampon TDL (exemple : 130 μl + 130 μl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

b) Contrôles positifs

- **Dosage de l'Etanercept** : le diluer au 1/101 en tampon TDL (exemple : 10µl + 1ml de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.
- **Dosage des anticorps anti-Etanercept** : le diluer au 1/2 en tampon TDL (exemple : 130µl + 130µl de TDL). Agiter vigoureusement au vortex.

3. Utilisation des anticorps biotinylés - prêts à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et les transférer dans un tube à partir duquel se fera le dépôt.

4. Utilisation du conjugué (streptavidine-HRP) - prêt à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et le transférer dans un tube à partir duquel se fera le dépôt.

5. Utilisation du substrat - prêt à l'emploi

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et le transférer dans un tube opaque à partir duquel se fera le dépôt.

PRECAUTIONS D'EMPLOI


- Retirer tous les réactifs hors de leur logement de conditionnement et les ramener impérativement à température ambiante (+18°C / +25°C) au minimum une demi-heure avant de commencer le dosage.


- La température des réactifs peut influencer le résultat final.
- S'assurer que les plaques soient bien égouttées après chaque lavage.


- Ne pas utiliser les réactifs si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent.

Les étalons et les contrôles sont d'origine humaine. Pour chacun, les recherches d'anticorps anti-HIV 1 et 2, anti-HCV et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. S'agissant de produits potentiellement infectieux, il est toutefois nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.

- Les réactifs en solution (excepté le substrat & la solution d'arrêt) contiennent comme agent de conservation, de l'azide de sodium à une concentration <0.1% ou du ProClin® 300 à une concentration <0.6%. Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. L'azide de sodium peut former des mélanges explosifs lors de son élimination dans les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.

-  À cette concentration, le ProClin® 300 peut être irritant pour les yeux, la peau et nuisible en cas d'ingestion en quantités importantes. C'est un sensibilisant cutané; une exposition prolongée ou répétée peut entraîner une réaction allergique chez certains sujets sensibles.

- Le coffret **LISA-TRACKER Duo Etanercept** () a été élaboré dans le respect du Règlement (CE) n° 1272/2008 en ce qui concerne la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances et des mélanges.

- **LISA-TRACKER Duo Etanercept** () a été optimisé pour les conditions opératoires précisées dans cette notice. Le non-respect des dilutions, de la préparation des réactifs, du protocole ou la substitution d'un réactif par un autre produit peuvent affecter les performances finales du test.

MODE OPERATOIRE

1. Préparation du test

Utiliser la feuille de travail contenue dans le coffret pour noter la localisation des échantillons.

Pour chaque essai, et pour chaque spécificité de dosage, prévoir :

- 5 puits « étalon » (gamme de calibration)
- 1 puits « contrôle positif »
- 1 puits par échantillon

Dans le cas d'un dosage « simultané » placer les barrettes correspondantes à chaque spécificité sur un support de plaque.

Remarque :

Dans le cadre de l'utilisation d'un automate de dilution/répartition, placer les barrettes dans l'ordre suivant : dosage de l'Etanercept puis dosage des anti-Etanercept.

2. Incubation des étalons, des contrôles positifs et des échantillons

Déposer 100µl par puits pour chaque étalon.

Déposer 100µl par puits de chaque contrôle dilué.

Déposer 100µl d'échantillons dilués dans les puits correspondant aux spécificités recherchées.

Laisser incuber 60 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de dilution et de lavage (TDL) (300µl/puits).

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

3. Incubation de l'anticorps biotinylé

Déposer 100µl d'anticorps biotinylé spécifique, prêt à l'emploi, dans tous les puits **respectifs.**

Incuber 60 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de dilution et de lavage (TDL) (300µl/puits).

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

4. Incubation du Conjugué

Déposer 100µl de conjugué prêt à l'emploi dans tous les puits.

Incuber 30 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de dilution et de lavage (TDL) (300µl/puits).

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

5. Incubation du Substrat

Déposer 100µl de substrat dans tous les puits.

Incuber 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

6. Arrêt de la réaction

Ajouter 100µl de H₂SO₄ dans tous les puits.

7. Lecture

Lire la densité optique de chaque puits avec un lecteur de microplaques muni d'un filtre 450nm au cours des 30 minutes suivant l'arrêt de la réaction.

RESULTATS ET INTERPRETATION

A) Dosage de l'Etanercept

- La densité optique (DO) de l'étalon 1 doit être au moins égale à 0.8.
- La valeur (µg/ml) du contrôle positif doit être comprise dans la fourchette d'acceptation inscrite sur le flacon.

- Tracer la courbe d'étalonnage (polynomiale) en portant en abscisse (axe des X) la quantité d'Etanercept ($\mu\text{g/ml}$) de chaque étalon et, en ordonnée (axe des Y), la DO correspondante.
- La quantité d'Etanercept de l'échantillon dosée peut être lue directement sur la courbe.
- Tout échantillon possédant une DO supérieure à celle de l'étalon 1 est considéré « hors-gamme ». Il peut être redilué afin d'estimer précisément la quantité d'Etanercept. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution.

B) Dosage des anticorps anti-Etanercept

- La densité optique (DO) de l'étalon 1 doit être au moins égale à 0.8.
- La valeur (ng/ml) du contrôle positif doit être comprise dans la fourchette d'acceptation inscrite sur le flacon.
- Tracer la courbe d'étalonnage (polynomiale) en portant en abscisse (axe des X) la quantité d'anticorps anti-Etanercept (ng/ml) de chaque étalon et, en ordonnée (axe des Y), la DO correspondante.
- La quantité d'anticorps anti-Etanercept de l'échantillon dosée peut être lue directement sur la courbe.
- Tout échantillon possédant une DO supérieure à celle de l'étalon 1 est considéré « hors-gamme ». Il peut être redilué afin d'estimer précisément la quantité d'anticorps anti-Etanercept. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution.

CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES DES DOSAGES

Limite de détection

Estimée à partir des 146 échantillons issus d'une population « individus sains » pour l'étanercept et 151 échantillons issus d'une population « individus sains » et traités pour les anti-étanercept.

Limite de détection Etanercept	Limite de détection Anti-Etanercept
0,2 $\mu\text{g/ml}$ Au 95 ^{ème} percentile	10 ng/ml Au 99 ^{ème} percentile

Plage de mesure

Etanercept	Anti-Etanercept
0,2 $\mu\text{g/ml}$ - 5 $\mu\text{g/ml}$	10 ng/ml - 100 ng/ml

Etude des substances interférentes

LISA-TRACKER Duo Etanercept (Theraclab) a été évalué :

- sur une population de sérums contenant des substances potentiellement interférentes (cryoglobulines, facteurs rhumatoïdes, anticorps hétérophiles, taux élevés de triglycérides, de bilirubine, d'IgG et/ou d'IgM, de protéine C1q),
 - sur une population de sérums de patients présentant des maladies autoimmunes,
 - sur des échantillons en solution complétés avec les composés suivants : bilirubine (à 0,2 mg/ml) et triglycérides (à 33 mg/ml).
- ⇒ Aucune interférence n'a été détectée.

Précision

Paramètres	Intra-essai (4 tests dans le même essai)		Inter-essais (4 tests dans 4 essais différents)	
	Valeur moyenne	CV (%)	Valeur moyenne	CV (%)
Etanercept ($\mu\text{g/ml}$)	0.53	1.8	0.52	4.9
	2.6	1.1	2.4	6.8
	5.3	2.4	4.3	13.9
Anti-Etanercept (ng/ml)	17.7	3.0	18	11.3
	29	5.5	33	13.0
	152	8.1	154	10.8

LIMITES

Le dosage de l'Etanercept montre une réaction croisée vis-à-vis des sérums de patients traités par tout anti-TNF comportant un fragment Fc. (Infliximab, Adalimumab, Golimumab,...).

La présence de biotine dans les échantillons de patients peut potentiellement impacter les immunodosages utilisant la technologie Streptavidine - Biotine.

CONTROLE DE QUALITE

Il est conseillé d'utiliser des contrôles de qualité interne ou externe pour les différentes spécificités. Les contrôles **IMMUNO-TROL Etanercept** ou **anti-Etanercept** (Theraclab), réf: LTE 002-PC ou LTE 003-PC, renferment de l'**Etanercept** ou des anticorps dirigés contre l'**Etanercept**. Ils sont à tester de façon identique à celle des échantillons.

BIBLIOGRAPHIE

Ainsworth MA & al. Tumor necrosis factor-alpha binding capacity and anti-infliximab antibodies measured by fluidphase radioimmunoassays as predictors of clinical efficacy of infliximab in Crohn's disease. Am J Gastroenterol. 2008 Apr;103(4):944-8.

Afif W & al. Clinical Utility of Measuring Infliximab and Human Anti-Chimeric Antibody Concentrations in Patients With Inflammatory Bowel Disease. Am J Gastroenterol 2010; 105:1133-1139.

Arends S & al. The formation of autoantibodies and antibodies to TNF- α blocking agents in relation to clinical response in patients with ankylosing spondylitis. Clin Exp Rheumatol. 2010 Sep-Oct;28(5):661-8.

Baert F & al. Influence of Immunogenicity on the Long-Term Efficacy of Infliximab in Crohn's Disease. N Engl J Med 2003;348:601-8.

Bartelds GM & al. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. JAMA. 2011 Apr 13;305(14):1460-8.

Bentzen K. Is There a Need for Immunopharmacologic Guidance of Anti-Tumor Necrosis Factor Therapies. ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 63, No. 4, April 2011, pp 867-870.

Candon S & al. Clinical and biological consequences of immunization to infliximab in pediatric Crohn's disease. Clin Immunol. 2006 Jan;118(1):11-9.

Choy & al. Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis : a phase II double-blinded, randomized, dose escalating trial. Rheumatology 2002;41:1133-1137.

Desroches M & al. Treatment failure with antagonists of TNF- α : mechanisms and implications for the care of patients. Eur. Cytokine Netw., Vol. 21 n° 4, December 2010, 226-31.

DeVries & al. Inefficacy of infliximab in ankylosing spondylitis is correlated with antibody formation. Ann Rheum Dis. 2007 Jan;66(1):133-4.

Edrees & al. Anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis: correlation of TNF-alpha serumlevel with clinical response and benefit from changing dose or frequency of infliximab infusions. Clin Exp Rheumatol. 2005 Jul-Aug;23(4):469-74.

Jaminitski & al. The presence or absence of antibodies to infliximab or adalimumab determines the outcome of switching to etanercept. Rheum Dis. 2011 Feb;70(2):284-8.

Koren & al. Recommendation on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products. Journal of Immunological Methods, 333 (2008) 1-9.

Korswagen LA & al. Venous and Arterial Thromboembolic Events in Adalimumab-Treated Patients With Anti-adalimumab Antibodies. ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 63, No. 4, April 2011, pp 877-883.

Krzysiek R & al. Circulating Concentration of Infliximab and Response to Treatment in Ankylosing Spondylitis: Results From a Randomized Control Study. Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research) Vol. 61, No. 5, May 15, 2009, pp 569-57.

Marotte & al. Circulating tumour necrosis factor-alpha bioactivity in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab: link to clinical response. Arthritis Res Ther. 2005;7(1):R149-55.

Mire-Sluis & al. Recommendation for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. Journal of Immunological Methods, 289 (2004) 1-16.

Piketty ML & al. Biotin: an emerging analytical interference, Ann Biol Clin 2017 ; 75(4) : 366-8.

Radstake TRDJ & al. Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2009;68:1739-1745.

Ram Raj Singh, & al. TNF α blockade in human diseases : mechanisms and future. Clin.Immunol., 2008 February ; 126(2):121-136.

Seow CH & al. Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis. Gut. 2010 Jan;59(1):49-54.

Sparado A & al. Switching from infliximab or etanercept to adalimumab in resistant or intolerant patients with spondyloarthritis: a 4-year study. Rheumatology (Oxford). 2010 Jun;49(6):1107-11.

Steenholdt C & al. Cut-off levels and diagnostic accuracy of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in Crohn's disease. Scandinavian Journal of Gastroenterology, March 2011, Vol. 46, N°3, Pages 310-318.

Takeuchi & al. Baseline tumour necrosis factor alpha levels predict the necessity for dose escalation of infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2011 Jul;70(7):1208-15.

Ternant D & al. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of Infliximab. Ther Drug Monit., 2006 April ; 28(2):169-174.

Van den Bemt BJF & al. Anti-infliximab antibodies are already detectable in most patients with rheumatoid arthritis halfway through an infusion cycle: an open-label pharmacokinetic cohort study. BMC Musculoskeletal Disorders 2011.

Vetterlein & al. No antibodies to PEG detected in patients treated with certolizumab pegol. Ann Rheum Dis 2008;67(Suppl II):236.

Wolbink GJ & al. Development of Anti-infliximab Antibodies and Relationship to Clinical Response in Patients With Rheumatoid Arthritis. ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 54, No. 3, March 2006, pp711-715.

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

A) Dilution des échantillons :

Dosage de l'Etanercept	Dosage des anticorps anti-Etanercept
au 1/101	au 1/2

B) Dilution des contrôles positifs :

Dosage de l'Etanercept	Dosage des anticorps anti-Etanercept
au 1/101	au 1/2

C) Mode opératoire :

Réactifs	Mode opératoire
Etalons	100 μ l / puits
Contrôles positifs dilués	
Echantillons dilués	
Incubation	1 h à température ambiante
Lavage*	Laver 3 fois en tampon de dilution/lavage (TDL) : 3 x 300 μ l / puits
Anticorps secondaires biotinylés	100 μ l / puits (réactifs spécifiques)
Incubation	1 h à température ambiante
Lavage*	Laver 3 fois en tampon de dilution/lavage (TDL) : 3 x 300 μ l / puits
Streptavidine-HRP	100 μ l / puits
Incubation	30 minutes à température ambiante
Lavage*	Laver 3 fois en tampon de dilution/lavage (TDL) : 3 x 300 μ l / puits
Substrat (TMB)	100 μ l / puits
Incubation	15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière
Solution « stop »	100 μ l / puits

* **Eliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.**

D) Exemples de configuration de dosage :

a) 42 sérums à doser Etanercept et anti-Etanercept

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Etalon 5	Sérum 3	Sérum 11	Sérum 19	Sérum 27	Sérum 35	Etalon 5	Sérum 3	Sérum 11	Sérum 19	Sérum 27	Sérum 35
B	Etalon 4	Sérum 4	Sérum 12	Sérum 20	Sérum 28	Sérum 36	Etalon 4	Sérum 4	Sérum 12	Sérum 20	Sérum 28	Sérum 36
C	Etalon 3	Sérum 5	Sérum 13	Sérum 21	Sérum 29	Sérum 37	Etalon 3	Sérum 5	Sérum 13	Sérum 21	Sérum 29	Sérum 37
D	Etalon 2	Sérum 6	Sérum 14	Sérum 22	Sérum 30	Sérum 38	Etalon 2	Sérum 6	Sérum 14	Sérum 22	Sérum 30	Sérum 38
E	Etalon 1	Sérum 7	Sérum 15	Sérum 23	Sérum 31	Sérum 39	Etalon 1	Sérum 7	Sérum 15	Sérum 23	Sérum 31	Sérum 39
F	C+	Sérum 8	Sérum 16	Sérum 24	Sérum 32	Sérum 40	C+	Sérum 8	Sérum 16	Sérum 24	Sérum 32	Sérum 40
G	Sérum 1	Sérum 9	Sérum 17	Sérum 25	Sérum 33	Sérum 41	Sérum 1	Sérum 9	Sérum 17	Sérum 25	Sérum 33	Sérum 41
H	Sérum 2	Sérum 10	Sérum 18	Sérum 26	Sérum 34	Sérum 42	Sérum 2	Sérum 10	Sérum 18	Sérum 26	Sérum 34	Sérum 42

Dosage Etanercept

Dosage anti-Etanercept

b) 2 patients à doser Etanercept et anti-Etanercept

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Etalon 5	Etalon 5										
B	Etalon 4	Etalon 4										
C	Etalon 3	Etalon 3										
D	Etalon 2	Etalon 2										
E	Etalon 1	Etalon 1										
F	C+	C+										
G	Sérum 1	Sérum 1										
H	Sérum 2	Sérum 2										

Dosage Etanercept Dosage anti-Etanercept

c) 42 sérums à doser en anti-Etanercept

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Etalon 5	Sérum 3	Sérum 11	Sérum 19	Sérum 27	Sérum 35						
B	Etalon 4	Sérum 4	Sérum 12	Sérum 20	Sérum 28	Sérum 36						
C	Etalon 3	Sérum 5	Sérum 13	Sérum 21	Sérum 29	Sérum 37						
D	Etalon 2	Sérum 6	Sérum 14	Sérum 22	Sérum 30	Sérum 38						
E	Etalon 1	Sérum 7	Sérum 15	Sérum 23	Sérum 31	Sérum 39						
F	C+	Sérum 8	Sérum 16	Sérum 24	Sérum 32	Sérum 40						
G	Sérum 1	Sérum 9	Sérum 17	Sérum 25	Sérum 33	Sérum 41						
H	Sérum 2	Sérum 10	Sérum 18	Sérum 26	Sérum 34	Sérum 42						

Dosage anti-Etanercept

INDEX DES SYMBOLES



Déclaration de conformité CE



Test ELISA



Référence produit



Numéro de Lot



Date d'expiration



Dispositif de Diagnostic *In Vitro*



Fabricant



Nombre de tests



Consulter les instructions d'utilisation



Limites de température



Risque biologique



Contient de l'azide de sodium



A reconstituer



Attention

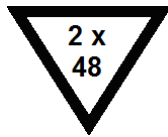



14 rue Ambroise Croizat
CS 90136 CROISSY BEAUBOURG
77435 MARNE LA VALLEE CX2
France

Tél : 01 64 62 10 12
Fax : 01 64 62 09 66

E-mail : support@theradiag.com
Internet : www.theradiag.com


LISA TRACKER Duo Etanercept

REF **LTE 005**

English
DEFINITION

LISA-TRACKER Duo Etanercept () is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for the quantitative determination of Etanercept (anti-TNF α) and anti-Etanercept antibodies in human serum samples. These tests can be separately or simultaneously done by following the standardized assay protocols.

DIAGNOSTIC VALUE

Anti-TNF α are therapeutic agents widely used to treat patients with various inflammatory diseases. Etanercept is one of the anti-TNF α recommended for the treatment of the rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, etc. Etanercept is a dimeric fusion protein consisting of two extracellular domains of the human p75 TNF α receptor, linked to the Fc fragment of a type 1 human immunoglobulin (IgG1). Etanercept is able to bind TNF α . Consequently, it blocks the action of TNF α responsible for the inflammatory state. However, during the treatment, some patients can develop antibodies against Etanercept. Consequently, the plasmatic level of anti-TNF α decreases and simultaneously the disease symptoms reappear or increase.

LISA-TRACKER Duo Etanercept () allows the detection of 2 parameters: Etanercept and anti-Etanercept antibodies. This kit allows the physician to monitor the level of these 2 parameters in patient sera.

SAMPLES COLLECTION AND HANDLING

- The test should be performed on plasma (EDTA, heparin or citrate collection tubes) or on serum.
- Lipemic sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- To avoid any non-specific binding, samples which have been frozen for more than 6 months or which are cloudy, should be centrifuged and filtered.

ASSAY PRINCIPLE

A. Dosage of Etanercept

The TNF α is coated onto a polystyrene microtiter plate (6 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the TNF α coated well, which allows to bind. After incubation, unbound proteins are removed by washing.
- Anti-human IgG biotinylated antibodies is added. After incubation, unbound antibodies are removed by washing.
- Then horseradish peroxidase labelled streptavidin is added. The streptavidin binds to the complex formed with

42 determinations

biotinylated anti-IgG antibodies. After incubation, the wells are washed again to eliminate any excess of conjugate.

- The bound enzyme is revealed by addition of substrate TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidin). The colour intensity is proportional to the amount of Etanercept.
- Adding H₂SO₄ allows to stop the enzymatic reaction.
- After stopping the reaction by H₂SO₄, the optical density is read by a spectrophotometer at 450nm.

A range of calibration allows to define the quantity of Etanercept of each patient samples expressed in μ g/mL.

B. Dosage of anti-Etanercept

The Etanercept is coated onto a polystyrene microtiter plate (6 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the Etanercept coated well, which allows to bind. After incubation, unbound proteins are removed by washing.
- Biotinylated Etanercept is added. After incubation, unbound antibodies are removed by washing
- Then horseradish peroxidase labelled streptavidin is added. The streptavidin binds to the complex formed with biotinylated Etanercept. After incubation, the wells are washed again to eliminate any excess of conjugate.
- The bound enzyme is revealed by addition of substrate TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidin). The colour intensity is proportional to the amount of anti-Etanercept antibodies.
- Adding H₂SO₄ allows to stop the enzymatic reaction.
- After stopping the reaction by H₂SO₄, the optical density is read by a spectrophotometer at 450nm.

A range of calibration allows to define the quantity of anti-Etanercept antibodies of each patient samples expressed in ng/mL.

REAGENTS

3 reagent families :

Color	Etanercept reagents	anti-Etanercept antibodies reagents	Common reagents
cap of vials	Blue	White	Green, White, Black or Purple
microwells	Blue	White	-

A) Specific reagents for the Etanercept determination

Strips of individual breakaway blue wells coated with human TNF α . MP	6 strips
5 vials of « Etanercept » Standards, ($\mu\text{g/mL}$). <u>Ready to use.</u> <u>The vials can be reused several times.</u> The quantity of Etanercept is indicated on the vial label. Blue caps ETA CAL n	5 x 1.5mL
«Positive control - Etanercept», ($\mu\text{g/mL}$). <u>To dilute.</u> <u>The vials can be reused several times.</u> The quantity of Etanercept is indicated on the vial label Blue cap ETA CONTROL +	1 x 250 μL
Biotinylated antibody vial. <u>Ready to use.</u> ETA Ab BIOT Blue cap	1 x 7.5mL

B) Specific reagents for the anti-Etanercept antibodies determination

Strips of individual breakaway white wells coated with Etanercept. MP	6 strips
5 vials of « anti-Etanercept » Standards, (ng/mL). <u>Ready to use.</u> <u>The vials can be reused several times.</u> The quantity of anti-Etanercept is indicated on the vial label White caps A-ETA CAL n	5 x 1.5mL
« Positive control – anti-Etanercept», (ng/mL). <u>To dilute.</u> <u>The vial can be reused several times</u> The quantity of anti-Etanercept is indicated on the vial label. White cap A-ETA CONTROL +	1 x 1mL
Biotinylated antibody vial <u>Ready to use.</u> A-ETA Ab BIOT White cap.	1 x 7.5mL

C) Common reagents

HRP labelled Streptavidin. <u>Ready to use.</u> CONJ HRP Green cap.	1 x 12mL
Phosphate-Tween Buffer pH 7,2 (10x) – <u>To reconstitute with distilled water.</u> White cap. BUF WASH 10x	1 x 100mL
Substrate (TMB). <u>Ready to use.</u> SUBS TMB Black cap.	1 x 12mL
Stop solution - H ₂ SO ₄ (0.25 N). <u>Ready to use.</u> SOLN STOP Purple cap	1 x 15mL

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- distilled water
- precision pipettes
- microplate spectrophotometer with 450 nm filter
- 8 channel pipettes

STABILITY AND STORAGE

- Store reagents and micro-wells at +2°C/+8°C in their own package.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- Store unused strips into their plastic bag (closed securely) with the desiccant.
- Store all components immediately after use again at +2°C/+8°C.

SETUP

Except the TDL, which can be prepare in advance, all reagents must be prepared extemporaneously.

1. Dilution and Wash buffer (TDL)

- Dilute concentrated Phosphate-Tween Buffer 1/10 in distilled water.

BUF | **WASH** | **10x**

- Shelf life : 3 months at +2°C/+8°C (avoid to use if signs of contamination or other visible changes occur).

NB. If there are crystals in the concentrated solution, warm the bottle up to +37°C for 15 minutes before use.

2. Preparation of samples and positive controls

a. Samples

- Etanercept determination

- Dilute to 1/101 in TDL - Ex : 10 μL sample + 1mL TDL
- Vortex vigorously.

- Anti-Etanercept determination

- Dilute to 1/2 in TDL - Ex : 130 μL sample + 130 μL TDL
- Vortex vigorously.

b. Positive controls

- Etanercept determination

- Dilute to 1/101 in TDL
- Ex : 10 μL positive control + 1mL TDL
- Vortex vigorously.

- anti-Etanercept determination

- Dilute to 1/2 in TDL
- Ex : 130 μL positive control + 130 μL TDL
- Vortex vigorously.

4. Use of ready-to-use biotinylated antibody.

- Estimate the amount required for handling and transfer to a tube.

5. Use of ready-to-use HRP Streptavidin conjugate.

- Estimate the amount required for handling and transfer to a tube.

6. Use of ready-to-use substrate.

- Estimate the amount required for handling and transfer to a dark tube.

PRECAUTIONS

Unpack all reagents in order to let them warm at room temperature (+18°C/+25°C) at least half an hour before starting the test.


⚠ The temperature of the reagents can impact the final result.


Check that all plates are well drained after each wash.


Avoid to use reagents if signs of contamination or other visible changes occur.

Human sources for the preparation of standards and controls have been tested and found negative for antibody to HIV 1 and 2, antibody to hepatitis C virus and hepatitis B virus antigen. Nevertheless, no test can offer complete assurance that HIV, hepatitis B virus or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled as potentially infective materials.

Reagents in solution (except for substrate buffer and stop solution) contain <0.1% of sodium azide and <0.6% of ProClin® 300. Do not eat and avoid contact with skin and eyes. Azide can form explosive mixtures in copper or lead piping. Rinse thoroughly after flushing.

-  At this concentration, ProClin® 300 is irritating to eyes and skin, and may be detrimental if enough quantity is ingested. It is a skin sensitizer; prolonged or repeated exposure may cause allergic reaction in certain sensitive individuals.

LISA-TRACKER Duo Etanercept () has been developed according to EC regulation n°1272/2008 relating to the classification, labelling and packaging of substances and mixtures.

LISA-TRACKER Duo Etanercept () has been optimized for the use as describe in this procedure. Do not substitute other manufacturer's reagents. Dilution or adulteration of these reagents may also affect the performance of the test. Close adherence to the test procedure will assure optimal performance.

METHOD

1. Preparing the test

Use the work sheet to note the sample locations.

Set out:

- 5 "standard" wells
- 1 well for positive control
- 1 well for each sample

For a simultaneous testing of the 2 parameters, detach the exact number of wells needed. Return unused wells to plastic pouch provided in the kit, with the desiccant bag.

Remark :

If a dispensing/diluting device is used, place the specific wells in the following order : dosage of Etanercept then dosage of anti-Etanercept.

2. Samples, positive controls and standards incubation

Add 100 µl of standards, diluted controls or samples.

Incubate for 60 minutes at room temperature (+18°C/+25°C).

Wash step:

Remove the content of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300µL of TDL buffer.

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess of liquid.

3. Incubation of biotinylated antibodies

Add 100µL of **specific** biotinylated antibodies in identified wells.

Incubate for 60 minutes at room temperature (+18°C/+25°C).

Wash step:

Remove the content of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300µL of dilution and washing buffer.

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess of liquid.

4. Incubation of Conjugate

Add 100µL of conjugate.

Incubate for 30 minutes at room temperature (+18°C/+25°C).

Wash step:

Remove the content of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300µL of dilution and washing buffer.

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess of liquid.

5. Incubation of Substrate

Add 100µL substrate into each well.

Incubate for 15 minutes at room temperature (+18°C/+25°C). Protect from light.

6. Stop of the reaction

Add 100µl of H₂SO₄ to each well.

7. Reading

Read the optical density of each well at 450nm within 30 minutes after stopping reaction.

RESULTS AND INTERPRETATION

A. Dosage of Etanercept

- The OD of the standard 1 should be at least 0.8.
- The positive control value should be comprised into the range indicated on the vial label.
- Trace the standard curve (polynomial curve), plotting the units of the 5 standard points (µg/mL) along the abscissa (X axis) and the corresponding OD values along the ordinate (Y axis).
- The Etanercept value can be directly read on the curve.
- Samples with values greater than that of standard 1 may be diluted to obtain a more precise result. The number of units should be multiplied by the selected dilution.

B. Dosage of anti-Etanercept

- The OD of the standard 1 should be at least 0.8.
- The positive control value should be comprised into the range indicated on the vial label.
- Trace the standard curve (polynomial curve), plotting the units of the 5 standard points (ng/mL) along the abscissa (X axis) and the corresponding OD values along the ordinate (Y axis).
- The anti-Etanercept value can be directly read on the curve.
- Samples with values greater than that of standard 1 may be diluted to obtain a more precise result. The number of units should be multiplied by the selected dilution.

CHARACTERISTICS AND PERFORMANCE OF THE TEST

Limits of detection / threshold values


Estimated on 146 healthy patient samples for Etanercept test and 151 healthy and treated patient samples for anti-Etanercept test.

Limit of detection Etanercept	Limit of detection Anti-Etanercept
0.2 µg/mL 95 th percentile	10 ng/mL 99 th percentile

Assay range

Etanercept	Anti-Etanercept
0.2 µg/mL - 5 µg/mL	10 ng/mL - 100 ng/mL

Interfering Substances Study

LISA-TRACKER Duo Etanercept () was evaluated to assess potential cross reactivity to other antibodies and interference :

- on positive samples for several components (cryoglobulins, rheumatoid factors, heterophilic antibodies, high levels of triglycerides, bilirubin, IgG and/or IgM, and C1q proteins, autoantibodies),
- on a population of patients' serums presenting autoimmune diseases,
- on samples completed with the following components: bilirubin (in 0.2 mg/mL) and triglycerides (in 33 mg/mL).

⇒ No interference was detected.

Precision

Parameters	Intra-run (4 tests in a same assay)		Inter-runs (4 tests 4 different assays)	
	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)
Etanercept (µg/mL)	0.53	1.8	0.52	4.9
	2.6	1.1	2.4	6.8
	5.3	2.4	4.3	13.9
Anti-Etanercept (ng/mL)	17.7	3.0	18	11.3
	29	5.5	33	13.0
	152	8.1	154	10.8


LIMITS

Serums of patients treated with anti-TNF containing a Fc fragment (Infliximab, Adalimumab, Golimumab,...) may cross-react with Etanercept test.

The presence of biotin in patients' specimens can potentially impact the immunodosages using the Streptavidin-Biotin technology.

QUALITY CONTROL

It is recommended to use internally and externally sourced control material for the different specificities. **IMMUNO-**

TROL Etanercept or **anti-Etanercept** controls () , Cat.n: LTE 002-PC or LTE 003-PC, contain **Etanercept** or antibodies directed against **Etanercept**. These materials are to be assayed in the same manner as the unknown samples.

REFERENCES

Ainsworth MA & al. Tumor necrosis factor-alpha binding capacity and anti-infliximab antibodies measured by fluidphase radioimmunoassays as predictors of clinical efficacy of infliximab in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2008 Apr;103(4):944-8.

Afif W & al. Clinical Utility of Measuring Infliximab and Human Anti-Chimeric Antibody Concentrations in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:1133–1139.

Arends S & al. The formation of autoantibodies and antibodies to TNF-α blocking agents in relation to clinical response in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010 Sep-Oct;28(5):661-8.

Baert F & al. Influence of Immunogenicity on the Long-Term Efficacy of Infliximab in Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2003;348:601-8.

Bartelds GM & al. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA.* 2011 Apr 13;305(14):1460-8.

Bendtsen K. Is There a Need for Immunopharmacologic Guidance of Anti-Tumor Necrosis Factor Therapies. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 63, No. 4, April 2011, pp 867–870.

Candon S & al. Clinical and biological consequences of immunization to infliximab in pediatric Crohn's disease. *Clin Immunol.* 2006 Jan;118(1):11-9.

Choy & al. Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis : a phase II double-blinded, randomized, dose escalating trial. *Rheumatology* 2002;41:1133-1137.

Desroches M & al. Treatment failure with antagonists of TNF-α: mechanisms and implications for the care of patients. *Eur. Cytokine Netw.,* Vol. 21 n° 4, December 2010, 226-31.

DeVries & al. Inefficacy of infliximab in ankylosing spondylitis is correlated with antibody formation. *Ann Rheum Dis.* 2007 Jan;66(1):133-4.

Edrees & al. Anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis: correlation of TNF-alpha serumlevel with clinical response and benefit from changing dose or frequency of infliximab infusions. *Clin Exp Rheumatol.* 2005 Jul-Aug;23(4):469-74.

Jaminitski & al. The presence or absence of antibodies to infliximab or adalimumab determines the outcome of switching to etanercept. *Rheum Dis.* 2011 Feb;70(2):284-8.

Koren & al. Recommendation on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products. *Journal of Immunological Methods,* 333 (2008) 1-9.

Korswagen LA & al. Venous and Arterial Thromboembolic Events in Adalimumab-Treated Patients With Anti-adalimumab Antibodies. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 63, No. 4, April 2011, pp 877–883.

Krzysiek R & al. Circulating Concentration of Infliximab and Response to Treatment in Ankylosing Spondylitis: Results From a Randomized Control Study. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)* Vol. 61, No. 5, May 15, 2009, pp 569–57.

Marotte & al. Circulating tumour necrosis factor-alpha bioactivity in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab: link to clinical response. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):R149-55.

Mire-Sluis & al. Recommendation for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of Immunological Methods,* 289 (2004) 1-16.

Piketty ML & al. Biotin: an emerging analytical interference, Ann Biol Clin2017 ; 75(4) : 366-8.

Radstake TRDJ & al. Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2009;68:1739–1745.

Ram Raj Singh, & al. TNF α blockade in human diseases : mechanisms and future. Clin.Immunol., 2008 February ; 126(2):121-136.

Seow CH & al. Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis. Gut. 2010 Jan;59(1):49-54.

Sparado A & al. Switching from infliximab or etanercept to adalimumab in resistant or intolerant patients with spondyloarthritis: a 4-year study. Rheumatology (Oxford). 2010 Jun;49(6):1107-11.

Steenholdt C & al. Cut-off levels and diagnostic accuracy of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in Crohn's disease. Scandinavian Journal of Gastroenterology, March 2011, Vol. 46, N°3, Pages 310-318.

Takeuchi & al. Baseline tumour necrosis factor alpha levels predict the necessity for dose escalation of infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2011 Jul;70(7):1208-15.

Ternant D & al. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of Infliximab. Ther Drug Monit., 2006 April ; 28(2):169-174.

Van den Bemt BJF & al. Anti-infliximab antibodies are already detectable in most patients with rheumatoid arthritis halfway through an infusion cycle: an open-label pharmacokinetic cohort study. BMC Musculoskeletal Disorders 2011.

Vetterlein & al. No antibodies to PEG detected in patients treated with certolizumab pegol. Ann Rheum Dis 2008;67(Suppl II):236.

Wolbink GJ & al. Development of Anti-infliximab Antibodies and Relationship to Clinical Response in Patients With Rheumatoid Arthritis. ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 54, No. 3, March 2006, pp711–715.

SUMMARY OF METHOD

A. Sample Dilution

Etanercept	Anti-Etanercept
1/101	1/2

B) Positive Control Dilution

Etanercept	Anti-Etanercept
1/101	1/2

C) Procedure

Reagents	Procedure
Standards	100 μ L / wells
Diluted positive controls	
Diluted samples	
Incubation	1 h at room temperature
Washing*	Wash 3 times with TDL buffer : 3 x 300 μ L / wells
Biotinylated antibodies	100 μ L / wells (specific reagents)
Incubation	1 h at room temperature
Washing*	Wash 3 times with TDL buffer : 3 x 300 μ L / wells
HRP-Streptavidin	100 μ L / wells
Incubation	30 minutes at room temperature
Washing*	Wash 3 times with TDL buffer : 3 x 300 μ L / wells
Substrate (TMB)	100 μ L / wells
Incubation	15 minutes at room temperature. Protect from light.
Stop solution	100 μ L / wells

* **Dry the microplate by tapping it gently on a towel to eliminate the excess of liquid.**

D) Configuration of the assays

a. 42 sera for Etanercept and anti-Etanercept

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19	Sera 27	Sera 35	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19	Sera 27	Sera 35
B	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20	Sera 28	Sera 36	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20	Sera 28	Sera 36
C	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21	Sera 29	Sera 37	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21	Sera 29	Sera 37
D	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22	Sera 30	Sera 30	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22	Sera 30	Sera 30
E	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23	Sera 31	Sera 39	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23	Sera 31	Sera 39
F	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24	Sera 32	Sera 40	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24	Sera 32	Sera 40
G	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25	Sera 33	Sera 41	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25	Sera 33	Sera 41
H	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26	Sera 34	Sera 42	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26	Sera 34	Sera 42

Etanercept assay

anti-Etanercept assay

b. 2 sera for Etanercept and anti-Etanercept

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard 5	Standard 5										
B	Standard 4	Standard 4										
C	Standard 3	Standard 3										
D	Standard 2	Standard 2										
E	Standard 1	Standard 1										
F	C+	C+										
G	Sera 1	Sera 1										
H	Sera 2	Sera 2										

Etanercept assay anti-Etanercept assay

c. 42 sera for anti-Etanercept determination

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19								
B	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20								
C	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21								
D	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22								
E	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23								
F	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24								
G	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25								
H	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26								

anti-Etanercept assay

SYMBOLS USED



EC Declaration of conformity



Number of test



ELISA Test



Consult Instructions



Catalogue number



Temperature limitation



Lot Number



Biological hazard



Expiry Date



Contains sodium azide



In Vitro Diagnostic Device



Reconstitute with



Manufacturer



Warning



14 rue Ambroise Croizat
CS 90136 CROISSY BEAUBOURG
77435 MARNE LA VALLEE CX2
France

Tel : +33 (0)1 64 62 10 12
Fax : +33 (0)1 64 62 09 66

E-mail : support@theradiag.com
Internet : www.theradiag.com