






KRIBIOLISA™ Anti-Tocilizumab ELISA

REF : KBI2022

Ver 1.1

IVD


Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Antibodies to Tocilizumab 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 KBI2022

 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

English Instructions	Pages 1 - 8
French Instructions	Pages 9 - 15
German Instructions	Pages 16 - 22
Spanish Instructions	Pages 23 - 29

Introduction:

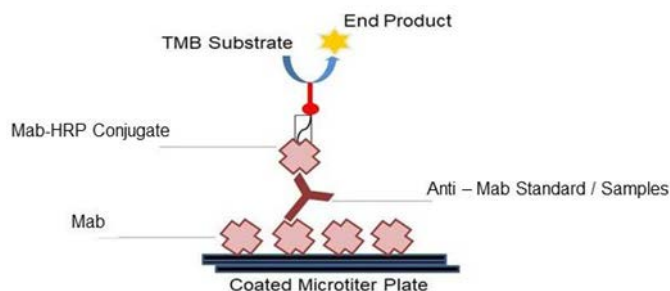
Tocilizumab, also known as atilizumab, is an immunosuppressive drug, mainly for the treatment of rheumatoid arthritis (RA) and systemic juvenile idiopathic arthritis, a severe form of arthritis in children. It is a humanized monoclonal antibody against the interleukin-6 receptor (IL-6R). Interleukin 6 (IL-6) is a cytokine that plays an important role in immune response and is implicated in the pathogenesis of many diseases, such as autoimmune diseases, multiple myeloma and prostate cancer. It was developed by Hoffmann–La Roche and Chugai.

Intended Use:

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

Principle:

The method employs the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. Tocilizumab is pre-coated onto microwells. Samples and standards are pipetted into microwells and antibodies to Tocilizumab present in the sample are bound by the capture antibody. Then, a HRP (horseradish peroxidase) conjugated Tocilizumab 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 antibodies to Tocilizumab present in the sample. Color development is then stopped by addition of stop solution. Absorbance is measured at 450 nm.

**Materials Provided:**

1. Tocilizumab Coated Microtiter Plate (12 x 8 wells) – 1 no
2. Anti-Tocilizumab Standard, (0.5 ml/vial) – 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 and 640 ng/ml
3. Tocilizumab:HRP Conjugate – 6 ml
4. Sample Diluent – 50 ml
5. Wash Buffer (20X) – 25 ml
6. TMB Substrate – 12 ml
7. Stop Solution – 12 ml
8. 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 ul to 1000 ul
3. Deionized (DI) water
4. Wash bottle or automated microplate washer
5. Standard 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.

Samples should be diluted 1:1000 (v/v), i.e. 1 ul sample + 999 ul sample diluent prior to assay. The samples may be kept at 2 - 8°C for up to three days. For long-term storage please store at -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 25 ml of 20X Wash Buffer in 475 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-Tocilizumab antibodies. High Dose Hook Effect is due to excess of Tocilizumab for very high concentrations of antibodies against Tocilizumab 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-Tocilizumab antibody 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-Tocilizumab.
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 **50 ul of Anti-Tocilizumab: HRP Conjugate** into each well.
3. Add **100 ul** of **Standards** or **Samples** into the respective wells.
4. Cover the plate and incubate for 45 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. Add **100 ul** of **TMB Substrate** in each well.
7. Incubate the plate at 37°C for 30 minutes in dark. DO NOT SHAKE or else it may result in higher backgrounds and worse precision. Positive wells should turn bluish in color.
8. Pipette out **100 ul** of **Stop Solution**. Wells should turn from blue to yellow in color.
9. Read the absorbance at 450 nm with a microplate reader.

Calculation of Results:

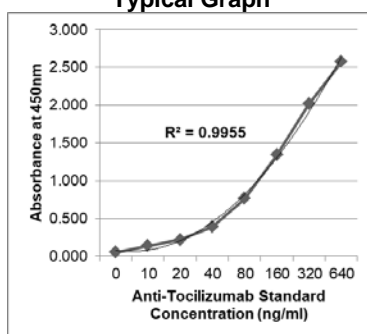
Determine the Mean Absorbance for each set of duplicate or triplicate Standards and Samples. Using standard graph paper, plot the average value (absorbance 450nm) of each standard on the Y-axis versus the corresponding concentration of the standards on the X-axis. Draw the best fit curve through the standard points. To determine the unknown Anti-Tocilizumab antibodies concentration, 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-Tocilizumab antibodies 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.

Typical Graph



Standards (ng/ml)	Abs1	Abs 2	Mean	Net Abs
0	0.051	0.046	0.048	0.000
10	0.137	0.136	0.137	0.088
20	0.217	0.218	0.218	0.169
40	0.395	0.380	0.388	0.339
80	0.771	0.754	0.762	0.714
160	1.365	1.322	1.343	1.295
320	2.040	1.998	2.019	1.971
640	2.566	2.584	2.575	2.527

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

Specificity:

The kit uses two antigens specific for Tocilizumab (RoActemra/Actemra) which were commercially procured. A full traceability certificate for standards/calibrator standardization is available on request.

Traceability:

There are no reference standards for Anti-Tocilizumab. The results are reported in ng/mL and the method has been standardized in the laboratories of KRISHGEN BIOSYSTEMS.

Linearity:

Standards provided in the kit will be used for measuring the linearity range of Anti-Tocilizumab present in matrix. The standards / calibrator range is 0 - 640 ng/ml.

Precision:

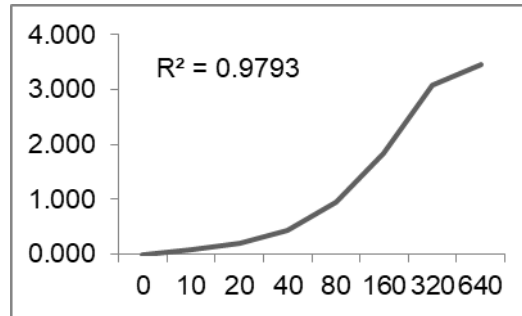
Precision is defined as the percent coefficient of variation (%CV) i.e. standard deviation divided by the mean and multiplied by 100. Assay precision was determined by both intra (n=5 assays) and inter assay (n=5 assays) reproducibility on two pools with low (10 ng/ml), medium (60 ng/ml) and high (640 ng/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%

Recovery:

Human sera and plasma were measured with two replicates and two runs per day for 20 days (n = 80). The human sera and plasma were pooled patient and single donor spiked samples. Samples were measured using one lot of reagent, in two laboratories of KRISHGEN BIOSYSTEMS. All data met our acceptance criteria for % CV and 95% confidence intervals for % CV.

Standards (ng/ml)	Absorbance of 1:1000 Diluted and Spiked in Serum	Net Abs	Interpolated Concentration	Serum Recovery %
0	0.066	0.000		---
10	0.160	0.094	10.27	86.39
20	0.255	0.189	22.88	92.10
40	0.496	0.430	44.23	97.86
80	1.016	0.950	81.30	99.49
160	1.896	1.830	149.96	94.20
320	3.142	3.076	358.46	100.90
640	3.526	3.460	575.23	109.17



* *Recov Conc = Recovery Concentration*
Abs = Absorbances at 450 nm
Std = Standards

Note: Serum was diluted using Standard Diluent provided with the kit

Safety Precautions:

- **This kit is For In-Vitro Diagnostic 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:

Intravenous tocilizumab: a review of its use in adults with rheumatoid arthritis...Dhillon S...BioDrugs...2014...Springer

Clinical pharmacology of tocilizumab for the treatment of patients with rheumatoid arthritis... Zhang X, Peck R...Expert Rev Clin Pharmacol...2011...Taylor & Francis

A phase I trial combining carboplatin/doxorubicin with tocilizumab, an anti-IL-6R monoclonal antibody, and interferon-α2b in patients with recurrent epithelial ovarian cancer...Dijkgraaf EM, Santegoets SJ...Ann Oncol...2015...Oxford

Tocilizumab in early progressive rheumatoid arthritis: FUNCTION, a randomised controlled trial... Burmester GR, Rigby WF, van Vollenhoven RF, Kay J, Rubbert-Roth A, Kelman A, Dimonaco S, Mitchell N...Ann Rheum Dis...2015...BMJ

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.



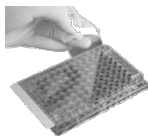
3. Pipette **50 ul Tocilizumab:HRP Conjugate** into the wells.



4. Pipette **100 ul Samples / Standards** into respective wells.



4. Cover plate and incubate for **45 mins** at 37°C.



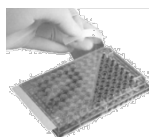
5. Aspirate and wash wells 4 times with **Wash Buffer (1X)**.



6. Pipette **100 ul TMB Substrate** into each well.



7. Cover plate and incubate for **30 mins** at 37°C.



8. Pipette **100 ul Stop Solution** into each well.



9. Read absorbance at 450nm with a microplate reader within **30 mins** of stopping reaction.



Typical Example of a Work List

Well #	Contents	Absorbance at 450nm	Mean Absorbance	ng/ml Tocilizumab 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	<i>Sample</i>			
3B 4B	<i>Sample</i>			

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. 2019

THANK YOU FOR USING KRISHGEN PRODUCT!






KRIBIOLISA™ Anti-Tocilizumab ELISA

REF : KBI2022

Ver 1.1

IVD


Enzyme Immunoassay pour la détermination quantitative des Anticorps à Tocilizumab dans le sérum, le plasma et la culture cellulaire supernatant

IVD	Pour le 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

Usage In Vitro Diagnostic uniquement. Achat ne comprennent ni assortis d'un droit de revendre ou transférer ce produit comme un produit autonome ou comme composant d'un autre produit. Toute utilisation de ce produit autre que de l'utilisation autorisée sans l'autorisation écrite expresse de KRISHGEN BioSystems est strictement interdite.

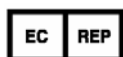


REF KBI2022

 96 tests



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:

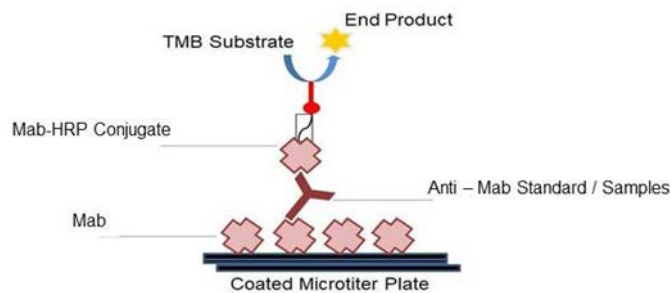
Le tocilizumab, également connu sous le nom d'atlizumab, est un médicament immunosuppresseur, principalement pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (PR) et de l'arthrite idiopathique juvénile systémique, une forme grave d'arthrite chez les enfants. Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé contre le récepteur interleukin-6 (IL-6R). Interleukin 6 (IL-6) est une cytokine qui joue un rôle important dans la réponse immunitaire et est impliquée dans la pathogénie de nombreuses maladies, telles que les maladies auto-immunes, le myélome multiple et le cancer de la prostate. Il a été développé par Hoffmann-La Roche et Chugai.

Utilisation Prévue:

Le KRIBIOLISA™ Anti-Tocilizumab ELISA est utilisé comme outil d'analyse pour la détermination quantitative des anticorps à Tocilizumab dans le sérum, le plasma et la culture cellulaire supernatant.

Principe:

La méthode utilise la technique quantitative d'immunoassay enzymatique sandwich. Le tocilizumab est pré-enduit sur des microwells. Les échantillons et les normes sont conduits dans des microwells et les anticorps à Tocilizumab présents dans l'échantillon sont liés par l'anticorps de capture. Ensuite, un HRP (cheval de raifort peroxidase) conjugué Tocilizumab est pipetted et incubé. Après avoir lavé des microwells afin d'enlever toute liaison non spécifique, la solution de substrat prêt à l'emploi (TMB) est ajoutée aux microwells et la couleur se développe proportionnellement à la quantité d'anticorps à Tocilizumab présent dans l'échantillon. Le développement des couleurs est ensuite arrêté par l'ajout de solution d'arrêt. L'absorption est mesurée à 450 nm.



Matériaux Fournis:

1. Tocilizumab Plaque de microtiter enduite (12 x 8 puits) - 1 no
2. Anti-Tocilizumab Standard, (0.5 ml/vial) - 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 et 640 ng/ml
3. Tocilizumab:HRP Conjugare - 6 ml
4. Échantillon Diluent - 50 ml
5. Tampon de lavage (20X) - 25 ml
6. Substrat TMB - 12 ml
7. Stop Solution - 12 ml
8. Manuel d'instruction

Matériel à Fournir Par L'utilisateur Final:

1. Microtiter Plate Reader capable de mesurer l'absorption à 450 nm.
2. Pipettes réglables et tuyauteur multicanal pour mesurer les volumes allant de 25 ul à 1000 ul.
3. Eau déionisée (DI).
4. Lavez la bouteille ou la laveuse à microplaque automatisée.
5. Papier graphique standard ou logiciel pour l'analyse des données.
6. Minuterie.
7. Papier absorbant

Manipulation / Stockage:

1. Tous les réactifs doivent être entreposés à 2 oC à 8 oC pour la stabilité.
2. Toutes les solutions de réactifs et de lavage doivent être utilisées dans les 12 mois suivant la date de fabrication.
3. Avant d'utiliser, apportez tous les composants à température ambiante (18-25 oC). À l'achèvement de l'essai, assurez-vous que tous les composants de la trousse sont retournés à des conditions de stockage appropriées.
4. Le substrat est sensible à la lumière et doit être protégé contre la lumière directe du soleil ou les sources UV.

Avertissements De Danger Pour La Santé:

1. Les réactifs qui contiennent des agents de conservation peuvent être nocifs s'ils sont ingérés, inhalés ou absorbés par la peau.
2. Usage In Vitro Diagnostic uniquement.

**Préparation Et Stockage Des Échantillons:**

Le sang est pris par venipuncture. Le sérum est séparé après la coagulation par centrifugation. Le plasma peut aussi être utilisé. Les échantillons lipaémiques, hémolytiques ou contaminés ne doivent pas être exécutés. Il faut éviter la congélation et le dégel répétés. Si des échantillons doivent être utilisés pour plusieurs essais, d'abord des échantillons d'aliquot et de conserver à - 20°C.

Pour cell Culture Supernatant - Si nécessaire, centrifugeuse pour enlever les débris avant l'analyse. Les échantillons peuvent être entreposés à -20°C ou -800°C. Évitez les cycles répétés de gel-dégel.

Préparation Avant Utilisation:

Laissez les échantillons atteindre la température ambiante avant l'essai. Prenez soin d'agiter doucement les échantillons de patients afin d'assurer l'homogénéité.

Les échantillons doivent être dilués 1:1000 (v/v), c'est-à-dire 1 échantillon ul - 999 ul échantillon diluent avant l'essai. Les échantillons peuvent être conservés à 2 à 8°C pendant une période pouvant aller jusqu'à trois jours. Pour un stockage à long terme, veuillez entreposer à -20°C.

Préparation Du Réactif (tous les réactifs doivent être dilués immédiatement avant l'utilisation):

1. Étiquetez les aliquots fabriqués avec la date du lot no et de l'expiration du kit et stockez-le dans des conditions appropriées mentionnées.
2. Amener tous les réactifs à la température ambiante avant utilisation.
3. Pour faire Wash Buffer (1X); diluer 25 ml de tampon de lavage 20X dans 475 ml d'eau DI.

Notes de procédure:

1. Afin d'atteindre une bonne reproductibilité et sensibilité d'analyse, il est essentiel de laver correctement les plaques pour éliminer les réactifs non réagis.
2. L'effet de crochet à dose élevée peut être observé dans des échantillons avec des concentrations très élevées d'anticorps anti-Tocilizumab. L'effet de crochet à dose élevée est dû à l'excès de Tocilizumab pour des concentrations très élevées d'anticorps contre Tocilizumab présents dans l'échantillon. L'effet de crochet à dose élevée est très probablement rencontré à partir d'échantillons tôt dans le processus de purification. Si l'effet crochet est possible, les échantillons à être analysés doivent être dilués avec un iluant compatible. Ainsi, si la concentration d'anticorps anti-Tocilizumab de l'échantillon non dilué est
3. inférieure à l'échantillon dilué, cela peut être indicatif de l'effet crochet.
4. Évitez l'analyse d'échantillons contenant de l'azide de sodium (NaN₃), car il pourrait détruire l'activité HRP

entraînant une sous-estimation de la quantité d'anti-Tocilizumab.

5. Il est recommandé que toutes les normes et échantillons soient analysés en doublons.
6. Maintenir une séquence de synchronisation répétitive de bien en bon pour toutes les étapes afin de s'assurer que les délais d'incubation sont les mêmes pour chaque puits.
7. Si le substrat a une couleur bleue distincte avant l'utilisation, il peut avoir été contaminé et l'utilisation d'un tel substrat peut conduire à une compromission de la sensibilité de l'essai.
8. Les plaques doivent être lues dans les 30 minutes suivant l'ajout de la solution Stop.
9. Dressez une liste de travail afin d'identifier l'emplacement des normes et des échantillons.

Procédure D'analyse:

1. Il est fortement recommandé que tous les contrôles et échantillons soient exécutés en doublons ou triplicates. Une courbe standard est nécessaire pour chaque essai. Toutes les étapes doivent être effectuées à 37°C.
2. Pipette **50 ul d'Anti-Tocilizumab:HRP Conjugare** dans chaque puits.
3. Ajouter **100 ul De Normes Ou D'échantillons** dans les puits respectifs.
4. Couvrir la plaque et incubé pendant 45 minutes à 37°C.
5. Aspirer et laver la plaque 4 fois avec **Wash Buffer (1X)** et tampon résiduel de tache en tapant fermement la plaque à l'envers sur du papier absorbant. Essuyer tout liquide du fond à l'extérieur des puits de microtitres car tout résidu peut interférer dans l'étape de lecture.
6. Ajouter **100 ul de Substrat TMB** dans chaque puits.
7. Incuber la plaque à 37°C pendant 30 minutes dans l'obscurité. **NE PAS SHAKE** ou bien il peut entraîner des arrières-plans plus élevés et une précision pire. Les puits positifs doivent devenir de couleur bleuâtre.
8. Pipette sur **100 ul De Stop Solution**. Les puits doivent passer du bleu au jaune.
9. Lisez l'absorption à 450 nm avec un lecteur de microplate.

Calcul Des Résultats:

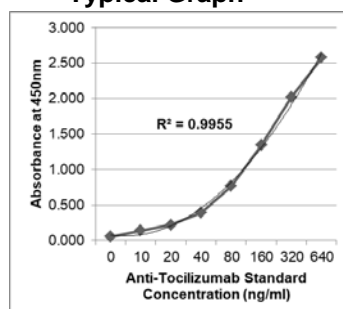
Déterminez l'absorption moyenne pour chaque ensemble de normes et d'échantillons en double ou en triple. À l'aide de papier graphique standard, tracez la valeur moyenne (absorption 450nm) de chaque norme sur l'axe Y par rapport à la concentration correspondante des normes sur l'axe X. Dessinez la meilleure courbe d'ajustement à travers les points standard. Pour déterminer la concentration inconnue d'anticorps anti-Tocilizumab, trouvez la valeur d'absorption moyenne de l'inconnu sur l'axe Y et tracez une ligne horizontale à la courbe standard. Au point d'intersection, tracez une ligne verticale vers l'axe X et lisez les anticorps Anti-Tocilizumab Concentration. Si les échantillons ont été dilués, multipliez par le facteur de dilution approprié. Le logiciel capable de générer une courbe de spline cubique est mieux recommandé pour les résultats automatisés.

Note:

Il est recommandé de répéter l'analyse à un facteur de dilution différent dans les cas suivants :

- Si la valeur d'absorption de l'échantillon est inférieure à la première norme.
- Si la valeur d'absorption est équivalente ou supérieure à la norme de 640 ng/ml.

Typical Graph



Standards (ng/ml)	Abs1	Abs 2	Mean	Net Abs
0	0.051	0.046	0.048	0.000
10	0.137	0.136	0.137	0.088
20	0.217	0.218	0.218	0.169
40	0.395	0.380	0.388	0.339
80	0.771	0.754	0.762	0.714
160	1.365	1.322	1.343	1.295
320	2.040	1.998	2.019	1.971
640	2.566	2.584	2.575	2.527

Contrôle De La Qualité:

Il est recommandé que pour chaque laboratoire analyse des échantillons de contrôle de la qualité appropriés dans chaque course à utiliser pour s'assurer que tous les réactifs et les procédures sont corrects.

Caractéristiques De Performance De La Trousse:

Ce kit a été validé conformément aux lignes directrices de l'EMA/FDA conformément au Code d'harmonisation des analyses biologiques du PCI.

Sensibilité:

Limite de Détection: Il est défini comme la concentration détectable la plus faible correspondant à un signal de la norme moyenne de '0' plus 2 SD.

10 répliques des normes '0' ont été évaluées et le LOD s'est avéré inférieur à 10 ng/ml.

Spécificité:

Le kit utilise deux antigènes spécifiques pour Tocilizumab (RoActemra/Actemra) qui ont été achetés commercialement. Un certificat complet de traçabilité pour la normalisation des normes/calibrateurs est disponible sur demande.

Traçabilité:

Il n'existe pas de normes de référence pour l'anti-Tocilizumab. Les résultats sont rapportés dans ng/mL et la méthode a été normalisée dans les laboratoires de KRISHGEN BIOSYSTEMS.

Linéarité:

Les normes fournies dans le kit seront utilisées pour mesurer la gamme de linéarité d'Anti-Tocilizumab présent dans la matrice.

La gamme de normes / calibrator est de 0 - 640 ng/ml.

Précision:

La précision est définie comme le coefficient de variation (%CV), c'est-à-dire l'écart standard divisé par la moyenne et multiplié par 100. La précision d'essai a été déterminée par la reproductibilité intra (n-5 assays) et inter-assay (n'5 assays) sur deux bassins avec des concentrations basses (10 ng/ml), moyennes (60 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 un technicien, il est recommandé que tous les opérateurs obtiennent une précision inférieure à ces objectifs de conception avant de communiquer les résultats.

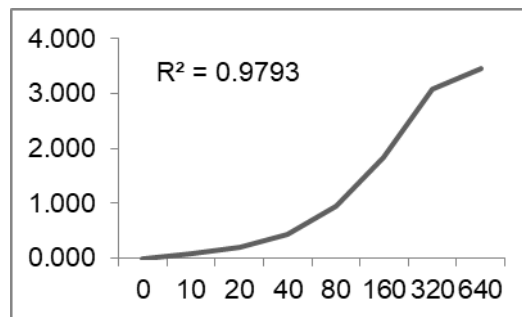
Pool	Intra Assay %CV	Inter Assay %CV
Low	<10%	<10%
Medium	<5%	<5%
High	<5%	<5%

Récupération:

Le sérum humain et le plasma ont été mesurés à l'aide de deux répliques et de deux séries par jour pendant 20 jours (n=80). Le sérum humain et le plasma ont été mis en commun des échantillons de patients et de donneurs isolés. Des échantillons ont été mesurés à l'aide d'un lot de réactifs, dans deux laboratoires de KRISHGEN

BIOSYSTEMS. Toutes les données répondaient à nos critères d'acceptation pour le pourcentage de CV et 95% d'intervalles de confiance pour le % CV.

Standards (ng/ml)	Absorbance of 1:1000 Diluted and Spiked in Serum	Net Abs	Interpolated Concentration	Serum Recovery %
0	0.066	0.000		---
10	0.160	0.094	10.27	86.39
20	0.255	0.189	22.88	92.10
40	0.496	0.430	44.23	97.86
80	1.016	0.950	81.30	99.49
160	1.896	1.830	149.96	94.20
320	3.142	3.076	358.46	100.90
640	3.526	3.460	575.23	109.17



* *Recov Conc = Recovery Concentration*
Abs = Absorbances at 450 nm
Std = Standards

Note: Serum was diluted using Standard Diluent provided with the kit

Précautions De Sécurité :

- **Usage In Vitro Diagnostic uniquement.** Suivez attentivement les instructions de travail.
- Les dates d'expiration indiquées sur le kit doivent être observées. Il en va de même pour la stabilité indiquée pour les réactifs.
- Ne pas utiliser ou mélanger les réactifs de différents lots.
- N'utilisez pas de réactifs d'autres fabricants.
- Éviter le décalage horaire pendant le tuyautage des réactifs.
- Tous les réactifs doivent être conservés dans le conteneur d'expédition d'origine.
- Certains des réactifs contiennent une petite quantité d'azide de sodium (0,1 % w/w) comme agent de conservation. Ils ne doivent pas être avalés ou autorisés à entrer en contact avec la peau ou la muqueuse.
- Les matériaux sources peut-être dérivés de fluides corporels humains ou d'organes utilisés dans la préparation de ce kit ont été testés et trouvés négatifs pour le HBsAg et le VIH ainsi que pour les anticorps contre le 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 la trousse contient des matières potentiellement dangereuses, les précautions suivantes doivent être observées
 - Ne fumez pas, ne mangez pas ou ne buvez pas pendant la manipulation du matériel du kit
 - Utilisez toujours des gants de protection
 - Jamais de matériau de pipette par la bouche
 - Essuyez rapidement les déversements, en lavant complètement la surface affectée à l'égard d'un décontaminant.
- Dans tous les cas, GLP devrait être appliqué avec tous les règlements généraux et individuels à l'utilisation de ce kit.



Références:

Tocilizumab intraveineux : revue de son utilisation chez les adultes atteints de polyarthrite rhumatoïde... Dhillon S... BioDrugs... 2014... Springer.

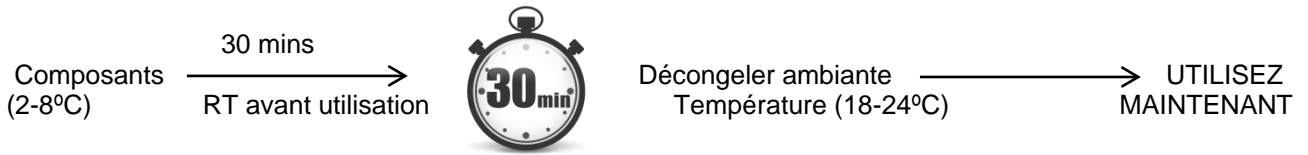
Pharmacologie clinique du tocilizumab pour le traitement des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde... Zhang X, Peck R... Expert Rev Clin Pharmacol... 2011... Taylor et Francis

Un essai de phase I combinant la carboplatine/doxorubicine avec le tocilizumab, un anticorps monoclonal anti-IL-6R, et l'interféron-2b dans les patients atteints d'un cancer épithélial récurrent de l'ovaire... Dijkgraaf EM, Santegoets SJ... Ann Oncol... 2015... Oxford

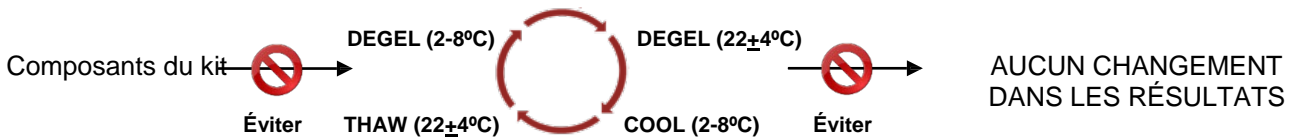
Tocilizumab dans la polyarthrite rhumatoïde progressive précoce : FUNCTION, un essai contrôlé randomisé... Burmester GR, Rigby WF, van Vollenhoven RF, Kay J, Rubbert-Roth A, Kelman A, Dimonaco S, Mitchell N... Ann Rheum Dis... 2015... Bmj

MODE OPERATOIRE SCHÉMATIQUE

1. Retirer tous les composants, 30 minutes avant d'ajouter dans la plaque d'essai.



2. Évitez le dégel froid répété des composants car il y aura une perte d'activité et cela peut affecter les résultats.




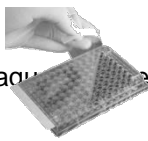
3. Pipette 50 ul Tocilizumab:HRP Conjugare dans les puits.



4. Pipeter 100 ul de Standards / Échantillons dans les puits respectifs.



4. Couvrir la plaque et Incuber pendant  at 37°C.




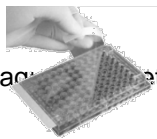
5. Aspirer et laver les puits 4 fois avec le Tampon de Lavage (1X)



6. Pipetter 100 ul Substrat TMB dans chaque puits.





7. Couvrir la plaque et Incuber pendant  at 37°C



8. Pipetter 100 ul de Solution d'arrêt dans chaque puits



9. 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'Tocilizumab 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	<i>Échantillon</i>			
3B 4B	<i>Échantillon</i>			

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.

Krishgen Biosystems. 2020

MERCI D'UTILISER LE PRODUIT KRISHGEN!






KRIBIOLISA™ Anti-Tocilizumab ELISA

REF : KBI2022

Ver 1.1

IVD


Enzym Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern gegen Tocilizumab in Serum, Plasma und Zellkultur-Überstand

IVD	Für In-vitro-diagnostische	REF	Katalog Nummer
	Lagerung Bei Einer	LOT	Batch Code
	Hergestellt von		Biologische Gefahr
	Ablaufdatum		Konsultieren Sie die Bedienungsanleitung

Für In-Vitro-Diagnostische Anwendung Nur. Kauf gehören oder das Recht zum Weiterverkauf oder dieses Produkt übertragen, entweder als eigenständiges Produkt oder als Bestandteil eines anderen Produkts tragen nicht. Verwendung dieses Produktes als die zulässige Nutzung ohne die ausdrückliche schriftliche Genehmigung des KRISHGEN BioSystems ist streng verboten.



REF KBI2022

 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:

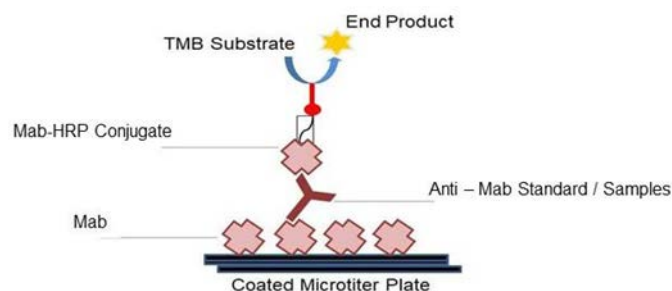
Tocilizumab, auch bekannt als Atlizumab, ist ein immunsuppressives Medikament, hauptsächlich zur Behandlung von rheumatoider Arthritis (RA) und systemischer juveniler idiopathischer Arthritis, einer schweren Form von Arthritis bei Kindern. Es ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R). Interleukin 6 (IL-6) ist ein Zytokin, das eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielt und in die Pathogenese vieler Krankheiten wie Autoimmunerkrankungen, multiples Myelom und Prostatakrebs verwickelt ist. Es wurde von Hoffmann–La Roche und Chugai entwickelt.

Beabsichtigte Verwendung:

Der KRIBIOLISA™ Anti-Tocilizumab ELISA wird als Analyseinstrument zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern gegen Tocilizumab in Serum, Plasma und Zellkulturüberstand eingesetzt.

Prinzip:

Die Methode verwendet die quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik. Tocilizumab ist auf Mikrobrunnen vorbeschichtet. Proben und Standards werden in Mikrobrunnen pipettiert und Antikörper gegen Tocilizumab, die in der Probe enthalten sind, sind durch den Capture-Antikörper gebunden. Dann wird ein HRP (Meerrettichperoxidase) konjugiertes Tocilizumab pipettiert und inkubiert. Nach dem Waschen von Mikrobrunnen, um eine unspezifische Bindung zu entfernen, wird die gebrauchsfertige Substratlösung (TMB) zu Mikrobrunnen hinzugefügt und die Farbe entwickelt sich proportional zu der Menge an Antikörpern gegen Tocilizumab, die in der Probe vorhanden sind. Die Farbentwicklung wird dann durch Hinzufügen einer Stop-Lösung gestoppt. Die Absorption wird bei 450 nm gemessen.

**Zur Verfügung gestellte Materialien:**

1. Tocilizumab beschichtete Mikrotiterplatte (12 x 8 Brunnen) – 1 nein
2. Anti-Tocilizumab Standard, (0,5 ml/Durchstechflasche) – 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 und 640 ng/ml
3. Tocilizumab:HRP Konjugat – 6 ml
4. Probe Verdünnermittel – 50 ml
5. Waschpuffer (20X) – 25 ml
6. TMB Substrat – 12 ml
7. Stop-Lösung – 12 ml
8. Bedienungsanleitung

Vom Endbenutzer zur Verfügung zu gestellte Materialien:

1. Microtiter Plate Reader in der Lage, Absorption bei 450 nm zu messen.
2. Einstellbare Pipetten und Mehrkanalpipettor zur Messung von Volumina von 25 µl bis 1000 µl
3. Deionisiertes (DI) Wasser
4. Waschflasche oder automatische Mikroplattenscheibe
5. Standard-Graphenpapier oder Software zur Datenanalyse
6. Timer
7. Absorbierendes Papier

Handhabung/Lagerung:

1. Alle Reagenzien sollten bei 20°C bis 80°C zur Stabilität gelagert werden.
2. Alle Reagenzien und Waschlösungen sollten innerhalb von 12 Monaten ab Herstellungsdatum verwendet werden.
3. Vor der Verwendung alle Komponenten auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Stellen Sie nach Abschluss des Assays sicher, dass alle Komponenten des Kits an die entsprechenden Lagerbedingungen zurückgegeben werden.
4. Das Substrat ist lichtempfindlich und sollte vor direkter Sonneneinstrahlung oder UV-Quellen geschützt werden.

Warnungen vor Gesundheitsgefahren:

1. Reagenzien, die Konservierungsstoffe enthalten, können schädlich sein, wenn sie durch die Haut aufgenommen, eingeatmet oder absorbiert werden.
2. Für In-Vitro-Diagnostische Anwendung Nur

**Probenvorbereitung und -lagerung:**

Blut wird durch Venenpunktion entnommen. Serum wird nach der Gerinnung durch Zentrifugation getrennt. Plasma kann auch verwendet werden. Lipaemische, hämolytische oder kontaminierte Proben sollten nicht ausgeführt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Sollen Proben für mehrere Assays verwendet werden, zunächst aliquote Proben und halten bei -20°C.

Für Zellkultur-Supernatant – Falls erforderlich, Zentrifuge, um Trümmer vor der Analyse zu entfernen. Proben können bei -20°C oder -80°C gelagert werden. Vermeiden Sie wiederholte Frost-Tau-Zyklen.

Vorbereitung vor Gebrauch:

Lassen Sie Proben vor dem Test Raumtemperatur erreichen. Achten Sie darauf, Patientenproben schonend zu rühren, um Homogenität zu gewährleisten.

Die Proben sollten 1:1000 (v/v), d.h. 1 µl Probe + 999 µl Probenverdünnungsvor-test vor dem Test verdünnt werden. Die Proben können bis zu drei Tage bei 2 - 8°C aufbewahrt werden. Für langzeitbereite Lagerung bitte bei -20°C lagern.

Reagenzzubereitung (alle Reagenzien sollten unmittelbar vor der Anwendung verdünnt werden):

1. Beschriften Sie alle Aliquots, die mit dem Kit Lot No und Ablaufdatum hergestellt werden, und speichern Sie es zu den angegebenen Bedingungen.
2. Bringen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur.
3. Um Wash Buffer (1X); 25 ml 20X Waschpuffer in 475 ml DI-Wasser verdünnen.

Verfahrenshinweise:

1. Um eine gute Testreproduzierbarkeit und Empfindlichkeit zu erreichen, ist eine ordnungsgemäße Reinigung der Platten zur Entfernung überschüssiger unreaktiver Reagenzien unerlässlich.
2. High Dose Hook Effect kann in Proben mit sehr hohen Konzentrationen von Anti-Tocilizumab-Antikörpern beobachtet werden. High Dose Hook Effect ist aufgrund eines Überschusses von Tocilizumab für sehr hohe Konzentrationen von Antikörpern gegen Tocilizumab in der Probe vorhanden. High Dose Hook-Effekt ist höchstwahrscheinlich von Proben früh im Reinigungsprozess auftreten. Wenn Hook Effect möglich ist, sollten die zu assayenden Proben mit einem kompatiblen Verdünnungsmittel verdünnt werden. Wenn also die Anti-Tocilizumab-Antikörperkonzentration der unverdünnten Probe geringer ist als die verdünnte Probe, kann dies auf den Hook-Effekt hinweisen.
3. Vermeiden Sie den Test von Proben, die Natriumazid (NaN₃) enthalten, da sie die HRP-Aktivität zerstören könnte, was zu einer Unterschätzung der Menge an Anti-Tocilizumab führen könnte.

4. Es wird empfohlen, alle Standards und Proben in Duplikaten zu beproben.
5. Halten Sie eine sich wiederholende Timing-Sequenz von gut bis gut für alle Schritte, um sicherzustellen, dass die Inkubationszeiten für jeden Brunnen gleich sind.
6. Wenn das Substrat vor der Verwendung eine ausgeprägte blaue Farbe hat, kann es kontaminiert worden sein, und die Verwendung eines solchen Substrats kann zu einer Kompromisierung der Empfindlichkeit des Assays führen.
7. Die Platten sollten innerhalb von 30 Minuten nach dem Hinzufügen der Stop-Lösung gelesen werden.
8. Erstellen Sie eine Arbeitsliste, um den Standort von Standards und Proben zu identifizieren.

Assay-Verfahren:

1. Es wird dringend empfohlen, alle Steuerelemente und Samples in Duplikaten oder Triplicaten auszuführen. Für jeden Test ist eine Standardkurve erforderlich. Alle Schritte müssen bei 37°C durchgeführt werden.
2. Pipette 50 ul von Anti-Tocilizumab: HRP Conjugate in jedem Brunnen.
3. Fügen Sie 100 ul Standards oder Samples in die jeweiligen Brunnen.
4. Bedecken Sie die Platte und inkubieren Sie 45 Minuten bei 37°C.
5. Aspirieren und Waschplatte 4 mal mit Waschpuffer (1X) und Blot Restpuffer durch festes Klopfen Platte auf dem Kopf auf saugfähigem Papier. Wischen Sie jede Flüssigkeit von der Unterseite außerhalb der Mikrotiterbrunnen ab, da rückstände in den Leseschritt eingreifen können.
6. Fügen Sie 100 ul TMB Substrat in jedem Brunnen hinzu.
7. Inkubieren Sie die Platte bei 37°C für 30 Minuten im Dunkeln. NICHT SHAKE oder sonst kann es zu höheren Hintergründen und schlechtere Präzision führen. Positive Brunnen sollten bläulich in der Farbe drehen.
8. Pipette aus 100 ul Stop Solution. Brunnen sollten sich von blau zu gelb in der Farbe drehen.
9. Lesen Sie die Absorption bei 450 nm mit einem Mikroplattenleser.

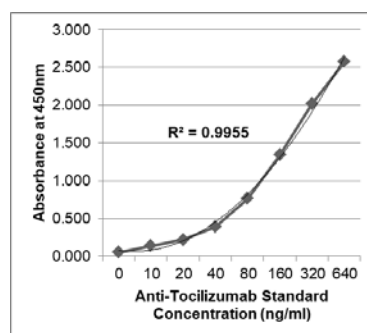
Berechnung der Ergebnisse:

Bestimmen Sie die mittlere Absorption für jeden Satz doppelter oder dreifacher Standards und Samples. Zeichnen Sie anhand von Standarddiagrammpapier den Durchschnittswert (Absorption 450nm) jedes Standards auf der Y-Achse im Vergleich zur entsprechenden Konzentration der Standards auf der X-Achse. Zeichnen Sie die beste Passungskurve durch die Standardpunkte. Um die unbekannte Anti-Tocilizumab-Antikörperkonzentration zu bestimmen, finden Sie den mittleren Absorptionswert 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-Tocilizumab-Antikörperkonzentration. Wenn Proben verdünnt wurden, multiplizieren Sie mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor. Software, die in der Lage ist, eine kubische Spline-Kurve-Fit zu erzeugen, wird am besten für automatisierte Ergebnisse empfohlen.

Hinweis:

- Es wird empfohlen, den Test bei einem anderen Verdünnungsfaktor in den folgenden Fällen zu wiederholen:
- Wenn der Probenabsorptionswert unter dem ersten Standard liegt.
 - Wenn der Absorptionswert äquivalent oder höher als der 640 ng/ml-Standard ist.

Typical Graph



Standards (ng/ml)	Abs1	Abs 2	Mean	Net Abs
0	0.051	0.046	0.048	0.000
10	0.137	0.136	0.137	0.088
20	0.217	0.218	0.218	0.169
40	0.395	0.380	0.388	0.339
80	0.771	0.754	0.762	0.714
160	1.365	1.322	1.343	1.295
320	2.040	1.998	2.019	1.971
640	2.566	2.584	2.575	2.527

Qualitätskontrolle:

Es wird empfohlen, für jeden Labortest geeignete Qualitätskontrollproben in jedem Durchlauf 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: Sie ist definiert als die niedrigste nachweisbare Konzentration, die einem Mittelwertsignal von '0' Standard plus 2* SD entspricht.

10 Wiederholungen von "0"-Standards wurden ausgewertet und die LOD betrug weniger als 10 ng/ml

Spezifität:

Das Kit verwendet zwei spezifische Antigene für Tocilizumab (RoActemra/Actemra), die kommerziell beschafft wurden. Ein vollständiges Rückverfolgbarkeitszertifikat für Normen/Kalibrator-Standardisierung ist auf Anfrage erhältlich.

Rückverfolgbarkeit:

Es gibt keine Referenzstandards für Anti-Tocilizumab. Die Ergebnisse werden in ng/mL gemeldet und die Methode wurde in den Laboratorien von KRISHGEN BIOSYSTEMS standardisiert.

Linearität:

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

Die Standards / Kalibratorbereich ist 0 - 640 ng/ml.

Präzision:

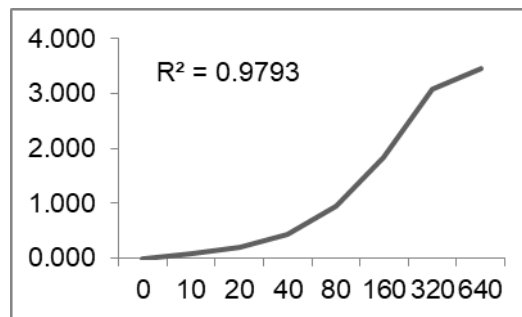
Die Genauigkeit ist definiert als der prozentuale Variationskoeffizient (%CV), d.h. Standardabweichung dividiert durch den Mittelwert und multipliziert mit 100. Die Assay-Präzision wurde sowohl durch Intra(n=5-Assays) als auch durch Inter-Assay (n=5-Assays) Reproduzierbarkeit an zwei Becken mit niedrigen (10 ng/ml), mittleren (60 ng/ml) und hohen (640 ng/ml) Konzentrationen bestimmt. Obwohl die tatsächliche Genauigkeit von Labor zu Labor und Techniker bis Techniker variieren kann, wird empfohlen, dass alle Bediener präzisionsunter diesen Entwurfszielen erreichen, bevor ergebnisse gemeldet wird.

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

Genesung:

Menschliche Seren und Plasma wurden mit zwei Wiederholungen und zwei Durchläufen pro Tag für 20 Tage (n = 80) gemessen. Die menschlichen Seren und Plasma wurden gepoolt Patienten und Einzelspender Spiked Proben. Die Proben wurden mit einer Charge Reagenz in zwei Laboratorien von KRISHGEN BIOSYSTEMS gemessen. Alle Daten erfüllten unsere Akzeptanzkriterien für % CV und 95% Konfidenzintervalle für % CV.

Standards (ng/ml)	Absorbance of 1:1000 Diluted and Spiked in Serum	Net Abs	Interpolated Concentration	Serum Recovery %
0	0.066	0.000		---
10	0.160	0.094	10.27	86.39
20	0.255	0.189	22.88	92.10
40	0.496	0.430	44.23	97.86
80	1.016	0.950	81.30	99.49
160	1.896	1.830	149.96	94.20
320	3.142	3.076	358.46	100.90
640	3.526	3.460	575.23	109.17



* *Recov Conc = Recovery Concentration*
Abs = Absorbances at 450 nm
Std = Standards

Note: Serum was diluted using Standard Diluent provided with the kit

Sicherheitsvorkehrungen:

- **Für In-Vitro-Diagnostische Anwendung Nur.** Befolgen Sie die Arbeitsanweisungen sorgfältig.
- Die auf dem Kit angegebenen Ablaufdaten sind zu beachten. Dasselbe gilt für die Stabilität, die für Reagenzien angegeben ist.
- Verwenden oder mischen Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Losen.
- Verwenden Sie keine Reagenzien anderer Hersteller.
- Vermeiden Sie Zeitverschiebungen beim Pipetieren von Reagenzien.
- Alle Reagenzien sollten im Original-Versandbehälter aufbewahrt werden.
- Einige der Reagenzien enthalten eine geringe Menge Natriumazid (ca. 0,1 % w/w) als Konservierungsmittel. Sie dürfen nicht geschluckt werden oder dürfen nicht mit Haut oder Schleimhaut in Berührung kommen.
- Quellmaterialien, die möglicherweise aus menschlichen Körperflüssigkeiten oder Organen gewonnen wurden, die bei der Herstellung dieses Kits verwendet wurden, wurden getestet und negativ auf HBsAg und HIV sowie auf HCV-Antikörper gefunden. Kein bekannter Test garantiert jedoch das Fehlen solcher viralen Wirkstoffe. Behandeln Sie daher alle Komponenten und alle Patientenproben wie potenziell gefährlich.
- Da das Kit potenziell gefährliche Stoffe enthält, sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen
 - Rauchen, essen oder trinken Sie nicht, während Sie Das Material des Kits behandeln
 - Verwenden Sie immer Schutzhandschuhe
 - Niemals Pipettenmaterial durch den Mund
 - Verschütten Sie verschüttet eisschnell und waschen Sie die betroffene Oberfläche gründlich mit einem Dekontaminationsmittel.
- In jedem Fall sollte GLP mit allen allgemeinen und individuellen Vorschriften auf die Verwendung dieses Kits angewendet werden.



Verweise:

Intravenöses Tocilizumab: eine Überprüfung seiner Anwendung bei Erwachsenen mit rheumatoider Arthritis... Dhillon S... BioDrugs... 2014... Springer

Klinische Pharmakologie von Tocilizumab zur Behandlung von Patienten mit rheumatoider Arthritis... Zhang X, Peck R... Experte Rev Clin Pharmacol... 2011... Taylor & Francis

Eine Phase-I-Studie, in der Carboplatin/Doxorubicin mit Tocilizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen IL-6R, und Interferon-2b bei Patienten mit rezidivierendem epitheliale Eierstockkrebs kombiniert wird... Dijkgraaf EM, Santegoets SJ... Ann Oncol... 2015... Oxford

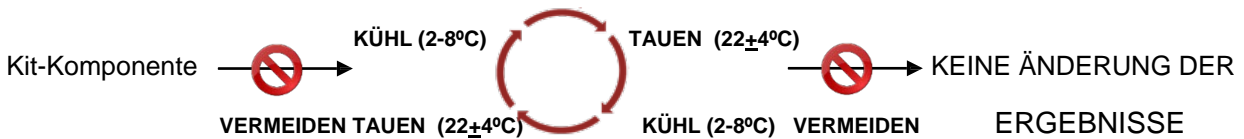
Tocilizumab bei früher progressiver rheumatoider Arthritis: FUNCTION, eine randomisierte kontrollierte Studie... Burmester GR, Rigby WF, van Vollenhoven RF, Kay J, Rubbert-Roth A, Kelman A, Dimonaco S, Mitchell N... Ann Rheum Dis... 2015... BmjGR, Rigby WF, van Vollenhoven RF, Kay J, Rubbert-Roth A, Kelman A, Dimonaco S, Mitchell N... Ann Rheum Dis... 2015... BMJ

SCHEMATISCHES TESTVERFAHREN


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

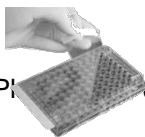




2. Vermeiden Sie wiederholtes Abkühlen und Auftauen der Komponenten, da es zu einem Aktivitätsverlust kommen kann und dies die Ergebnisse beeinträchtigen kann.




3.  50 ul Tocilizumab: HRP in jede Vertiefung pipettieren


4.  100 ul Standards / Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren



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

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

6.  100 ul TMB-Substrat in jede Vertiefung pipettieren

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

8.  100 ul Stopplösung in jede Vertiefung pipettieren.

9. 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 Tocilizumab Äquivalent
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	<i>Probe</i>			
3B 4B	<i>Probe</i>			

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. 2020

DANKE FÜR DAS KRISHGEN PRODUKT!






KRIBIOLISA™ Anti-Tocilizumab ELISA

REF : KBI2022

Ver 1.1

IVD


Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de Anticuerpos contra Tocilizumab en suero, plasma y sobrenadante de cultivo celular

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

Para In Vitro Uso de Diagnóstico Solamente. Compra no incluye o ejercer 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 expresa autorización escrita de KRISHGEN BioSystems está estrictamente prohibida.



REF KBI2022

 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

Introducción:

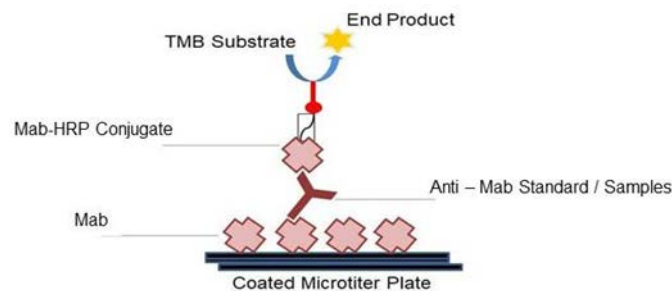
Tocilizumab, también conocido como atlizumab, es un medicamento inmunosupresor, principalmente para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR) y la artritis idiopática juvenil sistémica, una forma grave de artritis en niños. Es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de interleucina-6 (IL-6R). La interleucina 6 (IL-6) es una citoquina que desempeña un papel importante en la respuesta inmunitaria y está implicada en la patogénesis de muchas enfermedades, como las enfermedades autoinmunes, el mieloma múltiple y el cáncer de próstata. Fue desarrollado por Hoffmann-La Roche y Chugai.

Uso Previsto:

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

Principio:

El método emplea la técnica cuantitativa de inmunoensayo de enzimas sándwich. Tocilizumab está pre-revestido en micropozos. Las muestras y las normas se entuban en micropozos y los anticuerpos contra Tocilizumab presentes en la muestra están unidos por el anticuerpo de captura. Luego, un Tocilizumab conjugado conjugado HRP (peroxidasa de rábano picante) se pipetea e incuba. Después del lavado de micropozos con el fin de eliminar cualquier unión no específica, la solución de sustrato lista para usar (TMB) se añade a los micropozos y el color se desarrolla proporcionalmente a la cantidad de anticuerpos contra Tocilizumab presente en la muestra. El desarrollo del color se detiene entonces por la adición de la solución de parada. La absorbancia se mide a 450 nm.




Materiales Proporcionados:

1. Placa de microtíter recubierto de Tocilizumab (12 x 8 pocillos) - 1 no
2. Norma Anti-Tocilizumab, (0,5 ml/vial) - 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 y 640 ng/ml
3. Tocilizumab:HRP Conjugate - 6 ml
4. Diluyente de muestra - 50 ml
5. Tampón de lavado (20X) - 25 ml
6. Sustrato TMB - 12 ml
7. Solución Stop - 12 ml
8. Manual de instrucciones

Materiales Que Debe Proporcionar el Usuario Final:

1. Lector de placas de microtíter capaz de medir la absorbancia a 450 nm.
2. Pipetas ajustables y pipetador multicanal para medir volúmenes que van desde 25 ul a 1000 ul
3. Agua desionizada (DI)
4. Lave la botella o la lavadora automatizada de microplacas
5. Papel gráfico estándar o software para el análisis de datos
6. Temporizador
7. Papel absorbent

Manipulación / Almacenamiento:

1. Todos los reactivos deben almacenarse a 20C a 80C para mayor estabilidad.
2. Todos los reactivos y soluciones de lavado deben utilizarse en un plazo de 12 meses a partir de la fecha de fabricación.
3. Antes de usar, lleve todos los componentes a temperatura ambiente (18-250C). Al finalizar el ensayo, asegúrese de que todos los componentes del kit vuelvan a las condiciones de almacenamiento adecuadas. 
4. El sustrato es sensible a la luz y debe estar protegido de la luz solar directa o de fuentes UV.

Advertencias De Peligro Para La Salud:

1. Los reactivos que contienen conservantes pueden ser nocivos si se ingieren, inhalan o absorben a través de la piel.
2. Para In Vitro Uso de Diagnóstico Solamente

Preparación y Almacenamiento De Muestras:

La venopunción toma sangre. El suero se separa después de la coagulación por centrifugación. El plasma también se puede usar. No se deben ejecutar muestras lipaémicas, hemolíticas o contaminadas. Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas. Si se van a utilizar muestras para varios ensayos, inicialmente muestras de alícuota y mantener a - 20°C.

Para el sobrenadante de cultivo celular– Si es necesario, centrifuga para eliminar los desechos antes del análisis. Las muestras se pueden almacenar a -20°C o -80°C. Evite ciclos de congelación-descongelación repetidos.

Preparación Antes De Su Uso:

1. Deje que las muestras alcancen la temperatura ambiente antes del ensayo. Tenga cuidado de agitar las muestras de los pacientes suavemente para garantizar la homogeneidad.
2. Las muestras deben diluirse 1:1000 (v/v), es decir, 1 ul muestra + 999 ul diluyente de la muestra antes del ensayo. Las muestras pueden conservarse entre 2 y 8°C durante un máximo de tres días. Para almacenamiento a largo plazo, por favor almacene a -20°C.

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

1. Etiquete las alícuotas hechas con el kit Lot No y Expiration date y guárdelo en las condiciones apropiadas mencionadas.
2. Lleve todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
3. Para hacer wash buffer (1X); diluir 25 ml de tampón de lavado 20X en 475 ml de agua DI.

Notas de Procedimiento:

1. Con el fin de lograr una buena reproducibilidad y sensibilidad del ensayo, es esencial un lavado adecuado de las placas para eliminar el exceso de reactivos no reaccionados.
2. Se puede observar un efecto de gancho de alta dosis en muestras con concentraciones muy altas de anticuerpos anti-Tocilizumab. Efecto de gancho de alta dosis se debe al exceso de Tocilizumab para concentraciones muy altas de anticuerpos contra Tocilizumab presente en la muestra. El efecto Gancho de alta dosis se encuentra probablemente a partir de muestras al principio del proceso de purificación. Si es posible Efecto Gancho, las muestras a analizar deben diluirse con un diluyente compatible. Por lo tanto, si la concentración de anticuerpos Anti-Tocilizumab de la muestra sin diluir es menor que la muestra diluida, esto puede ser indicativo del Efecto Gancho.
3. Evite el ensayo de muestras que contengan azida sódica (NaN₃), ya que podría destruir la actividad de HrP que resulta en una subestimación de la cantidad de Anti-Tocilizumab.

4. Se recomienda que todas las Normas y Muestras se ensayen por duplicados.
5. Mantener una secuencia de sincronización repetitiva de pozo a pozo para todos los pasos para asegurarse de que los tiempos de incubación son los mismos para cada pozo.
6. Si el sustrato tiene un color azul distinto antes de su uso puede haber sido contaminado y el uso de dicho sustrato puede conducir a la mercantilización de la sensibilidad del ensayo.
7. Las placas deben leerse dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la solución Stop.
8. Hacer una lista de trabajo con el fin de identificar la ubicación de Las Normas y Muestras.

Procedimiento De Ensayo:

1. Se recomienda encarecidamente que todos los controles y muestras se ejecuten en duplicados o triplicados. Se requiere una curva estándar para cada ensayo. Todos los pasos deben realizarse a 37°C
2. Pipeta 50 ul de Anti-Tocilizumab: HRP Conjuga en cada poca.
3. Añadir 100 ul de normas o muestras en los pozos respectivos.
4. Cubra la placa e incubar durante 45 minutos a 37°C
5. Aspirar y lavar la placa 4 veces con el tampón de lavado (1X) y el tampón residual de la mancha tocando firmemente la placa boca abajo en el papel absorbente. La limpieza de cualquier líquido de la parte inferior exterior de los pozos de microtíter, ya que cualquier residuo puede interferir en el paso de lectura.
6. Agregue 100 ul de sustrato TMB en cada poca.
7. Incubar la placa a 37°C durante 30 minutos en la oscuridad. NO COMPARTIR o de lo contrario puede resultar en fondos más altos y peor precisión. Los pozos positivos deben volverse de color azulado.
8. Pipetear 100 ul de Stop Solution. Los pozos deben pasar de color azul a amarillo.
9. Lea la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas.

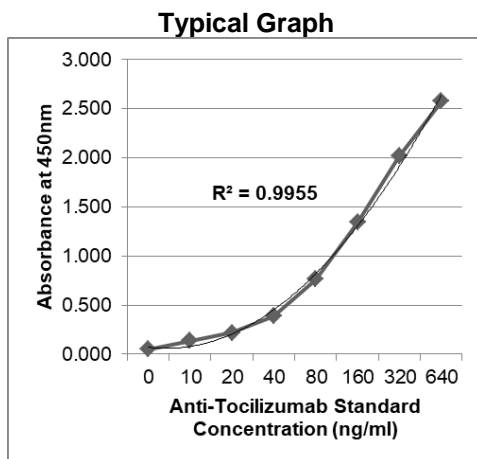
Cálculo de Resultados:

Determine la Absorbancia Media para cada conjunto de Normas y Muestras duplicadas o triplicadas. Utilizando papel gráfico estándar, trace el valor medio (absorbancia 450nm) de cada estándar en el eje Y frente a la concentración correspondiente de las normas en el eje X. Dibuje la curva de mejor ajuste a través de los puntos estándar. Para determinar la concentración desconocida de anticuerpos Anti-Tocilizumab, busque el valor de Absorbancia media del desconocido en el eje Y y dibuje una línea horizontal en la curva estándar. En el punto de intersección, dibuje una línea vertical hacia el eje X y lea la Concentración de anticuerpos Anti-Tocilizumab. Si las muestras se diluyeron, multiplique por el factor de dilución adecuado. El software que es capaz de generar una curva-ajuste spline cúbica se recomienda mejor para los resultados automatizados.

Nota:

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

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



Standards (ng/ml)	Abs1	Abs 2	Mean	Net Abs
0	0.051	0.046	0.048	0.000
10	0.137	0.136	0.137	0.088
20	0.217	0.218	0.218	0.169
40	0.395	0.380	0.388	0.339
80	0.771	0.754	0.762	0.714
160	1.365	1.322	1.343	1.295
320	2.040	1.998	2.019	1.971
640	2.566	2.584	2.575	2.527

Control De Calidad:

Se recomienda que para cada ensayo de laboratorio se utilicen muestras de control de calidad adecuadas en cada tirada para garantizar que todos los reactivos y procedimientos sean correctos.

Características De Rendimiento Del Kit:

Este kit ha sido validado de acuerdo con las directrices de la EMA/FDA de acuerdo 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 media de '0' estándar más 2 * SD.

Se evaluaron 10 réplicas de las normas «0» y se constató que el LOD era inferior a 10 ng/ml

Especificidad:

El kit utiliza dos antígenos específicos para Tocilizumab (RoActemra/Actemra) que se adquirieron comercialmente. Un certificado de trazabilidad completa para la estandarización de estándares/calibradores está disponible bajo petición.

Trazabilidad:

No existen normas de referencia para Anti-Tocilizumab. Los resultados se informan en ng/mL y el método ha sido estandarizado en los laboratorios de KRISHGEN BIOSYSTEMS.

Linealidad:

Las normas proporcionadas en el kit se utilizarán para medir el rango de linealidad de Anti-Tocilizumab presente en la matriz.

El rango de estándares / calibrador es 0 - 640 ng/ml.

Precisión:

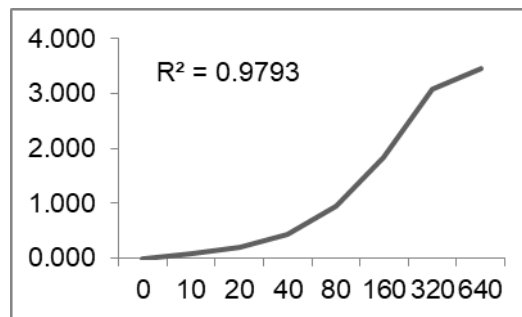
La precisión se define como el coeficiente porcentual de variación (%CV), es decir, la desviación estándar dividida por la media y multiplicada por 100. La precisión del ensayo se determinó tanto por la reproducibilidad intra (ensayos n-5) como por el ensayo entre ensayos (n-5) en dos piscinas con concentraciones bajas (10 ng/ml), medias (60 ng/ml) y altas (640 ng/ml). Si bien la precisión real puede variar de laboratorio a laboratorio y técnico a técnico, se recomienda que todos los operadores logren una precisión por debajo de estos objetivos de diseño antes de presentar los resultados.

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

Recuperación:

Los sueros humanos y el plasma se midieron con dos réplicas y dos corridas por día durante 20 días (n x 80). Los sueros humanos y el plasma fueron muestras de pacientes y pinchados de un solo donante. Las muestras se midieron utilizando un lote de reactivo, en dos laboratorios de KRISHGEN BIOSYSTEMS. Todos los datos cumplieron con nuestros criterios de aceptación para % CV y 95% intervalos de confianza para % CV.

Standards (ng/ml)	Absorbance of 1:1000 Diluted and Spiked in Serum	Net Abs	Interpolated Concentration	Serum Recovery %
0	0.066	0.000		---
10	0.160	0.094	10.27	86.39
20	0.255	0.189	22.88	92.10
40	0.496	0.430	44.23	97.86
80	1.016	0.950	81.30	99.49
160	1.896	1.830	149.96	94.20
320	3.142	3.076	358.46	100.90
640	3.526	3.460	575.23	109.17



* *Recov Conc = Recovery Concentration*
Abs = Absorbances at 450 nm
Std = Standards

Note: Serum was diluted using Standard Diluent provided with the kit

Precauciones de seguridad:

- **Para In Vitro Uso de Diagnóstico Solamente.** Siga cuidadosamente las instrucciones de trabajo.
- Deben observarse las fechas de caducidad indicadas en el kit. Lo mismo se refiere a la estabilidad declarada para los reactivos.
- No utilice ni mezcle reactivos de diferentes lotes.
- No utilice reactivos de otros fabricantes.
- Evite el cambio de hora durante el pipeteo de los reactivos.
- Todos los reactivos deben conservarse en el contenedor de envío original.
- Algunos de los reactivos contienen una pequeña cantidad de azida sódica (<<0,1 % p/p) como conservante. No deben tragarse ni permitirse que entren en contacto con la piel o la mucosa.
- Los materiales de origen tal vez derivados de fluidos u órganos corporales humanos utilizados en la preparación de este kit fueron probados y encontrados negativos para HBsAg y VIH, así como para los anticuerpos contra el VHC. Sin embargo, ninguna prueba conocida garantiza la ausencia de tales agentes virales. Por lo tanto, maneje todos los componentes y todas las muestras de pacientes como si fueran potencialmente peligrosas.
- Dado que el kit contiene materiales potencialmente peligrosos, se deben observar las siguientes precauciones
 - No fume, coma ni beba mientras manipula el material del kit
 - Utilice siempre guantes de protección
 - Nunca pipetee el material por vía oral
 - Limpie los derrames rápidamente, lavando bien la superficie afectada con un decontaminante.
- En cualquier caso, GLP debe aplicarse con todas las normativas generales e individuales al uso de este kit.



Referencias:

Tocilizumab intravenosa: una revisión de su uso en adultos con artritis reumatoide... Dhillon... BioFármacos... 2014... Springer

Farmacología clínica de tocilizumab para el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide... Zhang X, Peck R... Experto Rev Clin Pharmacol... 2011... Taylor & Francis

Un ensayo de fase I que combina carboplatino/doxorubicina con tocilizumab, un anticuerpo monoclonal anti-IL-6R, e interferón- α 2B en pacientes con cáncer ovárico epitelial recurrente... Dijkgraaf EM, Santegoets SJ... Ann Oncology... 2015... Oxford

Tocilizumab en la artritis reumatoide progresiva temprana: función, un ensayo controlado aleatorizado... Burmester GR, Rigby WF, van Vollenhoven RF, Kay J, Goma-Roth A, Kelman A, Dimonaco S, Mitchell N... Ann Rheum Dis... 2015... Bmj

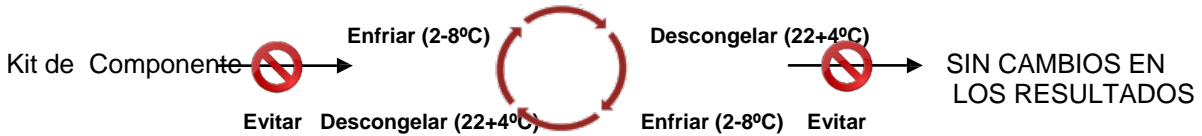
Efectividad de la tocilizumab con y sin fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintética en la artritis reumatoide: resultados de un estudio colaborativo europeo... Gabay C, Riek M, Hetland ML, Hauge EM, Pavelka K, Tomšič M, Canhao H, Chatzidionysiou K, Lukina G, Nordström DC, Lie E, Ancuta I, Hernández MV, van Riel PL, van Vollenhoven R, Kvien TK... Ann Rheum Dis. 2015.... BMJ

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. Pipetee 50 ul de Tocilizumab:HRP en cada pocillo



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



4. Cubrir la placa e incubar a 37°C

5. aspire y lave los pocillos 4 veces con Tampón de Lavado (1X)

6. Pipetear 100 ul de Sustrato TMB en cada pozo.

7. Cubrir la placa e incubar a 37°C

8. Pipetee 100 ul de Solución de Parada en Cada Pocillo.

9. 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 Tocilizumab equivalente
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	<i>Muestra</i>			
3B 4B	<i>Muestra</i>			

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. 2020

GRACIAS POR EL USO DEL PRODUCTO KRISHGEN!