

Serazym[®] ANA screen

Enzymimmunoassay zum Nachweis von IgG Antikörpern bei Bindegewebserkrankungen
in humanem Serum

REF E-065  96  *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Einführung

Kollagenosen (Bindegewebserkrankungen) sind systemische rheumatisch-entzündliche Erkrankungen die üblicherweise durch einen chronischen Verlauf mit übergreifenden Symptomen charakterisiert sind. Dazu gehören:

- Systemischer lupus erythematoses (SLE) und seine Varianten
- Sjögren Syndrom
- Systemische Sklerose
- Idiopathische (autoimmune) Myositiden
- Sharp Syndrom (Mischkollagenosen, mixed connective tissue disease)
- Overlap Syndrom

dsDNA-Antikörper:

IgG Antikörper gegen dsDNA sind Markerantikörper und ACR-Kriterium für die Diagnose eines systemischen Lupus erythematoses (SLE). Sie werden als prognostischer Marker des SLE angesehen und ihre Nachweisrate ist abhängig von dem Grad der Erkrankung und der organischen Manifestation:

- aktive SLE mit Beteiligung der Nieren >95%,
- aktive SLE ohne Beteiligung der Nieren 50-70%,
- inaktive SLE <40%.

In Patientenseren mit der Diagnose Rheumatoide Arthritis, juvenile chronische Arthritis, Sjögren Syndrom, Sklerose und anderen Erkrankungen können Antikörper gegen dsDNA zeitweise mit geringen Titern nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer höheren Spezifität im Vergleich zu anti-Nukleosomen-Antikörpern sind anti-dsDNA Antikörper unzweifelhaft von höchster Wichtigkeit für die Diagnose von SLE.

U1-snRNP-Antikörper:

Anti-U1-snRNP-Antikörper sind Marker-Antikörper und diagnostisches Kriterium von Mischkollagenosen (mixed connective tissue disease (MCTD)) mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 98% für hohe Titer von anti-U1-RNP-Antikörper in der Abwesenheit von anti-Sm- und anti-ds-DNA-Antikörpern.

Bei 13-32% der Patienten mit SLE und bei 10% der Patienten mit systemischer Sklerose wird ein meist geringer Titer von Anti-U1-RNP-Antikörpern nachgewiesen.

Durch Verwendung der drei RNP-Proteine A, C und 68 kD weist *Serazym*[®] ANA screen alle U1-RNP Antikörper nach.

Sm-Antikörper:

Anti-Sm-Antikörper sind ein diagnostische Marker und ACR-Kriterium von SLE mit einer Spezifität von 99%, aber einer Sensitivität von nur 10-15% bei SLE-Patienten kaukasischen Ursprung (und 30% bis über 40% bei asiatischen Patienten).

Antikörper gegen Sm gelten als prognostischer Marker für SLE seit ihre Assoziation mit verschiedenen organischen Erkrankungen (Niere, Zentralnervensystem) nachgewiesen wurde.

Ro/SS-A-Antikörper:

Anti-Ro/SS-A Antikörper gehören zu der Gruppe der antinukleären Antikörper (ANA), obgleich die Proteine Ro60 und Ro52 im Nukleus und im Zytoplasma lokalisiert sind. Ro60 ist bekannt als Protein des hY-RNP-Komplex, wohingegen Ro52 vor kurzem als E3-Ubiquitin-Ligase identifiziert wurde.

Antikörper gegen Ro/SS-A treten üblicherweise zusammen mit Antikörpern gegen La/SS-B auf.

Anti-Ro/SS-A-Antikörper wurden vorwiegend bei Patienten mit Sjögren Syndrom und den unterschiedlichen Formen von Lupus Erythematoses nachgewiesen, mit einer vermuteten höheren Spezifität von anti-Ro60-Antikörpern im Vergleich zu anti-Ro52-Antikörpern.

Sie dienen als diagnostischer Marker und sind Teil der Klassifikationskriterien für das primäre und sekundäre Sjögren Syndrom mit einer Sensitivität von 96% beziehungsweise 80%. Ro/SS-A-Antikörper werden als Marker für die frühe Diagnose des Sjögren Syndroms betrachtet, da sie Jahre vor der klinischen Manifestation auftreten.

Anti-Ro/SS-A-Antikörper sind bei 40-60% der SLE-Patienten nachweisbar. Sie können zusammen mit SLE-typischen Antikörpern (anti-ds-DNA-, anti-Sm-Antikörpern) auftreten oder als isolierte Antikörper, was auf eine relativ milde Form des SLE hindeutet.

Ebenso sind Antikörper gegen Ro/SS-A diagnostische Marker des subakuten kutanen Lupus erythematoses (SCLE) und sind in 90-100% der Fälle nachweisbar. In etwa 10% gehen diese Fälle in SLE über.

Antikörper gegen Ro/SS-A sind in nahezu 100% der neonatalen Lupus Erythematoses (NLE) Erkrankungen nachweisbar. Die Koinzidenz von anti-Ro/SS-A und LA/SS-B- Antikörpern ist mit einem kongenitalen Herzblock assoziiert.

Zusätzlich sind Antikörper gegen Ro/SS-A bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (5-8%) und systemischer Sklerotits (9%) nachweisbar.

La/SS-B-Antikörper:

Antikörper gegen La/SS-B dienen als wichtiger diagnostischer Marker und gehören zu den Klassifikationskriterien des Sjögren Syndrom. Die diagnostische Sensitivität liegt bei etwa 70% für das primäre und bei etwa 50% für das sekundäre Sjögren Syndrom. Im Falle eines simultanen Nachweises von La/SS-B- und Ro/SS-A-Antikörper ist die diagnostische Spezifität höher im Vergleich zum alleinigen Nachweis von Ro/SS-A-Antikörpern. Anti-La/SS-B-Antikörper treten fast immer zusammen mit anti-Ro/SS-A-Antikörpern auf.

La/SS-B-Antikörper werden als frühe diagnostische Marker für das Sjögren Syndrom angesehen, da sie Jahre vor der klinischen Manifestation nachgewiesen werden können.

In 25% der SLE-Fälle, in 70% der NLE-Fälle, sowie in 80% der SCLE-Fälle können Antikörper gegen La/SS-B nachgewiesen werden.

Scl 70-Antikörper:

Scl 70- oder Topoisomerase I-Antikörper sind diagnostische Marker für die systemische Sklerose mit einer Sensitivität von:

- 18-30% im Allgemeinen
- 10-15% bei limitierter Sklerose (CREST-Syndrom)
- 40-65% bei diffusen Formen der systemischen Sklerose

Die Spezifität erreicht nahezu 100%.

Patienten, die anti-Scl 70-Antikörper bilden, leiden üblicherweise an einer schwereren Erkrankung im Vergleich zu Patienten, die anti-Centromer-Antikörper bilden.

Antikörper gegen Scl 70 können Jahre vor einer klinischen Manifestation einer Sklerose nachgewiesen werden.

CENP-B-Antikörper:

CENP-B Antikörper werden als diagnostischer Marker der seltenen Form der systemischen Sklerose (Sensitivität 50-70%) gewertet. Patienten, die Antikörper gegen CENP-B entwickeln, zeigen üblicherweise einen eher milden Verlauf einer Sklerose. Jahre bevor spezifische Symptome einer Sklerose auftreten können Antikörper gegen CENP-B nachgewiesen werden. Sie sind nur bei 10-30% der Patienten mit primärer biliärer Zirrhose (PBC) und nur sehr selten bei Patienten die an anderen Kollagenosen leiden nachweisbar.

Jo-1-Antikörper:

Antikörper gegen Jo-1 repräsentieren einen diagnostischen Marker für idiopathische Myositiden mit einer diagnostischen Spezifität von nahezu 100%. Die Diagnostische Sensitivität erreicht 18-46% für Polymyositis und 25% für Dermatomyositis. Über 60% der Patienten mit messbarem Niveau an Antikörpern gegen Jo-1 leiden an fibrosierender Alveolitis.

Jo-1-Antikörper dienen als prognostischer Marker, da diese Patienten oft einen schweren Verlauf der Krankheit entwickeln.

Das Autoantigen, die Histidyl-tRNA-Synthetase, ist im Zytoplasma lokalisiert, so dass anti-Jo-1-Antikörper im eigentlichen Sinne nicht zu den antinukleären Antikörpern zu zählen sind.

Literatur:

1. Conrad, K., Schöblier, W., Hiepe, F., Fritzler, M.J.; Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases; Pabst Science Publishers Lengerich u.a. 2015
2. Peter, J.B., Shoenfeld Y. (Eds); Autoantibodies; Elsevier Amsterdam u.a. 1996
3. Tan, E.M.; Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune disease and probes for cell biology; Adv. Immunol. 44, 1989: 93-151

Anwendungsbereich

Serazym® ANA screen ist ein *in-vitro* Diagnostikum zum simultanen Nachweis von IgG Antikörpern gegen folgende nukleäre und zytoplasmatische Antigene: dsDNA, RNP, Sm, Ro/SS-A/60kD, La/SS-B, Scl-70, CENP und Jo-1 in humanem Serum.

Testprinzip

Im ersten Inkubationsschritt reagieren die verdünnten Proben, der gebrauchsfertige Kalibrator, sowie die negative Kontrolle mit den an der festen Phase adsorbierten hochreinen Antigenen. Ungebundene Komponenten werden nach einer 60 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT, 18...25°C) durch Absaugen und einem anschließenden Waschprozess entfernt.

Im zweiten Inkubationsschritt binden die Peroxidase (POD)-markierten anti-human-IgG Antikörper an die Probenantikörper. Ungebundenes Konjugat wird nach einer 30 minütigen Inkubation bei RT durch Absaugen und einem anschließenden Waschprozess entfernt.

Im dritten Schritt setzt die Peroxidase in einem 15 minütigen Inkubationsschritt bei RT die zugesetzte farblose Substratlösung mit Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Produkt um. Der Reaktionsstopp erfolgt durch Zugabe von Schwefelsäure in die Vertiefungen, wodurch ein Farbumschlag von blau zu gelb stattfindet.

Die bei 450/≥620 nm gemessene Extinktion (OD) des Endprodukts ist der Konzentration der spezifisch gebundenen Antikörper direkt proportional. Mit dem ermittelten OD-Wert des Kalibrators wird durch Multiplikation mit dem entsprechenden Faktor der Cut-off Wert errechnet. Der Bindungsindex wird durch Division der Extinktion der unbekannt Probe durch den vorher ermittelten Cut-off berechnet.

Testkomponenten

		Für 96 Kavitäten	
1	WELLS	Mikrotiterplatte Beschichtet mit 8 verschiedenen Antigenen / Well	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF CONC 10x	Waschpuffer 10-fach	100 ml Konzentrat für 1000 ml Lösung weisse Kappe
3	DIL	Verdünnungsmedium	100 ml · gebrauchsfertig rot gefärbt schwarze Kappe
4	CAL	Kalibrator Verdünnte Serumproben Faktor siehe Analysenzertifikat	1,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	CONTROL -	Negative Kontrolle Verdünnte Serumprobe	1,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6	CONJ HRP	POD-Konjugat POD-markierte, anti-human-IgG Antikörper	15 ml · gebrauchsfertig rot gefärbt rote Kappe
7	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	15 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe
8	STOP	Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure	15 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe
9		Abdeckfolien	2

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Gewinnung und Lagerung

Blut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation isolieren. Lipämische, hämolytische und kontaminierte Proben sollten nicht verwendet werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Die Lagerung der Proben ist bis zu 2 Tage bei 2...8 °C möglich. Darüber hinaus sollten die Proben bei -20°C eingefroren werden.

Vorbereitung vor Verwendung

Vor der Verwendung sollten die Proben auf RT erwärmt werden. Grundsätzlich sollte durch kurzes Aufschütteln eine Homogenität gesichert werden.

Hinweis: Die Patientenproben müssen vor dem Einsatz im Test 1 : 101 extern verdünnt werden, z.B. 10 µl Probe + 1000 µl Verdünnungsmedium (3).

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette 0,100 – 1,000 ml und 0,010 – 0,100 ml · Verstellbare 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten 0,050 – 0,200 ml · Pipettenspitzen · Reagenzbehälter zur Dispensierung mit 8-Kanalpipette · Messzylinder und Bechergläser 10 ml und 100 ml · Teströhrchen (2 ml) für die Probenverdünnung · 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät · Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter · destilliertes oder deionisiertes Wasser · Stoppuhr

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Serazym[®] ANA screen enthält Reagenzien für 12 x 8 Bestimmungen.

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C mindestens 2 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei Lagerung bei 2...8°C mindestens 1 Monat verwendbar.

Vorbereitung der Reagenzien

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem Aluminium-beschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und fest verschließen.

Stelle eine ausreichende Menge an Waschlösung durch das Verdünnen des Waschpuffers (10-fach) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser her.

Beispiel: 10 ml Waschpuffer (2) + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser

Außer dem Waschpuffer sind alle enthaltenen Komponenten gebrauchsfertig.

Testdurchführung

Alle Testkomponenten vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen.

Proben mit Verdünnungsmedium (3) 1 : 101 (v/v) verdünnen,

z.B. 10 μ l Probe + 1000 μ l Verdünnungsmedium (3).

Der Kalibrator und die Negative Kontrolle sind gebrauchsfertig.

Bei größeren Probenserien empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanalpipette, um Zeitverzögerungen zu vermeiden.

Die Einwirkzeit des Waschpuffers in den Kavitäten muss mindestens 5 Sekunden pro Waschzyklus betragen. Die Flüssigkeit muss nach jedem Waschzyklus komplett entfernt werden. Es wird empfohlen Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten zu entfernen.

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Arbeitsschritte

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Pipettiere: 100 µl **CAL** Kalibrator (4)
100 µl **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
100 µl **verdünnte Probe**
in die dafür vorgesehenen Kavitäten.
3. Platte abdecken (9) und für 60 min bei RT inkubieren.
4. Dekantieren und 3x mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 100 µl **CONJ HRP** HRP-Konjugat (6) pro Kavität pipettieren.
6. Platte abdecken (9) und für 30 min bei RT inkubieren.
7. Dekantieren und 3x mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 100 µl **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität pipettieren.
9. 15 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
10. 100 µl **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität pipettieren, vorsichtig mischen.
11. Messen der OD bei 450 nm / \geq 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min nach Reaktionsstopp.

Berechnung der Ergebnisse

Die Auswertung der Resultate erfolgt qualitativ über die Berechnung eines Cut-off Wertes oder semi-quantitativ durch die Ermittlung eines Bindungsindex (BI) für jede Probe auf der Basis des Cut-off Wertes unter Verwendung der folgenden Formel:

$$OD_{\text{Kalibrator}} \times \text{Faktor} = OD_{\text{Cut-off}}$$

Der Faktor ist chargenspezifisch und ist auf dem Analysenzertifikat aufgeführt.

Für die Berechnung des Bindungsindex (Ratio) wird die folgende Formel verwendet:

$$BI = OD_{\text{Probe}} / OD_{\text{Cut-off}}$$

Referenzwerte

Serazym® ANA screen	Bindungsindex
Positiv	$\geq 1,0$
Negativ	$< 1,0$

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden wenn:

- Der Extinktionsmittelwert vom Kalibrator CAL $\geq 0,80$
- Der Extinktionsmittelwert der Negativen Kontrolle CONTROL - $\leq 0,35$

Sind die o.g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten- und Temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Grenzen der Methode

Jede klinische Diagnose sollte nicht allein auf den Ergebnissen einer *in-vitro* diagnostischen Methode basieren. Um eine Diagnose zu erstellen sollten Ärzte sowohl alle klinischen Ergebnisse als auch die Laborergebnisse berücksichtigen. Wie bei allen immunologischen Bestimmungsmethoden können Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze sowie Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben zu inkorrekten Ergebnissen führen. Inkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Inkubation der Proben und der Kalibratoren können zu falschen Ergebnissen führen.

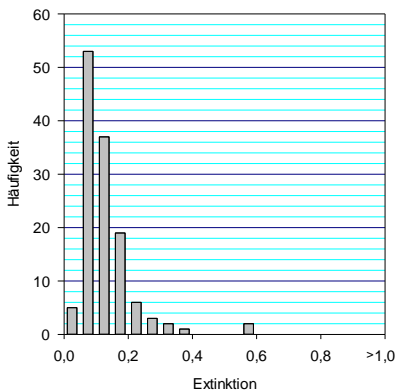
Bei automatischer Abarbeitung auf ELISA Prozessoren kann es in Abhängigkeit von der Einstellung des Washers gegebenenfalls empfehlenswert sein, die Kavitäten 5 mal (anstelle von 3 mal) je Waschzyklus zu waschen.

Leistungsmerkmale

Aus Mangel an internationalen Referenzpräparationen wird mittels Bindungsindex (BI) ausgewertet.

Häufigkeitsverteilung

Die Häufigkeitsverteilung der Antikörperkonzentration im *Serazym*[®] ANA screen von 128 unausgewählten Humanseren ist hier dargestellt:



Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizienten (VK [%]) im *Serazym*[®] ANA screen aus 6-fach Bestimmung von Proben:

Probe	BI	VK [%]
1	4,87	3,26
2	3,76	2,01
3	2,00	1,80
4	1,31	2,71

Inter-Assay Variationskoeffizienten (VK [%]) im *Serazym*[®] ANA screen in 16 differenten Ansätzen aus 2-fach Bestimmung von Proben:

Probe	BI	VK [%]
A	4,49	5,21
B	3,66	4,07
C	2,22	3,48
D	1,74	5,16

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck, seine geöffneten Reagenzien sowie die verdünnten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen mit Ausnahme von Waschlösung, TMB/Substratlösung und Stopplösung ist nicht erlaubt. Mikrotiterplatten und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Komplettierung eines Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.

Zeitverzögerungen beim Pipettieren sind zu vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Einige Reagenzien enthalten geringe Mengen Thimerosal (1,0 % v/v) und Thimerosal (< 0,01 % w/v) als Konservierungsmittel. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Nicht essen, trinken oder rauchen!







Nie mit dem Mund pipettieren!

Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!

Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!



Inkubationsschema *Serazym*[®] ANA screen

- | | | | |
|----|---|-------------|--|
| 1. |  | 100 µl | CAL (4) |
| | | 100 µl | CONTROL - (5) |
| | | 100 µl | verdünnte Probe |
| |  | 60 min | Inkubation (Raumtemperatur) |
| | | 3 x waschen | mit Waschlösung |
| 2. |  | 100 µl | CONJ HRP (6) |
| | | 30 min | Inkubation (Raumtemperatur) |
| |  | 3 x waschen | mit Waschlösung |
| 3. |  | 100 µl | SUBSTR TMB (7) |
| | | 15 min | Inkubation (Raumtemperatur) lichtgeschützt |
| 4. |  | 100 µl | STOP (8) |

Messung der Extinktion bei 450 / ≥ 620 nm



Hersteller

REF

Bestell-Nummer

LOT

Chargen-Nummer



Anzahl der Bestimmungen



Biologische Gefahr



Hinweise beachten



Verfallsdatum



Lagertemperatur



Arbeitsanleitung beachten

Serazym[®] ANA screen

Enzyme immunoassay for detection of IgG antibodies in connective tissue diseases
in human serum

REF E-065 ▽ 96 IVD *In-vitro*-diagnostic device CE



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Introduction

Connective tissue diseases are systemic inflammatory rheumatic diseases usually characterized by a chronic course (systemic connective tissue diseases) with overlapping symptoms (Overlap-Syndromes). Connective tissue diseases include:

- Systemic lupus erythematosus (SLE) and subsets
- Sjögren's syndrome
- Systemic sclerosis
- Idiopathic (autoimmune) myositis
- Mixed connective tissue disease (MCTD or Sharp syndrome)
- Overlap syndromes

dsDNA-antibodies:

IgG antibodies to dsDNA are marker antibodies and ACR-criterion for systemic lupus erythematoses (SLE). They are regarded as activity and prognostic marker of SLE. The detection frequency varies in dependence of the activity of the disease and organ manifestation: patients suffering from

- active SLE with renal involvement >95%,
- active SLE without renal involvement 50-70%,
- inactive SLE <40%.

In sera from patients with rheumatoid arthritis, juvenile chronic arthritis, Sjögren's syndrome, sclerosis and other diseases antibodies to dsDNA may also be detected temporarily with low titers. Due to their higher specificity in comparison to anti-nucleosome antibodies anti-dsDNA antibodies undoubtedly are of major importance for the diagnosis of SLE.

U1-snRNP antibodies:

Anti-U1-snRNP antibodies are marker antibodies and diagnostic criterion of mixed connective tissue disease (MCTD) with a sensitivity of 100% and a specificity of 98 % for high titers of anti-U1-RNP antibodies and in the absence of antibodies to Sm and dsDNA.

Antibodies to U1-RNP with often low titers are found in 13-32% of patients with SLE and in 10% of patients with systemic sclerosis.

Using the three RNP-proteins A, C and 68 kD *Serazym*[®] ANA screen detects all U1-RNP antibodies.

Sm antibodies:

Sm-antibodies are diagnostic marker and ACR-criterion of SLE with a specificity of 99%, but a sensitivity of only 10-15% in SLE patients of caucasian origin (and 30% to over 40% in asiatic patients).

Since an association to several organ manifestations (kidneys, central nervous system) has been proven, antibodies to Sm are considered as prognostic marker of SLE.

Ro/SS-A antibodies:

Ro/SS-A antibodies are predominantly detected in patients with Sjögren's syndrome and the different forms of lupus erythematoses. They serve as diagnostic marker and are part of the classification criteria of primary and secondary Sjögren's syndrome with a sensitivity of 96% and 80% respectively. Ro/SS-A antibodies are considered as markers for the early diagnosis of Sjögren's syndrome since they may occur years before clinical manifestation.

Anti-Ro/SS-A antibodies are detectable in 40-60% of patients who suffer from SLE. They may occur together with antibodies typical for SLE (anti-dsDNA, anti-Sm antibodies) or as isolated antibodies indicating a relatively mild form of SLE.

Antibodies to Ro/SS-A are a diagnostic marker of subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE) and detectable in 90-100% of the cases.

Ro/SS-A antibodies are detectable in nearly 100% of neonatal lupus erythematosus (NLE) cases. The coincidence of anti- Ro/SS-A and La/SS-B antibodies is associated with congenital heart block (CHB).

Ro/SS-A antibodies are additionally detectable in patients with rheumatoid arthritis (5-8%) and systemic sclerosis (9%).

La/SS-B antibodies:

Antibodies to La/SS-B serve as important diagnostic marker and belong to the classification criteria of Sjögren's syndrome. The diagnostic sensitivity is about 70% for the primary Sjögren's syndrome and about 50% for the secondary Sjögren's syndrome. In case of simultaneous detection of La/SS-B and Ro/SS-A antibodies diagnostic specificity for Sjögren's syndrome is higher in comparison to isolated detection of Ro/SS-A antibodies. Anti-La/SS-B antibodies almost always occur together with antibodies to Ro/SS-A.

La/SS-B antibodies are regarded as early diagnostic markers of Sjögren's syndrome, since they may be detectable years before clinical symptoms become evident. Antibodies to La/SS-B are detectable in 25% of systemic lupus erythematosus (SLE) cases, in 70% of neonatal lupus erythematosus (NLE) cases and in 80% of subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE) cases.

Scl 70 antibodies:

Scl 70- or Topoisomerase I antibodies are diagnostic marker of systemic sclerosis with a sensitivity of

- 18-30% in general
- 10-15% in limited sclerosis (CREST-syndrome)
- 40-65% in diffuse forms of systemic sclerosis

The specificity reaches nearly 100%.

Patients who develop anti-Scl 70 antibodies usually suffer from a more severe disease in comparison to patients with anti-centromer antibodies. Antibodies to Scl 70 may occur already years before specific symptoms of sclerosis are detectable.

CENP-B-antibodies:

CENP-B antibodies are considered as diagnostic marker of the limited form of systemic sclerosis (sensitivity 50-70%). Patients who develop antibodies to CENP-B usually show a rather mild course of sclerosis. Antibodies to CENP-B may occur already years before specific symptoms of sclerosis are detectable.

CENP-B antibodies are detectable in only 10-30% of patients with primary biliary cirrhosis (PBC) and very rarely in patients suffering from other connective tissue diseases.

Jo-1 antibodies:

Antibodies to Jo-1 represent a diagnostic marker for idiopathic myositis with a diagnostic specificity of nearly 100%. Diagnostic sensitivity reaches 18-46% for polymyositis and 25% for dermatomyositis. About 60% of patients with detectable levels of antibodies to Jo-1 suffer from fibrosing alveolitis.

Jo-1 antibodies serve as prognostic marker of myositis, since these patients often develop a severe course of the disease.

The cytoplasmatic localization of the target autoantigen (histidyl-tRNA-synthetase) actually excludes anti-Jo-1 antibodies from anti-nuclear antibodies in the original meaning of the word.

References:

1. Conrad, K., Schößler, W., Hiepe, F., Fritzler, M.J.; Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases; Pabst Science Publishers Lengerich, 2015
2. Peter, J.B., Shoenfeld Y. (Eds); Autoantibodies; Elsevier Amsterdam 1996
3. Tan, E.M.; Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune disease and probes for cell biology; Adv. Immunol. 44, 1989: 93-151

Intended use

Serazym[®] ANA screen is an *in-vitro* diagnostic device for simultaneous determination of IgG antibodies against the following nuclear and cytoplasmatic antigens: dsDNA, RNP, Sm, Ro/SS-A/60kD, La/SS-B, Scl-70, CENP and Jo-1 in human serum.

Principle of the test

In the first incubation step diluted samples, ready-to-use calibrator and negative control react with the solid-phase adsorbed highly purified antigens. Unbound components are removed after 60 minutes incubation at room temperature (RT, 18...25 °C) by aspirating the samples followed by a washing step.

In the second incubation step horseradish peroxidase (HRP)-labelled anti-human-IgG antibodies bind to sample antibodies. Unbound conjugate is removed after 30 minutes incubation at RT by aspirating followed by a washing step.

In the third step the HRP converts the subsequently added colourless substrate solution of hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) within a 15 min reaction time at RT into a blue product. The enzyme reaction is terminated by sulphuric acid dispensed into the wells turning the solution from blue to yellow.

The absorbance of the solution read at 450/≥620 nm (OD) is directly proportional to the amount of specifically bound antibodies. The cut-off is established by multiplying the absorbance of the calibrator with a corresponding factor. Patient ratio (binding index) are calculated by dividing the absorbance of the sample by the calculated cut-off.

Test components

		For 96 Wells
1	WELLS	Microtitration plate coated with 8 different antigens / well
		12 single breakable 8-well strips vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF CONC 10x	Wash buffer 10-fold
		100 ml concentrate for 1000 ml solution white cap
3	DIL	Sample diluent
		100 ml · ready-to-use coloured red black cap
4	CAL	Calibrator Diluted serum samples factor: see certificate of analysis enclosed
		1.0 ml ready-to-use coloured blue red cap
5	CONTROL -	Negative control Diluted serum sample
		1.0 ml · ready-to-use coloured blue green cap
6	CONJ HRP	HRP-conjugate HRP-labelled, anti-human-IgG antibodies
		15 ml · ready-to-use coloured red red cap
7	SUBSTR TMB	Substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide
		15 ml · ready-to-use blue cap
8	STOP	Stop solution 0.25 M sulphuric acid
		15 ml · ready-to-use yellow cap
9		Adhesive film
		2

Preparation and storage of samples

Collection and storage

Blood is taken by venipuncture. Serum is separated after clotting by centrifugation. Lipaemic, haemolytic and contaminated samples should not be used. Repeated freezing and thawing should be avoided. The samples may be kept at 2...8 °C for up to two days. Long-term storage requires -20 °C.

Preparation before use

Allow samples to reach RT prior to assay. Take care to agitate samples gently in order to ensure homogeneity.

Note: Patient samples have to be diluted 1 : 101, e.g. 10 µl sample + 1000 µl sample diluent (3).

Materials required but not provided

Adjustable one-channel micropipette 0.100 - 1.000 ml and 0.010 - 0.100 ml · Adjustable 8-channel micropipette 0.050 - 0.200 ml · Pipette tips · Reagent containers for dispensing with 8-channel pipette · Graduated measuring flasks 10 ml and 100 ml · Test tubes 2.0 ml for sample dilution · Microtitration plate washer (automatic or hand wash head) · Microtitration plate reader with optical filters of 450 nm for measurement and ≥ 620 nm for reference · Distilled or deionized water · Stop-watch

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

The *Serazym*[®] ANA screen has been designed for 12 x 8 determinations.

The complete kit with unopened reagent bottles and microtitration strips is stable until the expiry date printed on the kit box in case of storage at 2...8 °C. After opening all kit components are stable for at least 2 months, provided proper storage. The ready-to-use wash solution can be used for at least one month when stored at 2...8°C.

Reagent preparation

The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting the 10-fold concentrated wash buffer 1 + 9 with distilled or deionized water.

For example: 10 ml wash buffer (2) + 90 ml distilled or deionized water.

Besides wash buffer all components of the device are ready-to-use.

Assay procedure

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay.

Dilute patient samples with sample diluent (3) 1 : 101 (v/v), e.g. 10 µl sample + 1000 µl sample diluent (3).

The calibrator and the negative control are ready-to-use.

Avoid any time shift during dispensing of reagents and samples.

Make sure the soak time of the wash buffer in the wells is at least 5 seconds per wash cycle and that the remaining fluid is completely drained in every single wash cycle!

Avoid light exposure of the TMB substrate solution!

Working steps

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Pipette: 100 µl **CAL** calibrator (4)
100 µl **CONTROL -** negative control (5)
100 µl **diluted samples** resp.
into the intended wells.
3. Cover plate (9) and incubate for 60 min at RT.
4. Decant, then wash each well 3x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper.
5. Dispense 100 µl **CONJ HRP** HRP-conjugate (6) per well.
6. Cover plate (9) and incubate for 30 min at RT.
7. Decant, then wash each well 3x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper.
8. Dispense 100 µl **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
9. Incubate for 15 min at RT protected from light.
10. Dispense 100 µl **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
11. Read OD at 450 nm / ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

Result interpretation

Results can be interpreted qualitatively by calculating a cut-off or semi-quantitatively by calculating the binding index (BI) for each sample.

Therefore the cut-off value has to be determined.

The cut-off is established by multiplying the absorbance of the calibrator with a corresponding calculation factor.

Absorbance _{Calibrator} **x factor = absorbance** _{cut-off}

The calculation factor is lot-specific and stated on the certificate of analysis of the kit.

For calculation of the binding index (BI) the absorbance of the sample is divided by the calculated cut-off value.

BI sample = absorbance _{sample} / **absorbance** _{cut-off}

Reference values

Serazym® ANA screen	Binding index
positive	≥ 1.0
negative	< 1.0

Test validity

The test run is valid if:

- absorbance of calibrator CAL is ≥ 0.80
- absorbance of negative control CONTROL- is ≤ 0.35

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is followed correctly (incubation volumes, times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

Limitations of the method

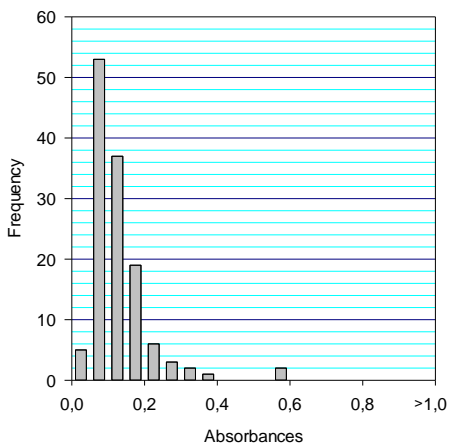
Any clinical diagnosis should not be based on the results of *in-vitro* diagnostic methods alone. Physicians are supposed to consider all clinical and laboratory findings possible to state a diagnosis. False results may be caused by cross contaminations of the kit reagents and samples, bacterial or fungal contaminations of reagents and/or samples, incorrect washing and incorrect incubation times. In case of background problems when using automatic microplate ELISA systems it may be recommendable to wash wells 5 times (instead of 3 times) in every wash cycle.

Performance characteristics

Due to the lack of an international reference preparation results are interpreted as binding index (BI).

Frequency distribution

The frequency distribution of 128 unselected blood donor samples in the *Serazym*[®] ANA screen is illustrated:



Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV [%]) in the *Serazym*[®] ANA screen from 6-fold determinations of samples:

sample	BI	CV [%]
1	4.87	3.26
2	3.76	2.01
3	2.00	1.80
4	1.31	2.71

Inter-assay coefficient of variation (CV [%]) in the *Serazym*[®] ANA screen in 16 different test runs from 2-fold determination of samples:

sample	BI	CV [%]
A	4.49	5.21
B	3.66	4.07
C	2.22	3.48
D	1.74	5.16

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instructions carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. The same relates to the stability stated for diluted reagents. Do not use or mix reagents from different lots, damaged packages or bottles or reagents from other manufacturers. Avoid time shift during dispensing of reagents. All reagents should be kept at 2...8 °C before use.

Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, wash buffer, substrate and stop solution.

Some of the reagents contain small amounts of Thimerosal (< 0.01% w/v) and Kathon (1.0% v/v) as preservative. They may neither be swallowed nor come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact rinse with plenty of water. Handle all samples as potentially infectious. Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions must always be observed:

Do not smoke, eat or drink while handling kit material!







Always use protective gloves!

Never pipette material by mouth!

Note safety precautions of the single test components!



Incubation scheme *Serazym*[®] ANA screen

- | | | | |
|----|---|----------|--|
| 1. |  | 100 µl | CAL (4) |
| | | 100 µl | CONTROL - (5) |
| | | 100 µl | diluted samples resp. |
| |  | 60 min | incubation (room temperature) |
| | | 3 x wash | with wash solution |
| 2. |  | 100 µl | CONJ HRP (6) |
| | | 30 min | incubation (room temperature) |
| |  | 3 x wash | with wash solution |
| 3. |  | 100 µl | SUBSTR TMB (7) |
| | | 15 min | incubation (room temperature) protected from light |
| 4. |  | 100 µl | STOP (8) |

Read OD at 450 / \geq 620 nm



Manufacturer



Catalogue-No.



Lot-No.



Number of determinations



Biohazard



Notice advices



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use