

Serazym[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG

Enzymimmunoassay zum Nachweis von IgG Antikörpern gegen Proteinase 3 (PR3)
in humanem Serum oder Plasma

r E-088 n 96 v *In-vitro*-Diagnostikum c



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

Einführung

Anti-neutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA) dienen als wichtiger Marker für systemische Vaskulitis und können durch indirekte Immunfluoreszenz (IIF) nachgewiesen werden. Abhängig vom Fluoreszenzmuster, können ANCA in c (cytoplasmatische) und p (perinukleäre) ANCA unterschieden werden.

Ein positiver indirekter Immunfluoreszenztest sollte mit einem antigen-spezifischen ELISA bestätigt werden.

Proteinase 3 (PR3), ein multifunktionelles Protein der azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten, gilt als primäres Zielantigen von cANCA und ist in 90 % der Seren von Patienten mit Wegener-Granulomatose im Rahmen einer Vaskulitis der kleinen Arterien und Venen nachweisbar.

Die diagnostische Sensitivität ist abhängig von Stadium und Aktivität der Erkrankung. Die Anti-Proteinase 3-Antikörpertiter korrelieren mit der Aktivität der Erkrankung und sind hilfreich bei der Optimierung der Therapie. Anti-PR3-Antikörper sind darüber hinaus in geringer Frequenz auch bei anderen, mit der Wegener-Granulomatose verwandten Vaskulitiden nachweisbar (mikroskopische Polyangiitis, Churg-Strauss-Syndrom, Panarteriitis nodosa).

Literatur:

1. Conrad, K., Schöblier, W., Hiepe, F.: Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen. Ein diagnostischer Leitfaden. Pabst Science Publishers Lengerich, 4. Auflage 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

Anwendungsbereich

Serazym® Anti-PR3 (cANCA) IgG ist ein *in-vitro* Diagnostikum zum quantitativen Nachweis von IgG Antikörpern gegen Proteinase 3 in humanem Serum oder Plasma.

Testprinzip

Im ersten Inkubationsschritt reagieren die verdünnten Proben, die gebrauchsfertigen Kalibratoren, sowie die positive Kontrolle mit dem an der festen Phase adsorbierten Antigen. 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. Anhand der gemessenen Extinktionen der Kalibratoren und deren entsprechenden Antikörper-Konzentrationen wird eine Kalibratorkurve erstellt, an der die Konzentrationen der unbekanntenen Proben abgelesen werden können.

Testkomponenten

Für 96 Kavitäten

| | | | |
|---|-------------------------|---|---|
| 1 | WELLS | Mikrotiterplatte beschichtet mit Antigen | 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 0 - 4 | Kalibratoren 0 - 4 Verdünnte Serumprobe CAL 0 = 1 U/ml CAL 1 = 10 U/ml CAL 2 = 30 U/ml CAL 3 = 100 U/ml CAL 4 = 300 U/ml | 1,0 ml je Kalibrator gebrauchsfertig blau gefärbt weisse Kappe |
| 5 | CONTROL + | Positive Kontrolle Verdünnte Serumprobe Konzentration siehe Analysenzertifikat | 1,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote 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 oder das Plasma durch Zentrifugation isolieren. Es kann sowohl Serum als auch Plasma im *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG verwendet werden. 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[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG 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 µl Probe + 1000 µl Verdünnungsmedium (3).

Die Kalibratoren und die Positive Kontrolle sind gebrauchsfertig.

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

Die Einwirkzeit der Waschlösung 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 0** Kalibrator 0 (4) optional*,
100 µl **CAL 1 - 4** Kalibratoren 1, 2, 3, 4 (4)
100 µl **CONTROL +** Positive 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** POD-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 / ≥ 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min nach Reaktionsstopp.

*Hinweis:

Das Mitführen von CAL 0 (1 U/ml) ermöglicht eine Quantifizierung der Konzentrationen unterhalb des CAL 1 Wertes (10 U/ml). Sollte keine Quantifizierung unterhalb des CAL 1 Wertes erforderlich sein, kann CAL 0 weggelassen werden.

Berechnung der Ergebnisse

Es wird eine Kalibratorkurve durch Auftragen der gemessenen Extinktionen der Kalibratoren CAL 0-4 (y-Achse) gegen die entsprechenden Antikörperkonzentrationen (x-Achse) konstruiert. Alternativ kann eine Kalibratorkurve durch Auftragen der gemessenen Extinktionen der Kalibratoren CAL 1-4 (y-Achse) gegen die entsprechenden Antikörperkonzentrationen (x-Achse) konstruiert werden.

Zur Erstellung der Kalibratorkurve wird das 4-Parameter-Regressionsmodell empfohlen.

Die Extinktionen der verdünnten Proben werden in Antikörperkonzentrationen U/ml durch Ablesen an der Kalibratorkurve umgewandelt. Die angegebenen Konzentrationen der Kalibratoren berücksichtigen bereits den regulären Verdünnungsfaktor der Serumproben von 1 : 101.

Bei Proben, deren Extinktion diejenige des Kalibrators CAL 4 überschreitet, ist die Bestimmung mit einer höheren externen Vorverdünnung zu wiederholen und das Ergebnis mit dem Faktor der zusätzlichen Verdünnung zu multiplizieren:

| Probenvolumen | zugewetztes Volumen (Verdünnungsmedium) | Finale Volumen | Verdünnung der Original-Probe | Multiplikationsfaktor |
|----------------|---|----------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| 10 µl | 1000 µl | 1010 µl | 1 : 101 = Probe 1 | <i>Kelne Multiplikation notwendig</i> |
| 500 µl Probe 1 | 500 µl | 1000 µl | 1 : 202 = Probe 2 | Faktor 2 |
| 500 µl Probe 2 | 500 µl | 1000 µl | 1 : 404 = Probe 3 | Faktor 4 |
| 500 µl Probe 3 | 500 µl | 1000 µl | 1 : 808 = Probe 4 | Faktor 8 |

Es ist zu beachten, dass Antikörper in Verdünnungen evtl. nicht stabil sind, was zu einem Aktivitätsverlust führen kann. Aus diesem Grund sollte eine notwendige Nachuntersuchung in einer höheren Verdünnung am selben Tag durchgeführt werden.

Referenzwerte

| Serazym® Anti-PR3 (cANCA) IgG | |
|-------------------------------|-----------|
| Positiv | ≥ 10 U/ml |
| Negativ | < 10 U/ml |

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden wenn:

- Der Extinktionsmittelwert von Kalibrator CAL 0 < CAL 1
- Der Extinktionsmittelwert von Kalibrator CAL 1 ≤ 0,70
- Der Extinktionsmittelwert von Kalibrator CAL 4 ≥ 1,20

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. Inkorrekt 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.

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben bis zu einer Konzentration von 500 mg/dl (Hämoglobin), 1000 mg/dl (Lipid) und 20 mg/dl (Bilirubin C und Bilirubin F) interferieren nicht. Rheumafaktoren interferieren bis zu einer Konzentration von 500 IU/ml nicht.

Diagnostische Sensitivität und Spezifität

82 Serumproben wurden im *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG und in einem kommerziell erhältlichen Vergleichstest getestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Vierfeldertafel dargestellt:

| | | Vergleichstest | |
|---|---------|----------------|---------|
| | | positiv | negativ |
| <i>Serazym</i> [®] Anti-PR3 (cANCA) IgG | positiv | 37 | 3 |
| | negativ | 0 | 42 |

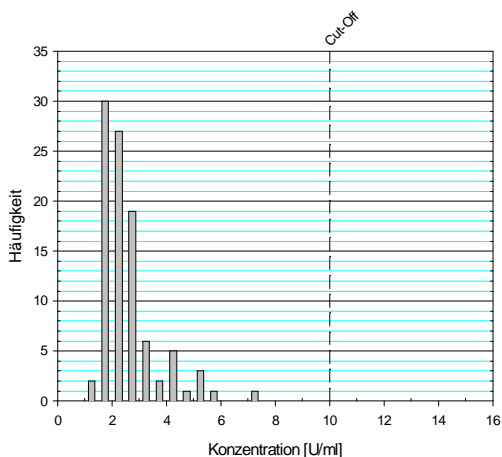
Die diagnostische Sensitivität wurde für dieses Panel mit 100 % bestimmt und die diagnostische Spezifität mit 93,3 %.

Kontrollgruppen

247 Serumproben wurden im *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG getestet. Folgende 9 Kontrollgruppen waren in diesem Serumpanel enthalten: Rheumatoide Arthritis, SLE, Sclerodermie, MCTD, Myositis, Sjögrens Syndrom, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und andere Kollagenosen. 17 Serumproben wurden als positiv im *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG bewertet. Dies entspricht einer klinischen Spezifität von 93,1 %.

Häufigkeitsverteilung

Die Häufigkeitsverteilung der Antikörperkonzentration im *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG von 97 unausgewählten Humanseren ist hier dargestellt:



Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizienten (VK [%]) im *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG aus 8-fach Bestimmung von Proben:

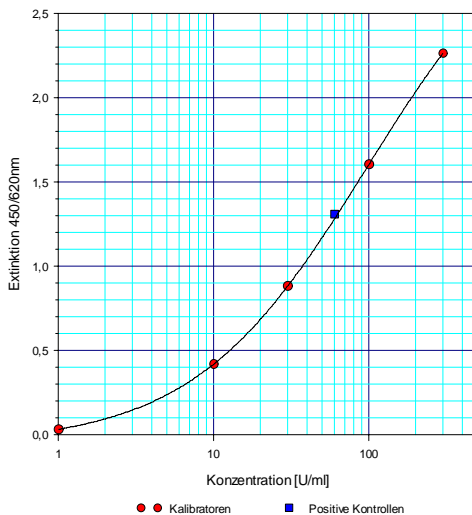
| Probe | Konzentration [U/ml] | VK [%] |
|-------|----------------------|--------|
| 1 | 195,8 | 5,96 |
| 2 | 88,2 | 4,72 |
| 3 | 25,6 | 5,18 |
| 4 | 16,8 | 2,47 |

Inter-Assay Variationskoeffizienten (VK [%]) im *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG in 8 differenten Ansätzen aus 2-fach Bestimmung von Proben:

| Probe | Konzentration [U/ml] | VK [%] |
|-------|----------------------|--------|
| A | 177,5 | 7,82 |
| B | 101,2 | 8,81 |
| C | 31,4 | 8,63 |
| D | 19,2 | 8,58 |

Typische Referenzkurve

Eine typische Referenzkurve im *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG ist hier dargestellt:



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 Waschpuffer, 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 können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. 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!













Änderungshistorie

| Version | Abschnitt | Änderungen |
|------------|---|--|
| 2021-03-11 | Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen, | Aktualisierung |
| | Änderungshistorie | Einführung des Abschnittes "Änderungshistorie" |
| | Testkomponenten | Aktualisierung |

Inkubationsschema *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG

- | | | | |
|----|---|-----------------|--|
| 1. |  | 100µl | CAL 0 - 4 (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 / \geq 620 nm

| | | | | |
|---|--|---|---|--------------------------|
|  Hersteller |  Herstellungsdatum |  Verwendbar bis | LOT Charge | REF Artikelnummer |
|  Vor Sonnenlicht schützen |  Temperaturbegrenzung |  Biologische Risiken |  Nicht wiederverwendbar | |
|  Gebrauchsanweisung beachten |  Achtung | IVD <i>In-vitro</i> - Diagnostikum |  Ausreichend für <n> Prüfungen | |

Serazym[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG

Enzyme immunoassay for detection of IgG antibodies to Proteinase 3 (PR3)
in human serum or plasma

r E-088 n 96 v *In-vitro*-diagnostic medical device c



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

Introduction

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) serve as important diagnostic markers for systemic vasculitis and can be detected by indirect immunofluorescence (IIF) on ethanol-fixed neutrophils. Depending from the staining pattern, ANCA are divided into c (cytoplasmic) and p (perinuclear) ANCA.

A positive indirect immunofluorescence test (IIF) should be confirmed by antigen specific ELISA. Proteinase 3 (PR3), a protein of the azurophil granules of neutrophilic granulocytes has been confirmed as the primary target antigen of cANCA. cANCA are detectable in more than 90 % of sera from patients suffering from Wegener's granulomatosis (WG). The anti-PR3 antibody titer correlates with the activity of the disease and may support optimization of therapy. Antibodies to PR3 may be detectable less frequently in sera from patients with other vasculitis forms like microscopic polyangiitis, Churg-Strauss syndrome or panarteritis nodosa.

References:

1. Conrad, K., Schöbler, W., Hiepe, F., Fritzler, M.J.: Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. Pabst Science Publishers Lengerich, 3rd edition 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® Anti-PR3 (cANCA) IgG is an *in-vitro* diagnostic medical device for quantitative determination of IgG antibodies to proteinase 3 in human serum or plasma.

Principle of the test

In the first incubation step diluted samples, ready-to-use calibrators and positive control react with the solid-phase adsorbed antigen. 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 aspiration followed by a washing step.

In the third step the HRP converts the subsequently added colorless 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. A calibration curve is established by plotting the concentrations of the antibodies of the calibrators (x-axis) and their corresponding absorbance values (y-axis). The antibody concentrations of the unknown specimens are directly read from the calibration curve.

Test components

| | | | For 96 Wells |
|---|-------------------------|---|--|
| 1 | WELLS | Microtitration plate coated with antigen | 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 0 - 4 | Calibrator 0 - 4 diluted serum sample CAL 0 = 1 U/ml CAL 1 = 10 U/ml CAL 2 = 30 U/ml CAL 3 = 100 U/ml CAL 4 = 300 U/ml | 1.0 ml per calibrator ready-to-use coloured blue white cap |
| 5 | CONTROL + | Positive control diluted serum sample concentration see certificate of analysis enclosed | 1.0 ml · ready-to-use coloured blue red 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 or plasma is separated after clotting by centrifugation. Serum or plasma can be used in the *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG. 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*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG 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 μ l sample + 1000 μ l sample diluent (3).

The calibrators and the positive control are ready-to-use.

Avoid any time shift during dispensing of reagents and samples.

Make sure the soak time of the wash solution 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 0** calibrator 0 (4) if desired*,
 100 µl **CAL 1 - 4** calibrators 1, 2, 3, 4 (4)
 100 µl **CONTROL +** positive 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 / \geq 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

* Note:

Using CAL 0 (1 U/ml) enables quantification of concentrations below the value of CAL 1 (10 U/ml), otherwise CAL 0 is not needed.

Result interpretation

Create a calibration curve by plotting the mean absorbances of the calibrators CAL 0-4 (Y-axis) to their corresponding antibody-concentrations (X-axis).
 Alternatively create a calibration curve by plotting the mean absorbances of the calibrators CAL 1-4 (Y-axis) to their corresponding antibody-concentrations (X-axis).

For the calibration curve use the 4-Parameter-regression-model.

Determine the antibody-concentrations of the unknown samples by referring their mean absorbances to the calibration curve. In case of using the prescribed sample dilution of 1 : 101, antibody-concentrations are not to be determined by multiplication with the dilution factor, since the calibrators are already prediluted.

If a sample after proper dilution of 1:101 produced a higher absorbance than calibrator CAL 4 please retest the sample at higher dilution and calculate its concentration in the following way:

| Sample volume | Added volume of diluent | Final volume | Dilution of original sample | Multiplication factor to determine analyte concentration of the original sample |
|------------------------|-------------------------|----------------|-----------------------------|---|
| <i>10 µl</i> | <i>1000 µl</i> | <i>1010 µl</i> | <i>1 : 101 = Sample 1</i> | <i>No multiplication required</i> |
| 500 µl Sample 1 | 500 µl | 1000 µl | 1 : 202 = Sample 2 | factor 2 |
| 500 µl Sample 2 | 500 µl | 1000 µl | 1 : 404 = Sample 3 | factor 4 |
| 500 µl Sample 3 | 500 µl | 1000 µl | 1 : 808 = Sample 4 | factor 8 |

Please be aware that antibodies may not be stable in diluted samples resulting in activity loss. By that reason reinvestigation at higher dilution should be done at the same day.

Reference values

| Serazym® Anti-PR3 (cANCA) IgG | |
|-------------------------------|-----------|
| positive | ≥ 10 U/ml |
| negative | < 10 U/ml |

Test validity

The test run is valid if:

- absorbance of calibrator CAL 0 is < CAL 1
- absorbance of calibrator CAL 1 is ≤ 0.70
- absorbance of calibrator CAL 4 is ≥ 1.20

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.

Interference

Haemolytic, lipaemic and icteric samples do not interfere with the test up to a concentration of 500 mg/dl (haemoglobin), 1000 mg/dl (lipids) and 20 mg/dl (bilirubin C and bilirubin F). Rheumatoid factors do not interfere up to a concentration of 500 IU/ml.

Performance characteristics

Diagnostic sensitivity and specificity

A total of 82 serum samples were tested both in Serazym® Anti-PR3 (cANCA) IgG and in another commercially available test. The results are shown in the following crosstabulation.

| | comparative test | |
|----------------------------------|------------------|------------|
| | positive | negative |
| Serazym® Anti-PR3 (cANCA) IgG | positive 37 | negative 3 |
| | negative 0 | 42 |

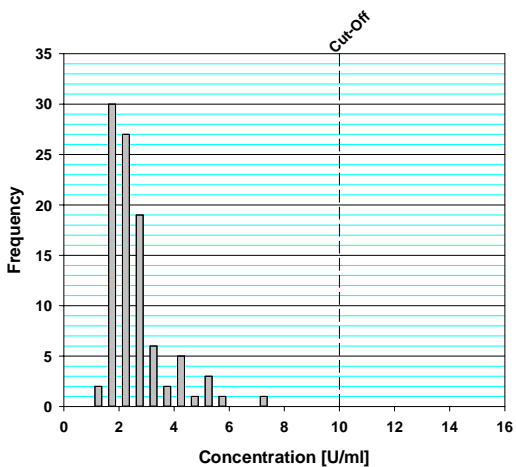
In reference to this panel the diagnostic sensitivity was determined with 100 % and diagnostic specificity with 93.3 %.

Control groups

A total of 247 serum samples were tested in Serazym® Anti-PR3 (cANCA) IgG. The 9 control groups consist of serum samples from the following diseases: Rheumatoid arthritis, SLE, Scleroderma, MCTD (Mixed connective tissue disease), Myositis, Sjögren Syndrome, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn and other collagenoses. The Serazym® Anti-PR3 (cANCA) IgG determined 17 serum samples of this collective positive with a clinical specificity of 93.1 %.

Frequency distribution

The frequency distribution of the *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG antibody concentrations measured in 97 unselected human serum samples is illustrated:



Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV [%]) in the *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG from 8-fold determinations of samples:

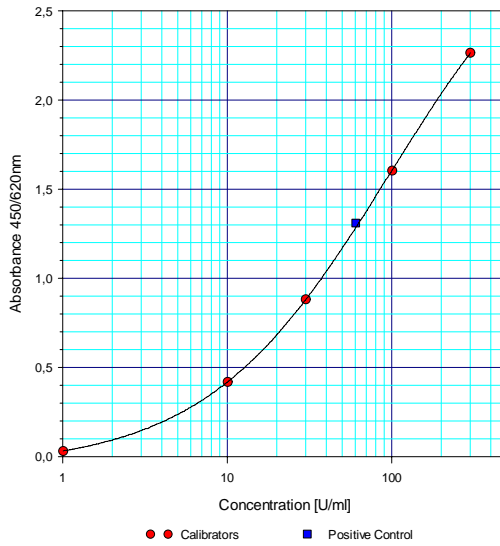
| sample | concentration [U/ml] | CV [%] |
|--------|----------------------|--------|
| 1 | 195.8 | 5.96 |
| 2 | 88.2 | 4.72 |
| 3 | 25.6 | 5.18 |
| 4 | 16.8 | 2.47 |

Inter-assay coefficient of variation (CV [%]) in the *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG from 8 different runs with twofold determinations of samples:

| sample | concentration [U/ml] | CV [%] |
|--------|----------------------|--------|
| A | 177.5 | 7.82 |
| B | 101.2 | 8.81 |
| C | 31.4 | 8.63 |
| D | 19.2 | 8.58 |

Typical reference curve

The typical reference curve in the *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG is illustrated:



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 may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They may neither be swallowed nor come into contact with skin or mucous membranes. 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!













History of Changes

| Version | Section | Modifications |
|------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 2021-03-11 | Common Advices and Precautions | Update |
| | History of Changes | Adding section "History of Changes " |
| | Test Components | Update |

Incubation scheme *Serazym*[®] Anti-PR3 (cANCA) IgG

- | | | | |
|----|---|----------|--|
| 1. |  | 100 µl | CAL 0 - 4 (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 |  Date of manufacture |  Use by | LOT Batch code | REF Catalog number |
|  Keep away from sunlight |  Temperature limits |  Biological risks |  Do not reuse | |
|  Consult instructions for use |  Caution | IVD <i>In-vitro</i> -diagnostic medical device |  Contains sufficient for <n> tests | |