

# Seraline<sup>®</sup> Vaskulitis-3 IgG

Line Immunoassay zum qualitativen Nachweis von IgG-Autoantikörpern gegen PR3, MPO und GBM in Serum oder Plasma humanen Ursprungs

**REF**

LIA-003-3 G



20

**IVD**

In-vitro-Diagnostikum

**CE**



Seramun Diagnostics GmbH • Spreehagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •  
T +49 33767 791-10 • [info@seramun.com](mailto:info@seramun.com) • [www.seramun.com](http://www.seramun.com)

**UDI**

Eindeutige Produktidentifizierung

**IVD**

In-vitro Diagnostikum



Hersteller



Land der Herstellung und Datum der Herstellung



Nicht wiederverwenden



Seriennummer



Begrenzung der Luftfeuchtigkeit



Vor Sonnenlicht schützen



Artikelnummer



Gebrauchsanweisung beachten



Verwendbar bis



Chargennummer



Ausreichend für  $n$  Prüfungen



Biologisches Risiko



Temperaturbereich



Achtung

## Zweckbestimmung

Seraline® Vaskulitis-3 IgG ist ein IVD-Test zur qualitativen Bestimmung von Autoantikörpern des IgG-Isotyps gegen die Antigene Proteinase 3 (PR3), Myeloperoxidase (MPO) und die glomeruläre Basalmembran (GBM) in Serum oder Plasma (Citrat, EDTA, Heparin) humanen Ursprungs durch einen Fachanwender in Laborumgebung.

Der Test kann angewendet werden in Kombination mit dem Zubehör Seraline®scan (Software).

Er dient der Diagnosehilfe von ANCA (anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper)-assoziierten Vaskulitiden (AAV) sowie von Immunkomplexvaskulitiden in Proben von Patienten mit Verdacht auf eine Erkrankung der Blutgefäße.

Der Test darf nicht verwendet werden mit anderen Probenmaterialien als Serum oder Plasma (Citrat, EDTA, Heparin) humanen Ursprungs, zu Screening, Überwachung, Diagnose, Vorhersage, Prognose, als therapiebegleitendes Diagnostikum, in patientennaher Umgebung und durch Laienanwender.

## Testprinzip

Der Seraline® Vaskulitis-3 IgG Test ist ein Line Immunoassay (Membranimmunassay).

### Die Reaktion zum Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

#### Schritt 1

Inkubation der zu untersuchenden Proben zusammen mit Teststreifen bei Raumtemperatur für 45 min in einer Verdünnung von 1 : 101. Entfernung der nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3-maliges Waschen der Teststreifen mit verdünntem Wasch- und Inkubationspuffer (WIB).

#### Schritt 2

Inkubation der Teststreifen für 45 min bei Raumtemperatur mit HRP-markierten Konjugatantikörpern. Entfernung der nicht gebundenen Konjugatantikörper durch Absaugen und 3-maliges Waschen der Teststreifen mit WIB.

#### Schritt 3

Inkubation der Teststreifen bei Raumtemperatur für 10 min mit Substrat. Die gebundenen HRP-Moleküle des Konjugats setzen das Substrat unter Ausbildung blauer Präzipitate um.

Stoppen der Reaktion durch Absaugen und 3-maliges Waschen der Teststreifen mit deionisiertem Wasser. Entfernung der Restflüssigkeit durch Trocknen der Teststreifen zwischen Filterpapier. Die Färbung der entwickelten Streifen ist bei dunkler Lagerung stabil.

Kleben der entwickelten Teststreifen auf das Auswertetemplate. Dabei die Funktionskontrolle der Teststreifen exakt auf die im Auswertetemplate vorgedruckte Trennlinie legen.

Identifizierung der gefärbten Antigenbanden auf den getrockneten Teststreifen durch Anlegen der Auswerteschablone. Bestimmung des Testergebnisses entsprechend den Auswertekriterien und die Dokumentation der identifizierten Banden im Auswertetemplate.

Alternativ ist eine Bildaufnahme mit einem herkömmlichen Flachbettscanner und die Auswertung mit der Evaluierungssoftware Seraline®scan möglich.

## Testkomponenten (Lieferumfang)

1	TESTSTR	<b>Teststreifen mit Auswerteschablone</b> Spezifische Antigene auf Nitrozellulose-Membran (s. verwendete Antigene)	Für 20 Bestimmungen: <b>20</b> Streifen Farbmarkierung: rot in einem Faltheft im Druckverschlussbeutel
2	WIB (5x)	<b>Wasch- und Inkubationspuffer (5x)</b> Seramun® Wash and incubation buffer (5x) Wässrige Pufferlösung	<b>70 mL Konzentrat</b> für 350 mL verdünnte Lösung, farblos, schwarze Kappe
3	CONJ HRP IgG	<b>Anti-human IgG-HRP-Konjugat</b> anti-human IgG-HRP	<b>35 mL</b> gebrauchsfertig, rot gefärbt, rote Kappe
4	SUBSTR	<b>Substrat</b> SeramunBlau® prec <0,1 % 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	<b>35 mL</b> gebrauchsfertig, farblos-hellgelb, blaue Kappe
5	INCUTRAY	<b>Inkubationswanne mit Deckel</b>	2 Stück
6	TEMPLATE	<b>Auswertetemplate</b>	1 Stück
7		<b>Analysenzertifikat</b>	1 Stück
8		<b>Gebrauchsanleitung</b>	1 Stück

## Verwendete Antigene

Bezeichnung	Beschreibung	Klinische Relevanz
<b>PR3</b>	Proteinase 3	Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, früher: Wegener-Granulomatose)
<b>MPO</b>	Myeloperoxidase	Mikroskopische Polyangiitis (MPA); Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA, Churg-Strauss-Syndrom)
<b>GBM</b>	Glomeruläre Basalmembran (GBM), α3 Kette des humanen Kollagen Typ IV	Immunkomplexvaskulitiden; anti-GBM Antikörper Erkrankung (GPS, Goodpasture-Syndrom)

## Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Einkanal-Mikropipette und Pipettenspitzen für 15 µL und 1500 µL • Kunststoffpinzette • Messzylinder und Bechergläser • Teströhrchen für die Probenverdünnung • Wipp-Schüttler • Filterpapier • Klebestift • Absaugsystem mit Auffanggefäß für infektiöse Lösungen • deionisiertes Wasser • Stoppuhr

Optional:

Flachbettscanner • Evaluierungssoftware Seraline®scan • automatisches Bearbeitungsgerät

## Wichtige Hinweise



**Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* Gebrauch bestimmt** und darf nur durch einen Fachanwender in Laborumgebung durchgeführt werden.

Die Gebrauchsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Komponenten aus beschädigten Verpackungen und Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.

**Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nur für die Komponenten Wasch- und Inkubationspuffer (5x) und Substrat erlaubt.**

Alle in Zusammenhang mit dem Seraline® Vaskulitis-3 IgG Test auftretenden schwerwiegenden Vorkommnisse sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem der Anwender und / oder der Patient niedergelassen sind, zu melden.

### Arbeitsplatzanforderungen:

Für die Durchführung von Line Immunoassays wird ein sauberer und faserfreier Arbeitsplatz benötigt. An den Teststeifen anheftende Fasern führen zu fehlerhaften Resultaten. Arbeitsplatz und Kit-Komponenten sollten nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt sein.

### Hinweise zur Testdurchführung:

Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Alle Testkomponenten vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen.

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und die Dauer der Wasch- und Inkubationsschritte sind einzuhalten.

Blasenbildung beim Pipettieren vermeiden, dies führt zu Auswertungsfehlern.

### Sicherheitshinweise

Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.

Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten.

Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potenziell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Zusätzliche Informationen über die Angaben in dieser Gebrauchsanleitung hinaus finden sich im Sicherheitsdatenblatt.

Das Produkt enthält folgende gefahrenbestimmende Substanz/en.

TESTSTR	-	Enthält Material tierischen und mikrobiologischen Ursprungs.
WIB (5x)	EUH208 EUH210	Enthält Reaktionsmasse aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen. Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. Enthält Material tierischen Ursprungs.
CONJ HRP	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. Enthält Material tierischen und mikrobiologischen Ursprungs.
SUBSTR	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.

## Grenzen der Methode

Eine Interpretation des Ergebnisses soll nur in enger Verbindung mit klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Kontaminationen der Reagenzien oder der Proben durch Bakterien oder Pilze können zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Die Verwendung von kontaminierten Proben kann die Hintergrundfärbung der Streifen erhöhen und darüber hinaus zu falschen Ergebnissen führen.

In Ausnahmefällen, z. B. bei Hypergammaglobulinämien, dem Vorhandensein von zirkulierenden Immunkomplexen oder Milcheiweiß-Antikörpern, kann sich der Hintergrund der Streifen sehr schnell blau färben. In solchen Fällen ist die Farbreaktion vorzeitig durch 3-maliges Spülen mit deionisiertem Wasser zu stoppen.

## Behandlung der Proben

### Probennahme

Serum oder Plasma (Citrat, EDTA, Heparin) humanen Ursprungs in geeignetem Gefäß sammeln.

### Probenehaltbarkeit und -lagerung

Serum oder Plasma humanen Ursprungs maximal 48 Stunden bei 2...8 °C lagern. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei < -15 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

Es ist zu beachten, dass Antikörper in Verdünnungen evtl. nicht stabil sind, was zu einem Aktivitätsverlust führen kann.

### Probenvorbereitung

#### *Serum/Plasma:*

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

Serum- oder Plasmaproben 1 : 101 (v/v) (15 µL Probe und 1500 µL verdünnter Wasch- und Inkubationspuffer (hergestellt aus WIB (5x)) in der Inkubationswanne verdünnen.

## Behandlung der Reagenzien

### Reagenzienhaltbarkeit und -lagerung

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzienflaschen und Teststreifen ist bei Lagerung bei 2...8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 2 Monate haltbar. Der verdünnte Wasch- und Inkubationspuffer ist bei 2...8 °C bis zu 1 Monat verwendbar.

### Reagenzienvorbereitung

Vor dem Testansatz sind alle Reagenzien auf Raumtemperatur zu erwärmen. Nicht benötigte Teststreifen in den Beutel zurücklegen und verschließen.

**Wasch- und Inkubationspuffer WIB (5x) 1 : 5 (v/v)** mit deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 70 mL WIB (5x) + 280 mL deionisiertes Wasser. Der verdünnte Wasch- und Inkubationspuffer ist vor Verwendung gründlich zu durchmischen, Schaumbildung vermeiden!

Das **Substrat** ist vor direktem Lichteinfall zu schützen.

## Testdurchführung

Die Durchführung erfolgt bei Raumtemperatur (RT, 18...25 °C). Alle gebrauchsfertigen Testreagenzien und der verdünnte Waschpuffer **auf Raumtemperatur erwärmen**.

Teststreifen mit einer Kunststoffpinzette so in die Inkubationswanne legen, dass die aufgedruckten Nummern nach oben zeigen.

Alle Inkubationsschritte sollten auf einem Wipp-Schüttler mit einer empfohlenen Schüttelfrequenz von 20 bis 30 Rotationen pro Minute erfolgen.

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

1. Teststreifen **TESTSTR** mit **1,5 mL** verdünntem Wasch- und Inkubationspuffer **5 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
2. **15 µL** Probe zugeben.
3. Wanne mit Deckel **INCUTRAY** abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
4. Lösungen absaugen und Teststreifen **3x 5 min** mit jeweils **1,5 mL** verdünntem Wasch- und Inkubationspuffer waschen.
5. **1,5 mL** Konjugat **CONJ HRP IgG** zugeben.
6. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
7. Lösungen absaugen und Teststreifen **3x 5 min** mit jeweils **1,5 mL** verdünntem Wasch- und Inkubationspuffer waschen.
8. Teststreifen mit **1,5 mL** **SUBSTR** **10 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
9. Substrat absaugen und Teststreifen **3x** mit **1,5 mL** deionisiertem Wasser spülen.
10. Die Teststreifen nach dem Abstoppen zwischen Filterpapier **trocknen** und anschließend auswerten.

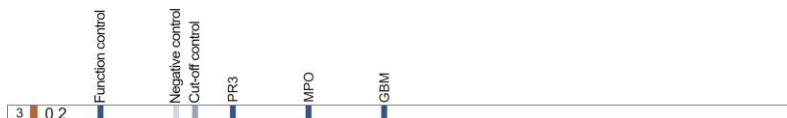
## Auswertung der Ergebnisse

### Gültigkeitskriterien für den Test

Auf jedem Teststreifen des Seraline® Vaskulitis-3 IgG sind 3 Kontrollbanden aufgetragen:

1. Die Funktionskontrolle muss sichtbar sein.
2. Die Intensität der Negativkontrolle muss kleiner als die der Cut-off Kontrolle sein.
3. Die Cut-off Kontrolle muss sichtbar sein (Bandenintensität dient der Bewertung der diagnostischen Banden als positiv oder negativ).

Der Test kann ausgewertet werden, wenn die Funktionskontrolle und die Cut-off Kontrolle sichtbar sind.



Sind die Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Die Abarbeitung muss gemäß Gebrauchsanleitung erfolgen (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, ist der Hersteller zu kontaktieren.

Die Testauswertung nur an trockenen Streifen durchführen. Die Teststreifen vor direktem Sonnenlicht schützen. Die Zuordnung der Banden mit Hilfe der beiliegenden Auswerteschablone durchführen. Die identifizierten Banden im Auswertetemplate dokumentieren.

Alternativ ist eine Bildaufnahme mit einem herkömmlichen Flachbettscanner und automatische Auswertung mit der Evaluierungssoftware Seraline®scan möglich.

## Interpretation der Ergebnisse

Es werden nur Banden als positiv bewertet, die eine Intensität  $\geq$  der Cut-off Kontrolle zeigen.

Bewertung	Bewertungskriterium
Positiv	Farbintensität der Banden $\geq$ Cut-off Kontrolle
Negativ	Farbintensität der Banden $<$ Cut-off Kontrolle

## Leistungsmerkmale

### Interferierende Substanzen

Alle getesteten Substanzen haben keine signifikanten Auswirkungen auf die Testergebnisse, wenn sie in stark erhöhten Konzentrationen im Serum vorhanden sind: Bilirubin C und F (Simulation ikterischer Proben) je 20 mg/dL, Hämoglobin (Simulation hämolytischer Proben) 500 mg/dL, Lipide (Triglyceride) (Simulation lipämischer Proben) 1000 mg/dL und Rheumafaktor 500 IU/mL.

### Diagnostische Sensitivität

Zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität wurden n = 19 (PR3), n = 24 (MPO) und n = 8 (GBM) vorcharakterisierte Proben untersucht. Die Sensitivität wurde im Vergleich zu Referenztesten im Seraline® Vaskulitis-3 IgG bestimmt.

PR3 (n = 19)		Referenztest	
		positiv	negativ
<b>Seraline® Vaskulitis-3 IgG</b>	positiv	17	0
	negativ	2	0
Proben gesamt		19	

Diagnostische Sensitivität: 89,5 %

MPO (n = 24)		Referenztest	
		positiv	negativ
<b>Seraline® Vaskulitis-3 IgG</b>	positiv	20	0
	negativ	2	2
Proben gesamt		22	2

Diagnostische Sensitivität: 90,9 %

GBM (n = 8)		Referenztest	
		positiv	negativ
<b>Seraline® Vaskulitis-3 IgG</b>	positiv	7	1
	negativ	0	0
Proben gesamt		7	1

Diagnostische Sensitivität: 100 %

### Diagnostische Spezifität

Ein Kollektiv von n = 120 Blutspendersonen wurde zur Ermittlung der Spezifität in Seraline® Vaskulitis-3 IgG untersucht.

Blutspender	Anzahl [n]	Spezifität [%]
Kollektiv 1	120	95,0

### Vergleichende Sensitivität und Spezifität

Zur Bestimmung der vergleichenden Sensitivität und Spezifität wurden n = 117 vorcharakterisierte Proben untersucht. Die vergleichende Sensitivität und Spezifität wurde im Vergleich zu einem Referenztest im Seraline® Vaskulitis-3 IgG bestimmt.

Antigen	Sensitivität* [%]	Spezifität [%]	Übereinstimmung [%]
MPO	97,2 (35/36)	100 (81/81)	99,1 (116/117)
PR3	100 (24/24)	91,4 (85/93)	93,2 (109/117)
GBM	100 (16/16)	100 (101/101)	100 (117/117)

\*Alle diskrepant bestimmten Proben wurden zusätzlich in einem zweiten, unabhängigen Vergleichstest überprüft. Dabei konnten alle 8 diskrepanten Proben bestätigt werden.



## Applikation

### Software gestützte Auswertung

Die Auswertung erfolgt visuell mittels einer beiliegenden Schablone. Alternativ ist eine Bildaufnahme mit einem herkömmlichen Flachbettscanner und die Auswertung mit der Evaluierungssoftware Seraline®scan möglich.

## Änderungshistorie












Version	Abschnitt	Änderungen
2023_02_de_en	Gesamtes Dokument	Aktualisierung der Zweckbestimmung Umstellung der Teilabschnitte Einfügen der Sicherheitshinweise

# Seraline<sup>®</sup> Vaskulitis-3 IgG

Line Immunoassay for the qualitative detection of IgG autoantibodies directed against PR3, MPO and GBM in serum or plasma of human origin

<b>REF</b>	LIA-003-3 G	$\nabla \Sigma$	20
<b>IVD</b>	In-vitro-diagnostic medical device	<b>CE</b>	

 **Seramun Diagnostica GmbH** • Sprenhagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •  
 T +49 33767 791-10 • [info@seramun.com](mailto:info@seramun.com) • [www.seramun.com](http://www.seramun.com)

<b>UDI</b> Eindeutige Produktidentifizierung	<b>IVD</b> In-vitro Diagnostikum	 Hersteller
 Land der Herstellung und Datum der Herstellung	 Nicht wiederverwenden	<b>SN</b> Seriennummer
 Begrenzung der Luftfeuchtigkeit	 Vor Sonnenlicht schützen	<b>REF</b> Artikelnummer
 Gebrauchsanweisung beachten	 Verwendbar bis	<b>LOT</b> Chargennummer
 Ausreichend für n Prüfungen	 Biologisches Risiko	 Temperaturbereich
		 Achtung

## Intended Use

Seraline® Vaskulitis-3 IgG is an IVD assay for the qualitative determination of antibodies of the IgG isotype against the antigens proteinase 3 (PR3), myeloperoxidase (MPO) and glomerular basement membrane (GBM) in serum or plasma (citrate, EDTA, heparin) of human origin by a laboratory professional user.

The test can be used in combination with accessory Seraline®scan (software).

It is intended to aid in the diagnosis of ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) associated vasculitis (AAV) and immune complex vasculitis in samples from patients with suspicion of blood vessel disease.

The test must not be used with specimen materials other than serum or plasma (citrate, EDTA, heparin) of human origin, for screening, monitoring, diagnosis, prediction, prognosis, as companion diagnostic, in the near patient setting and by lay persons.

## Principle of the Test

Seraline® Vaskulitis-3 IgG test is a line immunoassay (membrane-based immunoassay).

**Detection of specific antibodies is performed in 3 steps:**

### Step 1

Incubation of 1 : 101 diluted samples and test strips for 45 min at room temperature. After incubation samples are aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with diluted wash and incubation buffer (WIB).

### Step 2

Incubation of test strips with HRP-labelled conjugate antibodies for 45 min at room temperature. Removal of unbound conjugate antibodies by aspiration and 3 wash cycles with WIB.

### Step 3

Incubation of test strips at room temperature for 10 min with substrate. The reaction is stopped by aspiration and 3 wash cycles with deionized water. Removing of the residual liquid by drying the test strips between filter paper. The coloration of the developed strips is stable when stored in the dark.

Fixation of the developed test strips on the evaluation template. When doing so, placement of the functional control of the test strips exactly on the separating line pre-printed in the evaluation template. Identification of the stained antigen bands on the dried test strips with help of the evaluation template. Determination of the test result according to the evaluation criteria and documentation of the identified bands in the evaluation template.

Alternatively, image acquisition with a conventional flatbed scanner and evaluation with software Seraline®scan is possible.

## Test Components (Delivery Scope)

1	TESTSTR	<b>Test strips with evaluation template</b> Specific antigens on nitrocellulose membrane (see antigens used)	For 20 determinations <b>20 strips</b> color coding: red in a folding booklet in a pressure seal bag
2	WIB (5x)	<b>Wash and incubation buffer (5x)</b> Seramun® Wash and incubation buffer (5x) Aqueous buffer	<b>70 mL concentrate</b> for 350 mL diluted buffer, colorless, black cap
3	CONJ HRP IgG	<b>Anti-human IgG-HRP-Conjugate</b> anti-human IgG-HRP	<b>35 mL</b> ready-to-use, colored red, red cap
4	SUBSTR	<b>Substrate</b> SeramunBlau® prec <0.1 % 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	<b>35 mL</b> ready-to-use, colorless to pale yellow, blue cap
5	INCUTRAY	<b>Incubation tray with cover</b>	2 pieces
6	TEMPLATE	<b>Evaluation template</b>	1 piece
7		<b>Certificate of Analysis</b>	1 piece
8		<b>Instructions for Use</b>	1 piece

## Antigens used

Name	Description	Clinical relevance
<b>PR3</b>	Proteinase 3	Granulomatosis with polyangiitis (GPA, formerly: Wegener's granulomatosis)
<b>MPO</b>	Myeloperoxidase	Microscopic polyangiitis (MPA); Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA, Churg-Strauss-Syndrome)
<b>GBM</b>	Glomerular basement membrane (GBM), α3 chain of human collagen type IV	Immune complex vasculitis anti-GBM antibody disease (GPS, Goodpasture-Syndrome)

## Additional Materials and Aids Required for the Test Procedure

Single-channel micropipette and pipette tips for 15 µL and 1500 µL • plastic tweezers • graduated cylinders and beakers • test tubes for sample dilution • rocking shaker • filter paper • glue stick • aspiration system with collection vessel for infectious solutions • deionized water • stopwatch

Optional:

Flatbed scanner • evaluation software Seraline® scan • automatic processing device

## Important Information



**This device is for *in vitro* diagnostic use only.** The kit may be performed by laboratory professionals only.

Follow the instructions carefully.

The shelf life specified must be observed. Do not mix components with reagents from other manufacturers. Do not use reagents from damaged packages or bottles.

**Mixing of test kit components of different lots is only allowed for wash and incubation buffer (5x) and substrate.**

All serious incidents occurring in relation with Seraline® Vaskulitis-3 IgG must be reported to the manufacturer and the competent authority of the EU member state in which the user and / or the patient are located.

### Workplace Requirements

A clean and fiber-free workspace is required to perform line immunoassays. Particles or fibers which may adhere to the test strips can lead to erroneous results. The workstation and kit components should not be exposed to direct sunlight.

### Information on Assay Procedure

All reagents should be stored at 2...8 °C. Bring all test components to room temperature before use.

Store substrate protected from light!

The order of the pipetting steps and duration of the wash and incubation steps must be observed.

Avoid bubble formation during pipetting, this will lead to evaluation errors.

### Safety Instructions

Reagents must not be swallowed. Contact with skin or mucous membranes should be avoided.

Some reagents may contain biocides as preservative.

Handle all components and patient samples as if potentially hazardous and infectious.

Additional information may be taken from the Material Safety Data Sheet.

The product contains the following hazard component/-s.

TESTSTR	-	Contains material of animal and microbiological origin.
WIB (5x)	EUH208	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May cause allergic reactions. Safety data sheet available on request.
	EUH210	Contains material of animal origin
CONJ HRP	EUH210	Safety data sheet available on request. Contains material of animal and microbiological origin.
SUBSTR	EUH210	Safety data sheet available on request.

### Limitations of the Procedure

Result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks.

Impurities and cross contamination of reagents or samples by fungi or bacteria can lead to false positive as well as false negative results.

The use of contaminated samples may increase the background color of the test strips and lead to incorrect results.

In rare cases, e.g., hypergammaglobulinemia, circulating immune complexes, or milk antibodies, the test strips may turn blue very quickly. In such cases the color reaction should be stopped early by rinsing the test strips 3 times with deionized water.

## Sample Treatment

### Sample Collection

Collect serum or plasma (citrate, EDTA, heparin) of human origin in suitable sampling container.

### Sample Shelf Life and Storage

Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 48 hours. For longer periods samples have to be stored at < -15 °C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

It should be noted that diluted antibodies may not be stable, which may lead to a loss of activity. Required follow-up testing at higher dilution therefore should be performed same day.

### Sample Preparation

*Serum/Plasma:*

Bring samples to RT before use. In general, homogeneity should be ensured by brief shaking.

Dilute serum and/or plasma samples 1 : 101 (v/v) (15 µL sample and 1500 µL diluted wash and incubation buffer (prepared from WIB (5x)) in the incubation well.

## Reagent Treatment

### Reagent Shelf Life and Storage

The complete test kit with sealed reagent bottles and test strips is stable until the printed expiration date when stored at 2...8 °C. All opened test kit components are stable for up to 2 months when stored properly at 2...8 °C. The diluted wash and incubation buffer can be stored at 2...8 °C for up to 1 month.

### Reagent Preparation

Allow all components to reach **room temperature** prior to use. Return unused test strips to the pouch and seal.

Dilute **wash and incubation buffer WIB (5x)** 1 : 5 with deionized water.

Example: 70 mL WIB (5x) + 280 mL deionized water. The prepared wash and incubation buffer must be thoroughly mixed before use. Avoid foam formation!

The **substrate** must be protected from direct light.

## Assay Procedure

Test must be performed at room temperature (18...25 °C). Bring **all** ready-to-use test reagents and the diluted wash buffer to **room temperature**.

Place test strips in incubation wells using plastic tweezers. Imprinted numbers should point upwards.

All incubation steps should be performed on a rocking shaker with a recommended frequency of 20 to 30 rotations per minute.

Follow the pipetting scheme and time schedules of the protocol.

1. Incubate test strip **TESTSTR** with **1.5 mL** diluted wash and incubation buffer for **5 min** on the shaker
2. Add **15 µL** of sample.
3. Cover tray with lid **INCUTRAY** and incubate on rocking shaker for **45 min**.
4. Aspirate solutions and wash test strips **3x 5 min** with **1.5 mL** diluted wash and incubation buffer.
5. Add **1.5 mL** conjugate **CONJ HRP IgG**.
6. Cover tray with lid **INCUTRAY** and incubate for **45 min** on rocking shaker.
7. Aspirate solutions and wash test strips **3x 5 min** with **1.5 mL** diluted wash and incubation buffer.
8. Incubate test strips with **1.5 mL** **SUBSTR** for **10 min** on rocking shaker.
9. Aspirate substrate and rinse test strip **3x** with **1.5 mL** deionized water to stop color reaction.
10. **Dry** test strips between filter paper, then evaluate.

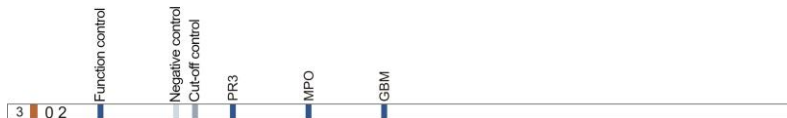
## Evaluation of Results

### Validity Criteria for the Test

Each test strip of Seraline® Vaskulitis-3 IgG contains three control bands:

1. The function control must be visible.
2. The intensity of the negative control must be lower than of the cut-off control.
3. The cut-off control must be visible (intensity of the bands is used to discriminate between positive and negative results).

Test may be evaluated if function control and cut-off control are visible.



If the above-mentioned quality criteria are not met, test should be repeated strictly following the test procedure (incubation times and temperatures, sample and wash and incubation buffer dilution, wash steps). In case of repeated failure of the quality criteria contact the manufacturer.

Evaluate dry test strips only. Protect test strips from direct sunlight. Assign protein bands using the enclosed evaluation template.

Alternatively, image acquisition with a conventional flatbed scanner and automatic evaluation with Seraline®scan evaluation software is possible.



## Interpretation of Results

Bands with an intensity  $\geq$  cut-off control only are considered positive.

Evaluation	Evaluation criteria
Positive	Color intensity of bands $\geq$ cut-off control
Negative	Color intensity of bands $<$ cut-off control

## Performance Characteristics

### Interfering Substances

All tested substances do not have a significant impact on the test results even if present in elevated concentrations in the serum: 20 mg/dL bilirubin C and F each (simulation of icteric samples); 500 mg/dL hemoglobin (simulation of hemolytic samples); 1000 mg/dL lipids (triglycerides) (simulation of lipemic samples) and 500 IU/mL rheumatoid factor.

### Diagnostic Sensitivity

For the determination of the diagnostic sensitivity,  $n = 19$  (PR3),  $n = 24$  (MPO) and  $n = 8$  (GBM) precharacterized samples were tested. Diagnostic sensitivity was determined in comparison to reference tests in Seraline<sup>®</sup> Vaskulitis-3 IgG.

PR3 (n = 19)		Reference test	
		positive	negative
<b>Seraline<sup>®</sup> Vaskulitis-3 IgG</b>	positive	17	0
	negative	2	0
Sample total		19	

Diagnostic sensitivity: 89.5 %

MPO (n = 24)		Reference test	
		positive	negative
<b>Seraline<sup>®</sup> Vaskulitis-3 IgG</b>	positive	20	0
	negative	2	2
Sample total		22	2

Diagnostic sensitivity: 90.9 %

GBM (n = 8)		Reference test	
		positive	negative
<b>Seraline<sup>®</sup> Vaskulitis-3 IgG</b>	positive	7	1
	negative	0	0
Sample total		7	1

Diagnostic sensitivity: 100 %

### Diagnostic Specificity

A study population of  $n = 120$  blood donors was investigated to determine the specificity in Seraline<sup>®</sup> Vaskulitis-3 IgG.

Blood donors	Number of samples [n]	Specificity [%]
Collective 1	120	95.0

### Comparative Sensitivity and Specificity

For the determination of comparative sensitivity and specificity,  $n = 117$  precharacterized samples were tested. Comparative sensitivity and specificity were determined in comparison to a reference test in Seraline<sup>®</sup> Vaskulitis-3 IgG.

<b>Antigen</b>	<b>Sensitivity* [%]</b>	<b>Specificity [%]</b>	<b>Agreement [%]</b>
MPO	97.2 (35/36)	100 (81/81)	99.1 (116/117)
PR3	100 (24/24)	91.4 (85/93)	93.2 (109/117)
GBM	100 (16/16)	100 (101/101)	100 (117/117)

\* All discrepantly determined samples were examined in a second, independent test. This test confirmed all 8 discrepant samples.

## **Application**

### **Software based evaluation**

Evaluation is performed visually using the enclosed template. Alternatively, image acquisition with a conventional flatbed scanner and evaluation with Seraline<sup>®</sup>scan evaluation software is possible.

## Change History

<b>Version</b>	<b>Section</b>	<b>Modifications</b>
2023-02_de_en	Entire document	Updating of the intended use Conversion of the subsections Insertion of the safety instructions

## References

1. Charles LA, Caldas MLR, Falk RJ et al, Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *J Leukocyte Biol* 1991, 50, 539-546.
2. Chen M, Yu F, Zhang Y et al, Characteristics of Chinese patients with Wegener's granulomatosis with anti-myeloperoxidase autoantibodies. *Kidney Int.* 2005, 68, 2225-2229.
3. Churg J, Churg A, Idiopathic and secondary vasculitis: a review. *Mod Pathol* 1989, 2, 144-160.
4. Cohen Tervaert JW, van der Waude FJ, Fauci, AS et al, Association between active Wegener's granulomatosis and anti-cytoplasmic antibodies. *Arch Intern Med* 1989, 149, 2461-2465.
5. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M et al, Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 2003, 348, 2543- 2556.
6. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA et al. 2012 revised international Chapel Hill consensus conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013 65: 1-11.
7. Luqmani R et al. *EULAR points to consider in the development of classification and diagnostic criteria in systemic vasculitis*. EULAR, 2010.
8. Ozaki S, ANCA associated vasculitis: Diagnostic and therapeutic strategy, *Allergol Int* 2007, 56, 87-96.
9. Papiris SA, Manali ED, Kalomenidis I et al, Bench-to-bedside review: Pulmonary-renal syndromes- an update for the intensivist. *Critical Care* 2007, 213.
10. Ruperto N, Classification Criteria and Diagnostic Tests for Vasculitides. *J Rheumatol* 2012, 39, 1503-1505; doi:10.3899/jrheum.120640.
11. Salama AD, Levy J, Lightstone L et al, Goodpasture's disease. *Lancet* 2001, 358, 917-920.
12. Sigl M, Amendt K, Klassifikation und Diagnostik der Vaskulitiden. *Vasomed* 2015, 27(6), 280-285.
13. Silva de Souza AW, Autoantibodies in systemic vasculitis. *Front Immunol* 2015, 6(184).
14. Weiss SJ, Tissue destruction by neutrophils. *New Engl. J Med* 1989, 320, 365-376.
15. Yates M, Watts R, ANCA-associated Vasculitis. *Clinical Medicine* 2017, 17(1), 60-64.