




Serazym® Nucleo ANAscreen plus

Enzymimmunoassay zum Nachweis von ANA gegen native nukleäre Antigene und Jo-1
in humanem Serum oder Plasma

REF E-100  96  *In-vitro*-Diagnostikum 



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

Einführung

Kollagenosen (Bindegewbserkrankungen) 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

Kollagenosen sind durch ein typisches Autoantikörperprofil charakterisiert, welches mit dem *Serazym®* Nucleo ANAscreen plus nachweisbar ist.

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.

Nukleosomen-Antikörper:

Autoantikörper gegen Nukleosomen, einem Komplex bestehend aus zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 umgeben von helicaler DNA, sind bei 56 bis 90% der SLE-Patienten nachweisbar, aber ebenfalls bei Patienten mit medikamenten-induziertem Lupus. In manchen Fällen können sie früher nachgewiesen werden als anti-dsDNA-Antikörper und sind deshalb als früher diagnostischer Marker eines beginnenden SLE nutzbar.

Histon-Antikörper:

Antikörper gegen Histone sind in vielen vorzugsweise rheumatischen Erkrankungen nachweisbar und sind daher nicht spezifisch für eine bestimmte Erkrankung. Trotzdem werden hohe Titer von anti-Histon-Antikörpern meist ausschließlich bei Patienten mit SLE und medikamenten-induziertem Lupus gemessen. Können in diesem Fall keine SLE-Marker wie anti-ds-DNA- und anti-Sm-Antikörper nachgewiesen werden, so weist ein hoher anti-Histon-Antikörper –Titer auf einen medikamenten-induziertem Lupus hin.

P0-Antikörper:

Autoantikörper gegen ribosomale Phosphoproteine (P0, P1, P2) werden als hoch spezifisch für SLE angesehen. Autoantikörper gegen das Hauptzielantigen P0 sind als diagnostischer Marker von SLE mit einer diagnostischen Sensitivität von 10-20% (bis zu 40% bei asiatischen Patienten) und einer diagnostischen Sensitivität von nahezu 100% bekannt. Anti-P0 Antikörper sind vorwiegend während der aktiven Phase von SLE nachweisbar und sind assoziiert mit einer Erkrankung der Nieren und Leber.

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.

Sm-Antikörper:

Anti-Sm-Antikörper sind ein diagnostischer 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 Erythematodes 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 erythematodes (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 Erythematodes (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 Sklerotis (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 SCLÉ-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 eine 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., Schöbler, W., Hiepe, F.
Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases
Pabst Science Publishers Lengerich u.a. 2002
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® Nucleo ANAscreen plus ist ein *In-vitro*-Diagnostikum zum simultanen quantitativen Nachweis von Autoantikörpern vom IgG-/IgA-/IgM-Isotyp in humanem Serum oder Plasma (EDTA- oder Citrat-Plasma). Autoantikörper gegen folgende nukleäre und zytoplasmatische Antigene können nachgewiesen werden: dsDNA, Nukleosomen, Histone, P0, U1-snRNP, Sm, Ro/SS-A/60kD/52kD, La/SS-B, Scl-70, CENP-B und Jo-1.

Testprinzip

Im ersten Inkubationsschritt reagieren die verdünnten Proben, die gebrauchsfertigen Kalibratoren, sowie die positive Kontrolle mit den an der festen Phase adsorbierten zellbasierten und selektiv angereicherten 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 reagieren gebundene Antikörper mit Peroxidase (POD)-markierten anti-human-IgG/-IgA/-IgM Antikörpern. Ungebundenes Konjugat wird nach einer 30 minütigen Inkubation bei RT durch Absaugen und einem anschließenden Waschprozess entfernt.

Im dritten Schritt setzt die POD 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 (Y-Achse) und deren entsprechenden Antikörper-Konzentrationen (X-Achse) wird eine Referenzkurve erstellt, an der Antikörper-Konzentration der unbekanntenen Patientenproben direkt von der abgelesen werden.

Testkomponenten

Für 96 Kavitäten

1	WELLS	Mikrotiterplatte Beschichtet mit nukleären und zytoplasmatischen Antigenen	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 Serumproben 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/ -IgA/ -IgM 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 oder Plasma (EDTA und Citratplasma) im *Serazym*[®] Nucleo ANAscreen plus 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[®] Nucleo ANAScreen plus 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 10-fach konzentrierten Waschpuffers 1 + 9 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.

Patientenproben mit Verdünnungsmedium (3) 1 + 100 (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 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 0 - 4** Kalibratoren 0, 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** 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 / ≥ 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min nach Reaktionsstopp.

Berechnung der Ergebnisse

Eine Referenzkurve wird durch Auftragen der gemessenen Extinktionen der Kalibratoren CAL 0-4 (Y-Achse) gegen die entsprechenden Antikörperkonzentrationen (X-Achse) konstruiert. Es wird empfohlen eine 4-Parameter-Regression mit lin-log-Koordinaten für die optische Dichte und die Konzentration anzufertigen.

Die Extinktionen der verdünnten Proben werden in Antikörperkonzentrationen U/ml (Antikörper-Einheiten/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	zugewasenes Volumen (Verdünnungsmedium)	Finales Volumen	Verdünnung der Original-Probe	Multiplikationsfaktor
10µl	1000µl	1010µl	1 : 101 = Probe 1	Keine Multiplikation notwendig
500µl Probe 1	500µl	1000µl	1 : 202 = Probe 2	Faktor 2
500µl Probe 2	500µl	1000µl	1 : 404 = Probe 3	Faktor 4
500µl Probe 3	500µl	1000µl	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® Nucleo ANAscreen plus	
Positiv	> 10 U/ml
Grauzone	8 – 10 U/ml
Negativ	< 8 U/ml

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden wenn:

- Der Extinktionsmittelwert von Kalibrator CAL 0 < CAL 1
- Der Extinktionsmittelwert von Kalibrator CAL 1 $\leq 0,70$
- Der Extinktionsmittelwert von Kalibrator CAL 4 $\geq 1,20$

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.

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.

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 mit dem Test. Rheumafaktoren interferieren bis zu einer Konzentration von 500 IU/ml nicht mit dem Test.

Leistungsmerkmale

Vergleichende Sensitivität und Spezifität

Sensitivität

62 Serumproben von Patienten wurden getestet, um die Sensitivität des Serazym® Nucleo ANAscreen plus im Vergleich zu einem anderen kommerziell verfügbaren Test zu ermitteln.

Ein Kollektiv von 62 Patienten wurde auf der Basis von mindestens 4 ACR-Kriterien für Rheumatische Erkrankungen ausgewertet. Diese Patientengruppe enthielt 28 SLE-Fälle, 16 PSS-Fälle und 18 unterschiedliche rheumatische Erkrankungen (Myositis, CREST-Syndrome, MCTD).

Die zugehörigen Daten sind in der folgenden Tabelle dargestellt. Patientenproben, die im Grauzonenbereich ermittelt wurden, wurden als positiv gewertet.

Diagnose	n	Vergleichstest		Serazym® Nucleo ANAscreen plus	
		positiv	Sensitivität	positiv	Sensitivität
SLE	28	27	96,4 %	27	96,4 %
PSS	16	16	100,0 %	16	100,0 %
andere	18	17	94,4 %	17	94,4 %
Total	62	60	96,8 %	60	96,8 %

Spezifität

55 Serumproben von gesunden Blutspendern wurden im *Serazym®* Nucleo ANAscreen plus im Vergleich zu einem anderen kommerziell verfügbaren Test getestet.

Die zugehörigen Daten sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Blut-spender	n	Vergleichstest		Serazym® Nucleo ANAscreen plus	
		negativ	Spezifität	negativ	Spezifität
	55	48	87,3 %	55	100 %

Kontrollgruppen

80 Serumproben wurden im *Serazym®* Nucleo ANAscreen plus getestet. Die acht Kontrollgruppen bestanden aus jeweils 10 Serumproben folgender Erkrankungen: EBV, CMV, Hypergammaglobulinämie, RF-IgA, RF-IgM, CCP, PR3 und MPO.

10 Serumproben aus diesem Kollektiv wurden falsch positiv detektiert.

Vergleichstest

207 Serumproben wurden sowohl im *Serazym®* Nucleo ANAscreen plus als auch in einem anderen kommerziell verfügbaren ELISA getestet. Die Ergebnisse sind in folgender Kreuztabelle dargestellt.

Serazym® Nucleo ANAscreen plus	Vergleichstest		
	positiv	Grauzone	negativ
positiv	118	4	1
Grauzone	9	1	0
negativ	8	11	55

Präzision

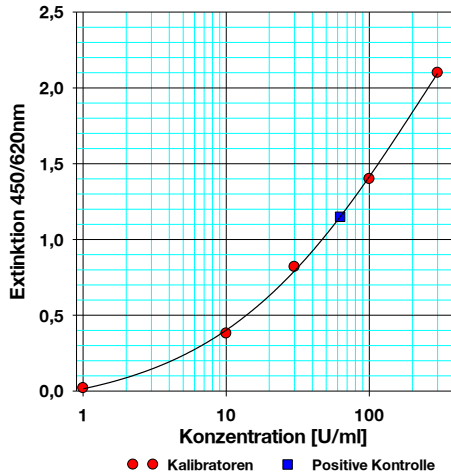
Intra-Assay Variationskoeffizienten (VK [%]) im *Serazym®* Nucleo ANAscreen plus aus 8-fach Bestimmung von Proben:

Probe	Konzentration [U/ml]	VK [%]
1	210,5	5,3
2	121,9	7,1
3	48,7	4,1
4	4,2	7,5

Inter-Assay Variationskoeffizienten (VK [%]) im *Serazym®* Nucleo ANAscreen plus in 6 differenten Ansätzen aus zweifach Bestimmung von Proben:

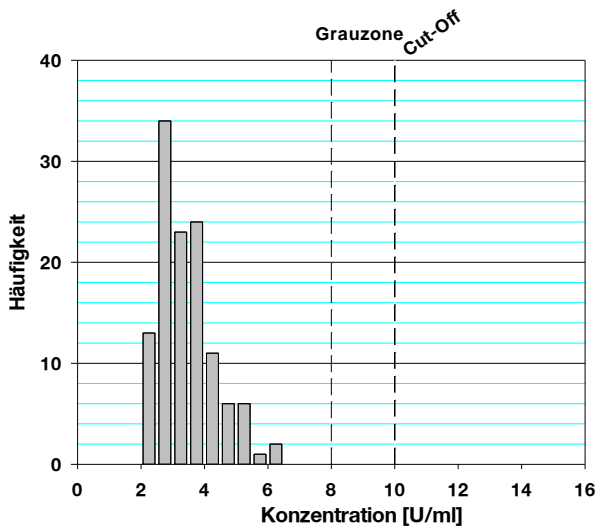
Probe	Konzentration [U/ml]	VK [%]
A	100,5	10,8
B	23,6	9,1
C	16,2	10,9
D	5,1	4,5

Typische Referenzkurve



Häufigkeitsverteilung

Häufigkeitsverteilung der Antikörperkonzentration im *Serazym*[®] Nucleo ANAscreen plus von 120 unausgewählten Humanseren.



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!

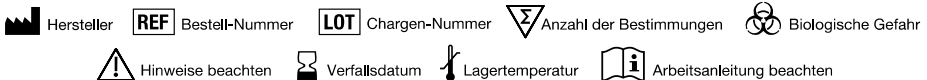
Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!
Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!



Inkubationsschema *Serazym*[®] Nucleo ANAScreen plus

- | | | | |
|----|---|-------------|--|
| 1. |  | 100 µl | 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 / ≥ 620 nm



Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2019-09-13	Referenzwerte Leistungsmerkmale Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen Änderungshistorie	Aktualisierung

Serazym® Nucleo ANAscreen plus

Enzyme immunoassay for detection of ANA to native nuclear antigens and Jo-1
in human serum or plasma

REF E-100 ▼ 96 IVD *In-vitro*-diagnostic medical 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

Connective tissue diseases are characterized by typical autoantibody profiles, detectable with *Serazym*® Nucleo ANAscreen plus.

dsDNA-antibodies:

IgG antibodies to dsDNA are marker antibodies and ACR-criterion for systemic lupus erythematosus (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.

Nucleosomal antibodies:

Autoantibodies to nucleosome, a complex consisting of two copies of the histones H2A, H2B, H3 and H4 surrounded by helical DNA are detectable in 56 to 90 % of SLE patients but also in cases of drug induced Lupus. Sometimes they can be detected earlier than anti dsDNA antibodies and therefore are useful as early diagnostic indicator of the onset of SLE.

Histone antibodies:

Antibodies to histones are detectable in many, preferably rheumatic diseases and therefore not specific for a disease. Nevertheless high titers of anti-histone antibodies are found almost exclusively in patients with SLE and drug-induced lupus. In the absence of SLE -markers like anti-dsDNA and anti-Sm antibodies high titers of anti-histone antibodies are characteristic for drug-induced lupus.

P0 antibodies:

Autoantibodies to ribosomal phosphoproteins (P0, P1, P2) are regarded as highly specific for SLE. Autoantibodies to the major target antigen P0 are known as diagnostic marker of SLE reaching a diagnostic sensitivity of 10-20% (and up to 40% in asiatic patients) and a diagnostic specificity of nearly 100%. Anti-P0 antibodies are predominantly detectable during the active phase of SLE and associated with renal and liver involvement.

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-snRNP antibodies and in the absence of antibodies to Sm and dsDNA.

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

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 erythematosus. 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., Schöbner, W., Hiepe, F.
Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases
Pabst Science Publishers Lengerich u.a. 2002
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

Intended use

Serazym® Nucleo ANAscreen plus is an *in-vitro* diagnostic medical device for the simultaneous determination of autoantibodies of IgG/IgA/IgM isotype in human serum or plasma (EDTA or citrate plasma). Autoantibodies to the following nuclear and cytoplasmatic antigens can be detected: dsDNA, nucleosomes, histones, P0, U1-snRNP, Sm, Ro/SS-A/60kD/52kD, La/SS-B, Scl-70, CENP-B and Jo-1.

Principle of the test

In the first incubation step diluted samples, ready-to-use calibrators and positive control react with the solid-phase adsorbed cell based and selective enriched 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 bound antibodies react with horseradish peroxidase (HRP)-labelled anti-human-IgG/ -IgA/ -IgM 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. 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 nuclear and cytoplasmatic antigens	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 samples 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/-IgA/-IgM 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		Protective sheet	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*[®] Nucleo ANAscreen plus. 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*[®] Nucleo ANAscreen plus 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 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 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 0 - 4** calibrators 0, 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.

Result interpretation

Create a reference curve by plotting the mean absorbances of the calibrators CAL 0-4 (Y-axis) to their corresponding antibody-concentrations (X-axis).
 A 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is recommended.

Determine the antibody-concentrations of the unknown samples by referring their mean absorbances to the reference curve. In case of using a sample dilution of 1+100, 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 the 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
10µl	1000µl	1010µl	1 : 101 = <i>Sample 1</i>	<i>No multiplication required</i>
500µl <i>Sample 1</i>	500µl	1000µl	1 : 202 = <i>Sample 2</i>	factor 2
500µl <i>Sample 2</i>	500µl	1000µl	1 : 404 = <i>Sample 3</i>	factor 4
500µl <i>Sample 3</i>	500µl	1000µl	1 : 808 = <i>Sample 4</i>	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® Nucleo ANAscreen plus	
negative	< 8 U/ml
grey zone	8 – 10 U/ml

positive	> 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) 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

Sensitivity validation data

A total of 62 serum samples from patients were tested, in order to determine the sensitivity of the Serazym® Nucleo ANAscreen plus compared to another commercially available test. A collective of 62 patients were evaluated on the basis of at least 4 ACR-criteria of rheumatic diseases. These 62 patients include 28 SLE, 16 PSS and 18 different rheumatic disease (myositis, CREST-syndrome, MCTD) cases.

The associated data are shown in the following table. Samples of patients which are located in the grey zone are dedicated as positive.

diagnosis	n	comparative test		Serazym® Nucleo ANAscreen plus	
		positive	sensitivity	positive	sensitivity
SLE	28	27	96.4 %	27	96.4 %
PSS	16	16	100.0 %	16	100.0 %
others	18	17	94.4 %	17	94.4 %
Total	62	60	96.8 %	60	96.8 %

Specificity validation data

A total of 55 serum samples of healthy blood donors was tested in *Serazym*[®] Nucleo ANAscreen plus compared to another commercially available test.

blood donors	n	comparative test		<i>Serazym</i> [®] Nucleo ANAscreen plus	
		negative	specificity	negative	specificity
	55	48	87.3 %	55	100 %

Control groups

A total of 80 serum samples was tested in *Serazym*[®] Nucleo ANAscreen plus. The 8 control groups consist of respectively 10 serum samples from the following diseases: EBV, CMV, hypergammaglobulinemia, RF-IgA, RF-IgM, CCP, PR3 and MPO. The *Serazym*[®] Nucleo ANAscreen plus detected 10 serum samples of this collective demonstrably false positive.

Comparative test

A total of 207 serum samples were tested both in *Serazym*[®] Nucleo ANAscreen plus and in another commercially available test. The results are shown in the following crosstabulation.

<i>Serazym</i> [®] Nucleo ANAscreen plus		comparative test		
		positive	grey zone	negative
positive		118	4	1
grey zone		9	1	0
negative		8	11	55

Precision

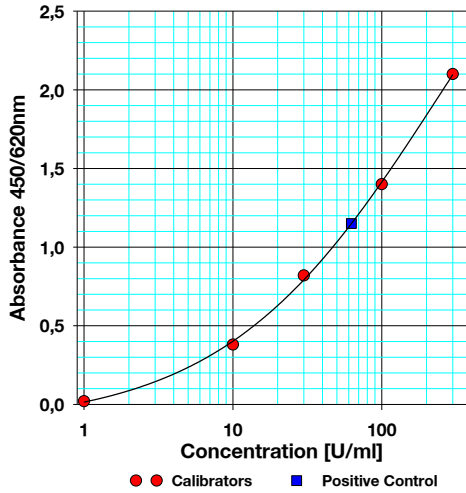
Intra-assay coefficient of variation (CV %) in the *Serazym*[®] Nucleo ANAscreen plus from 8-fold determinations of samples:

sample	concentration [U/ml]	CV [%]
1	210.5	5.3
2	121.9	7.1
3	48.7	4.1
4	4.2	7.5

Inter-assay coefficient of variation (CV %) in the *Serazym*[®] Nucleo ANAscreen plus from 6 different runs with twofold determinations of samples:

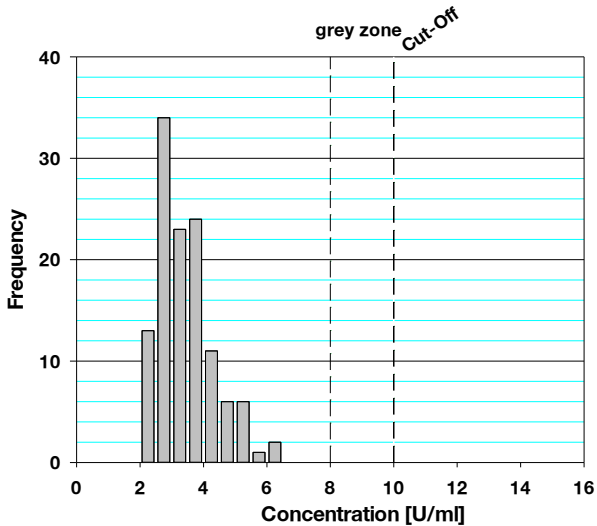
sample	concentration [U/ml]	CV [%]
A	100.5	10.8
B	23.6	9.1
C	16.2	10.9
D	5.1	4.5

Typical reference curve



Frequency distribution

Frequency distribution of *Serazym*[®] Nucleo ANAscreen plus concentrations in 120 serum samples:



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. 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*[®] Nucleo ANAScreen plus

- | | | | |
|----|---|----------|--|
| 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



Catalogue-No.



Lot-No.



Number of determinations



Biohazard



Notice advices



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use

History of changes

Version	Section	Modifications
2019-09-13	Reference values Performance Characteristics Common advices and precautions History of changes	Update