

Serazym[®] Nucleo ANAscreen plus

Enzymimmunoassay zum quantitativen Nachweis von IgG-, IgA- und IgM-Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene (antinukleäre Antikörper - ANA) in Serum oder Plasma humanen Ursprungs

REF	E-100		96
IVD	In-vitro-Diagnostikum		




Seramun Diagnostica GmbH • Spreenhagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

UDI Eindeutige Produktidentifizierung


IVD In-vitro Diagnostikum

 Hersteller

 Land der Herstellung und Datum der Herstellung


 Nicht wiederverwenden

SN Seriennummer

 Begrenzung der Luftfeuchtigkeit

 Vor Sonnenlicht schützen

REF Artikelnummer

 Gebrauchsanweisung beachten


 Verwendbar bis

LOT Chargennummer

 Ausreichend für *n* Prüfungen

 Biologisches Risiko

 Temperaturbereich

 Achtung

Zweckbestimmung

Serazym® Nucleo ANAScreen plus ist ein IVD-Test zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörpern des IgG-, IgA- und IgM-Isotyps gegen nukleäre Antigene (antinukleäre Antikörper - ANA) in Serum oder Plasma (Citrat, EDTA) humanen Ursprungs durch einen Fachanwender in Laborumgebung.

Er dient der Diagnosehilfe von Kollagenosen in Proben von Patienten mit Verdacht auf das Vorliegen einer systemischen Autoimmunerkrankung (Kollagenose).

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

Testprinzip

Serazym® Nucleo ANAScreen plus ist ein Enzymimmunoassay, bei dem die verdünnten Serum- oder Plasmaproben, die gebrauchsfertigen Kalibratoren sowie die Positivkontrolle mit den an der festen Phase adsorbierten, zellbasierten und selektiv angereicherten Antigenen reagieren. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT, 18...25 °C) werden die ungebundenen Komponenten in einem Waschschrift entfernt. Im zweiten Inkubationsschritt binden die Peroxidase (HRP)-markierten anti-human-IgG-/IgA-/IgM-Antikörper an die Probenantikörper. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT wird ungebundenes Konjugat in einem Waschschrift entfernt. Die HRP setzt im folgenden 15-minütigen enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung in ein blaues Reaktionsprodukt um. Diese Reaktion wird nach Inkubation durch Zugabe der Stopplösung beendet, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die bei 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Antikörper direkt proportional. Anhand der gemessenen Extinktionen der Kalibratoren und deren entsprechenden Antikörperkonzentrationen wird eine Kalibrierkurve erstellt, an der die Konzentrationen der Patientenproben abgelesen werden können.

Testkomponenten (Lieferumfang)

		Für 96 Kavitäten	
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit nukleären Antigenen (ANA)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten, farblos, vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF (10x)	Waschpuffer (10x) Seramun® Wash buffer G TRIS-basierter Puffer	100 mL Konzentrat für 1000 mL Lösung, farblos, weiße Kappe
3	DIL	Probenpuffer Seramun® Sample diluent O TRIS-basierter Puffer	100 mL, gebrauchsfertig, orange gefärbt, schwarze Kappe
4	CAL 0 - 4	Kalibratoren 0 – 4 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 +	Positivkontrolle Konzentration siehe Analysezertifikat	1,0 mL, gebrauchsfertig, blau gefärbt, rote Kappe
6	CONJ HRP	HRP-Konjugat HRP-markierte anti-human- IgG, anti-human-IgA und anti- human-IgM-Antikörper (Schaf)	15 mL, gebrauchsfertig, rot gefärbt, rote Kappe

7	SUBSTR	Substrat SeramunBlau® slow2 70 < 0,1 % 3,3',5,5'-Tetramethyl- benzidin	15 mL, gebrauchsfertig, farblos, blaue Kappe
8	STOP	Stopplösung SeramunBlau® stop 0,25 M Schwefelsäure	15 mL, gebrauchsfertig, farblos, gelbe Kappe
9	COVER	Abdeckfolie	2 Stück
10		Analysenzertifikat	1 Stück
11		Gebrauchsanleitung	1 Stück

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette • 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten mit Pipettenspitzen • Reagenzienbehälter für Mehrkanal-Mikropipetten • 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät • Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und 620 nm Referenzfilter • deionisiertes Wasser • Messzylinder • Teströhrchen für die Probenverdünnung

Wichtige Hinweise



Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* diagnostischen Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden.

Die Gebrauchsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck und seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Komponenten aus beschädigten Verpackungen bzw. 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 Waschpuffer (10x), Substrat und Stopplösung erlaubt.

Alle im Zusammenhang mit Serazym® Nucleo ANAScreen plus auftretenden schwerwiegenden Vorkommnisse sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem Anwender und/oder Patient niedergelassen sind, zu melden.

Hinweise zur Testdurchführung

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

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

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

Die Durchführung der Absaug- und Waschschrte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Washers oder einer Wasserstrahlpumpe erfolgen.

Beim Waschvorgang dispensierten, verdünnten Waschpuffer mindestens 5 s einwirken lassen und Waschpufferreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen!

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

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 Patientenproben und Kontrollen 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:

WELLS	-	Enthält Material tierischen Ursprungs.
WASHBUF (10x)	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
DIL	-	Enthält Material tierischen Ursprungs.
CAL 0 - 4	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
CONTROL +	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
CONJ HRP	Gefahrbestimmende Komponenten	N-Methyl-2-pyrrolidon; 1-Methyl-2-pyrrolidon
	H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
	P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
	P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
	P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
	P501	Inhalt/Behälter gemäß den geltenden lokalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.
EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.	
		Nur für gewerbliche Anwender.
		Enthält Material tierischen Ursprungs.
SUBSTR	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich
STOP	Gefahrbestimmende Komponenten	Schwefelsäure 2,5 %
	H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

Grenzen der Methode

Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze sowie Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben können zu inkorrekten Ergebnissen führen. Inkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenzien sowie inkorrekte Zeiten bei der Inkubation der Proben und der Kalibratoren können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.

Die Gesamtinterpretation des ELISA-Testergebnisses sollte im Zusammenhang mit dem klinischen Bild erfolgen.

Behandlung der Proben

Probennahme

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

Probenthaltbarkeit und -lagerung

Serum- oder Plasmaproben humanen Ursprungs bis zu 2 Tage bei 2...8 °C lagern. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Mehrfaches (> 3x) Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

Probenvorbereitung

Vor der Verwendung die Proben auf Raumtemperatur erwärmen und durch kurzes Aufschütteln die Homogenität sichern.

Patientenproben mit Probenpuffer 1 : 101 (v/v) in einem Teströhrchen (zusätzlich benötigtes Hilfsmittel) verdünnen.

Beispiel: 10 µL Probe + 1000 µL Probenpuffer.

Behandlung der Reagenzien

Reagenzienhaltbarkeit und -lagerung

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 2 Monate haltbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2...8 °C bis zu 1 Monat haltbar.

Reagenzienvorbereitung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminiumbeschichteten 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 verschließen.

Waschpuffer (10x) 1 : 10 mit deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 10 mL Waschpuffer (10x) + 90 mL deionisiertes Wasser.

Außer dem Waschpuffer sind alle enthaltenen Komponenten gebrauchsfertig.

Das Substrat ist vor direktem Lichteinfall zu schützen. Sollte das Substrat dunkel gefärbt sein oder Partikel aufweisen, darf dieses nicht mehr verwendet werden.

Testdurchführung

1. Testreagenzien und benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Je 100 µL

CAL	0 - 4
-----	-------

 Kalibratoren 0, 1, 2, 3 und 4
100 µL

CONTROL	+
---------	---

 Positivkontrolle
100 µL verdünnte Probe pipettieren.
3. Platte abdecken und 60 min bei RT inkubieren.
4. Dekantieren und 3-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 100 µL

CONJ HRP

 HRP-Konjugat pro Kavität.
6. Platte abdecken und 30 min bei RT inkubieren.
7. Dekantieren und 3-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 100 µL

SUBSTR

 Substrat pro Kavität.
9. 15 min **lichtgeschützt** bei RT inkubieren.
10. 100 µL

STOP

 Stopplösung pro Kavität, kurz schütteln.
11. Messen der OD bei 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min.

Auswertung der Ergebnisse

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

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

Die Extinktionen der verdünnten Proben werden in Antikörperkonzentrationen U/mL durch Ablesen an der Kalibrierkurve 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 Vorverdünnung zu wiederholen und das Ergebnis mit dem Faktor der zusätzlichen Verdünnung zu multiplizieren:

Probenvolumen	Zugesetztes Volumen (Probenpuffer)	Finales Volumen	Verdünnung der Originalprobe	Multiplikationsfaktor
10 µL	1000 µL	1010 µL	1 : 101 = Probe 1	-
500 µL Probe 1	500 µL	1000 µL	1 : 202 = Probe 2	2
500 µL Probe 2	500 µL	1000 µL	1 : 404 = Probe 3	4

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.

Interpretation der Ergebnisse

Positiv	> 10 U/mL
Grauzone	8 – 10 U/mL
Negativ	< 8 U/mL

Bei Proben mit Ergebnissen innerhalb der Grauzone sollte der Test wiederholt werden.

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn

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

Sind die genannten 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.

Leistungsmerkmale

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 ELISA zu ermitteln. Jeder der Patienten des Kollektivs wies mindestens 4 ACR-Kriterien für rheumatische Erkrankungen auf. Diese Patientengruppe enthielt 28 Fälle von systemischem Lupus erythematodes (SLE), 16 Fälle von primärem Sjögren-Syndrom (PSS) und 18 unterschiedliche rheumatische Erkrankungen (Myositis, CREST-Syndrom, MCTD).

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

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

Spezifität

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

	n	Vergleichs-ELISA		Serazym® Nucleo ANAscreen plus	
		negativ	Spezifität	negativ	Spezifität
Blutspender	55	48	87,3 %	55	100 %

Kontrollgruppen

80 Serumproben wurden im Serazym® Nucleo ANAscreen plus getestet. Die 8 Kontrollgruppen bestanden aus jeweils 10 Serumproben mit Antikörpertitern gegen folgende Parameter: 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 der folgender Kreuztabelle dargestellt:

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

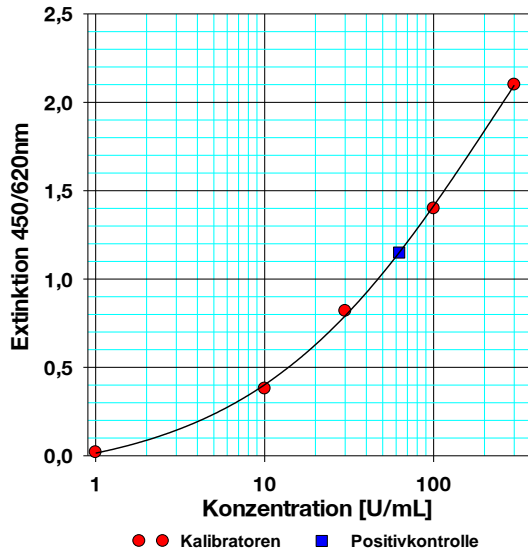
Präzision

Zur Bestimmung der Präzision wurden 4 Proben mehrfach bestimmt: Für die Bestimmung des Intra-Assay-Variationskoeffizienten (VK) wurden die Proben in einer 8-fachen Bestimmung in einem Testlauf vermessen. Die Bestimmung des Inter-Assay-Variationskoeffizienten erfolgte durch eine Doppelbestimmung der Proben in 6 verschiedenen Testläufen:

Probe	Intra-Assay-Variationskoeffizient		Inter-Assay-Variationskoeffizient	
	Konzentration [U/mL]	VK [%]	Konzentration [U/mL]	VK [%]
1	210,5	5,3	100,5	10,8
2	121,9	7,1	23,6	9,1
3	48,7	4,1	16,2	10,9
4	4,2	7,5	5,1	4,5

Kalibrierkurve

Eine typische Kalibrierkurve im Serazym® Nucleo ANAscreen plus ist nachfolgend dargestellt:



Interferenz



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

Änderungshistorie












Version	Abschnitt	Änderungen
2022-11_v01_DE_EN	Gesamtes Dokument	Aktualisierung der Zweckbestimmung Umstellung der Teilabschnitte Einfügen von Sicherheitshinweisen Aktualisierung Wichtige Hinweise

Serazym[®] Nucleo ANAscreen plus

Enzyme immunoassay for the quantitative detection of autoantibodies of the IgG-, IgA- and IgM-isotype against nuclear antigens (antinuclear antibodies – ANA) in serum or plasma of human origin

REF	E-100		96
IVD	In-vitro-diagnostic medical device		

 **Seramun Diagnostica GmbH** • Sprenhagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

IVD In-vitro diagnostic medical device	UDI Unique device identifier	 Manufacturer
 Country of manufacture and date of manufacture	REF Article number	SN Serial number
 Keep away from sunlight	 Humidity limitation	LOT Batch code
 Consult instructions for use	 Temperature limit	 Do not reuse
 Sufficient for <i>n</i> tests	 Biohazard	 Use-by date
		 Attention

Intended Use

Serazym® Nucleo ANAScreen plus is an IVD test for the quantitative determination of autoantibodies of the IgG-, IgA- and IgM-isotype against nuclear antigens (antinuclear antibodies – ANA) in serum or plasma (citrate, EDTA) of human origin by a laboratory professional user.

It is intended to aid in the diagnosis of a collagenosis in specimen materials from patients with suspicion of a systemic autoimmune disease.

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

Principle of the Test

Serazym® Nucleo ANAScreen plus is an enzyme immunoassay in which the diluted serum or plasma samples, the ready-to-use calibrators and the positive control react with the cell based and selective enriched antigens adsorbed to the solid phase. After a 60-minute incubation at room temperature (RT, 18...25 °C) unbound components are removed by a wash step. In the second incubation step horseradish peroxidase (HRP)- labeled anti-human IgG/IgA/IgM antibodies bind to the sample antibodies. After a 30-minute incubation at RT unbound conjugate is removed by a wash step. HRP converts the colorless substrate solution to a blue reaction product in the following 15-minute enzymatic reaction step. The reaction is stopped by addition of the stop solution, resulting in a color change from blue to yellow. The optical density (OD) of the reaction product measured at 450 nm measuring and ≥ 620 nm reference filter is directly proportional to the concentration of specifically bound antibodies. Using the measured absorbances of the calibrators and their corresponding antibody concentrations, a calibration curve is generated from which the concentrations of the patient samples can be read.

Test Components (Delivery Scope)

			For 96 wells
1	WELLS	Microtiter plate coated with nuclear antigens (ANA)	12 single breakable 8-well strips, colorless, vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF (10x)	Wash buffer (10x) Seramun® Wash buffer G TRIS based buffer	100 mL concentrate for 1000 mL solution, colorless, white cap
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent O TRIS based buffer	100 mL, ready to use, colored orange, black cap
4	CAL 0 - 4	Calibrators 0 – 4 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 colored blue white cap
5	CONTROL +	Positive control Concentration see certificate of analysis	1.0 mL, ready to use, colored blue, red cap
6	CONJ HRP	HRP conjugate HRP labeled anti-human IgG, anti-human IgA and anti-human IgM antibodies (sheep)	15 mL, ready to use, colored red, red cap
7	SUBSTR	Substrate SeramunBlau® slow2 70 < 0.1 % 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	15 mL, ready to use, colorless, blue cap

8	STOP	Stop solution SeramunBlau® stop 0.25 M sulphuric acid	15 mL, ready to use, colorless, yellow cap
9	COVER	Covering film	2 pieces
10		Certificate of Analysis	1 piece
11		Instructions for Use	1 piece

Additional Materials and Aids Required for the Test Procedure

Adjustable single-channel micropipette • 8-channel pipette or multi-pipette with pipette tips • reagent container for multi-channel micro-pipettes • 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer • microplate reader with 450 nm measuring filter and ≥ 620 nm reference filter • deionized water • measuring cylinder • tubes for sample preparation

Important Information



This device is for *in-vitro* diagnostic use only. Follow the instructions carefully. The kit may be performed by health professionals only.

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

Mixing of test kit components of different lots is only allowed for wash buffer (10x), substrate and stop solution.

All serious incidents occurring in relation with Serazym® Nucleo ANAscreen plus must be reported to the manufacturer and the competent authority of the EU member state in which user and/or patient are located.

Information on Assay Procedure

All reagents should be stored at 2...8 °C. Bring all test components to room temperature before use. For larger sample series, pipetting reagents from liquid reservoirs using a multichannel pipette is recommended to avoid time delays. Follow the pipetting scheme and time schedules of the protocol. The aspiration and washing steps can be performed manually or with the help of a microplate washer or waterjet pump. Wash solution should be allowed a minimum reaction time of 5 s in the wells per wash cycle. Remove wash buffer residues by thoroughly aspirating or tapping out the cavities! Protect substrate from light!

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.

Product contains the following hazardous component/-s:

WELLS	-	Contains material of animal origin.
WASHBUF (10x)	EUH208	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction.
	EUH210	Safety data sheet available on request.
DIL	-	Contains material of animal origin.
CAL 0 - 4	EUH208	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction.
	EUH210	Safety data sheet available on request.
CONTROL +	EUH208	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction.
	EUH210	Safety data sheet available on request.
CONJ HRP	Hazard components H360D P202	N-methyl-2-pyrrolidone; 1-methyl-2-pyrrolidone May damage the unborn child. Do not handle until all safety precautions have been read and understood.
	P280	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
	P308+P313 P501	If exposed or concerned: Get medical advice/attention. Dispose of contents/container in accordance with local regulations.
	EUH208	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Restricted to professional users.
		Contains material of animal origin.
SUBSTR	EUH210	Safety data sheet available on request
STOP	Hazard components H290	Sulphuric acid 2.5 % May be corrosive to metals.

Limitations of the Procedure

Contamination of reagents and samples by bacteria or fungi as well as cross-contamination of the test kit reagents and samples can lead to incorrect results. Incorrect washing to separate unbound components from the sample and test reagents as well as incorrect incubation times of the samples and calibrators can cause incorrect results as well.

The overall interpretation of an ELISA test result should consider all clinical findings.

Sample Treatment

Sample Collection

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

Sample Shelf Life and Storage

Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 2 days. For longer periods samples have to be stored at -20 °C. Repeated (> 3x) freezing and thawing of samples should be avoided.

Sample Preparation

Bring samples to room temperature before use. Homogeneity should be ensured by shaking components briefly. Samples have to be diluted 1 : 101 (v/v) with sample diluent.

Example: 10 µL sample and 1000 µL sample diluent.

Reagent Treatment

Reagent Shelf Life and Storage

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

Reagent Preparation

The microtiter plate with breakable 8-well strips is vacuum sealed with desiccant. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored at 2...8 °C and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Dilute wash buffer (10x) 1 : 10 with deionized water.

Example: 10 mL wash buffer (10x) + 90 mL deionized water.

Except for the wash buffer all components included in the test kit are ready to use.

The substrate must be protected from direct light. The test should not be performed with a substrate solution that is colored dark or contains colored precipitates.

Assay Procedure

1. Allow test reagents and required number of wells to reach room temperature (RT). Shake reagents gently before use. Avoid foaming.
2. Pipette 100 µL

CAL	0 - 4
-----	-------

 Calibrators 0, 1, 2, 3 and 4
100 µL

CONTROL	+
---------	---

 Positive control
100 µL diluted sample each.
3. Cover the plate and incubate for 60 min at RT
4. Decant, then wash each well 3 x with 300 µL diluted wash buffer. Tap dry onto absorbent paper if necessary.
5. 100 µL

CONJ HRP

 HRP conjugate per cavity.
6. Cover the plate and incubate for 30 min at RT.
7. Decant, then wash each well 3 x with 300 µL diluted wash buffer. Tap dry onto absorbent paper if necessary.
8. 100 µL

SUBSTR

 substrate per cavity.
9. Incubate for 15 min at RT **protected from light**.
10. 100 µL

STOP

 stop solution per cavity, mix gently.
11. Read OD at 450 nm and ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min following reaction stop.

Evaluation of Results

A calibration curve is created by plotting the measured absorbances of the calibrators CAL 0 - 4 (y-axis) against the corresponding antibody concentrations (x-axis).

The 4-parameter regression model is recommended to create the calibration curve.

The absorbances of the diluted samples are converted to antibody concentrations U/mL by extrapolating from the calibration curve. The indicated concentrations of the calibrators already take into account the regular dilution factor of the serum samples of 1 : 101.

Measurements of samples with a higher absorbance than that of calibrator CAL 4 have to be repeated in a higher predilution. Results have to be multiplied with the factor of the additional dilution:

Sample volume	Added volume of sample diluent	Final volume	Dilution of original sample	Multiplication factor
10 µL	1000 µL	1010 µL	1 : 101 = Sample 1	-
500 µL Sample 1	500 µL	1000 µL	1 : 202 = Sample 2	2
500 µL Sample 2	500 µL	1000 µL	1 : 404 = Sample 3	4

Note that antibodies in dilutions may not be stable, which may lead to a loss of activity. For this reason, a reinvestigation should be performed in a higher dilution at the same day.

Interpretation of Results

Positive	> 10 U/mL
Gray zone	8 – 10 U/mL
Negative	< 8 U/mL

Test should be repeated if read-out lays within the gray zone.

Test validation

The test run is valid if

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

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

Performance Characteristics

Sensitivity and Specificity

Sensitivity

A total of 62 serum samples from patients were tested to determine the sensitivity of Serazym® Nucleo ANAscreen plus compared to another commercially available ELISA. Each patient of this collective presented at least 4 ACR criteria for rheumatic diseases. This group of patients included 28 cases of systemic lupus erythematosus (SLE), 16 cases of primary Sjögren syndrome (PSS) and 18 different rheumatic diseases (myositis, CREST syndrome, MCTD).

The associated data are shown in the following table. Patient samples determined to be ranged in the grey zone were considered to be positive.

Diagnosis	n	Comparative ELISA		Serazym® Nucleo ANAscreen plus	
		positive	sensitivity	positive	sensitivity
SLE	28	27	96.4 %	27	96.4 %
PSS	16	16	100 %	16	100 %
Others	18	17	94.4 %	17	94.4 %
Total	62	60	96.8 %	60	96.8 %

Specificity

A total of 62 serum samples from blood donors were tested in Serazym® Nucleo ANAscreen plus in comparison to another commercially available ELISA.

	n	Comparative ELISA		Serazym® Nucleo ANAscreen plus	
		negative	specificity	negative	specificity
Blood donors	55	48	87.3 %	55	100 %

Control groups

A total of 80 serum samples were tested in Serazym® Nucleo ANAscreen plus. The 8 control groups consisted of 10 serum samples each with antibody titers for the following parameters: EBV, CMV, hypergammaglobulinemia, RF-IgA, RF-IgM, CCP, PR3 and MPO. 10 serum samples from this collective were detected false positive.

Comparative test

A total of 207 serum samples were tested in Serazym® Nucleo ANAscreen plus and in another commercially available ELISA. Results are shown in the following table:

		Comparative ELISA		
		positive	gray zone	negative
Serazym® Nucleo ANAscreen plus	positive	118	4	1
	gray zone	9	1	0
	negative	8	11	55

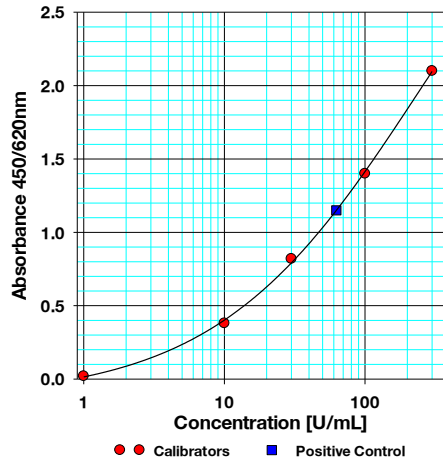
Precision

To determine precision 4 samples were measured multiple times. For the determination of the intra-assay coefficient of variation (CV) samples were measured in an 8-fold determination in one test run. The determination of the inter-assay coefficient of variation was done by a 2-fold determination in 6 different test runs:

Sample	Intra-assay coefficient of variation		Inter-assay coefficient of variation	
	concentration [U/mL]	CV [%]	concentration [U/mL]	CV [%]
1	210.5	5.3	100.5	10.8
2	121.9	7.1	23.6	9.1
3	48.7	4.1	16.2	10.9
4	4.2	7.5	5.1	4.5

Calibration Curve

A typical calibration curve in Serazym® Nucleo ANAscreen plus is shown below:



Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples do not interfere in a concentration of up to 500 mg/dL (hemoglobin), 1000 mg/dL (lipids) and 20 mg/dL (bilirubin C and bilirubin F). Rheumatoid factors do not interfere in a concentration of up to 500 IU/mL.

Change History

Version	Section	Modifications
2022-11_v01_DE_EN	Entire document	Updating of the Intended Use Conversion of subsections Insertion of Safety Instructions Updating Important Information

References

1. Conrad, K, Schößler, W et al. (2015): "Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: A diagnostic reference", Pabst Science Publishers, Vol. 3, Lengerich, Germany.
2. Peter, JB, Shoenfeld Y (1996): "Autoantibodies". Elsevier, Vol. 1, Amsterdam, The Netherlands.
3. Tan, EM (1989): "Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune disease and probes for cell biology", Adv. Immunol., Vol. 44, p. 93-151.