

Seraline[®] Vaskulitis-3 IgG

Line Immunoassay zum Nachweis von IgG- Antikörpern bei systemischer Vaskulitis
in humanem Serum oder Plasma

REF LIA-003-3 G  20  *In-vitro*-Diagnostikum 



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

Einführung

Primäre systemische Vaskulitiden von kleinen und mittelgroßen Gefäßen (1) unbekannter Ätiologie sind mit anti-neutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) assoziiert. Neutrophile Granulozyten treten gehäuft an den Läsionen kleiner Gefäße auf, wahrscheinlich in Folge einer direkten Aktivierung durch ANCA. Dadurch wird ein destruktiver Entzündungsprozess initiiert. In den betreffenden Läsionen lassen sich keine Immunglobuline oder Komplementkomponenten (sog. Pauci-Immun Vaskulitis) nachweisen (2,3).

Hauptantigene von ANCA-assoziiierter Vaskulitis (**AAV**) sind:

Proteinase 3 (PR3) als ein Vertreter der Serin-Proteasen wird in der Immunfluoreszenz als Hauptantigen der zytoplasmatischen ANCA (cANCA) detektiert. Diagnostisch ist sie streng assoziiert mit der granulomatösen Polyangiitis (**GPA**, früher Wegener Granulomatose, 85% sind anti-PR3 Antikörper positiv) (4).

Myeloperoxidase (MPO) ist ein stark basisches Protein der azurophilen Granula und ist in die Erzeugung reaktiver Sauerstoffverbindungen involviert (5). Als Hauptantigen der perinukleären ANCA (pANCA) fungiert es diagnostisch als Marker für die mikroskopische Polyangiitis (**MPA**, 45%), die Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (**EGPA**, früher Churg-Strauss Syndrom **CCS**, 60%) und die idiopathische Glomerulonephritis (65%).

Geographisch herrschen MPO-assoziierte Vaskulitiden überwiegend in Asien (Japan und China) vor, während im europäischen Raum PR3-assoziierte Vaskulitiden überwiegen (6). MPO-Antikörper spielen eine besondere Rolle bei der Abklärung des pulmo-renalen Syndroms. Dabei zeigen sie für den Formenkreis der nekrotisierenden Vaskulitiden eine hohe Spezifität.

Die pANCA ähnlichen Muster können durch Autoantikörper gegen andere Zielantigene z.B. Elastase, Kathepsin und Lysozym verursacht werden und sind assoziiert mit Kollagenosen, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder autoimmunen Hepatitiden. Deshalb sollten zur Abklärung von Antikörperspezifitäten Tests mit gereinigten Antigenen (ELISA oder LIA) gegenüber Immunfluoreszenztesten bevorzugt werden.

Glomeruläres Basalmembranprotein (GBM) ist das Hauptantigen von Autoantikörpern, die an der nichtkollagenen Domäne der $\alpha 3$ -Kette vom Kollagen Typ IV binden (10). Diese Struktur ist auch in anderen Membranen präsent. Anti-GBM Antikörper sind bei über 90% der Patienten mit Goodpasture Syndrom (GPS) nachweisbar und aktivieren nach erfolgter Targetbindung Komplement. Durch aktivierte zelluläre Proteinase werden im Anschluss die Zellmembran und damit die Filtrationsbarriere zerstört. Nur der frühzeitige Nachweis dieser spezifischen Antikörper ermöglicht eine schnelle Diagnose und damit den schnellen Beginn einer adäquaten Therapie, welche zu einer dramatischen Verbesserung der Prognose führt.

Das Goodpasture-Syndrom ist extrem selten (1 Fall pro 1.000.000 Einwohner pro Jahr, 3,8% der Patienten mit pulmonal-renalem Syndrom auf Intensivstationen (8)) und betrifft überwiegend die ethnische Gruppe der Kaukasier. Bei ca. 20% der Patienten verursacht die schnell fortschreitende Glomerulonephritis ein akutes Nierenversagen (9). Ohne Therapie liegt die Mortalität zwischen 75 und 90%. Genetische (>80% der Patienten sind HLA DR15 oder DR4 positiv) und Umweltfaktoren (Rauchen, Infektionen) sind in die Pathogenese involviert.

Das Goodpasture Syndrom kann zusammen mit einer akuten systemischen Vaskulitis auftreten (**GPS/ AAV Overlap**).

Literatur:

1. Jenette JC, Falk RJ, Andrassy K. et al, Nomenclature of systemic vasculitides: proposal of an international conference. *Arthritis Rheumatol* 1994, 37, 187-192.
2. Charles LA, Caldas MLR, Falk RJ et al, Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *J Leukocyte Biol* 1991, 50, 539-546.
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 anticytoplasmic antibodies. *Arch Intern Med* 1989, 149, 2461-2465.
5. Weiss SJ, Tissue destruction by neutrophils. *New Engl. J Med* 1989, 320, 365-376.
6. Ozaki S, ANCA associated vasculitis: Diagnostic and therapeutic strategy. *Allergol. Int.* 2007, 56, 87-96.
7. Chen M, Yu F, Wang SX et al, Renal histology in Chinese patients with anti-myelo-peroxidase autoantibody-positive Wegener's granulomatosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 22, 139-145.
8. Papiris SA, Manali ED, Kalomenidis I et al, Bench-to-bedside review: Pulmonary-renal syndromes- an update for the intensivist. *Critical Care* 2007, 213.
9. Salama AD, Levy J, Lightstone L et al, Goodature's disease. *Lancet* 2001, 358, 917-920.
10. 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.

Anwendungsbereich

Der *Seraline*[®] Vaskulitis-3 IgG ist ein empfindlicher Line Immunoassay (LIA) zum Nachweis von Autoantikörpern vom IgG Isotyp gegen folgende Antigene: Proteinase 3, Myeloperoxidase und glomeruläres Basalmembranprotein in humanem Serum oder Plasma.

Testprinzip

Die Antigene werden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und fixiert. Nach der Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran wird diese in gebrauchsfertige Streifen geschnitten. Die Reaktion zum Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Die zu untersuchenden Proben werden in einer Verdünnung von 1 : 101 zusammen mit Teststreifen in den Vertiefungen der Inkubationswanne inkubiert. Dabei reagieren die spezifischen Antikörper mit den auf der Membran fixierten Antigenen. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden die nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit Wasch- und Inkubationspufferlösung (WIB) entfernt.

Schritt 2

Enzymmarkierte (Meerrettichperoxidase, POD) Konjugatantikörper (anti-human-IgG, oder -IgA oder -IgM) reagieren mit den an die Antigenbanden gebundenen Probenantikörpern. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden nicht gebundene Konjugatmoleküle durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit WIB entfernt.

Schritt 3

Während der Substratreaktion setzen die gebundenen POD-Moleküle des Konjugats das Substrat unter Ausbildung blauer Präzipitate um. Die Reaktion wird nach 10 min durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser gestoppt.

Die gefärbten Antigenbanden auf den getrockneten Teststreifen werden durch Anlegen der Auswerteschablone identifiziert und das Testergebnis entsprechend der Auswertekriterien bestimmt. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren.

Alternativ können die Teststreifen mit der Evaluierungssoftware *Seraline*[®]scan automatisch ausgewertet werden.

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparinplasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (15 µl Probe und 1500 µl WIB) mit der gebrauchsfertigen Wasch- und Inkubationslösung (hergestellt aus konzentriertem WIB (2)) in der Inkubationswanne verdünnt. Die Proben sollten steril entnommen und maximal 48 Stunden bei 2..8°C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20°C zu lagern. Tiefgefrorene Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Die Verwendung von kontaminierten Proben kann die Hintergrundfärbung der Streifen erhöhen und darüber hinaus zu falschen Ergebnissen führen.

Testkomponenten

1	TESTSTR	Teststreifen inkl. Auswerteschablone	20 Streifen Farbcodierung: rot
2	WIB CONC 5x	Wasch- und Inkubationspuffer, 5-fach	70 ml Konzentrat, transparente Flasche, schwarze Kappe
3	CONJ HRP IgG	Anti-human IgG-POD- Konjugat	35 ml gebrauchsfertig, IgG , rot gefärbt, transparente Flasche, rote Kappe
4	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	35 ml gebrauchsfertig, schwarze Flasche, blaue Kappe
5	INCUTRAY	Inkubationswanne mit Deckel	2

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Messzylinder und Bechergläser
- Pipetten und Pipettenspitzen für 15 µl und 1500 µl
- Kunststoffpinzette
- Wipp-Schüttler
- Filterpapier
- Absaugsystem mit Auffanggefäß für infektiöse Lösungen
- destilliertes oder deionisiertes Wasser

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Mit einem Testbesteck können 20 Bestimmungen durchgeführt werden.

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Teststreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung nach Öffnung innerhalb von 3 Monaten zu verbrauchen.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien auf Raumtemperatur zu erwärmen. Stellen Sie die gebrauchsfertige Wasch- und Inkubationslösung her, indem Sie das Wasch- und Inkubationspufferkonzentrat (5-fach) vor Verwendung gründlich schütteln und 1 : 5 mit destilliertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 20 ml WIB (5-fach) + 80 ml destilliertes Wasser

Testdurchführung

- Der Test ist bei Raumtemperatur (18...25°C) durchzuführen.
- 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 ca. 20 bis 30 Rotationen pro Minute erfolgen.
- Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Arbeitsschritte

1. Teststreifen mit **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) **5 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
2. **15 µl** Probe zugeben.
3. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
4. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
5. **1,5 ml** **CONJ HRP** zugeben.
6. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
7. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
8. Teststreifen mit **1,5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** auf Wipp- Schüttler inkubieren.
9. Substrat absaugen und Teststreifen zum Abstoppen der Farbreaktion **3 x** mit **1,5 ml** destilliertem Wasser spülen.
10. Die Teststreifen sind nach dem Abstoppen zwischen Filterpapier zu trocknen und anschließend auszuwerten.

Achtung:

Bei „Problemseren“ (Hypergammaglobulinämien, zirk. Immunkomplexe, Milchantikörper) kann sich der Hintergrund der Streifen sehr schnell blau färben. In solchen Fällen ist die Farbreaktion vorzeitig durch dreimaliges Spülen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser zu stoppen.

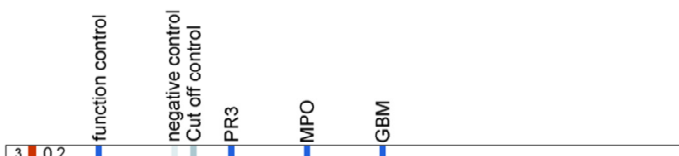
Auswertung

Gültigkeitskriterien für den Test

Auf jedem Teststreifen des *Seraline*[®] Vaskulitis-3 IgG sind untereinander 3 Kontrollbanden aufgetragen:

- a) Die Funktionskontrolle (positive Bande mit jeder Probe).
- b) Die Negativ-Kontrolle (Bandenintensität muss kleiner sein, als die der Cut-off-Kontrolle).
- c) Die Cut-off-Kontrolle (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.



Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung sollte nur an trockenen Streifen erfolgen. Die Teststreifen können mit Hilfe der Evaluierungssoftware *Seraline*[®]scan automatisch ausgewertet werden. Alternativ kann die Zuordnung der Banden mit Hilfe der beiliegenden Auswerteschablone durchgeführt werden. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren.

Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

Bewertung	IgG
negativ	Farbintensität der Banden < Cut-off-Kontrolle
positiv	Farbintensität der Banden ≥ Cut-off-Kontrolle

Inverse Antigenbanden (helle Antigenbande auf dunklem Hintergrund) sind als negativ zu bewerten. Die entsprechende Probe sollte mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

Leistungsmerkmale

Sensitivität

Zur Einschätzung der Leistungsmerkmale des *Seraline*[®] Vaskulitis-3 IgG wurden klinisch definierte Seren untersucht und die Ergebnisse jeweils antigenspezifisch mit einem anderen kommerziellen Line Assay verglichen.

MPO:

		<i>Seraline</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	
		positiv	negativ
Vergleichs- test	positiv	20	0
	negativ	2	2

Übereinstimmung: 92%

PR3:

		<i>Seraline</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	
		positiv	negativ
Vergleichs- test	positiv	17	0
	negativ	2	0

Übereinstimmung: 90%

GBM:

		<i>Seraline</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	
		positiv	negativ
Vergleichs- test	positiv	7	1
	negativ	0	0

Übereinstimmung: 88%

In einer externen Studie wurden 117 Seren im Vergleich zu einem anderen kommerziellen Test untersucht. Der Vergleichstest wurde hinsichtlich Spezifität und Sensitivität mit 100% postuliert.

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)

Mit einem zweiten, unabhängigen Vergleichstest wurden diskrepante Ergebnisse überprüft. Bei allen 8 diskrepanten Proben wurden die Ergebnisse des *Seraline*[®] Vaskulitis-3 IgG mit dem zweiten Vergleichstest bestätigt.

Spezifität

Aus den Untersuchungen der Seren von n = 120 Blutspendern wurde eine Spezifität von 95% ermittelt.

Grenzen der Methode

Eine Interpretation des Ergebnisses soll nur in enger Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Wie bei allen immunologischen Bestimmungsmethoden können Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze zu inkorrekten Ergebnissen führen. Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben bis zu einer Konzentration von 500 mg/dl (Hämoglobin), 1000 mg/dl (Lipide) und 20 mg/dl (Billirubin C und Billirubin F) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse. Rheumafaktoren bis zu einer Konzentration von 500 IU/ml beeinflussen ebenfalls nicht die Ergebnisse.

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. Teststreifen und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Teststreifen dürfen nur mit einer Kunststoffpinzette gehandhabt werden. Vor Testbeginn sollten im Protokollvordruck Probenidentifikationsnummer, Teststreifennummer und Chargennummer notiert werden. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Wasch- und Inkubationspuffer und Substrat.** Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8°C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

- **Nicht essen, trinken oder rauchen!**
- **Nie mit dem Mund pipettieren!**
- **Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!**
- **Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!**






Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2018-03-15	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung

Hersteller	REF Bestell-Nummer	LOT Chargen-Nummer	Anzahl der Bestimmungen	Biologische Gefahr
Hinweise beachten	Verfallsdatum	Lagertemperatur	Arbeitsanleitung beachten	

Seraline[®] Vaskulitis-3 IgG

Line Immunoassay for detection of IgG- antibodies in systemic vasculitis
in human serum or plasma

REF LIA-003-3 G  20  *In-vitro*-Diagnostic device 



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

Introduction

Primary systemic vasculitis of small and middle large vessels (1) of unknown etiopathogenesis is associated with anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies (ANCA). Because ANCA seem to activate directly neutrophil granulocytes which are accumulated in the lesions of small vessels and thereby initiate an inflammatory destructive process no immunoglobulins or complement components are seen in the vascular lesions (so called pauci-immune vasculitis) (2, 3).

Major antigens of ANCA are:

Proteinase 3 (PR3) (synonym: azurophil granule protein) a member of the serine proteases family, is the main target of cytoplasmic ANCA (cANCA) seen by immunofluorescence and is strongly associated with Granulomatosis with polyangiitis (**GPA**, previously known as Wegener's granulomatosis, 85% anti-PR3 antibody positive) (4).

Myeloperoxidase (MPO) is a strongly cationic protein of the azurophil granula and is involved in the generation of reactive oxygen species (5). It is the main target of perinuclear ANCA (pANCA) which are serological markers for microscopic polyangiitis (**MPA**, 45%), Eosinophilic Granulomatosis with Polyangiitis (**EGPA** previously known as Churg-Strauss syndrome, 60%) and idiopathic glomerulonephritis (65%). MPO-ANCA associated vasculitis is more common in Japanese and Chinese and PR3-ANCA associated vasculitis more common in Europeans (6). In PR3-ANCA associated vasculitis glomerulonephritis is more common and more severe than in patients with MPO-associated vasculitis (7). Although MPO is the main target of pANCA a similar immunofluorescence pattern can be produced by antibodies to elastase, cathepsin and lysozyme. Therefore methods (ELISA or LIA) with purified antigens as targets should be used to determine fine specificity of antibodies classified by immunofluorescence.

Glomerular basement membrane (GBM) is the target of autoantibodies which bind to the non-collagenous domain of the $\alpha 3$ chain of collagen type IV (10). This structure is also present in other membranes. Anti-GBM antibodies detectable in about 90% of patients activate complement after binding. Cellular proteases are attracted and cause membrane disruption and destruction of the filtration barrier. Due to knowledge of the target antigen highly purified or recombinant antigen in ELISAs or LIAs enables a rapid diagnosis and an early onset of adequate therapy which dramatically improves prognosis. The good pasture's syndrome (**GPS**) is extremely rare (one case per 1.000.000 inhabitants per year, 3.8% of patients with pulmonary-renal syndrome in intensive care units) (8) and predominantly affects Caucasians. However, due to rapidly progressive glomerulonephritis it is responsible for about 20% of acute renal failure cases (9). Untreated, mortality is between 75 and 90 %. Genetic (> 80% of patients are positive for HLA DR15 or DR4) and environmental factors (smoking, infections) have been implicated in the pathogenesis. Sometimes the good pasture's syndrome can be superimposed to ANCA positive systemic vasculitis (**GPS/ AAV Overlap**).

Literature:

1. Jenette JC, Falk RJ, Andrassy K. et al, Nomenclature of systemic vasculitides: proposal of an international conference. *Arthritis Rheumatol* 1994, 37, 187-192.
2. Charles LA, Caldas MLR, Falk RJ et al, Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *J Leukocyte Biol* 1991, 50, 539-546.
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 anticytoplasmic antibodies. *Arch Intern Med* 1989, 149, 2461-2465.
5. Weiss SJ, Tissue destruction by neutrophils. *New Engl. J Med* 1989, 320, 365-376.
6. Ozaki S, ANCA associated vasculitis: Diagnostic and therapeutic strategy. *Allergol. Int.* 2007, 56, 87-96.
7. Chen M, Yu F, Wang SX et al, Renal histology in Chinese patients with anti-myelo-peroxidase autoantibody-positive Wegener's granulomatosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 22, 139-145.
8. Papisir SA, Manali ED, Kalomenidis I et al, Bench-to-bedside review: Pulmonary-renal syndromes- an update for the intensivist. *Critical Care* 2007, 213.
9. Salama AD, Levy J, Lightstone L et al, Goodature's disease. *Lancet* 2001, 358, 917-920.
10. 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.

Intended use

The *Seraline*[®] Vaskulitis-3 IgG is a Line Immunoassay (LIA) for detection of autoantibodies of the IgG isotype directed against the following antigens: proteinase 3, myeloperoxidase and glomerular basement membrane in human serum or plasma samples.

Principle of the test

The antigens are plotted on nitrocellulose membranes and blocked to avoid unspecific reactions. After this procedure the membrane is cut into strips. The reaction for detection of specific antibodies is performed in 3 steps:

Step 1

The test strips are incubated in the diluted (1 : 101) serum or plasma samples for 45 minutes. Specific antibodies present in the samples react with the membrane bound antigens during that time. After incubation unbound proteins are removed by 3 washing cycles.

Step 2

The second incubation starts with the addition of enzyme labelled, isotype specific conjugate antibodies to the nitrocellulose strips. After 45 minutes of incubation unbound conjugate is removed by 3 washing cycles.

Step 3

The addition of the colourless precipitating substrate stains the membrane bound immune complexes by formation of blue precipitates. The reaction is stopped after 10 minutes by aspirating the substrate followed by rinsing the strips with sufficient quantity of distilled or deionized water.

After drying the strips, interpretation of the resulting pattern is done by comparison with the specific template. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*[®] scan software.

Preparation and storage of samples

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. Samples have to be diluted 1 : 101 (15 µl sample and 1500 µl WIB) with the ready to use wash and incubation solution (prepared from concentrated WIB (2)) in the incubation tray. Sample collection should be done in a sterile manner. Samples can be stored at 2...8°C for a maximum of 48 hours. For longer storage times samples have to be stored at -20°C. Frozen samples have to be warmed to room temperature and mixed well before starting the test run. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Kit components

1	TESTSTR	test strips incl. evaluation template	20 strips colour coded: red
2	WIB CONC 5x	wash and incubation buffer 5-fold	70 ml concentrate, transparent bottle, black cap
3	CONJ HRP IgG	anti-human IgG-HRP-conjugate	35 ml , ready to use, IgG , coloured red, transparent bottle, red cap
4	SUBSTR TMB	substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	35 ml , ready to use, black bottle, blue cap
5	INCUTRAY	incubation tray with cover	2

Materials required but not provided

- glassware
- pipettes and tips for 15 µl and 1500 µl
- plastic forceps
- rocking platform (vertical)
- filter paper
- collecting devices for infectious material
- distilled or deionized water

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 20 determinations. The complete test kit with closed reagent bottles is stable until the expiry date printed on the labels when stored at 2...8°C. After opening and proper storage as requested the reagents have to be used within 3 months.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. Ready to use wash and incubation solution has to be prepared from the 5-fold concentrated WIB (2) by dilution of 1 : 5 with distilled water. Mix the concentrate before dilution.

For example: 20 ml WIB (5-fold) + 80 ml distilled water

Assay procedure

- The test has to be performed at room temperature (18...25°C).
- The test strips have to be transferred into the incubation tray by use of plastic forceps in a way that the printed strip number on the top is visible.
- All incubation steps should be done on a rocking platform with a recommended frequency of rocking of about 20 - 30 rotations per minute.
- The following procedure has to adhere strictly to the time table.

Working steps

1. Incubate the test strips with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)) on a rocking platform for **5 min**.
2. Add **15 µl** sample.
3. Cover the incubation tray and incubate for **45 min** on a rocking platform.
4. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
5. Add **1.5 ml** **CONJ HRP**
6. Cover the incubation tray and incubate **45 min** on a rocking platform.
7. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
8. Incubate the test strips with **1.5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** on a rocking platform.
9. Aspirate substrate and rinse the test strips **3 x** with **1.5 ml** distilled water to stop the reaction.
10. The developed test strips have to be dried between filter paper before evaluation.

Please Note:

With so-called „problematic“ samples (e.g. from patients with hypergammaglobulinaemia, circulating immune complexes, antibodies to milk proteins) the background develops rapidly and the test strips discolour blue. In such cases the substrate reaction has to be terminated earlier.

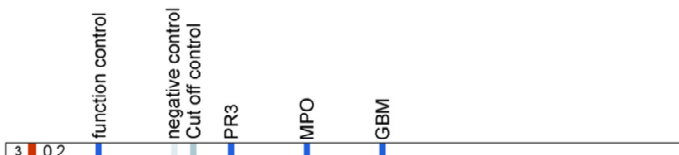
Test evaluation

Test validity

The *Seraline*[®] Vaskulitis-3 IgG test strips contain 3 consecutive control lines beneath the test strip number:

- a) Function control (positive reaction with every sample).
- b) Negative control (band intensity must be less than the Cut off control).
- c) Cut off control (band intensity is used for result evaluation of the diagnostic bands).

The test run is valid if the function control and the Cut off control are clearly visible.



Result interpretation

Generally the evaluation of the test has to be done with dried strips. To support identification of stained bands the evaluation template should be used. The identified bands have to be documented on the data sheet. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*[®] scan software. Judgement of the bands is performed according to the following classification:

Result interpretation	IgG
negative	Colour intensity of bands < Cut off control
positive	Colour intensity of bands ≥ Cut off control

Inverse bands (bright bands on dark background) should be evaluated as negative. The respective serum should always be examined using other serological methods.

Performance characteristics

Sensitivity

Clinically defined serum samples have been tested with the *Seraline*[®] Vaskulitis-3 IgG and another commercially available Line Immunoassay. The test results of both assays have been interpreted by comparing every single antigen band.

MPO:

		<i>Seraline</i> [®] Vaskulitis-3 IgG		Agreement: 92%
		positive	negative	
competitor	positive	20	0	
	negative	2	2	

PR3:

		<i>Seraline</i> [®] Vaskulitis-3 IgG		Agreement: 90%
		positive	negative	
competitor	positive	17	0	
	negative	2	0	

GBM:

		<i>Seraline</i> [®] Vaskulitis-3 IgG		Agreement: 88%
		positive	negative	
competitor	positive	7	1	
	negative	0	0	

For an external study serum samples from 117 patients have been tested with another commercially available test. The results have been evaluated for every single antigen and specificity and sensitivity of the comparative test were postulated as 100%.

Antigens	Sensitivity	Specificity	Agreement
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)

Serum samples with discrepant results have been retested with a second commercially available test. The results of the 8 discrepant samples have been in concordance with the *Seraline*[®] Vaskulitis-3 IgG results.

Specificity

Sera from 120 blood donors have been investigated. From the results a specificity of 95% has been calculated.

Limitations of the procedure

The final result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. As in other Immunoassays, impurities and cross contamination of reagents and samples by fungi or bacteria can produce false positive as well as false negative results. Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the test strips or insufficient rinsing after substrate reaction and also incorrect timing can produce erroneous results.

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples did not interfere with the test up to a concentration of 500 mg/dl (hemoglobin), 1000 mg/dl (lipids) and 20 mg/dl (bilirubin C and bilirubin F). Rheumatoid factors did not interfere up to a concentration of 500 IU/ml.

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The test should be performed by trained technical laboratory staff only. The test instructions have to be followed strictly. Do not use reagents from damaged packages or bottles. Handle the test strips with plastic forceps only. Prior to testing the identification numbers of the samples, the numbers of the test strips and the lot number of the kit should be documented on the data sheet. The expiry dates stated on the respective labels are to be observed.

Do not use or mix reagents from different lots except for wash and incubation buffer and for substrate.

Do not use reagents from other manufacturers to complete the kit. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact immediately remove by rinsing with water. All reagents should be stored at 2...8°C. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should be observed:

- **Do not smoke, eat or drink while handling kit material!**
- **Never pipette by mouth!**
- **Always use protective gloves!**
- **Note safety precautions of the single test components!**



History of changes

Version	Section	Modifications
2018-03-15	Common advices and precautions	Update



Manufacturer



Catalogue-No.



Lot-No.



Number of determinations



Biohazard



Notice advices



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use

