

SeraSpot® ANA-12 IgG

Spotimmunoassay zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen nukleäre und cytoplasmatische Antigene in humanem Serum oder Plasma

REF SP-002-12 G-S6 ▾ 48 REF SP-002-12 G-S12 ▾ 96 REF SP-002-12 G-S24 ▾ 2x 96
IVD In-vitro-Diagnostikum CE



Seramun Diagnostica GmbH · Sreenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 33767 791-10 · Fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Einführung

Kollagenosen sind systemische entzündlich-rheumatische Erkrankungen mit meist chronischem Verlauf (systemische Bindegeweserkrankungen), die z. T. überlappend auftreten können (Overlap-Syndrome). Zu den Kollagenosen zählen:

- Systemischer Lupus erythematoses (SLE) und Subformen
- Sjögren-Syndrom (SjS)
- Systemische Sklerodermie (SC)
- Idiopathische (autoimmune) Myositiden
- Mixed connective tissue disease (MCTD oder Sharp-Syndrom)
- Overlap-Syndrome

Jede Kollagenose ist durch typische Autoantikörperprofile charakterisiert, die alle mit dem SeraSpot® ANA-12 IgG erfasst werden.

dsDNA-Antikörper:

dsDNA-Antikörper vom IgG-Isotyp sind Markerantikörper und ACR-Kriterium (American College of Rheumatology) des systemischen Lupus erythematoses (SLE). Sie gelten als Aktivitäts- und Prognosemarker des SLE. Die Nachweisfrequenz variiert in Abhängigkeit von der Aktivität der Erkrankung und Organmanifestationen: aktiver SLE mit Nierenbeteiligung > 95 %, aktiver SLE ohne Nierenbeteiligung 50 - 70 %, inaktiver SLE < 40 %. In geringer Frequenz und meist niedrigtitrig sind dsDNA-Antikörper bei rheumatoider Arthritis, der juvenilen idiopathischen Arthritis, beim Sjögren Syndrom, der Sklerodermie sowie anderen Erkrankungen nachweisbar. Die Bedeutung der Bestimmung von dsDNA-Antikörpern für die Diagnostik des SLE ist nach wie vor unumstritten, da sie eine höhere Spezifität als die Nukleosomen-Antikörper besitzen.

Nukleosomen-Antikörper:

Antikörper gegen Nukleosomen, einer Strukturkomponente des Chromatins, welche aus vier Homodimeren der Histone H2A, H2B, H3 und H4 besteht, um die sich helikale DNA windet, werden in 56 - 90 % beim SLE gefunden. Sie lassen sich teilweise zeitlich vor den dsDNA-Antikörpern in den Frühphasen eines sich entwickelnden SLE nachweisen. Sie besitzen außerdem eine hohe diagnostische Spezifität beim Arzneimittel-induzierten SLE.

Sm-Antikörper:

Sm-Antikörper sind diagnostischer Marker und ACR-Kriterium des SLE mit einer Spezifität von 99 %, jedoch einer Sensitivität von 10 - 15 % bei SLE-Patienten kaukasischen Ursprungs sowie prognostischer Marker des SLE, da eine Assoziation zu einigen schweren Organmanifestationen (Niere, ZNS) nachgewiesen wurde.

P0-Antikörper:

Autoantikörper gegen ribosomale Phosphoproteine (P0, P1, P2) gelten als hoch spezifisch für den SLE. Autoantikörper gegen das Haupttargetantigen P0 sind ein diagnostischer Marker eines SLE mit einer diagnostischen Sensitivität von 10 - 20 % (bei asiatischen Patienten bis zu 40 %) und einer diagnostischen Spezifität von nahezu 100 %. P0-Antikörper sind vor allem in der aktiven Phase des SLE nachweisbar und mit einer Nieren- und Leberbeteiligung assoziiert.

Histon-Antikörper:

Histon-Antikörper sind nicht spezifisch für eine Erkrankung, da sie bei einer Vielzahl von Erkrankungen vorzugsweise des rheumatischen Formenkreises nachweisbar sind. Allerdings sind hochtitrige Histon-Antikörper fast ausschließlich bei SLE und Arzneimittel-induziertem Lupus nachweisbar. Hochtitrige Histon-Antikörper sind bei Abwesenheit von anderen SLE-Markern (dsDNA-, Sm-Antikörper) ein Hinweis auf einen Arzneimittel-induzierten Lupus.

U1-snRNP-Antikörper:

U1-snRNP-Antikörper sind Markerantikörper und Diagnosekriterium der Mixed connective tissue disease (MCTD) mit einer Sensitivität von 100 % (per Definition) und einer Spezifität von hochtitrigen U1-RNP-Antikörpern bei Abwesenheit von Sm- und dsDNA-Antikörpern von 98 %. U1-RNP-Antikörper mit häufig niedrigen Titern sind in 13 - 32 % beim SLE, sowie in 10 % bei systemischer Sklerodermie zu finden. Durch den Einsatz der drei RNP-Proteine A, C und 68 kDa im *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG werden alle U1-RNP-Antikörper erfasst.

Ro/SS-A-Antikörper:

Ro/SS-A-Antikörper gehören zu der Gruppe der Antinukleären Antikörper (ANA), wengleich das Ro60- und das Ro52-Protein sowohl nukleär als auch cytoplasmatisch lokalisiert sind. Während das Ro60-Protein Bestandteil der hY-RNP-Komplexe ist, wurde das Ro52-Antigen als eine E3-Ubiquitin-Ligase identifiziert. Ro/SS-A-Antikörper sind meist mit den La/SS-B-Antikörpern vergesellschaftet. Ro/SS-A-Antikörper werden vorwiegend beim Sjögren-Syndrom und den verschiedenen Formen des Lupus erythematoses gefunden, wobei den Ro60-Antikörpern eine höhere Spezifität als den Ro52-Antikörpern zugesprochen wird. Sie sind ein diagnostischer Marker und Bestandteil der Klassifikationskriterien des primären oder sekundären Sjögren-Syndroms mit einer Sensitivität von 96 % bzw. 80 %. Ro/SS-A-Antikörper gelten als frühdiagnostischer Marker des Sjögren-Syndroms, da sie der Erkrankung Jahre vorausgehen können. Ro/SS-A-Antikörper sind in 40 - 60 % bei Patienten mit einem systemischen Lupus erythematoses (SLE) nachweisbar. Sie können gemeinsam mit SLE-typischen Antikörpern (dsDNA-, Sm-Antikörper) oder isoliert auftreten und so auf eine relativ benigne Form des SLE hinweisen. Ro/SS-A-Antikörper sind ein diagnostischer Marker des subakuten kutanen Lupus erythematoses (SCLE). Sie sind in 90 - 100 % der Fälle nachweisbar. In ca. 10 % wird ein Übergang in einen SLE beobachtet. Beim neonatalen Lupus erythematoses (NLE) sind Ro/SS-A-Antikörper in nahezu 100 % der Fälle nachweisbar. Das koinzidierte Auftreten von Ro/SS-A- und La/SS-B-Antikörpern ist mit dem kongenitalen Herzblock (CHB) assoziiert. Ro/SS-A-Antikörper sind auch bei Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis in 5 - 8 % sowie in 9 % bei Sklerodermie nachweisbar.

La/SS-B-Antikörper:

La/SS-B-Antikörper sind ein wichtiger diagnostischer Marker und Bestandteil der Klassifikationskriterien des Sjögren-Syndroms. Die diagnostische Sensitivität beträgt für das primäre Sjögren Syndrom ca. 70 % und für das sekundäre Sjögren Syndrom ca. 50 %. Die diagnostische Spezifität für das Sjögren-Syndrom ist bei gleichzeitigem Nachweis von La/SS-B- und Ro/SS-A-Antikörpern höher als bei Ro/SS-A-Antikörper-Positivität allein. La/SS-B-Antikörper sind fast immer mit den Ro/SS-A-Antikörpern vergesellschaftet und nur äußerst selten singular nachweisbar. La/SS-B-Antikörper gelten als frühdagnostischer Marker eines Sjögren Syndroms, da sie sogar bis Jahre der Erkrankung vorausgehen können. Beim systemischen Lupus erythematodes (SLE) sind La/SS-B-Antikörper in 25 % der Fälle, beim neonatalen Lupus erythematodes (NLE) in 70 % sowie beim subakut kutanen Lupus erythematodes (SCLE) in 80 % der Fälle zu finden. Bei anderen Kollagenosen sind La/SS-B-Antikörper relativ selten nachweisbar.

Scl-70-Antikörper:

Scl-70- oder Topoisomerase I-Antikörper sind ein diagnostischer Marker der systemischen Sklerodermie mit einer Sensitivität von

- 18 - 30 % allgemein
- 10 - 15 % bei limitierter Sklerodermie (CREST-Syndrom)
- 40 - 65 % bei diffusen Formen der Sklerodermie

und einer Spezifität von nahezu 100 %.

Patienten mit Scl-70-Antikörpern haben in der Regel eine schwerere Verlaufsform als Patienten mit Centromer-Antikörpern. Scl-70-Antikörper können Jahre vor dem Auftreten spezifischer Sklerodermiesymptome nachweisbar sein.

CENP-B-Antikörper:

CENP-B-Antikörper gelten als diagnostischer Marker der limitierten Form der systemischen Sklerodermie mit einer Sensitivität von 50 - 70 %. Patienten mit CENP-B-Antikörpern haben einen relativ günstigen Verlauf der Sklerodermie. CENP-B-Antikörper können Jahre vor dem Auftreten spezifischer Sklerodermiesymptome nachweisbar sein. CENP-B-Antikörper werden in 10 - 30 % bei Patienten mit einer primären biliären Zirrhose (PBC) und sehr selten bei anderen Kollagenosen gefunden.

Jo-1-Antikörper:

Jo-1-Antikörper sind ein diagnostischer Marker für die idiopathische Myositis mit einer diagnostischen Spezifität von nahezu 100 %. Die diagnostische Sensitivität beträgt 18 - 46 % für die Polymyositis sowie 25 % für die Dermatomyositis. Ca. 60 % der Jo-1-Antikörper positiven Patienten weisen eine fibrosierende Alveolitis auf. Jo-1-Antikörper gelten als prognostischer Marker der Myositis, da diese Patienten häufig einen schweren Krankheitsverlauf haben. Das Autoantigen, die Histidyl-tRNA-Synthetase, ist im Cytoplasma 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., Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen Pabst Science Publishers Lengerich u.a. 2006, 2. Aufl.
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

Der *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG ist ein *in-vitro*-Diagnostikum (Spotimmunoassay, SIA) zum Nachweis von antinukleären (ANA) und cytoplasmatischen Antikörpern vom IgG-Isotyp gegen folgende Antigene: dsDNA, Nucleosome, Sm, P0, Histone, U1-snRNP, Ro/SS-A 60, Ro/SS-A 52, La/SS-B, Scl-70, CENP-B und Jo-1 in humanem Serum oder Plasma.

Testprinzip

Der *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG Test ist ein Festphasenimmunoassay auf der Basis rekombinanter oder gereinigter nativer Proteine / Protein Komplexe und dsDNA, die in Array-Anordnung (Spotarray) auf den Boden der Kavitäten von 96well-Mikrotiterplatten fixiert sind, und die als Fängermoleküle für Autoantikörper gegen nukleäre und cytoplasmatische Antigene dienen. Spezifisch gebundene Antikörper werden mit Peroxidase-(POD)-markierten anti-human IgG-Antikörpern und einer nachgeschalteten Substratreaktion mit Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. An den Stellen, an welchen sich Immunkomplexe ausgebildet haben, entwickeln sich blaue Spots durch Präzipitations-Produkte einer farblosen Substratlösung. Die schwach- bis dunkelblauen Spots sind ohne Hilfsmittel sichtbar.

Der Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Inkubation der zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1 : 101 in den ausgewählten Kavitäten. Entfernung der nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 2

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit POD-markierten Konjugatantikörpern gegen humane Antikörper vom IgG-Typ. Entfernung der nicht gebundenen Konjugatantikörper durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 3

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit Substratlösung SeramunBlau[®] spot dark. Stoppen der Reaktion durch Absaugen der Substratlösung. Entfernen von Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch. Die Färbung der entwickelten Arrays ist bei dunkler Lagerung stabil.

Innerhalb von 24 h nach Beendigung der Nachweisreaktion können von den entwickelten Analysen mit den Scannern Seramun *SpotSight*[®] plate oder Seramun *SpotSight*[®] strip Bildaufnahmen der Kavitäten (Images) erstellt und unter Verwendung der Software Seramun *SpotSight*[®] scan analysiert werden. Unter Berücksichtigung der testspezifischen Auswertekriterien wird das Testergebnis ermittelt.

Testkomponenten

		Für 48 Bestimmungen	Für 96 Bestimmungen	Für 2x96 Bestimmungen
1	WELLS Kavitäten mit Arrays Farbmarkierung: Violett	6 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF CONC 10X Waschpuffer Seramun® Wash buffer A	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	2x 100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe
3	DIL Verdünnungsmedium Seramun® Sample diluent B	55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	2x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	4x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe
4	CONJ HRP IgG Anti-human IgG- POD- Konjugat	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe
5	SUBSTR TMB Substrat SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe
6	COVER Abdeckfolie	2x	2x	4x
7	SWAB Tupfer mit 70 % (v/v) Isopropylalkohol	3x2	6x2	12x2

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Proben sollten steril entnommen und maximal 7 Tage bei 2...8 °C gelagert werden. Serum sollte nach der Gerinnung so schnell wie möglich abzentrifugiert werden. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden.

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparinplasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (z.B. 10 µl Probe und 1000 µl Puffer) mit dem gebrauchsfertigen Verdünnungsmedium verdünnt.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Einstellbare Einkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen
- Einstellbare Mehrkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen
- Reagenziencontainer für Mehrkanal-Mikropipetten
- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Fusselfreies Filterpapier
- Teströhrchen (1 ml) zur Probenverdünnung
- Becherglas und Messzylinder
- Stoppuhr
- Washer für 96well-Mikrotiterplatten (optional)
- Auffanggefäß für infektiöse Lösungen
- Seramun *SpotSight*® plate oder Seramun *SpotSight*® strip Scanner mit Auswertesoftware Seramun *SpotSight*® scan

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 1x 48, 1x 96 oder 2x 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und vakuumversiegelten Testkomponenten ist bei 2...8 °C-Lagerung bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C mindestens 3 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei einer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 4 Wochen und bei einer Lagerung bei RT bis zu 2 Wochen verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien und die vakuumversiegelten Testkomponenten auf Raumtemperatur zu erwärmen. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenbeutel in den Beutel zurücklegen und verschließen.

1 Teil Waschpufferkonzentrat **WASHBUF CONC 10X** mit 9 Teilen destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Beispiel: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser. Die Waschlösung ist vor Verwendung gründlich zu durchmischen. Das Substrat **SUBSTR TMB** ist vor direktem Lichteinfall zu schützen! Der Test darf nicht durchgeführt werden, sollte die Substratlösung **SUBSTR TMB** dunkel gefärbt sein oder dunkle Partikel aufweisen!

Arbeitsplatzanforderungen

Für die Durchführung von Spotimmunoassays wird ein sauberer und faserfreier Arbeitsplatz benötigt. An der Unterseite der Kavitäten anheftende Fasern führen zu fehlerhaften Resultaten. Arbeitsplatz und Kit-Komponenten sollten nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt sein.

Testdurchführung

Durchführung bei Raumtemperatur (18...25 °C). Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Für die Handhabung der SeraSpot® Teste wird empfohlen, den Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) zu verwenden. Der Kit ist zum mehrfachen Gebrauch konzipiert.

Wichtige Hinweise:

- **Mechanischer Kontakt (Kratzen) auf dem Boden der Kavitäten mit Pipettenspitzen oder Washer-Nadeln ist zu vermeiden. Dadurch wird der Array irreparabel geschädigt!**
- **Alle Flüssigreagenzien (Probe, Konjugat und Substrat) sind blasenfrei in die Kavitäten einzubringen!**
- **Vor dem Erstellen von Images der entwickelten Kavitäten ist es notwendig, die Unterseite der Kavitäten von anhaftenden Fusseln mit dem im Kit enthaltenen Tupfer **SWAB** zu reinigen!**
- **Durch die Trocknung der Restflüssigkeit erscheinen die Images kontrastreicher, dadurch kann es bei wiederholtem Scannen zu geringfügigen Abweichungen der Messwerte kommen. Die Bewertung der einzelnen Parameter wird dadurch nicht verändert.**

Arbeitsschritte

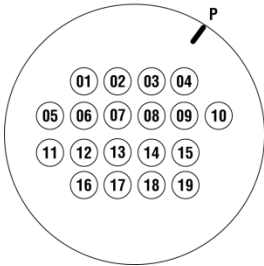
1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten **WELLS** auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. **100 µl** 1 : 101 verdünnte Probe pro Kavität pipettieren. Herstellung der Arbeitsverdünnung der Patientenprobe z.B. 10 µl Serum + 1000 µl Verdünnungsmedium **DIL**.
3. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
4. **Lösungen absaugen.** Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung (hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
5. **50 µl** des gebrauchsfertigen Konjugates **CONJ HRP IgG** pro Kavität pipettieren.
6. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
7. **Lösungen absaugen.** Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung (hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
8. **50 µl** der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung **SUBSTR TMB** pro Kavität pipettieren.
9. Platte abdecken und lichtgeschützt für **30 min** bei RT inkubieren.
10. Substratlösung absaugen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
11. Unterseite der Kavitäten mit Tupfer **SWAB** abwischen.
12. Bildaufnahme der Kavitäten mit dem Scanner Seramun *SpotSight*® plate / Seramun *SpotSight*® strip und Imageanalyse mit der Software Seramun *SpotSight*® scan. Erfolgt die Bildaufnahme mit dem Scanner Seramun *SpotSight*® strip, sind die Mikrotiterplattenstreifen aus dem Rahmen zu entnehmen und in die Streifenaufnahme des Scanners einzulegen.

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

Nach dem Absaugen der Substratlösung sind die entwickelten Spots in der Platte bei Aufbewahrung im Dunkeln 24 Stunden stabil.

Auswertung

Arraylayout



Parameter	Kontrollen
05 U1-snRNP	01 Positivkontrolle (PC)
06 CENP-B	02 Negativkontrolle (NC), 0 rel. Units
07 Nucleosome	03 Cut-off Kontrolle (CO), 30 rel. Units
08 Histone	04 Referenz 3 (R3), 60 rel. Units
10 dsDNA	09 Referenz 2 (R2), 100 rel. Units
11 Jo-1	15 Referenz 1 (R1), 300 rel. Units
12 Scl-70	19 Serumkontrolle (SC)
13 Sm	
14 P0	
16 La/SS-B	
17 Ro/SS-A 52	
18 Ro/SS-A 60	P Positionsmarkierung

Gültigkeitskriterien für den Test

Der *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG Test enthält die folgenden Kontrollspots:

1. Positivkontrolle (PC). Intensiv gefärbter Spot, dunkler als Cut-off Kontrolle. Immer angefärbt.
2. Cut-off Kontrolle (CO), entspricht 30 rel. Units. Schwach gefärbter Spot. Wird für die Bewertung der Parameter-spezifischen Signale verwendet.
3. Negativkontrolle (NC), entspricht 0 rel. Units. Sehr schwach gefärbter Spot, die Färbeintensität der Negativkontrolle muss kleiner als die der Cut-off Kontrolle sein.
4. Serumkontrolle (SC). Intensiv gefärbter Spot, immer angefärbt, wenn sich Probe im Well befinden hat. Ein Wegbleiben der Färbung des Spots der Serumkontrolle deutet auf Fehlen von Probe hin.
5. Referenz 1 (R1), entspricht 300 rel. Units. Intensiv gefärbter Spot, immer angefärbt.
6. Referenz 2 (R2), entspricht 100 rel. Units. Schwächere Färbung als der R1-Spot, immer angefärbt.
7. Referenz 3 (R3), entspricht 60 rel. Units. Schwächere Färbung als der R2-Spot, immer angefärbt.

Die Spots NC, CO, R1 ... R3 werden zur Erstellung einer Referenzkurve (4 Parameter nichtlineare Regression) verwendet, um die Färbeintensitäten der Antigen-spots in relativen Einheiten (rel. Units) bzw. in internationalen Einheiten (IU) für dsDNA auszudrücken.

Der Test kann nicht ausgewertet werden, wenn eines der unter Punkt 1. bis 7. aufgeführten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt ist.

Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung erfolgt unter Verwendung der *SeraSpot*[®] Mess- und Auswertetechnik. Eine visuelle Plausibilitätskontrolle ist mit Hilfe der im Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) enthaltenen Lupe möglich.

Die Ergebnisse werden wie folgt interpretiert:

Bewertung	IgG
negativ	Farbintensität der Antigen-Spots ≤ Cut-off Kontrolle
positiv	Farbintensität eines oder mehrerer Antigen-Spots > Cut-off Kontrolle

Grenzen der Methode

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

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben (Konzentration bis zu 500 mg/dl Hämoglobin, 1000 mg/dl Lipide und 20 mg/dl Bilirubin C / Bilirubin F) und Rheumafaktoren (500 IU/ml) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse.

Testdurchführung

Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können zu falschen Ergebnissen führen.

Das Einbringen von Luftblasen beim Pipettieren der Proben und/oder Reagenzien bewirkt eine ungleichmäßige Signalausbildung des Arrays, wodurch eine Auswertung nicht mehr möglich ist.

Durch Kratzer auf dem Wellboden beschädigte Arrays sind für die Auswertung nicht verwendbar.

Im Arraybereich anhaftende Fasern oder Partikel interferieren mit der Imageanalyse.

Leistungsmerkmale

Diagnostische Sensitivität

Serologisch vorcharakterisierte Proben (Referenztest 1) von Patienten mit Verdacht auf Kollagenosen wurden im SeraSpot® ANA-12 IgG Test untersucht („Initiale Sensitivität“). Proben mit diskrepanten Resultaten wurden in einem zweiten Assay (Referenztest 2) nachgetestet, wobei die hier erzielten Ergebnisse der endgültigen Statusbestimmung der im SeraSpot®-Assay zum Referenztest 1 diskrepant bestimmten Proben dienen („Berichtigte Sensitivität“).

U1-snRNP	n = 47	Referenztest 1		Initiale Sensitivität: 82,1 % Berichtigte Sensitivität: 91,4 %	
			positiv (n = 39)		negativ (n = 8)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positiv		32
		negativ	7	8	
CENP-B	n = 112	Referenztest 1		Sensitivität: 100,0 %	
			positiv (n = 18)		negativ (n = 94)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positiv		18
		negativ	0	92	
Nucleosome	n = 103	Referenztest 1		Initiale Sensitivität: 45,3 % Berichtigte Sensitivität: 80,4 %	
			positiv (n = 75)		negativ (n = 28)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positiv		34
		negativ	41	22	
Histone	n = 103	Referenztest 1		Initiale Sensitivität: 67,3 % Berichtigte Sensitivität: 94,7 %	
			positiv (n = 49)		negativ (n = 54)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positiv		33
		negativ	16	39	
dsDNA	n = 103	Referenztest 1		Initiale Sensitivität: 83,1 % Berichtigte Sensitivität: 97,2 %	
			positiv (n = 77)		negativ (n = 26)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positiv		64
		negativ	13	12	
Jo-1	n = 60	Referenztest 1		Initiale Sensitivität: 93,3 % Berichtigte Sensitivität: 93,3 %	
			positiv (n = 15)		negativ (n = 45)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positiv		14
		negativ	1	42	
Scl-70	n = 112	Referenztest 1		Initiale Sensitivität: 92,2 % Berichtigte Sensitivität: 92,2 %	
			positiv (n = 64)		negativ (n = 48)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positiv		59
		negativ	5	45	
Sm	n = 103	Referenztest 1		Initiale Sensitivität: 53,3 % Berichtigte Sensitivität: 98,9 %	
			positiv (n = 15)		negativ (n = 88)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positiv		8
		negativ	7	87	
P0	n = 103	Referenztest 1		Sensitivität: 100,0 %	
			positiv (n = 6)		negativ (n = 97)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positiv		6
		negativ	0	92	
La/SS-B	n = 103	Referenztest 1		Initiale Sensitivität: 57,9 % Berichtigte Sensitivität: 94,3 %	
			positiv (n = 19)		negativ (n = 84)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positiv		11
		negativ	8	78	
Ro/SS-A 52	n = 103	Referenztest 1		Initiale Sensitivität: 96,4 % Berichtigte Sensitivität: 100,0 %	
			positiv (n = 28)		negativ (n = 75)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positiv		27
		negativ	1	75	
Ro/SS-A 60	n = 103	Referenztest 1		Initiale Sensitivität: 87,5 % Berichtigte Sensitivität: 95,5 %	
			positiv (n = 48)		negativ (n = 55)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positiv		42
		negativ	6	55	

Diagnostische Spezifität

Ein Kollektiv von Blutspendenserum (n = 200) wurde im *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG Test untersucht. Proben mit positiven Resultaten wurden mit einem Referenztest (Referenztest 1) nachgetestet.

U1-snRNP		Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 200)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	18	Spezifität:	91,0 %
	negativ	0	182		
CENP-B		Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 200)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	2	Spezifität:	99,0 %
	negativ	0	198		
Nucleosome		Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 200)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	11	Spezifität:	94,5 %
	negativ	0	189		
Histone		Referenztest 1			
		positiv (n = 3)	negativ (n = 197)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	3	10	Spezifität:	94,9 %
	negativ	0	187		
dsDNA		Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 200)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	2	Spezifität:	99,0 %
	negativ	0	198		
Jo-1		Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 200)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	1	Spezifität:	99,5 %
	negativ	0	199		
Scl-70		Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 200)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	7	Spezifität:	96,5 %
	negativ	0	193		
Sm		Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 200)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	1	Spezifität:	99,5 %
	negativ	0	199		
P0		Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 200)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	1	Spezifität:	99,5 %
	negativ	0	199		
La/SS-B		Referenztest 1			
		positiv (n = 2)	negativ (n = 198)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	2	7	Spezifität:	96,5 %
	negativ	0	191		
Ro/SS-A 52		Referenztest 1			
		positiv (n = 2)	negativ (n = 198)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	2	2	Spezifität:	99,0 %
	negativ	0	196		
Ro/SS-A 60		Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 200)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	1	Spezifität:	99,5 %
	negativ	0	199		

Kreuzreaktivität

Proben von Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Ein Kollektiv von 113 Seren von Patienten mit Rheumatoider Arthritis und serologisch (Referenztest 1) positivem anti-CCP Antikörper- (n=30) bzw. Rheumafaktor-Nachweis (n= 83) wurde im *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG Test untersucht. Proben mit diskrepanten Resultaten wurden, wie unter „Diagnostische Sensitivität“ beschrieben, in einem zweiten Referenztest untersucht und bewertet.

U1-snRNP	n = 113	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 113)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	15	Initiale Spezifität:	86,7 %
	negativ	0	98	Berichtigte Spezifität:	86,7 %
CENP-B	n = 113	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 113)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	3	Initiale Spezifität:	97,3 %
	negativ	0	110	Berichtigte Spezifität:	99,1 %
Nucleosome	n = 113	Referenztest 1			
		positiv (n = 4)	negativ (n = 109)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	2	2	Initiale Spezifität:	98,2 %
	negativ	2	107	Berichtigte Spezifität:	98,2 %
Histone	n = 113	Referenztest 1			
		positiv (n = 9)	negativ (n = 104)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	9	14	Initiale Spezifität:	86,5 %
	negativ	0	90	Berichtigte Spezifität:	86,5 %
dsDNA	n = 113	Referenztest 1			
		positiv (n = 1)	negativ (n = 112)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	1	4	Initiale Spezifität:	96,4 %
	negativ	0	108	Berichtigte Spezifität:	97,3 %
Jo-1	n = 113	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 113)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	0	Spezifität:	100,0 %
	negativ	0	113		
Scl-70	n = 113	Referenztest 1			
		positiv (n = 6)	negativ (n = 107)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	6	3	Initiale Spezifität:	97,2 %
	negativ	0	104	Berichtigte Spezifität:	98,1 %
Sm	n = 113	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 113)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	1	Initiale Spezifität:	99,1 %
	negativ	0	112	Berichtigte Spezifität:	99,1 %
P0	n = 113	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 113)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	2	Initiale Spezifität:	98,2 %
	negativ	0	111	Berichtigte Spezifität:	99,1 %
La/SS-B	n = 113	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 113)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	7	Initiale Spezifität:	93,8 %
	negativ	0	106	Berichtigte Spezifität:	93,8 %
Ro/SS-A 52	n = 113	Referenztest 1			
		positiv (n = 3)	negativ (n = 110)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	3	3	Initiale Spezifität:	97,3 %
	negativ	0	107	Berichtigte Spezifität:	99,1 %
Ro/SS-A 60	n = 113	Referenztest 1			
		positiv (n = 1)	negativ (n = 112)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	1	2	Initiale Spezifität:	98,2 %
	negativ	0	110	Berichtigte Spezifität:	99,1 %

Epstein-Barr-Virus (EBV)-Antikörper positive Proben

Serologisch (Referenztest 1) EBV-Antikörper positiv getestete Proben wurden im *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG Test untersucht.

U1-snRNP	n = 22	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 22)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	0	Spezifität:	100,0 %
	negativ	0	22		
CENP-B	n = 22	Referenztest 1			
		positiv (n = 2)	negativ (n = 20)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	2	0	Spezifität:	100,0 %
	negativ	0	20		
Nucleosome	n = 22	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 22)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	1	Spezifität:	95,5 %
	negativ	0	21		
Histone	n = 22	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 22)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	5	Spezifität:	77,3 %
	negativ	0	17		
dsDNA	n = 22	Referenztest 1			
		positiv (n = 1)	negativ (n = 21)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	1	1	Spezifität:	95,2 %
	negativ	0	20		
Jo-1	n = 22	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 22)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	0	Spezifität:	100,0 %
	negativ	0	22		
Sci-70	n = 22	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 22)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	1	Spezifität:	95,5 %
	negativ	0	21		
Sm	n = 22	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 22)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	1	Spezifität:	95,5 %
	negativ	0	21		
P0	n = 22	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 22)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	0	Spezifität:	100,0 %
	negativ	0	22		
La/SS-B	n = 22	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 22)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	3	Spezifität:	86,4 %
	negativ	0	19		
Ro/SS-A 52	n = 22	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 22)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	0	Spezifität:	100,0 %
	negativ	0	22		
Ro/SS-A 60	n = 22	Referenztest 1			
		positiv (n = 0)	negativ (n = 22)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv	0	0	Spezifität:	100,0 %
	negativ	0	22		

Cytomegalie-Virus (CMV)-Antikörper positive Proben

Serologisch (Referenztest 1) CMV-Antikörper positiv getestete Proben wurden im *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG Test untersucht.

U1-snRNP	n = 27	Referenztest 1		Spezifität:	88,9 %	
			positiv (n = 0)			negativ (n = 27)
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv			0
		negativ	0	24		
CENP-B	n = 27	Referenztest 1		Spezifität:	100,0 %	
			positiv (n = 0)			negativ (n = 27)
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv			0
		negativ	0	27		
Nucleosome	n = 27	Referenztest 1		Spezifität:	92,6 %	
			positiv (n = 0)			negativ (n = 27)
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv			0
		negativ	0	25		
Histone	n = 27	Referenztest 1		Spezifität:	100,0 %	
			positiv (n = 1)			negativ (n = 26)
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv			0
		negativ	1	26		
dsDNA	n = 27	Referenztest 1		Spezifität:	96,2 %	
			positiv (n = 1)			negativ (n = 26)
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv			1
		negativ	0	25		
Jo-1	n = 27	Referenztest 1		Spezifität:	100,0 %	
			positiv (n = 0)			negativ (n = 27)
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv			0
		negativ	0	27		
Scl-70	n = 27	Referenztest 1		Spezifität:	92,6 %	
			positiv (n = 0)			negativ (n = 27)
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv			0
		negativ	0	25		
Sm	n = 27	Referenztest 1		Spezifität:	100,0 %	
			positiv (n = 0)			negativ (n = 27)
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv			0
		negativ	0	27		
PO	n = 27	Referenztest 1		Spezifität:	100,0 %	
			positiv (n = 0)			negativ (n = 27)
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv			0
		negativ	0	27		
La/SS-B	n = 27	Referenztest 1		Spezifität:	88,9 %	
			positiv (n = 0)			negativ (n = 27)
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv			0
		negativ	0	24		
Ro/SS-A 52	n = 27	Referenztest 1		Spezifität:	96,3 %	
			positiv (n = 0)			negativ (n = 27)
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv			0
		negativ	0	26		
Ro/SS-A 60	n = 27	Referenztest 1		Spezifität:	100,0 %	
			positiv (n = 0)			negativ (n = 27)
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positiv			0
		negativ	0	27		

Präzision

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden im *SeraSpot®* ANA-12 IgG Test untersucht und die relativen Units (rel. Units) ermittelt. Aus den erhaltenen Werten wurden die Variationskoeffizienten (VK) als Maß für die Präzision innerhalb eines Testlaufs (Intra-Assay-VK), zwischen verschiedenen Testläufen (Inter-Assay-VK) und zwischen verschiedenen Testchargen (Inter-Chargen-VK) ermittelt.

	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Interbatch-VK	
	rel. Units [\bar{x}] n = 40	VK [%]	rel. Units [\bar{x}] n = 80	VK [%]	rel. Units [\bar{x}] n = 240	VK [%]
U1-snRNP	64,9	8,9	55,8	9,0	56,3	15,5
CENP-B	39,0	8,1	37,4	12,3	35,3	12,7
Nucleosome	43,6	11,9	48,5	19,3	48,9	24,2
Histone	67,6	8,8	57,3	14,8	55,6	12,3
dsDNA	63,3	7,8	72,9	11,2	72,4	11,7
Jo-1	48,7	5,4	47,4	10,5	49,1	15,2
Scl-70	37,1	11,6	40,4	15,9	42,3	16,4
Sm	77,4	10,5	93,2	12,8	91,8	13,3
P0	57,9	7,9	48,7	10,1	54,6	21,0
La/SS-B	54,7	11,9	53,1	10,2	52,8	13,9
Ro/SS-A 52	68,0	9,3	84,2	12,9	88,9	19,6
Ro/SS-A 60	96,3	13,3	130,7	15,9	143,6	18,7
Durchführung	1 Bearbeiter, 40x Bestimmung, 1 Charge		5 Bearbeiter, 2x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag 20 Tage, 1 Charge		5 Bearbeiter, 2x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag 20 Tage, 3 Chargen	

Automatisierbarkeit

Proben (n = 96) mit bekannter Antikörperreaktivität wurden manuell sowie mit dem Mikrotiterplatten-Prozessor DS2® (Dynex Technologies; manuelle Probenverdünnung) abgearbeitet. Aus den gemessenen Farbintensitäten der Spots (RAW) wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 für ausgewählte Antikörperreaktivitäten zwischen den einzelnen Methoden der Durchführung ermittelt.

	Dynex DS2® vs. Manuelle Abarbeitung
	r^2
U1-snRNP	0,978
CENP-B	0,989
Nucleosome	0,962
Histone	0,758
dsDNA	0,996
Jo-1	0,998
Scl-70	0,995
Sm	0,999
P0	0,963
La/SS-B	0,991
Ro/SS-A 60	0,986
Ro/SS-A 52	0,997

r^2 wurde nicht ermittelt, wenn mehr als 90 % der Gesamtzahl (n = 96) der untersuchten Proben keine Antikörperreaktivität für die jeweiligen Antigene zeigten.

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 oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer und TMB-Substratlösung. Diese sind Chargen- und Parameter-übergreifend verwendbar.

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. Bei Kontakt muss unverzüglich mit fließendem Wasser gespült werden. 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
2020-08-12	Allgemein	Generelle Überarbeitung
	Vorbereitung und Lagerung der Proben	Probenstabilität
	Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien	Lagerung gebrauchsfertiger Waschpuffer
	Testkomponenten	Aktualisierung
	Grenzen der Methode	Interferenz
	Leistungsmerkmale	Aktualisierung der Daten

Inkubationsschema SeraSpot® ANA-12 IgG











1.  100 µl
30 min
 3 x Waschen

verdünnte Probe (1 : 101)
Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität
2.  50 µl
30 min
 3 x Waschen

Konjugat **CONJ HRP IgG**
Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität
3.  50 µl
30 min
 Absaugen

Substratlösung **SUBSTR TMB**
Inkubation (lichtgeschützt bei Raumtemperatur)
4.  Bildaufnahme der Kavitäten
und Imageanalyse









Scanner Seramun *SpotSight*® plate / Seramun
SpotSight® strip und Software Seramun
SpotSight® scan

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

SeramunBlau®, SeraSpot® und Seramun SpotSight® sind eingetragene Marken der Seramun Diagnostica GmbH.

SeraSpot® ANA-12 IgG

Spotimmunoassay for detection of IgG antibodies to nuclear and cytoplasmatic antigens
in human serum or plasma

 SP-002-12 G-S6  48  SP-002-12 G-S12  96  SP-002-12 G-S24  2x 96
 *In-vitro*-diagnostic medical device 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 33767 791-10 · fax +49 33767 791-99 · 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, all detectable with SeraSpot® ANA-12 IgG.

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.

Nucleosome antibodies:

Autoantibodies to nucleosomes, a complex consisting of four homodimers of the histones H2A, H2B, H3 and H4 resulting in an octamer 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 an onset of SLE.

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.

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.

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.

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-RNP with often low titers are found in 13 - 32 % of patients with SLE and in 10 % of patients with systemic sclerosis.

Using the three RNP-proteins A, C and 68 kD *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG detects all U1-RNP antibodies.

Ro/SS-A antibodies:

Anti-Ro/SS-A antibodies belong to the group of antinuclear antibodies (ANA), although the proteins Ro60 and Ro52 are localized in both, nucleus and cytoplasm. Ro60 is known as protein of the hY-RNP-complex, whereas Ro52 has been identified as E3-Ubiquitin-Ligase. Antibodies to Ro/SS-A usually occur together with La/SS-B antibodies.

Ro/SS-A antibodies are predominantly detected in patients with Sjögren's syndrome and the different forms of lupus erythematosus with an assumed higher specificity of the antibodies to Ro60 in comparison to anti-Ro52 antibodies. 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. About 10 % of them turn into SLE.

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.

La/SS-B antibodies are only rarely detected in other connective tissue diseases.

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.

Literature:

1. Conrad, K., Schöbner, W., Hiepe, F., Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen Pabst Science Publishers Lengerich u.a. 2006, 2. Aufl.
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

The *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG is an *in vitro* diagnostic medical device (spotimmunoassay, SIA) for the detection of antinuclear (ANA) and cytoplasmic antibodies of the IgG isotype directed against the following antigens: dsDNA, Nucleosome, Sm, P0, Histone, U1-snRNP, Ro/SS-A 60, Ro/SS-A 52, La/SS-B, Scl-70, CENP-B and Jo-1 in human serum or plasma samples.

Principle of the test

SeraSpot[®] ANA-12 IgG test is a solid phase immunoassay based on the use of recombinant or purified native proteins / protein complexes and dsDNA as capture antigens printed in array arrangement (spot array) on the bottom of the wells of 96-well microtiter plates. The antigens serve as capture molecules for autoantibodies to nuclear antigens (ANA). Bound antibodies are detected by Horseradish Peroxidase-(HRP)-labeled antibodies against human antibodies of IgG-type by substrate reaction with hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB). At the site of formed immune complexes blue spots develop as precipitated product from colorless substrate solution. Pale blue to dark blue spots are visible by eye.

The test procedure for antibody detection is performed in 3 steps:

Step 1

Incubation of 1 : 101 diluted samples for 30 minutes at room temperature in the intended wells. After incubation samples are sucked off and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash buffer.

Step 2

Incubation of wells with the anti-human IgG-HRP-conjugate for 30 minutes at room temperature. After incubation the antibody is sucked off and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash buffer.

Step 3

Incubation of wells with substrate solution SeramunBlau[®] spot dark for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by aspirating the substrate solution, followed by tapping the plate/strip dry onto lint-free absorbent paper. The coloring of the developed arrays is stable when stored protected from light.

After finishing step 3, developed assays can be scanned within 24 hours either by using the Seramun *SpotSight*[®] plate or Seramun *SpotSight*[®] strip scanner. The obtained images are interpreted by using the Software Seramun *SpotSight*[®] scan. Taking account of the test-specific evaluation criteria, the test result is determined.

Kit components

		For 48 determinations	For 96 determinations	For 2x 96 determinations	
1	WELLS	Wells with arrays	6 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	12 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	2x 12 single breakable 8-well strips in frame separately vacuum-sealed with desiccant
Color coding: purple					
2	WASHBUF CONC 10X	Wash buffer Seramun® Wash buffer A	100 ml concentrate transparent bottle, white cap	100 ml concentrate transparent bottle, white cap	2x 100 ml concentrate transparent bottle, white cap
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent B	55 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle, black cap	2x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cap	4x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cap
4	CONJ HRP IgG	Anti-human IgG-HRP-conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap	2x 8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap
5	SUBSTR TMB	Substrate SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap	2x 8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap
6	COVER	Adhesive film	2x	2x	4x
7	SWAB	Swab with 70 % (v/v) Isopropyl alcohol	3x2	6x2	12x2

Preparation and storage of samples

Sample collection should be done in a sterile manner. Serum is separated after clotting by centrifugation as soon as possible. Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 7 days. For longer storage times samples have to be stored at -20 °C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided. Bring the samples to room temperature and mix well.

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. The samples have to be diluted 1 : 101 (e.g. 10 µl sample and 1000 µl buffer) with the ready-to-use sample diluent.

Materials required but not provided

- Adjustable single-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Adjustable multi-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Reagent container for multi-channel micro-pipettes
- Distilled or deionized water
- lint-free absorbent paper
- Test tubes (1 ml) for sample dilution
- Beaker and measuring cylinder
- stop watch
- Washer for 96-well microtiter plates (optional)
- Collecting devices for infectious material
- Seramun *SpotSight*® plate or Seramun *SpotSight*® strip scanner with evaluation software Seramun *SpotSight*® scan

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 1x 48, 1x 96 or 2x 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label; that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8 °C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 3 months, provided proper storage. The ready-to-use wash solution can be used up to 4 weeks when stored at 2...8 °C and up to 2 weeks when stored at room temperature.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtiter 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 one part of the wash buffer concentrate **WASHBUF CONC 10X** with 9 parts of distilled or deionized water. For Example: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml distilled water. The substrate **SUBSTR TMB** must be protected from direct light! The test should not be performed with a substrate solution **SUBSTR TMB** that is colored dark or contains colored precipitates!

Workplace requirements

Processing the spotimmunoassays requires a clean and lint-free workplace. Adhesion of fibers to the plastic surface of the wells has to be avoided. Fibers may disturb optical image generation of arrays and cause erroneous results. Workplace and kit components should not be exposed to direct sunlight.

Assay procedure

Performance at room temperature (18...25 °C) and at the specified incubation times.

For the handling of SeraSpot® tests the use of the starter kit (order number: SP-000-1) is recommended. The kit is designed for multiple use.

Important notes:

- **Avoid any contact or scratching on the bottom surface of the wells by pipet tips or washer needles. This results in irreparable damages of the spot array.**
- **All liquid reagents (sample, conjugate and substrate) have to be pipetted without causing air bubbles into the wells.**
- **Before starting imaging of the wells it is necessary to remove particles or fibers, which may adhere to the underside of the bottom of the wells, by using the swab **SWAB** provided in the kit.**
- **Due to the drying of residual liquid, the images may appear more contrast-intensive, which can lead to slight deviations of the measured values during repeated scanning. Evaluation of the individual parameters is not changed!**

Working steps

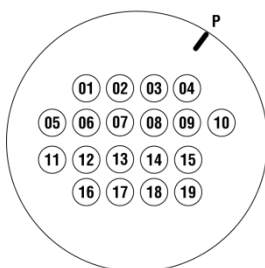
1. Warm all reagents and required wells **WELLS** to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Add **100 µl** of 1 : 101 diluted sample to each well. Preparation of working dilution of the sample e.g. 10 µl serum and 1000 µl sample diluent **DIL**.
3. Cover plate with adhesive film **COVER** and incubate for **30 min** at room temperature.
4. Empty wells (aspirate and discard samples), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **WASHBUF CONC 10X**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
5. Add **50 µl** of the ready-to-use conjugate solution **CONJ HRP IgG** to each well.
6. Cover plate with adhesive film **COVER** and incubate for **30 min** at room temperature.
7. Empty wells (aspirate and discard conjugate), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **WASHBUF CONC 10X**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
8. Add **50 µl** of the ready-to-use substrate solution **SUBSTR TMB** to each well.
9. Cover plate and protect from light. Incubate for **30 min** at room temperature.
10. Empty wells (aspirate and discard substrate). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
11. Clean bottom of wells with swab **SWAB**.
12. Perform image acquisition using the Seramun *SpotSight*® plate or the Seramun *SpotSight*® strip scanner and evaluate the results with the Seramun *SpotSight*® scan software. If image acquisition is performed with the scanner Seramun *SpotSight*® strip, transfer single 8-well microtiter plate strips to the scanners strip holder.

Aspiration and washing steps can be performed manually or with a washer for 96-well microtiter plates.

After aspiration of the substrate solution, the color of developed spots is stable for 24 hours when the plate is stored in the dark

Test evaluation

Array layout



Parameter	Controls
05 U1-snRNP	01 Positive control (PC)
06 CENP-B	02 Negative control (NC), 0 rel. units
07 Nucleosome	03 Cut-off control (CO), 30 rel. units
08 Histone	04 Reference 3 (R3), 60 rel. units
10 dsDNA	09 Reference 2 (R2), 100 rel. units
11 Jo-1	15 Reference 1 (R1), 300 rel. units
12 Scl-70	19 Serum control (SC)
13 Sm	
14 P0	
16 La/SS-B	
17 Ro/SS-A 52	
18 Ro/SS-A 60	P Well position marker

Validity criteria for the test

The *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG test includes the following control spots:

1. Positive control (PC). Intensively stained spot, darker than Cut-off control. Always stained.
2. Cut-off control (CO), corresponding to 30 rel. units. Weakly stained spot. Used for result evaluation of parameter specific signals.
3. Negative control (NC), corresponding to 0 rel. units. Pale spot with intensity lower than Cut-off control.
4. Serum control (SC). Intensively stained spot always stained in presence of sample. Absence of spot indicates absence of sample.
5. Reference 1 (R1), corresponding to 300 rel. units. Intensively stained spot. Always stained.
6. Reference 2 (R2), corresponding to 100 rel. units. Intensity lower than R1. Always stained.
7. Reference 3 (R3), corresponding to 60 rel. units. Intensity lower than R2. Always stained.

The spots NC, CO, R1 ... R3 are used to create a reference curve (four parameter non-linear regression) to calculate the staining intensities of the spots in relative units (rel. units) or in international units (IU) for dsDNA.

The test cannot be evaluated if one of the validity criteria listed in points 1 to 7 is not fulfilled.

Result interpretation

Evaluation of the test has to be performed by using the Seramun *SpotSight*[®] scan software. A visual plausibility check is possible with the aid of the magnifying lens contained in the starter kit (order number: SP-000-1).

Judgment of spot staining is performed in accordance to the following classification:

Result Interpretation	IgG
negative	color intensity of antigen spots \leq Cut-off control
positive	color intensity of one or more antigen spots $>$ Cut-off control

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

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples (concentrations up to 500 mg/dl hemoglobin, 1000 mg/dl lipids and 20 mg/dl bilirubin C / bilirubin F) do not interfere with the test. Rheumatoid factors also do not interfere with the test.

Assay procedure

Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the wells or incorrect timing can produce erroneous results.

Air bubbles generated by too forceful pipetting of samples and/or reagents cause uneven signal formation of arrays. These arrays cannot be used for evaluation.

Damaged arrays e.g. by scratching the well bottom with pipet tips or washer needles are not suitable for evaluation.

Any kind of fibers which may adhere underside the bottom of the wells or to the array area cause erroneous results.

Performance characteristics

Diagnostic sensitivity

Serologically predetermined samples (reference test 1) of patients with suspected connective tissue diseases were tested in the *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG test. Samples with discrepant results were retested in a second assay (reference test 2) for detection of antibodies against autoantigens. The results obtained in the reference test 2 were used for determination of the final status of the samples with discrepant results ("Amended sensitivity").

U1-snRNP	n = 47	Reference test 1		Initial sensitivity:	82.1 %
		positive (n = 39)	negative (n = 8)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive	32	0	Amended sensitivity:	91.4 %
	negative	7	8		
CENP-B	n = 112	Reference test 1		sensitivity:	100.0 %
		positive (n = 18)	negative (n = 94)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive	18	2		
	negative	0	92		
Nucleosome	n = 103	Reference test 1		Initial sensitivity:	45.3 %
		positive (n = 75)	negative (n = 28)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive	34	6	Amended sensitivity:	80.4 %
	negative	41	22		
Histone	n = 103	Reference test 1		Initial sensitivity:	67.3 %
		positive (n = 49)	negative (n = 54)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive	33	15	Amended sensitivity:	94.7 %
	negative	16	39		
dsDNA	n = 103	Reference test 1		Initial sensitivity:	83.1 %
		positive (n = 77)	negative (n = 26)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive	64	14	Amended sensitivity:	97.2 %
	negative	13	12		
Jo-1	n = 60	Reference test 1		Initial sensitivity:	93.3 %
		positive (n = 15)	negative (n = 45)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive	14	3	Amended sensitivity:	93.3 %
	negative	1	42		
Scl-70	n = 112	Reference test 1		Initial sensitivity:	92.2 %
		positive (n = 64)	negative (n = 48)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive	59	3	Amended sensitivity:	92.2 %
	negative	5	45		
Sm	n = 103	Reference test 1		Initial sensitivity:	53.3 %
		positive (n = 15)	negative (n = 88)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive	8	1	Amended sensitivity:	98.9 %
	negative	7	87		
P0	n = 103	Reference test 1		sensitivity:	100.0 %
		positive (n = 6)	negative (n = 97)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive	6	5		
	negative	0	92		
La/SS-B	n = 103	Reference test 1		Initial sensitivity:	57.9 %
		positive (n = 19)	negative (n = 84)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive	11	6	Amended sensitivity:	94.3 %
	negative	8	78		
Ro/SS-A 52	n = 103	Reference test 1		Initial sensitivity:	96.4 %
		positive (n = 28)	negative (n = 75)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive	27	0	Amended sensitivity:	100.0 %
	negative	1	75		
Ro/SS-A 60	n = 103	Reference test 1		Initial sensitivity:	87.5 %
		positive (n = 48)	negative (n = 55)		
<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive	42	0	Amended sensitivity:	95.5 %
	negative	6	55		

Diagnostic specificity

A total of 200 blood donor samples were tested by the SeraSpot® ANA-12 IgG test ("Initial specificity"). Positive samples were followed up with a reference test (reference test 1).

U1-snRNP		n = 200	Reference test 1		
			positive (n = 0)	negative (n = 200)	
SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0	18	specificity: 91.0 %
	negative		0	182	
CENP-B		n = 200	Reference test 1		
			positive (n = 0)	negative (n = 200)	
SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0	2	specificity: 99.0 %
	negative		0	198	
Nucleosome		n = 200	Reference test 1		
			positive (n = 0)	negative (n = 200)	
SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0	11	specificity: 94.5 %
	negative		0	189	
Histone		n = 200	Reference test 1		
			positive (n = 3)	negative (n = 197)	
SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		3	10	specificity: 94.9 %
	negative		0	187	
dsDNA		n = 200	Reference test 1		
			positive (n = 0)	negative (n = 200)	
SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0	2	specificity: 99.0 %
	negative		0	198	
Jo-1		n = 200	Reference test 1		
			positive (n = 0)	negative (n = 200)	
SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0	1	specificity: 99.5 %
	negative		0	199	
Scl-70		n = 200	Reference test 1		
			positive (n = 0)	negative (n = 200)	
SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0	7	specificity: 96.5 %
	negative		0	193	
Sm		n = 200	Reference test 1		
			positive (n = 0)	negative (n = 200)	
SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0	1	specificity: 99.5 %
	negative		0	199	
PO		n = 200	Reference test 1		
			positive (n = 0)	negative (n = 200)	
SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0	1	specificity: 99.5 %
	negative		0	199	
La/SS-B		n = 200	Reference test 1		
			positive (n = 2)	negative (n = 198)	
SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		2	7	specificity: 96.5 %
	negative		0	191	
Ro/SS-A 52		n = 200	Reference test 1		
			positive (n = 2)	negative (n = 198)	
SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		2	2	specificity: 99.0 %
	negative		0	196	
Ro/SS-A 60		n = 200	Reference test 1		
			positive (n = 0)	negative (n = 200)	
SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0	1	specificity: 99.5 %
	negative		0	199	

Cross-reactivity

Samples from patients with rheumatoid arthritis

A collection of 113 samples from patients suffering from rheumatoid arthritis with a positive anti-CCP (n=30) or RF (n=83) serology (reference test 1) were tested in the *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG test and followed up with a second reference test ("Amended specificity").

U1-snRNP	n = 113	Reference test 1		Initial specificity: 86.7 % Amended specificity: 86.7 %	
		positive (n = 0)	negative (n = 113)		
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	98	
CENP-B	n = 113	Reference test 1		Initial specificity: 97.3 % Amended specificity: 99.1 %	
		positive (n = 0)	negative (n = 113)		
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	110	
Nucleosome	n = 113	Reference test 1		Initial specificity: 98.2 % Amended specificity: 98.2 %	
		positive (n = 4)	negative (n = 109)		
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive		2
		negative	2	107	
Histone	n = 113	Reference test 1		Initial specificity: 86.5 % Amended specificity: 86.5 %	
		positive (n = 9)	negative (n = 104)		
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive		9
		negative	0	90	
dsDNA	n = 113	Reference test 1		Initial specificity: 96.4 % Amended specificity: 97.3 %	
		positive (n = 1)	negative (n = 112)		
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive		1
		negative	0	108	
Jo-1	n = 113	Reference test 1		Specificity: 100.0 %	
		positive (n = 0)	negative (n = 113)		
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	113	
Scl-70	n = 113	Reference test 1		Initial specificity: 97.2 % Amended specificity: 98.1 %	
		positive (n = 6)	negative (n = 107)		
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive		6
		negative	0	104	
Sm	n = 113	Reference test 1		Initial specificity: 99.1 % Amended specificity: 99.1 %	
		positive (n = 0)	negative (n = 113)		
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	112	
P0	n = 113	Reference test 1		Initial specificity: 98.2 % Amended specificity: 99.1 %	
		positive (n = 0)	negative (n = 113)		
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	111	
La/SS-B	n = 113	Reference test 1		Initial specificity: 93.8 % Amended specificity: 93.8 %	
		positive (n = 0)	negative (n = 113)		
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	106	
Ro/SS-A 52	n = 113	Reference test 1		Initial specificity: 97.3 % Amended specificity: 99.1 %	
		positive (n = 3)	negative (n = 110)		
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive		3
		negative	0	107	
Ro/SS-A 60	n = 113	Reference test 1		Initial specificity: 98.2 % Amended specificity: 99.1 %	
		positive (n = 1)	negative (n = 112)		
		<i>SeraSpot</i> [®] ANA-12 IgG	positive		1
		negative	0	110	

Epstein-Barr-virus (EBV) antibody positive samples

EBV antibody positive samples (reference test 1) were tested in the SeraSpot® ANA-12 IgG test.

U1-snRNP	n = 22	Reference test 1		Specificity: 100.0 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 22)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	22	
CENP-B	n = 22	Reference test 1		Specificity: 100.0 %	
			positive (n = 2)		negative (n = 20)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		2
		negative	0	20	
Nucleosome	n = 22	Reference test 1		Specificity: 95.5 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 22)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	21	
Histone	n = 22	Reference test 1		Specificity: 77.3 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 22)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	17	
dsDNA	n = 22	Reference test 1		Specificity: 95.2 %	
			positive (n = 1)		negative (n = 21)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		1
		negative	0	20	
Jo-1	n = 22	Reference test 1		Specificity: 100.0 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 22)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	22	
Scl-70	n = 22	Reference test 1		Specificity: 95.5 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 22)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	21	
Sm	n = 22	Reference test 1		Specificity: 95.5 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 22)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	21	
P0	n = 22	Reference test 1		Specificity: 100.0 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 22)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	22	
La/SS-B	n = 22	Reference test 1		Specificity: 86.4 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 22)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	19	
Ro/SS-A 52	n = 22	Reference test 1		Specificity: 100.0 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 22)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	22	
Ro/SS-A 60	n = 22	Reference test 1		Specificity: 100.0 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 22)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	22	

Cytomegalovirus (CMV) antibody positive samples

CMV antibody positive samples (reference test 1) were tested in the SeraSpot® ANA-12 IgG test.

U1-snRNP	n = 27	Reference test 1		Specificity: 88.9 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 27)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	24	
CENP-B	n = 27	Reference test 1		Specificity: 100.0 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 27)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	27	
Nucleosome	n = 27	Reference test 1		Specificity: 92.6 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 27)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	25	
Histone	n = 27	Reference test 1		Specificity: 100.0 %	
			positive (n = 1)		negative (n = 26)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	1	26	
dsDNA	n = 27	Reference test 1		Specificity: 96.2 %	
			positive (n = 1)		negative (n = 26)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		1
		negative	0	25	
Jo-1	n = 27	Reference test 1		Specificity: 100.0 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 27)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	27	
Scl-70	n = 27	Reference test 1		Specificity: 92.6 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 27)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	25	
Sm	n = 27	Reference test 1		Specificity: 100.0 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 27)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	27	
P0	n = 27	Reference test 1		Specificity: 100.0 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 27)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	27	
La/SS-B	n = 27	Reference test 1		Specificity: 88.9 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 27)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	24	
Ro/SS-A 52	n = 27	Reference test 1		Specificity: 96.3 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 27)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	26	
Ro/SS-A 60	n = 27	Reference test 1		Specificity: 100.0 %	
			positive (n = 0)		negative (n = 27)
		SeraSpot® ANA-12 IgG	positive		0
		negative	0	27	

Precision

Samples of known antibody titer were assayed by *SeraSpot*[®] ANA-17 IgG test. The staining intensities of spots were determined as relative units (rel. units) according to the reference curve and the variation coefficients (CV) were calculated in order to determine the within-run precision (intra-assay-CV), between-run precision (inter-assay-CV) and Lot-to-Lot precision (Interbatch-CV).

	Intra-assay-CV		Inter-assay-CV		Interbatch-CV	
	rel. units \bar{x} n = 40	CV [%]	rel. units \bar{x} n = 80	CV [%]	rel. units \bar{x} n = 240	CV [%]
U1-snRNP	64.9	8.9	55.8	9.0	56.3	15.5
CENP-B	39.0	8.1	37.4	12.3	35.3	12.7
Nucleosome	43.6	11.9	48.5	19.3	48.9	24.2
Histone	67.6	8.8	57.3	14.8	55.6	12.3
dsDNA	63.3	7.8	72.9	11.2	72.4	11.7
Jo-1	48.7	5.4	47.4	10.5	49.1	15.2
Scl-70	37.1	11.6	40.4	15.9	42.3	16.4
Sm	77.4	10.5	93.2	12.8	91.8	13.3
P0	57.9	7.9	48.7	10.1	54.6	21.0
La/SS-B	54.7	11.9	53.1	10.2	52.8	13.9
Ro/SS-A 52	68.0	9.3	84.2	12.9	88.9	19.6
Ro/SS-A 60	96.3	13.3	130.7	15.9	143.6	18.7
Procedure	1 operator, 40x determinations, 1 batch		5 operators, 2x determinations, 2x testings per day 20 days, 1 batch		5 operators, 2x determinations, 2x testings per day, 20 days, 3 batches	

Automation

Samples (n = 96) of known antibody titer were assayed manually and (in parallel) by use of the microplate processor DS2[®] (Dynerx Technologies; manual sample dilution). Color intensity of antigen spots was recorded and used for calculation of the coefficient of determination r^2 for selected antibody reactivities and the different methods of operation.

	Dynex DS2 [®] vs. manual processing
	r^2
U1-snRNP	0.978
CENP-B	0.989
Nucleosome	0.962
Histone	0.758
dsDNA	0.996
Jo-1	0.998
Scl-70	0.995
Sm	0.999
P0	0.963
La/SS-B	0.991
Ro/SS-A 52	0.997
Ro/SS-A 60	0.986

r^2 was not determined if more than 90 % of the total number (n = 96) of the samples showed no antibody reactivity for the particular antigens.

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. The test instructions have to be followed strictly. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. Do not use reagents from damaged packages or bottles.

Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, wash buffer and TMB substrate solution. These can be used across batches and parameters.

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.

In particular 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
2020-08-12	General	General revision
	Preparation and storage of samples	Stability of samples
	Preparation and storage of reagents	Storage of ready-to-use wash solution
	Kit components	Update
	Limitations of the procedure	Interference
	Performance characteristics	Update of data

Incubation scheme *SeraSpot*[®] ANA-12 IgG

-  100 µl
30 min
 3 x wash
diluted sample (1 : 101)
incubation (room temperature)
with wash solution, each 400 µl per well
-  50 µl
30 min
 3 x wash
conjugate **CONJ HRP IgG**
incubation (room temperature)
with wash solution, each 400 µl per well
-  50 µl
30 min
 Aspiration
substrate **SUBSTR TMB**
incubation (room temperature, protected from light)
- imaging of wells and image analysis
scanner Seramun *SpotSight*[®] plate / Seramun *SpotSight*[®] strip and software Seramun *SpotSight*[®] scan

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

SeramunBlau®, SeraSpot® und Seramun SpotSight® are registered trademarks of Seramun Diagnostica GmbH.