

SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG

Spotimmunoassay zum Nachweis von IgG Antikörpern bei systemischer Vaskulitis
in humanem Serum oder Plasma

REF SP-003-3 G-S6 ▽ 48 REF SP-003-3 G-S12 ▽ 96 REF SP-003-3 G-S24 ▽ 2x 96
IVD *In-vitro*- Diagnostikum CE



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

Einführung

Primäre systemische Vaskulitiden von kleinen und mittelgroßen Gefäßen (1) unbekannter Ätiologie sind mit anti-neutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern assoziiert (ANCA). 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-immune“ Vaskulitis) nachweisen (2,3).

Hauptantigene von ANCA 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 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 (45 %), das Churg-Strauss Syndrom (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 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.

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-myeloperoxidase 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, Goodpasture'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 **SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG Test** ist ein *in-vitro*-Diagnostikum (Spotimmunoassay, SIA) zum Nachweis von Autoantikörpern vom IgG-Isotyp gegen folgende Antigene: Proteinase 3 (PR3), Myeloperoxidase (MPO) und glomeruläres Basalmembranprotein (GBM) in humanem Serum oder Plasma.

Testprinzip

Der **SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG Test** ist ein Festphasenimmunoassay basierend auf der Verwendung rekombinanter oder gereinigter nativer Proteine, die in Arrayanordnung (Spotarray) auf den Boden der Wells von 96well-Mikrotiterplatten fixiert sind, und die als Fängermoleküle für Autoantikörper gegen Proteinase 3, Myeloperoxidase und glomeruläres Basalmembranprotein 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 der farblosen Substratlösung. Die Farbintensität der Spots korreliert mit der Antikörperkonzentration. 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 Waschpuffer.

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** quantitativ analysiert werden. Unter Berücksichtigung der testspezifischen Auswertekriterien wird das Testergebnis ermittelt.

Verwendete Autoantigene

Bezeichnung	Klinische Relevanz / Spezifität	Beschreibung
PR3	Wegener's Granulomatose	95 % Proteinase 3
MPO	Mikroskopische Polyangiitis (MPA); Churg-Strauss-Syndrom (CSS); Idiopathische membranöse Glomerulonephritis	45 % 60 % 65 % Myeloperoxidase
GBM	Goodpasture-Syndrom	90 % "Glomerular basement membrane antigen" (GBM), $\alpha 3$ Kette des humanen Kollagen Typ IV

Testkomponenten

		Für 48 Bestimmungen	Für 96 Bestimmungen	Für 2x96 Bestimmungen	
1	WELLS	Kavitäten mit Arrays	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
Farbmarkierung: Rot					
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	Probenverdünnpuffer 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 48 Stunden 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 Probenverdünnpuffer 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 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

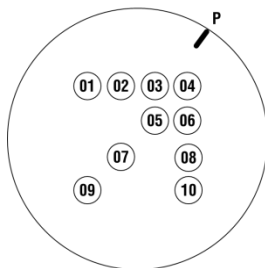
1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten **WELLS** auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. **100 µl** 1:101 verdünnte Probe pro Kavität pipettieren. Herstellung der Arbeitsverdünnung der Patientenprobe z.B. 10 µl Serum + 1000 µl Probenverdünnungspuffer.
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 (2), 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 (2), 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 Waschschrte 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

05	GBM
07	MPO
09	PR3

Kontrollen

01	Positivkontrolle (PC)
02	Negativkontrolle (NC), 0 rel. Units
03	Cut-off Kontrolle (CO), 30 rel. Units
04	Referenz 3 (R3), 60 rel. Units
06	Referenz 2 (R2), 100 rel. Units
08	Referenz 1 (R1), 300 rel. Units
10	Serumkontrolle (SC)

P Positionsmarkierung

Gültigkeitskriterien für den Test

Der *SeraSpot*[®] Vaskulitis-3 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) auszudrücken.

Der Test kann nicht ausgewertet werden, wenn eine 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 \leq 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 dem Verdacht auf entzündliche Gefäßerkrankungen wurden im *SeraSpot*[®] Vaskulitis-3 IgG Test untersucht („Initiale Sensitivität“). Proben mit diskrepanten Resultaten wurden in einem zweiten Assay zum Nachweis von Autoantikörpern bei Vaskulitiden nachgetestet (Referenztest 2), wobei die hier erzielten Ergebnisse der endgültigen Statusbestimmung der im *SeraSpot*[®]-Test zum Referenztest 1 diskrepant bestimmten Proben dienen („Berichtigte Sensitivität“).

GBM	n = 18	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positiv	15	0
	negativ	3	0

Initiale Sensitivität: **83,3 %**

Berichtigte Sensitivität: **93,8 %**

MPO	n = 30	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positiv	30	0
	negativ	0	0

Initiale Sensitivität: **100 %**

Berichtigte Sensitivität: **100 %**

PR3	n = 33	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positiv	33	0
	negativ	0	0

Initiale Sensitivität: **100 %**

Berichtigte Sensitivität: **100 %**

Diagnostische Spezifität

Ein Kollektiv von Blutspendenserum (n = 224, Referenztest 1) wurde im *SeraSpot*[®] Vaskulitis-3 IgG Test untersucht. Proben mit positiven Resultaten wurden in einem zweiten Assay zum Nachweis von Autoantikörpern bei Vaskulitiden nachgetestet, wobei die damit erzielten Ergebnisse der endgültigen Statusbestimmung der Proben dienen („Berichtigte Spezifität“).

GBM	n = 224	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positiv	0	1
	negativ	2	221

Initiale Spezifität: **99,5 %**

Berichtigte Spezifität: **99,5 %**

MPO	n = 219	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positiv	0	0
	negativ	0	219

Initiale Spezifität: **100 %**

Berichtigte Spezifität: **100 %**

PR3	n = 224	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positiv	0	7
	negativ	0	217

Initiale Spezifität: **96,9 %**

Berichtigte Spezifität: **96,9 %**

Kreuzreaktivität

Potentiell kreuzreaktive Proben wurden im *SeraSpot*[®] Vaskulitis-3 IgG Test untersucht („Initiale Spezifität“) und mit einem zweiten Assay zum Nachweis von Autoantikörpern bei Vaskulitiden nachuntersucht („Berichtigte Spezifität“).

CCP-positive Proben (Antikörper gegen cyclisches citrulliniertes Peptid)

GBM	n = 30	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positiv	0	1
	negativ	0	29

Initiale Spezifität: **96,7 %**

Berichtigte Spezifität: **100 %**

MPO	n = 30	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positiv	0	0
	negativ	0	30

Initiale Spezifität: **100 %**

Berichtigte Spezifität: **100 %**

PR3	n = 30	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positiv	0	0
	negativ	0	30

Initiale Spezifität: **100 %**

Berichtigte Spezifität: **100 %**

ANA-positive Proben (Antinukleäre Antikörper)

GBM	n = 40	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positiv	0	0
	negativ	0	40

Initiale Spezifität: **100 %**

Berichtigte Spezifität: **100 %**

MPO	n = 40	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positiv	0	0
	negativ	0	40

Initiale Spezifität: **100 %**

Berichtigte Spezifität: **100 %**

PR3	n = 40	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positiv	1	0
	negativ	0	39

Initiale Spezifität: **100 %**

Berichtigte Spezifität: **100 %**

Präzision

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden im *SeraSpot*[®] Vaskulitis-3 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		Inter-Chargen-VK	
	rel. Units $[\bar{x}]$ n = 48	VK [%]	rel. Units $[\bar{x}]$ n = 80	VK [%]	rel. Units $[\bar{x}]$ n = 240	VK [%]
GBM	58,8	4,4	54,5	6,7	55,6	7,1
MPO	69,5	6,4	73,3	12,6	71,6	10,9
PR3	44,5	6,1	48,7	14,6	51,1	12,0
Durchführung	1 Bearbeiter, 48x 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 (OD) wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 für ausgewählte Antikörperreaktivitäten zwischen den einzelnen Methoden der Durchführung ermittelt.

	Dynex DS2 [®] vs. manuelle Abarbeitung
	r^2
GBM	0,997
MPO	0,996
PR3	0,996

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. 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!**

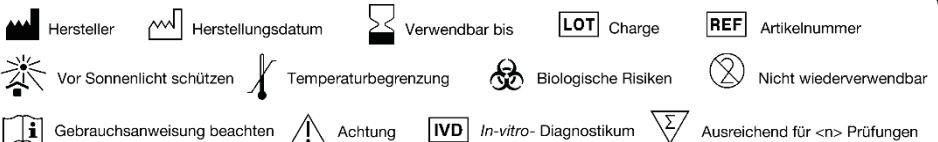


Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2018-03-01	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung
2019-02-05	Testkomponenten Leistungsmerkmale	Aktualisierung Aktualisierung der Daten

Inkubationsschema *SeraSpot*[®] Vaskulitis-3 IgG

- | | | | |
|----|---|--|---|
| 1. |  | 100 µl
30 min | verdünnte Probe (1 : 101)
Inkubation (Raumtemperatur) |
| |  | 3 x Waschen | mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität |
| 2. |  | 50 µl
30 min | Konjugat CONJ HRP IgG (4)
Inkubation (Raumtemperatur) |
| |  | 3 x Waschen | mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität |
| 3. |  | 50 µl
30 min | Substratlösung SUBSTR TMB (5)
Inkubation (lichtgeschützt bei Raumtemperatur) |
| |  | Absaugen | |
| 4. | | Bildaufnahme der Kavitäten
und Imageanalyse | Scanner Seramun <i>SpotSight</i> [®] plate / Seramun
<i>SpotSight</i> [®] strip und Software Seramun
<i>SpotSight</i> [®] scan |



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

SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG

Spotimmunoassay for detection of IgG antibodies in in systemic vasculitis
in human serum or plasma

REF SP-003-3 G-S6 ▽ 48 REF SP-003-3 G-S12 ▽ 96 REF SP-003-3 G-S24 ▽ 2x 96
IVD *In-vitro*- diagnostic device CE



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 33767 791-10 · fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Introduction

Primary systemic vasculitis of small and middle large vessels (1) of unknown ethiopathogenesis is associated with anti-neutrophil cytoplasmic 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: azurophilic 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 Wegener’s granulomatosis (85 % anti-PR3 antibody positive) (4).

Myeloperoxidase (MPO) is a strongly cationic protein of the azurophilic granules 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 (45 %), 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 immuno-fluorescence picture 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 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.

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-myeloperoxidase 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, Goodpasture'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

SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG is an *in vitro* diagnostic device (spotimmunoassay, SIA) for the detection of autoantibodies of the IgG isotype directed against the following antigens: Proteinase 3 (PR3), myeloperoxidase (MPO) and glomerular basement membrane (GBM) in human serum or plasma samples.

Principle of the test

SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG test is a solid phase immunoassay based on the use of recombinant or purified native proteins as capture antigens printed in array arrangement (spot array) on the bottom of the wells of 96well-microtitration plates. The antigens serve as capture molecules for autoantibodies against proteinase 3, myeloperoxidase and glomerular basement membrane. 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 are developed as precipitated product from colorless substrate solution. Color intensity is correlated to the antibody concentration. 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 solution.

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 solution.

Step 3

Incubation of wells with substrate solution SeramunBlau® spot dark for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by sucking off 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.

Used Autoantigens

Nomenclature	Clinical relevance / Specificity		Description
PR3	Wegener's granulomatosis	95 %	Proteinase 3
MPO	Mikroskopische polyangiitis (MPA); Churg-Strauss-syndrom (CSS); Idiopathic membranous glomerulonephritis	45 % 60 % 65 %	Myeloperoxidase
GBM	Goodpasture-Syndrom	90 %	"Glomerular basement membrane antigen" (GBM), α 3 chain of human collagen type IV

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: red			
2	WASHBUF CONC 10X	Wash buffer Seramun® Wash buffer A	100 ml concentrate transparent bottle, white cup	100 ml concentrate transparent bottle, white cup	2x 100 ml concentrate transparent bottle white cup
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent B	55 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle black cup	2x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cup	4x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cup
4	CONJ HRP IgG	Anti-human IgG-HRP-conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cup	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cup	2x 8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cup
5	SUBSTR TMB	Substrate SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cup	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cup	2x 8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cup
6	COVER	Adhesive film	2x	2x	4x
7	SWAB	Swab with 70 % (v/v) Isopropyl alcohol	3x 2	6x 2	12x 2

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 48 hours. For longer storage times samples have to be stored at -20 °C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided!

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. The samples have to be diluted 1 : 101 (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 de-ionized 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

Execution 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 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

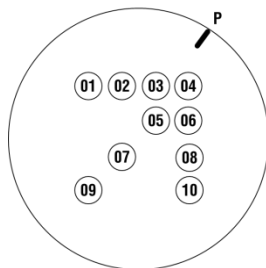
1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Add **100 µl** of 1 : 101 diluted sample to each well. Preparation of working dilution of the sample e.g. 10 µl serum and 1000 µl sample dilution buffer.
3. Cover plate with adhesive film **[COVER]** and incubate for **30 min** at room temperature.
4. Empty wells (aspirate and discard samples), then wash wells **three times** using **400 µl** wash solution per well (made of (2)). 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 samples), then wash wells **three times** using **400 µl** wash solution per well (made of (2)). 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.
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 via washer for 96-well microtiter plates.

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

Test evaluation

Array layout



Parameter
05 GBM
07 MPO
09 PR3

Controls
01 Positive control (PC)
02 Negative control (NC), 0 rel. units
03 Cut-off control (CO), 30 rel. units
04 Reference 3 (R3), 60 rel. units
06 Reference 2 (R2), 100 rel. units
08 Reference 1 (R1), 300 rel. units
10 Serum control (SC)
P Well position marker

Validity criteria for the test

The *SeraSpot*[®] Vaskulitis-3 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).

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 inflammatory vascular disease were tested in the *SeraSpot*[®] Vaskulitis-3 IgG test ("Initial sensitivity"). Samples with discrepant results were retested in a second assay (reference test 2) for detection of autoantibodies in systemic vasculitis. The results obtained in the reference test 2 were used for determination of the final status of the samples with discrepant results ("Amended sensitivity").

GBM	n = 18	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positive	15	0
	negative	3	0

Initial sensitivity: 83.3 %

Amended sensitivity: 93.8 %

MPO	n = 30	reference test 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positive	30	0
	negative	0	0

Initial sensitivity: 100 %

Amended sensitivity: 100 %

PR3	n = 33	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positive	33	0
	negative	0	0

Initial sensitivity: 100 %

Amended sensitivity: 100 %

Diagnostic specificity

A total of 224 blood donor samples were tested by the *SeraSpot*[®] Vaskulitis-3 IgG test ("Initial specificity"). Samples with positive results were retested in a second assay for detection of autoantibodies in systemic vasculitis. The results obtained were used for determination of the final status of the samples ("Amended specificity").

GBM	n = 224	reference test 1	
		positive	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positive	0	1
	negative	2	221

Initial specificity: 99.5 %

Amended specificity: 99.5 %

MPO	n = 219	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positive	0	0
	negative	0	219

Initial specificity: 100 %

Amended specificity: 100 %

PR3	n = 224	reference test 1	
		positive	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] Vaskulitis-3 IgG	positive	0	7
	negative	0	217

Initial specificity: 96.9 %

Amended specificity: 96.9 %

Cross-reactivity

Potential cross-reacting samples were tested in the SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG test ("Initial specificity") and followed up with a reference test ("Amended specificity").

CCP-positive samplings (antibodies against cyclic citrullinated peptide)

GBM	n = 30	reference test 1	
		positive	negative
SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG	positive	0	1
	negative	0	29

Initial specificity: 96.7 %

Amended specificity: 100 %

MPO	n = 30	reference test 1	
		positive	negative
SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG	positive	0	0
	negative	0	30

Initial specificity: 100 %

Amended specificity: 100 %

PR3	n = 30	reference test 1	
		positive	negative
SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG	positive	0	0
	negative	0	30

Initial specificity: 100 %

Amended specificity: 100 %

ANA-positive samplings (antinuclear antibodies)

GBM	n = 40	reference test 1	
		positive	negative
SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG	positive	0	0
	negative	0	40

Initial specificity: 100 %

Amended specificity: 100 %

MPO	n = 40	reference test 1	
		positive	negative
SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG	positive	0	0
	negative	0	40

Initial specificity: 100 %

Amended specificity: 100 %

PR3	n = 40	reference test 1	
		positive	negative
SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG	positive	1	0
	negative	0	39

Initial specificity: 100 %

Amended specificity: 100 %

Precision

Samples of known antibody titer were assayed by SeraSpot® Vaskulitis-3 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 = 48	CV [%]	rel. units [\bar{x}] n = 80	CV [%]	rel. units [\bar{x}] n = 240	CV [%]
GBM	58.8	4.4	54.5	6.7	55.6	7.1
MPO	69.5	6.4	73.3	12.6	71.6	10.9
PR3	44.5	6.1	48.7	14.6	51.1	12.0
Procedure	1 operator, 48x determination, 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® (Dynex Technologies; manual sample dilution). Sample dilution was performed manually for both methods. Color intensity (OD) of 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
GBM	0.997
MPO	0.996
PR3	0.996

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, washing 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
2018-03-01	Common advices and precautions	Update
2019-XX-XX	Kit components	Update
	Performance characteristics	Update of data

Incubation scheme *SeraSpot*[®] Vaskulitis-3 IgG

- | | | | |
|----|--|--|---|
| 1. | 
 | <p>100 µl
30 min</p> <p>3 x wash</p> | <p>diluted sample (1 : 101)
incubation (room temperature)</p> <p>with washing solution, each 400 µl per well</p> |
| 2. | 
 | <p>50 µl
30 min</p> <p>3 x wash</p> | <p>conjugate CONJ HRP IgG (4)
incubation (room temperature)</p> <p>with washing solution, each 400 µl per well</p> |
| 3. | 
 | <p>50 µl
30 min</p> <p>Aspiration</p> | <p>substrate SUBSTR TMB (5)
incubation (room temperature, protected from light)</p> |
| 4. | | <p>imaging of wells and image analysis</p> | <p>scanner <i>Seramun SpotSight</i>[®] plate / <i>Seramun SpotSight</i>[®] strip and software <i>Seramun SpotSight</i>[®] scan</p> |

 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.

