

Seraline[®] ANA-12 IgG

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

REF LIA-002-12 G  20  *In-vitro*-Dagnostikum CE



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

Einführung

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

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

Jede Kollagenose ist durch typische Autoantikörperprofile charakterisiert, die alle mit dem vorliegenden *Seraline*[®] ANA-12 IgG erfasst werden.

dsDNA-Antikörper:

dsDNA-Antikörper vom IgG Isotyp sind Markerantikörper und ACR-Kriterium des systemischen Lupus erythematosus (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 Nukleosom-Antikörper besitzen.

Nukleosomen-Antikörper:

Antikörper gegen Nukleosomen, einer Strukturkomponente des Chromatins, welche aus jeweils 2 Kopien 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. 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 *Seraline*[®] 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 zytoplasmatisch lokalisiert sind. Während das Ro60-Protein Bestandteil der hY-RNP-Komplexe ist, wurde das Ro52-Antigen erst kürzlich 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 erythematodes 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 erythematodes (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 subakut kutanen Lupus erythematodes (SCLE). Sie sind in 90 - 100% der Fälle nachweisbar. In ca. 10% wird ein Übergang in einen SLE beobachtet. Beim neonatalen Lupus erythematodes (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 frühdiagnostischer 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 Zytoplasma lokalisiert, so dass anti-Jo-1-Antikörper im eigentlichen Sinne nicht zu den antinukleären Antikörpern zu zählen sind.

Literatur:

1. Conrad, K., Schöbler, W., Hiepe, F., 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 *Seraline*[®] ANA-12 IgG ist ein empfindlicher Line Immunoassay (LIA) zum Nachweis von antinukleären und cytoplasmatischen Antikörpern (ANA) vom IgG Isotyp gegen folgende Antigene: dsDNA, Nukleosomen, Sm, P0, Histone, U1 snRNP, Ro/SS-A 60 kDa, Ro/SS-A 52 kDa, La/SS-B, Scl-70, CENP-B und Jo-1 in humanem Serum oder Plasma.

Testprinzip

Die Antigene werden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und fixiert. Nach der Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran wird diese in gebrauchsfertige Streifen geschnitten.

Die Reaktion zum Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

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

Schritt 2

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

Schritt 3

Während der Substratreaktion setzen die gebundenen POD-Moleküle des Konjugats das Substrat unter Ausbildung blauer Präzipitate um. Die Reaktion wird nach 10 min durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser gestoppt. Die gefärbten Antigenbanden auf den getrockneten Teststreifen werden durch Anlegen der Auswerteschablone identifiziert und das Testergebnis entsprechend der Auswertekriterien bestimmt. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren.

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

Vorbereitung und Lagerung der Proben

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

Testkomponenten

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

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

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

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Mit einem Testbesteck können 20 Bestimmungen durchgeführt werden.

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

Vorbereitung und Verwendung

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

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

Testdurchführung

- Der Test ist bei Raumtemperatur (18...25°C) durchzuführen.
- Teststreifen mit einer Kunststoffpinzette so in die Inkubationswanne legen, dass die aufgedruckten Nummern nach oben zeigen.
- Alle Inkubationsschritte sollten auf einem Wipp-Schüttler mit einer empfohlenen Schüttelfrequenz von ca. 20 bis 30 Rotationen pro Minute erfolgen.
- Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Arbeitsschritte

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

Achtung:

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

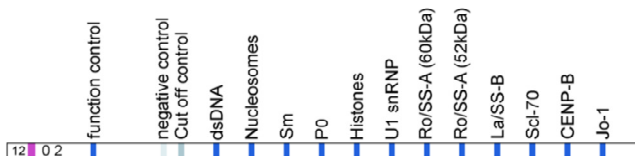
Auswertung

Gültigkeitskriterien für den Test

Auf jedem Teststreifen des *Seraline*[®] ANA-12 IgG sind untereinander 3 Kontrollbanden aufgetragen:

- a) Die Funktionskontrolle (positive Bande mit jeder Probe).
- b) Die Intensität der negativ-Kontrolle muss kleiner als die der Cut-off-Kontrolle sein.
- c) Die Cut-off-Kontrolle (Bandenintensität dient der Bewertung der diagnostischen Banden als positiv oder negativ).

Der Test kann ausgewertet werden, wenn die Funktionskontrolle, die erwartete Konjugatkontrolle und die Cut-off-Kontrolle sichtbar sind.



Interpretation der Ergebnisse

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

Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

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

Leistungsmerkmale

Sensitivität

Zur Einschätzung der Leistungsmerkmale des *Seraline*[®] ANA-12 IgG wurden aus einem Kollektiv von 71 Patienten mit klinisch gesicherten Kollagenosen (Details s.u.) untersucht und die Spezifität hinsichtlich des entsprechenden Krankheitsbildes bestimmt.

klinischer Befund	Anzahl [n]	Sensitivität [%]
SLE	42	86
Sklerodermie	20	95
MCTD	2	100
Myositis	7	100
Gesamt	71	89

In einer externen Studie wurden 160 Seren im Vergleich zu einem anderen kommerziellen Test (Test 1) untersucht. Der Vergleichstest wurde hinsichtlich Spezifität und Sensitivität mit 100 % postuliert.

Antigen	Sensitivität	Spezifität	Übereinstimmung
dsDNA	90.9% (30/33)	98.4 % (125/127)	96.9% (155/160)
Nucleosomen	71.0% (22/31)	99.2% (128/129)	93.8% (150/160)
Sm	96.2% (25/26)	99.3% (133/134)	98.8% (158/160)
P0	85.3% (29/34)	100% (126/126)	96.9% (155/160)
Histone	87.5% (28/32)	96.9% (124/128)	95.0% (152/160)
U1 snRNP	91.4% (32/35)	99.2% (124/125)	97.5% (156/160)
Ro/SS-A (60kDa)	100% (78/78)	95.1% (78/82)	97.5% (156/160)
Ro/SS-A (52kDa)	100% (71/71)	100% (89/89)	100% (160/160)
La/SS-B	100% (42/42)	97.5% (115/118)	98.1% (157/160)
Scl-70	100% (22/22)	100% (138/138)	100% (160/160)
CENP-B	100% (21/21)	100% (139/139)	100% (160/160)
Jo-1	61.9% (13/21)	100% (139/139)	95.0% (152/160)

Mit einem zweiten, unabhängigen Vergleichstest (Test 2) wurden diskrepante Ergebnisse überprüft. Nachfolgend ist die Übereinstimmung vom *Seraline*[®] ANA-12 IgG mit Test 2 dargestellt.

dsDNA: 3 von 5 diskrepanten Seren wurden bestätigt

Nucleosomen: 1 von 10 diskrepanten Seren wurden bestätigt

Sm: 2 von 2 diskrepanten Seren wurden bestätigt

P0: 3 von 5 diskrepanten Seren wurden bestätigt

Histone: 2 von 8 diskrepanten Seren wurden bestätigt

U1 snRNP: 4 von 4 diskrepanten Seren wurden bestätigt

Ro/SS-A (60kDa): 3 von 4 diskrepanten Seren wurden bestätigt

La/SS-B: 2 von 3 diskrepanten Seren wurden bestätigt

Jo-1: 7 von 8 diskrepanten Seren wurden bestätigt

Spezifität

Zur Bestimmung der Spezifität wurden in zwei unabhängigen Untersuchungen Kollektive von n = 120 bzw. n = 46 Blutspendersonen getestet.

Blutspender	Anzahl [n]	Spezifität [%]
Kollektiv 1	120	97
Kollektiv 2	46	95
Gesamt	166	96

Grenzen der Methode

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

Interferenz

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

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

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

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

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






Änderungshistorie

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

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

Seraline[®] ANA-12 IgG

Line Immunoassay for detection of IgG- antibodies in connective tissue diseases
in human serum or plasma

REF LIA-002-12 G  20  *In-vitro*-Diagnostic device 



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

Introduction

Connective tissue diseases are systemic inflammatory rheumatic diseases usually characterized by a chronic course (systemic connective tissue diseases) with overlapping symptoms (Overlap-Syndromes). Connective tissue diseases include:

- Systemic lupus erythematosus (SLE) and subsets
- Sjögren's syndrome
- Systemic sclerosis
- Idiopathic (autoimmune) myositis
- Mixed connective tissue disease (MCTD or Sharp syndrome)
- Overlap syndromes

Connective tissue diseases are characterized by typical autoantibody profiles, all detectable with *Seraline[®]* 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.

Nucleosomal antibodies:

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

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-RNP 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 *Seraline*[®] 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 only recently 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:

4. Conrad, K., Schöbler, W., Hiepe, F., Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen Pabst Science Publishers Lengerich u.a. 2006, 2. Aufl.
5. Peter, J.B., Shoenfeld Y. (Eds), Autoantibodies Elsevier Amsterdam u.a. 1996
6. Tan, E.M., Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune disease and probes for cell biology, Adv. Immunol. 44, 1989: 93-151

Intended use

The *Seraline*[®] ANA-12 IgG is a Line Immunoassay (LIA) for detection of 12 antinuclear and cytoplasmatic antibodies (ANA) of the IgG isotype directed against the following antigens: dsDNA, nucleosomes, Sm, P0, histones, U1 snRNP, Ro/SS-A 60 kDa, Ro/SS-A 52 kDa, La/SS-B, Scl-70, CENP-B and Jo-1 in human serum or plasma samples.

Principle of the test

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

Step 1

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

Step 2

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

Step 3

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

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

Preparation and storage of samples

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

Kit components

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

Materials required but not provided

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

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

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

Reagent preparation

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

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

Assay procedure

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

Working steps

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

Please Note:

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

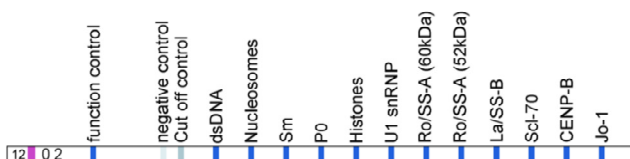
Test evaluation

Test validity

The *Seraline*[®] ANA-12 IgG test strips contain 3 consecutive control lines under the test strip number:

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

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



Result interpretation

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

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

Performance characteristics

Sensitivity

Sera from 71 patients suffering from clinically manifested connective tissues diseases were screened with *Seraline*[®] ANA-12 IgG for their specific antibody level. According to the clinical diagnosis the following Sensitivities were estimated.

Clinical diagnosis	Number [n]	Sensitivity [%]
SLE	42	86
Scleroderma	20	95
MCTD	2	100
Myositis	7	100
Total	71	89

In an external study serum samples from 160 patients have been tested with *Seraline*[®] ANA-12 IgG another commercially available test (test 1). The results have been evaluated for each single antigen and specificity and sensitivity of the comparative test were postulated as 100 %.

Antigens	Sensitivity	Specificity	Agreement
dsDNA	90.9% (30/33)	98.4 % (125/127)	96.9% (155/160)
Nucleosomen	71.0% (22/31)	99.2% (128/129)	93.8% (150/160)
Sm	96.2% (25/26)	99.3% (133/134)	98.8% (158/160)
P0	85.3% (29/34)	100% (126/126)	96.9% (155/160)
Histone	87.5% (28/32)	96.9% (124/128)	95.0% (152/160)
U1 snRNP	91.4% (32/35)	99.2% (124/125)	97.5% (156/160)
Ro/SS-A (60kDa)	100% (78/78)	95.1% (78/82)	97.5% (156/160)
Ro/SS-A (52kDa)	100% (71/71)	100% (89/89)	100% (160/160)
La/SS-B	100% (42/42)	97.5% (115/118)	98.1% (157/160)
ScI-70	100% (22/22)	100% (138/138)	100% (160/160)
CENP-B	100% (21/21)	100% (139/139)	100% (160/160)
Jo-1	61.9% (13/21)	100% (139/139)	95.0% (152/160)

Serum samples with discrepant results have been tested with a second commercial by available test (test 2). The agreement of results between *Seraline*[®] ANA-12 IgG and test 2 were as follows:

dsDNA: 3 of 5 discrepant samples were confirmed
Nucleosomen: 1/10 discrepant samples were confirmed
Sm: 2 of 2 discrepant samples were confirmed
P0: 3 of 5 discrepant samples were confirmed
Histones: 2 of 8 discrepant samples were confirmed
U1 snRNP: 4 of 4 discrepant samples were confirmed
Ro/SS-A (60kDa): 3 of 4 discrepant samples were confirmed
La/SS-B: 2 of 3 discrepant samples were confirmed
Jo-1: 7 of 8 discrepant samples were confirmed

Specificity

Diagnostic specificity was estimated by investigation of two panels of apparently healthy blood donors (panel 1: n = 120 and panel 2: n = 46).

Blood donors	Number [n]	Specificity [%]
Panel 1	120	97
Panel 2	46	95
Total	166	96

Limitations of the procedure

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

Interference

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

Common advices and precautions

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

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

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

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

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



History of changes

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



Manufacturer



Catalogue-No.



Lot-No.



Number of determinations



Biohazard



Notice advices



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use