





















SeraSpot[®] Vaskulitis-3 IgG

Spotimmunoassay zum quantitativen Nachweis von IgG-Autoantikörpern gegen PR3, MPO und GBM in Serum oder Plasma humanen Ursprungs

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



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

 UDI Eindeutige Produktidentifizierung	 IVD In-vitro Diagnostikum	 Hersteller
 Land der Herstellung und Datum der Herstellung	 Nicht wiederverwenden	 SN Seriennummer
 Begrenzung der Luftfeuchtigkeit	 Vor Sonnenlicht schützen	 REF Artikelnummer
 Gebrauchsanweisung beachten	 Verwendbar bis	 LOT Chargennummer
 Ausreichend für n Prüfungen	 Biologisches Risiko	 Temperaturbereich
		 Achtung

Zweckbestimmung

SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG ist ein IVD-Test zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörpern des IgG-Isotyps gegen die Antigene Proteinase 3 (PR3), Myeloperoxidase (MPO) und glomeruläre Basalmembran (GBM) in Serum oder Plasma (Citrat, EDTA, Heparin) humanen Ursprungs durch einen Fachanwender in Laborumgebung.

Der Test wird angewendet in Kombination mit dem Gerät Seramun SpotSight® plate mono / Seramun SpotSight® strip zur Bildaufnahme und der Software Seramun SpotSight® scan zur Bildanalyse.

Er dient der Diagnosehilfe von ANCA (Anti-neutrophile cytoplasmatische Antikörper)- assoziierten Vaskulitiden (AAV) sowie von Immunkomplexvaskulitiden in Proben von Patienten mit Verdacht auf eine Erkrankung der Blutgefäße.

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

Testprinzip

SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG Test ist ein Festphasenimmunoassay (Spotimmunoassay) basierend auf der Verwendung rekombinanter oder nativer gereinigter Antigene, die in Arrayanordnung (Spotarray) auf den Boden der Kavitäten von 96-well Mikrotiterplatten fixiert sind, und die als Fängermoleküle für Autoantikörper gegen Proteinase 3, Myeloperoxidase und glomeruläre Basalmembran dienen. Nach Inkubation werden ungebundene Komponenten durch Waschstreps entfernt und spezifisch gebundene Antikörper mittels Peroxidase (HRP)-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 ausbilden, entwickeln sich blaue Spots durch Präzipitation des Substrats. 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 min in einer Verdünnung von 1 : 101 in den ausgewählten Kavitäten. Entfernung der nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3-maliges Waschen der Kavitäten mit verdünntem Waschpuffer.

Schritt 2

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

Schritt 3

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 min mit Substrat SeramunBlau® spot dark. Stoppen der Reaktion durch Absaugen des Substrates. Entfernen von Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch. Die entwickelten Arrays sind bis zur Bildanalyse lichtgeschützt aufzubewahren.

Testkomponenten (Lieferumfang)

		Für 48 Bestimmungen	Für 96 Bestimmungen	Für 2 x 96 Bestimmungen	
1	WELLS	Mikrotiterplatte (Kavitäten mit Arrays) Vaskulitis-spezifische Antigene und Kontrollen als Spots in Arrayformat immobilisiert	6 teilbare 8er-Streifen im Rahmen Farbmarkierung rot vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	12 teilbare 8er-Streifen im Rahmen Farbmarkierung rot vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2 x 12 teilbare 8er Streifen im Rahmen Farbmarkierung rot vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF (10x)	Waschpuffer (10x) Seramun® Wash buffer A TRIS-basierter Puffer	100 mL Konzentrat für 1000 mL Lösung farblos weiße Kappe	100 mL Konzentrat für 1000 mL Lösung farblos weiße Kappe	2 x 100 mL Konzentrat für je 1000 mL Lösung farblos weiße Kappe
3	DIL	Probenpuffer Seramun® Sample diluent B	55 mL gebrauchsfertig rot gefärbt schwarze Kappe	2 x 55 mL gebrauchsfertig rot gefärbt schwarze Kappe	4 x 55 mL gebrauchsfertig rot gefärbt schwarze Kappe
4	CONJ HRP IgG	Konjugat anti-Human IgG-HRP Konjugat (Schaf)	8,0 mL gebrauchsfertig rot gefärbt rote Kappe	8,0 mL gebrauchsfertig rot gefärbt rote Kappe	2 x 8,0 mL gebrauchsfertig rot gefärbt rote Kappe
5	SUBSTR	Substrat SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	8,0 mL gebrauchsfertig farblos blaue Kappe	8,0 mL gebrauchsfertig farblos blaue Kappe	2 x 8,0 mL gebrauchsfertig farblos blaue Kappe
6	COVER	Abdeckfolie	2 Stück	2 Stück	4 Stück
7	SWAB	Tupfer 70 % (v/v) Isopropylalkohol	3 x 2 Stück	6 x 2 Stück	12 x 2 Stück
8		Analysenzertifikat	1 Stück	1 Stück	1 Stück
9		Gebrauchs-anleitung	1 Stück	1 Stück	1 Stück

Verwendete Antigene

Bezeichnung	Beschreibung	Klinische Relevanz
PR3	Proteinase 3	Wegener-Granulomatose (GPA)
MPO	Myeloperoxidase	Mikroskopische Polyangiitis (MPA); Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA, Churg-Strauss-Syndrom)
GBM	glomeruläre Basalmembran (GBM), α3 Kette des humanen Kollagen Typ IV	Immunkomplexvaskulitiden; anti-GBM Antikörper Erkrankung (Goodpasture-Syndrom)

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette • Verstellbare 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten • Reagenzienbehälter für Mehrkanal-Mikropipetten • Messzylinder • Teströhrchen für die Probenverdünnung • Teströhrchenständer • Mikrotiterplatten-Waschgerät • Laborsystem Seramun SpotSight® plate mono / strip Scanner mit angeschlossenem PC (Auswertesoftware Seramun SpotSight® scan) • deionisiertes Wasser • fusselfreies Filterpapier • Stoppuhr • Auffanggefäße für infektiöse und nicht-infektiöse Lösungen • lichtundurchlässige Abdeckung (Substrat-Reaktion)

Wichtige Hinweise



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

Die Gebrauchsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck und seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Komponenten aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nur für die Komponenten Probenpuffer, Waschpuffer und Substrat erlaubt.

Alle im Zusammenhang mit dem SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG auftretenden schwerwiegenden Vorkommnisse sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

Hinweise zur Testdurchführung

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

Bei größeren Probenreihen empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanalpipette, um Zeitverzögerungen zu vermeiden. Reagenzien mit Anzeichen einer Kontamination sollten nicht verwendet werden.

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

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Nicht korrekte Probenverdünnung, nicht korrektes 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.

Beschädigte Arrays durch **Kratzer** auf dem Boden der Kavitäten sind für die Auswertung nicht verwendbar.

Vor dem Erstellen von Images der entwickelten Kavitäten ist es notwendig, die Unterseite der Kavitäten von anhaftenden Fusseln mit dem im Kit enthaltenen Tupfer 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.

Arbeitsplatzanforderungen

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

Sicherheitshinweise

Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.

Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten.

Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potenziell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Zusätzliche Informationen über die Angaben in dieser Gebrauchsanleitung hinaus finden sich im Sicherheitsdatenblatt.

Das Produkt enthält folgende gefahrenbestimmende Substanz/en:

WELLS	-	Enthält Material tierischen Ursprungs.
WASHBUF (10x)	EUH208 EUH210	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen. Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich
DIL	EUH208 EUH210 -	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen. Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. Enthält Material tierischen Ursprungs.
CONJ HRP IgG	Gefahrbestimmende Komponente EUH208 H360D P202 P280 P308+P313 P501 -	N-Methyl-2-pyrrolidon; 1-Methyl-2-pyrrolidon Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen. Nur für gewerbliche Anwender. Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen. Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. Inhalt / Behälter gemäß den geltenden lokalen Vorschriften der Entsorgung zuführen. Enthält Material tierischen Ursprungs.
SWAB	Gefahrbestimmende Komponente H225 H319 H336 P210 P280 P304+P340 P305+P351+P338	2-Propanol; Isopropylalkohol; Isopropanol Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. Verursacht schwere Augenreizung. Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen. Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz / Gehörschutz tragen. BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

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

In seltenen Fällen können Proben Antikörper gegen BSA (Rinderserumalbumin) und / oder AGE (advanced glycation endproducts) enthalten, die unspezifische Reaktionen hervorrufen können, so dass das Testergebnis durch die Software Seramun SpotSight® scan als „nicht auswertbar“ („n.a.“) bewertet wird.

Behandlung der Proben

Probennahme

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

Probenhaltbarkeit und -lagerung

Serum- oder Plasmaproben humanen Ursprungs maximal 7 Tage bei 2...8 °C lagern. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei < -15 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

Probenvorbereitung

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

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

Beispiel: 10 µL Probe + 1000 µL Probenpuffer.

Behandlung der Reagenzien

Reagenzienhaltbarkeit und -lagerung

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

Reagenzienvorbereitung

Die **Mikrotiterplatte** mit teilbaren Streifen ist in einem aluminiumbeschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung **erst nach Erreichen der Raumtemperatur**. Nicht gebrauchte Streifen vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen.

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

Beispiel: 10 mL Waschpuffer (10x) + 90 mL deionisiertes Wasser. Der verdünnte Waschpuffer ist vor Verwendung gründlich zu durchmischen!

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

Testdurchführung

Die Durchführung erfolgt bei Raumtemperatur (RT, 18...25 °C). **Alle** gebrauchsfertigen Testreagenzien, den verdünnten Waschpuffer und die Mikrotiterplatte **auf Raumtemperatur erwärmen**.

Alle Reagenzien vor Gebrauch durch leichtes Schütteln mischen, Schaumbildung vermeiden. Die Durchführung der Absaug- und Waschschrte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Waschgerätes erfolgen.

Wichtige Hinweise zur Testdurchführung:

Mechanischer Kontakt (**Kratzen**) auf dem Boden der Kavitäten mit Pipettenspitzen oder Waschgerät-Nadeln ist zu **vermeiden**. Dadurch wird der Array irreparabel geschädigt!

Alle Flüssigreagenzien (verdünnte Probe, Konjugat und Substrat) sind **blasenfrei** in die Kavitäten einzubringen!

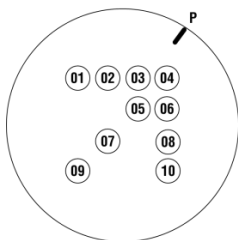
1. Benötigte Anzahl an Kavitäten **WELLS** entsprechend der Probenanzahl bereitstellen.
2. Herstellung der Arbeitsverdünnung der Probe: 1 : 101 Verdünnung
z.B. 10 µL Probe + 1000 µL Probenpuffer **DIL**
3. **100 µL** verdünnte Probe pro Kavität pipettieren.
4. Kavitäten mit Abdeckfolie **COVER** abkleben und **30 min** bei RT inkubieren.
5. Lösung absaugen. Kavitäten **3x** mit jeweils **400 µL** Waschpuffer waschen.
Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
6. **50 µL** des gebrauchsfertigen Konjugates **CONJ HRP IgG** (anti-Human IgG-HRP)
pro Kavität pipettieren.
7. Kavitäten mit Abdeckfolie **COVER** abkleben und **30 min** bei RT inkubieren.
8. Lösung absaugen. Kavitäten **3x** mit jeweils **400 µL** Waschpuffer waschen.
Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
9. **50 µL** des gebrauchsfertigen Substrats **SUBSTR** pro Kavität pipettieren.
10. Kavitäten abdecken und lichtgeschützt für **30 min** bei RT inkubieren.
11. Substrat absaugen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
12. Vor der Bildaufnahme die Unterseite der Kavitäten mit Tupfer **SWAB** abwischen.
13. **Bildaufnahme** der Kavitäten mit dem Laborsystem Seramun SpotSight® plate mono / strip
und Bildanalyse mit der Software Seramun SpotSight® scan.

Erfolgt die Bildaufnahme mit dem Scanner Seramun SpotSight® strip, sind die Mikrotiterplattenstreifen aus dem Plattenrahmen zu entnehmen und in die Streifenaufnahme des Scanners einzulegen.

Nach dem Absaugen des Substrats sind die entwickelten Spots bei Aufbewahrung im Dunkeln 24 h stabil.

Auswertung der Ergebnisse

Arraylayout



Antigene

- 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

Quantitative Auswertung

Gültigkeitskriterien für den Test

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

SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG 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 Färbintensität der Negativkontrolle muss kleiner als die der Cut-off Kontrolle sein.
4. Serumkontrolle (SC). Intensiv gefärbter Spot, immer angefärbt, wenn sich Probe in der Kavität befunden hat. Ein Ausbleiben 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 R1, immer angefärbt.
7. Referenz 3 (R3), entspricht 60 rel.Units. Schwächere Färbung als R2, immer angefärbt.

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

Sind die genannten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Die Abarbeitung muss gemäß Gebrauchsanleitung erfolgen (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, ist der Hersteller zu kontaktieren.

Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung erfolgt unter Verwendung des Laborsystems Seramun SpotSight® plate mono / strip in Kombination mit der Software Seramun SpotSight® scan.

Die Ergebnisse werden wie folgt interpretiert:

Bewertung	Bedingungen
Positiv	Farbintensität eines oder mehrerer Antigen-Spots > Cut-off Kontrolle
Negativ	Farbintensität der Antigen-Spots ≤ Cut-off Kontrolle

Leistungsmerkmale

Präzision

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden im SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG untersucht und die 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 (Lot-zu-Lot-VK) ermittelt.

Antigen	Intra-Assay-Variationskoeffizient		Inter-Assay-Variationskoeffizient		Lot-zu-Lot-Variationskoeffizient	
	\bar{x} rel.Units n=48	VK [%]	\bar{x} rel.Units n=80	VK [%]	\bar{x} rel.Units n=240	VK [%]
PR3	44,5	6,1	48,7	14,6	51,1	12,0
MPO	69,5	6,4	73,3	12,6	71,6	10,9
GBM	58,8	4,4	54,5	6,7	55,6	7,1
Durchführung	1 Bearbeiter 48 x Bestimmung 1 Charge		5 Bearbeiter 2 x Bestimmungen 2 x Durchführung pro Tag 20 Tage 1 Charge		5 Bearbeiter 2 x Bestimmungen 2 x Durchführung pro Tag 20 Tage 3 Chargen	

Messbereich (LoB, LoD, LoQ, Linearität, High-Dosis-Hook-Effekt)

LoB

Die Bestimmung der Hintergrundsignale (LoB, Limit of Blank) mittels Probenpuffer ohne Zugabe einer (Matrix)-Probe resultierte in folgenden LoB-Werten: PR3 9,1 rel.Units, MPO 0,5 rel.Units, GBM 0,1 rel.Units.

LoD

Die untere Nachweisgrenze als niedrigste Konzentration, bei der der Analyt innerhalb der Matrix nachgewiesen werden kann (LoD, Limit of Detection), wurde für PR3 mit 12,7 rel.Units, für MPO mit 6,2 rel.Units und für GBM mit 3,1 rel.Units bestimmt.

Linearität

Die Daten zeigen, dass zwischen dem Gehalt an Analyten in der Probe und dem Messwert eine lineare Relation im gesamten dynamischen Bereich des Tests vorliegt. Somit können Einflüsse der Probenmatrix ausgeschlossen und eine genaue Bestimmung des Analyten sichergestellt werden.

Festlegung der Grenzwerte

Die Daten aus den Studien zur Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung im Vergleich zu Referenztests wurden mittels ROC-Analyse (Receiver Operating Characteristics) zur Bestimmung des Wertes für die Cut-off Kontrolle verwendet.

Der Cut-off Bereich wird testspezifisch festgelegt.

Interferierende Substanzen

Alle getesteten Substanzen haben keine signifikanten Auswirkungen auf die Testergebnisse, wenn sie in stark erhöhten Konzentrationen im Serum vorhanden sind: Bilirubin C und F (Simulation ikterischer Proben) je 20 mg/dL; Hämoglobin (Simulation hämolytischer Proben) 500 mg/dL, Lipide (Triglyceride) (Simulation lipämischer Proben) 1000 mg/dL und Rheumafaktor 500 IU/mL.

Kreuzreaktivität

Serumproben von Patienten mit rheumatoiden Erkrankungen, welche Autoantikörper gegen CCP (cyclisches citrulliniertes Peptid) und antinukleäre Antikörper (ANA) aufweisen, zeigen keine Kreuzreaktivität im SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG. Die Spezifität beträgt 100 %.

Diagnostische Sensitivität

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden n=103 vorcharakterisierte positive Patienten-Proben untersucht. Die diagnostische Leistung wurde für jeden Parameter (PR3, MPO, GBM) im Vergleich zur klinischen Diagnose, ELISA-Referenz- und Immunfluoreszenz-Ergebnissen bestimmt.

PR3		Befund	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	60	0
	negativ	9	34
Proben gesamt		69	34

Diagnostische Sensitivität: 87,0 %

MPO		Befund	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	30	4
	negativ	0	69
Proben gesamt		30	73

Diagnostische Sensitivität: 100,0 %

GBM		Befund	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	6	0
	negativ	0	97
Proben gesamt		6	97

Diagnostische Sensitivität: 100,0 %

Diagnostische Spezifität

Zur Bestimmung der Spezifität wurden n=200 negative Blutspenderproben untersucht. Die diagnostische Leistung wurde für jeden Parameter (PR3, MPO, GBM) im Vergleich zur klinischen Diagnose, ELISA-Referenz- und Immunfluoreszenz-Ergebnissen bestimmt.

PR3		Befund	
		negativ	
SeraSpot®	positiv	8	
	negativ	192	
Proben gesamt		200	

Diagnostische Spezifität: 96,0 %

MPO		Befund	
		negativ	
SeraSpot®	positiv	1	
	negativ	199	
Proben gesamt		200	

Diagnostische Spezifität: 99,5 %

GBM		Befund	
		negativ	
SeraSpot®	positiv	2	
	negativ	198	
Proben gesamt		200	

Diagnostische Spezifität: 99,0 %

Positiver und negativer prädiktiver Wert

Aus den Studien wurden folgende PPV erhalten: PR3 88,2 %, MPO 96,8 % und GBM 75 %.

Aus den Studien wurden folgende NPV erhalten: PR3 95,5 %, MPO 100 % und GBM 100 %.

Likelihood Ratio

An allen Parametern des SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG wird eine hohe diagnostische Evidenz erreicht, welche sich in einer hohen positive Likelihood Ratio (LR+) und einer niedrigen negative Likelihood Ratio (LR-) widerspiegelt.

Es wurden folgende Werte für LR+ erreicht: PR3 22, MPO nähert sich gegen ∞ und GBM 100.

Es wurden folgende Werte für LR- erreicht: PR3 0,14, MPO 0 und GBM 0.

Applikation

Automatische Abarbeitung




Die vergleichenden Untersuchungen per Hand verdünnter positiver Proben zwischen manueller und automatischer Abarbeitung zeigen, dass die Abarbeitung des SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG am Mikrotiterplatten-Prozessor möglich ist. Daten wurden mit dem Gerät DS2® (Dynex Technologies) erhoben. Für die erstellte Regressionsgerade wurde ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 > 0,9$ für die Antigene (PR3, MPO, GBM) erreicht.


Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2022-09_v02_DE_EN	Wichtige Hinweise	Einfügen eines Hinweises zum Umgang mit schwerwiegenden Vorkommnissen
	Leistungsmerkmale	Cut-off wird testspezifisch festgelegt
	Gesamtes Dokument	Aktualisierung von Formulierungen und Korrektur von Schreibfehlern












SeraSpot[®] Vaskulitis-3 IgG

Spot immunoassay for the quantitative detection of IgG autoantibodies against PR3, MPO and GBM in serum or plasma of human origin

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



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

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

Intended Use

SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG is an IVD test for the quantitative determination of autoantibodies of the IgG isotype against the antigens proteinase 3 (PR3), myeloperoxidase (MPO) and glomerular basement membrane (GBM) in serum or plasma (citrate, EDTA, heparin) of human origin by a laboratory professional user.

The test is used in combination with the Seramun SpotSight® plate mono / Seramun SpotSight® strip device for image acquisition and the software Seramun SpotSight® scan for image analysis.

It is intended to aid in the diagnosis of ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies)- associated vasculitis (AAV) and immune complex vasculitis in specimen materials from patients with suspicion of a blood vessel disease.

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

Principle of the Test

SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG is a solid phase immunoassay (spot immunoassay) using recombinant or native purified antigens printed in array format (spot array) on the bottom of wells of 96-well microtiter plates. Autoantibodies will bind to the immobilized antigens Proteinase 3, Myeloperoxidase und Glomerular Basement Membrane. After incubation and wash steps bound antibodies are detected by horseradish peroxidase (HRP)-labeled antibodies against human antibodies of IgG-isotype by substrate reaction with hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). Blue spots indicate the formation of immune complexes. Spots range from pale to dark blue and are visible by eye.

Detection of Specific Antibodies is Performed in 3 Steps:

Step 1

Incubation of 1 : 101 diluted samples for 30 min at room temperature in selected wells. After incubation samples are aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash buffer.

Step 2

Incubation of wells with the HRP-labeled anti-Human IgG for 30 min at room temperature. Removal of unbound conjugate antibodies by aspiration and 3 wash cycles with wash buffer.

Step 3

Incubation of wells with substrate SeramunBlau® spot dark for 30 min at room temperature. The reaction is stopped by aspirating the substrate, followed by tapping the plate / strip dry onto lint-free absorbent paper. The developed arrays are to be stored light-protected until image analysis.

Test Components (Delivery Scope)

			For 48 determinations	For 96 determinations	For 2 x 96 determinations
1	WELLS	Microtiter plate (wells with arrays) Vasculitis-specific antigens and controls immobilized as spots in array layout	6 single breakable 8-well strips in frame color coding: red vacuum sealed with desiccant	12 single breakable 8-well strips in frame color coding: red vacuum sealed with desiccant	2 x 12 single breakable 8-well strips in frame color coding: red vacuum sealed with desiccant
2	WASHBUF (10x)	Wash buffer (10x) Seramun® Wash buffer A 10x TRIS-based buffer	100 mL concentrate for 1000 mL buffer colorless white cap	100 mL concentrate for 1000 mL buffer colorless white cap	2 x 100 mL concentrate for each 1000 mL buffer colorless white cap
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent B	55 mL ready-to-use solution colored red black cap	2 x 55 mL ready-to-use solution colored red black cap	4 x 55 mL ready-to-use solution colored red black cap
4	CONJ HRP IgG	Conjugate anti-Human IgG-HRP conjugate (sheep)	8.0 mL ready-to-use solution colored red red cap	8.0 mL ready-to-use solution colored red red cap	2 x 8.0 mL ready-to-use solution colored red red cap
5	SUBSTR	Substrate SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	8.0 mL ready-to-use solution colorless blue cap	8.0 mL ready-to-use solution colorless blue cap	2 x 8.0 mL ready-to-use solution colorless blue cap
6	COVER	Covering film	2 pieces	2 pieces	4 pieces
7	SWAB	Swab 70 % (v/v) Isopropyl alcohol	3 x 2 pieces	6 x 2 pieces	12 x 2 pieces
8		Certificate of Analysis	1 piece	1 piece	1 piece
9		Instructions for Use	1 piece	1 piece	1 piece

Antigens Used

Name	Description	Clinical relevance
PR3	Proteinase 3	Wegener's granulomatosis (GPA)
MPO	Myeloperoxidase	Microscopic polyangiitis (MPA); Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA, Churg-Strauss-Syndrome)
GBM	Glomerular basement membrane (GBM), α3 chain of human collagen type IV	Immune complex vasculitis anti-GBM antibody disease (Goodpasture-Syndrome)

Additional Materials and Aids Required for the Test Procedure

Adjustable single-channel micro-pipettes • adjustable 8-channel micro-pipette or multi-pipette • reagent container for multi-channel micro-pipettes • measuring cylinder • test tubes for sample dilution • test tube rack • washer for 96-well microtiter plates • laboratory system: Seramun SpotSight® plate mono / strip scanner with evaluation software Seramun SpotSight® scan • deionized water • lint-free absorbent paper • stop watch • collecting devices for infectious material • opaque cover (substrate reaction)

Important Information



This device is for *in-vitro* diagnostic use only. The kit may be performed by A laboratory professional user only.

Follow the instructions carefully. The shelf life specified must be observed. Do not use reagents from damaged packages or bottles. Do not use reagents from other manufacturers.

Mixing of test kit components of different lots is only allowed for sample diluent, wash buffer and substrate.

All serious incidents occurring in relation with the SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG must be reported to the manufacturer and the competent authority of the EU member state in which the user and/or the patient are located.

Information on Assay Procedure

All reagents should be stored at 2...8 °C. Bring all components to room temperature before use.

For larger sample series, pipetting reagents from liquid reservoirs using a multi-channel pipette is recommended to avoid time delays. Reagents that appear contaminated should not be used.

Avoid time delays when dispensing reagents.

Substrate must be protected from direct light!

Incorrect dilution of samples, incorrect washing of wells and incorrect timing may lead to erroneous results.

Air bubbles generated by forceful pipetting of samples and/or reagents may cause uneven signal formation of arrays. These arrays cannot be evaluated.

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

Before taking images of the wells make sure to remove particles or fibers which may adhere to the bottom side of the wells using the swab provided in the kit.

Images of dried spots may appear more intense, which can lead to slight deviations of the measured values when scanned repeatedly. Assessment of the individual parameters is not changed.

Workplace Requirements

Processing spot immunoassays requires a clean workplace. Adhesion of fibers to the plastic surface of the wells should be avoided. Fibers may cause interferences when taking images of arrays and cause erroneous results. Workplace and kit components should not be exposed to direct sunlight.

Safety Instructions

Reagents must not be swallowed. Contact with skin or mucous membranes should be avoided. Some reagents may contain biocides as preservative. Handle all components and patient samples as if potentially hazardous and infectious.

Additional information may be taken from the Material Safety Data Sheet.

Product contains the following hazardous component/-s:

WELLS	-	Contains material of animal origin.
WASHBUF (10x)	EUH208 EUH210	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Safety data sheet available on request.
DIL	EUH208 EUH210 -	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Safety data sheet available on request. Contains material of animal origin.
CONJ HRP IgG	Hazard components EUH208 H360D P202 P280 P308+P313 P501 -	N-methyl-2-pyrrolidone; 1-methyl-2-pyrrolidone Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Restricted to professional users. May damage the unborn child. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection. IF exposed or concerned: Get medical advice / attention. Dispose of contents / container to in accordance with local regulations. Contains material of animal origin.
SWAB	Hazard components H225 H319 H336 P210 P280 P304+P340 P305+P351+P338	Propan-2-ol; isopropyl alcohol; isopropanol Highly flammable liquid and vapour. Causes serious eye irritation. May cause drowsiness or dizziness. Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking. Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection. IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Limitations of the Procedure

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

In rare cases, specimens may contain antibodies to BSA (bovine serum albumin) and / or AGE (advanced glycation end products), which may cause nonspecific reactions, so that the test result is read as "not available" ("n.a.") by the Seramun SpotSight® scan software.

Sample Treatment

Sample Collection

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

Sample Shelf Life and Storage

Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 7 days. For longer periods samples have to be stored at < -15 °C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided!

Sample Preparation

Bring samples to room temperature before use. Homogeneity should be ensured by shaking components briefly.

Samples have to be diluted 1 : 101 (v/v) with sample diluent. Example: 10 µL sample and 1000 µL sample diluent.

Reagent Treatment

Reagent Shelf Life and Storage

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

Reagent Preparation

Allow all components to reach **room temperature** prior to use. The **microtiter plate** is vacuum sealed 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 at 2...8 °C and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

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

Example: 10 mL wash buffer (10x) + 90 mL deionized water. The prepared wash buffer must be thoroughly mixed before use.

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

Assay Procedure

Performance at room temperature (RT, 18...25 °C). Bring **all** ready-to-use test reagents, prepared wash buffer and microplate to **room temperature**. Mix all reagents before use by gently shaking, avoid foaming.

The aspiration and washing steps can be carried out manually or with the aid of a microtiter plate washer.

Important Notes on Test Procedure:

Avoid mechanical contact (**scratching**) on the bottom of the wells with pipette tips or washer needles. This will irreparably damage the array!

All liquid reagents (sample, conjugate and substrate) have to be pipetted **without** causing **air bubbles** in the wells.

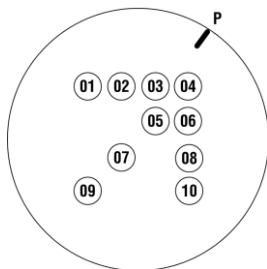
1. Provide the required number of wells **WELLS** according to the number of samples.
2. Preparation of working dilution of the sample: 1 : 101 dilution
e.g. 10 µL sample to 1000 µL sample diluent **DIL**
3. Pipette **100 µL** diluted sample per well.
4. Cover plate with covering film **COVER** and incubate for **30 min** at RT.
5. Remove liquid, then wash wells **3x** using **400 µL** wash buffer per well, Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
6. **Add 50 µL** of the conjugate **CONJ HRP IgG** (anti-Human IgG-HRP) to each well.
7. Cover plate with covering film **COVER** and incubate for **30 min** at RT.
8. Remove liquid, then wash wells **3x** using **400 µL** wash buffer per well, Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
9. **Add 50 µL** of the substrate **SUBSTR** to each well.
10. Cover plate and protect from light. Incubate for **30 min** at RT.
11. Remove liquid. Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
12. Clean bottom of wells with swab **SWAB** shortly before scanning the images.
13. **Take images** using the Seramun SpotSight® plate mono / strip und 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 scanner's strip holder.

After aspiration of the substrate the color of developed spots is stable for 24 h when the plate is stored protected from light.

Evaluation of Results

Arraylayout



Antigens

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

Quantitative Evaluation

Validity Criteria for the Test

The spots NC, CO, R1 ... R3 are used to create a reference curve (4-parameter non-linear regression) to calculate the staining intensities of the antigen spots in relative units (rel.Units).

SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG includes the following control spots:

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

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

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

Interpretation of Results

Evaluation of the test has to be performed by using the Seramun SpotSight® plate mono / strip and in combination with the Seramun SeraSpot® scan software.

The results are interpreted as follows:

Evaluation	Conditions
Positive	Color intensity of one or more antigen spots > cut-off control
Negative	Color intensity of the antigen spots ≤ cut-off control

Performance Characteristics

Precision

Samples with known antibody reactivity were examined in the SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG and rel.Units were determined. These values were then used to determine the coefficients of variation (CV) as a measure of the precision within a test run (intra-assay CV), between different test runs (inter-assay CV) and between different test lots (lot-to-lot CV).

Antigen	Intra-assay coefficient of variation		Inter-assay coefficient of variation		Lot-to-lot coefficient of variation	
	\bar{x} rel.Units n=48	CV [%]	\bar{x} rel.Units n=80	CV [%]	\bar{x} rel.Units n=240	CV [%]
PR3	44.5	6.1	48.7	14.6	51.1	12.0
MPO	69.5	6.4	73.3	12.6	71.6	10.9
GBM	58.8	4.4	54.5	6.7	55.6	7.1
Procedure	1 operator 48 determinations 1 batch		5 operators 2 determinations 2 testings per day 20 days 1 batch		5 operators 2 determinations 2 testings per day 20 days 3 batches	

Limits of Detection (LoB, LoD, LoQ, High-Dose-Hook-Effect)

LoB

Determination of the background signals (LoB, Limit of Blank) using sample dilution buffer without addition of a (matrix) sample resulted in the following LoB values: PR3 9.1 rel.Units; MPO 0.5 rel.Units, GBM 0.1 rel.Units.

LoD

The lower detection limit, as the lowest concentration at which analyte can be detected within the matrix (LoD, Limit of Detection), was determined with 12.7 rel.Units for PR3, with 6.2 rel.Units for MPO and with 3.1 rel.Units for GBM.

Linearity

Data show a linear relationship between the level of analyte in the sample and the measured value throughout the dynamic range of the test. Thus, influences of the sample matrix can be excluded and a correct determination of the analyte can be ensured.

Determination of the Cut-off Value

Data from sensitivity and specificity studies compared to reference tests were used to determine the value for the cut-off control by ROC analysis (Receiver Operating Characteristics). The cut-off range is determined specifically for each test.

Interfering Substances

All tested substances do not have a significant impact on the test results even if present in elevated concentrations in the serum: 20 mg/dL bilirubin C and F each (simulation of icteric samples), 500 mg/dL hemoglobin (simulation of hemolytic samples), 1000 mg/dL lipids (triglycerides) (simulation of lipemic samples) and 500 IU/mL rheumatoid factor.

Cross Reactivity

Serum samples from patients with rheumatoid diseases, with autoimmune antibodies against CCP (cyclic citrullinated peptide) and antinuclear antibodies (ANA), show no cross-reactivity in the SeraSpot® Vasculitis-3 IgG. The specificity amounts to 100 %.

Diagnostic Sensitivity

Pre-characterized positive patient samples (n=103) were analyzed to determine the sensitivity. Performance was verified for each parameter (PR3, MPO, GBM) in comparison to clinical diagnosis, reference ELISA and immunofluorescence results.

PR3		Diagnosis	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	60	0
	negative	9	34
Sample total		69	34

Diagnostic Sensitivity: 87.0 %

MPO		Diagnosis	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	30	4
	negative	0	69
Sample total		30	73

Diagnostic Sensitivity: 100.0 %

GBM		Diagnosis	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	6	0
	negative	0	97
Sample total		6	97

Diagnostic Sensitivity: 100.0 %

Diagnostic Specificity

Negative blood donor samples (n=200) were analyzed to determine the diagnostic specificity. Performance was verified for each parameter (PR3, MPO, GBM) in comparison to clinical diagnosis, reference ELISA and immunofluorescence results.

PR3		Diagnosis
		negative
SeraSpot®	positive	8
	negative	192
Sample total		200

Diagnostic Specificity: 96.0 %

MPO		Diagnosis
		negative
SeraSpot®	positive	1
	negative	199
Sample total		200

Diagnostic Specificity: 99.5 %

GBM		Diagnosis
		negative
SeraSpot®	positive	2
	negative	198
Sample total		200

Diagnostic Specificity: 99.0 %

Positive and Negative Predictive Value

The following PPV were obtained from the studies: PR3 88.2 %; MPO 96.8 %, GBM 75 %.

The following NPV were obtained from the studies: PR3 95.5 %; MPO 100 %, GBM 100 %.

Likelihood Ratio

High diagnostic evidence is achieved for all parameters of SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG, which corresponds with a high positive likelihood ratio (LR+) and a low negative likelihood ratio (LR-).

The following LR+ were obtained from the studies: PR3 22; MPO close to ∞ , GBM 100.

The following LR- were obtained from the studies: PR3 0.14; MPO 0, GBM 0.

Application

Automated Workflow

Manually diluted positive samples were assayed side by side in SeraSpot® Vaskulitis-3 IgG, by hand and by use of an automatic microplate processor. Data were generated with the device DS2® (Dynex Technologies). The correlation was calculated with $R^2 > 0.9$ for the antigens PR3, MPO, GBM. Assay procedure using an automatic microplate processor such as DS2® is possible.

Change History

Version	Section	Modifications
2022-09_v02_DE_EN	Important Information	Insertion note on dealing with serious incidents
	Performance characteristics	Cut-off range is determined specifically for each test.
	Entire document	Updating of wording and correction of spelling mistakes

References

1. Charles LA, Caldas MLR, Falk RJ et al, Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *J Leukocyte Biol* 1991, 50, 539-546.
2. 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.
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 anti-cytoplasmic antibodies. *Arch Intern Med* 1989, 149, 2461-2465.
5. 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.
6. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K. et al, Nomenclature of systemic vasculitides: proposal of an international conference. *Arthritis Rheumatol* 1994, 37, 187-192.
7. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA et al. 2012 revised international Chapel Hill consensus conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum.* 2013; 65: 1-11
8. Ozaki S, ANCA associated vasculitis: Diagnostic and therapeutic strategy. *Allergol. Int.* 2007, 56, 87-96.
9. Papiris SA, Manali ED, Kalomenidis I et al, Bench-to-bedside review: Pulmonary-renal syndromes- an update for the intensivist. *Critical Care* 2007, 213.
10. Salama AD, Levy J, Lightstone L et al, Goodpasture's disease. *Lancet* 2001, 358, 917-920.
11. Weiss SJ, Tissue destruction by neutrophils. *New Engl. J Med* 1989, 320, 365-376.