

Produkt- und Gebrauchsinformation

Seraline[®] Vaskulitis-3 IgG

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

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



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

Vertrieb

Virotech Diagnostics GmbH · Löwenplatz 5 · 65428 Rüsselsheim · Germany · www.virotechdiagnostics.com
Telefon +49 (0) 6142 6909 0 · Fax +49 (0) 6142 6909 19 · info@virotechdiagnostics.com

Einführung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Literatur:

1. Jenette JC, Falk RJ, Andrassy K. et al, Nomenclature of systemic vasculitides: proposal of an international conference. *Arthritis Rheumatol* 1994, 37, 187-192.
2. Charles LA, Caldas MLR, Falk RJ et al, Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *J Leukocyte Biol* 1991, 50, 539-546.
3. Churg J, Churg A, Idiopathic and secondary vasculitis: a review. *Mod. Pathol.* 1989, 2, 144-160.
4. Cohen Tervaert JW, van der Waude FJ, Fauci, AS et al, Association between active Wegener's Granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Arch Intern Med* 1989, 149, 2461-2465.
5. Weiss SJ, Tissue destruction by neutrophils. *New Engl. J Med* 1989, 320, 365-376.
6. Ozaki S, ANCA associated vasculitis: Diagnostic and therapeutic strategy. *Allergol. Int.* 2007, 56, 87-96.
7. Chen M, Yu F, Wang SX et al, Renal histology in Chinese patients with anti-myelo-peroxidase autoantibody-positive Wegener's granulomatosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 22, 139-145.
8. Papiris SA, Manali ED, Kalomenidis I et al, Bench-to-bedside review: Pulmonary-renal syndromes- an update for the intensivist. *Critical Care* 2007, 213.
9. Salama AD, Levy J, Lightstone L et al, 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 *Seraline*[®] Vaskulitis-3 IgG ist ein empfindlicher Line Immunoassay (LIA) zum Nachweis von Autoantikörpern vom IgG Isotyp gegen folgende Antigene: Proteinase 3, Myeloperoxidase und glomeruläres Basalmembranprotein in humanem Serum oder Plasma.

Testprinzip

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

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

Schritt 1

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

Schritt 2

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

Schritt 3

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

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

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

Vorbereitung und Lagerung der Proben

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

Testkomponenten

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

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

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

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Mit einem Testbesteck können 20 Bestimmungen durchgeführt werden.

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

Vorbereitung und Verwendung

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

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

Testdurchführung

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

Arbeitsschritte

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

Achtung:

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

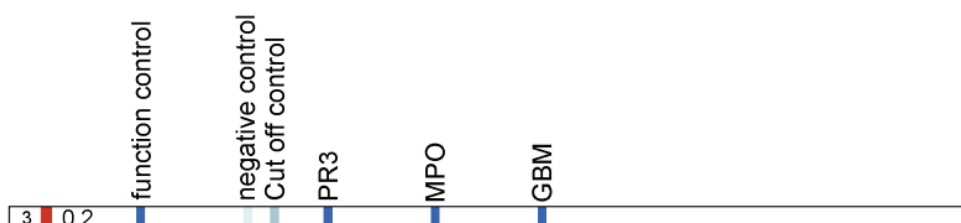
Auswertung

Gültigkeitskriterien für den Test

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

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

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



Interpretation der Ergebnisse

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

Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

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

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

Leistungsmerkmale

Sensitivität

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

MPO:

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

Übereinstimmung: 92%

PR3:

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

Übereinstimmung: 90%

GBM:

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

Übereinstimmung: 88%

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

Antigen	Sensitivität	Spezifität	Übereinstimmung
MPO	97.2% (35/36)	100% (81/81)	99.1% (116/117)
PR3	100% (24/24)	91.4% (85/93)	93.2% (109/117)
GBM	100% (16/16)	100% (101/101)	100% (117/117)

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

Spezifität

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

Grenzen der Methode

Eine Interpretation des Ergebnisses soll nur in enger Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Wie bei allen immunologischen Bestimmungsmethoden können Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze zu inkorrekten Ergebnissen führen.

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

Interferenz

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

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Teststreifen und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Teststreifen dürfen nur mit einer Kunststoffpinzette gehandhabt werden. Vor Testbeginn sollten im Protokollvordruck Probenidentifikationsnummer, Teststreifennummer und Chargennummer notiert werden. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Wasch- und Inkubationspuffer und Substrat.** Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien (2, 3, 4) enthalten geringe Mengen Kathon (1,0% v/v) als Konservierungsmittel. 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!**



