

## ANA ViraChip® IgG Test Kit 2.0

### Gebrauchsanweisung



Chip-Immunoblot zum qualitativen Nachweis von **IgG** Autoantikörpern gegen spezifische **nukleäre** und **zytoplasmatische** Antigene in humanem Serum im Rahmen der Autoimmundiagnostik.

Der **ANA ViraChip® IgG Test Kit 2.0** ist ein Immunoblot auf Basis eines Enzym-Immunoassays im Microarray-Format, bei dem folgende aufgereinigte ANA-spezifische Antigene verwendet werden: **dsDNA, Sm, Sm/RNP, PCNA, P0, SS-A 52, SS-A 60 (Ro), SS-B (La), Scl-70, CENP B, Jo-1, PM/Scl** und **DFS70**. Zusätzlich ist eine **DNA-Spezifitätskontrolle** zur Bewertung der spezifischen Reaktivität des dsDNA Spottriplets aufgetragen.

Der ANA ViraChip® IgG Test Kit 2.0 ist nach der Richtlinie **98/79/EG** hergestellt.

### Testprinzip

Am Boden jeder Kavität einer 96 well Standard-Mikrotiterplatte (MTP) befindet sich eine Nitrozellulose-Membran auf der Antigene als Analytspots fixiert sind (Microarray). Während der Seruminkubation binden nukleäre und zytoplasmatische Autoantikörper im Patientenserum an die fixierten Antigene auf dem Microarray. Während der Konjugatinkubation bindet das Konjugat an den Antigen-Antikörper-Komplex. Nach Zugabe der Chromogen / Substratlösung setzt die an den Konjugat-Antikörper gebundene Alkalische Phosphatase das Chromogen / Substrat um und färbt damit den Antigen-Antikörper-Komplex auf dem Microarray lila bis schwarz an. Nach der Seruminkubation, der Konjugatinkubation und der Chromogen / Substratinkubation erfolgt jeweils ein Waschschritt zur Entfernung ungebundener Antikörper und Reagenzien.

Jeder Microarray beinhaltet neben den Analytspots folgende Kontrollspots: **Serumkontrollen, Konjugatkontrollen, Kalibratorkontrollen** und eine **Negativkontrolle**. Die Analytspots dienen dem Nachweis von Antikörpern gegen die nukleären und zytoplasmatischen Antigene **dsDNA, Sm, Sm/RNP, PCNA, P0, SS-A 52, SS-A 60 (Ro), SS-B (La), Scl-70, CENP B, Jo-1, PM/Scl** und **DFS70**. Zusätzlich ist eine **DNA-Spezifitätskontrolle** zur Bewertung der spezifischen Reaktivität des dsDNA Spottriplets aufgetragen.

Zur eindeutigen Kennzeichnung sind die Kavitäten farblich kodiert: Dazu ist der ANA ViraChip® IgG durch einen **orangenen Vollkreis** auf dem Kavitätenrand markiert.

Best.-Nr.:	<b>V-ANCGOK</b>
Packungsgröße:	<b>MTP à 96 einzelbrechbaren Kavitäten</b>
Probenmaterial:	<b>10 µl Serum</b>
Testdauer:	<b>ca. 130 Minuten</b>

### Kitinhalt

1 MTP à 96 Kavitäten	<b>ANA ViraChip® IgG Antigen Coated Wells</b> Einzelbrechbare Kavitäten mit ViraChip® Microarrays, gebrauchsfertig	(Prod.-Nr.: V-ANCGAC)
12 ml	<b>ViraChip® AP-Anti-Human IgG Conjugate</b> Anti-human IgG Konjugatlösung für ViraChip® Teste, aus Ziege, mit boviner alkalischer Phosphatase, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-UVCGKI)
100 ml	<b>ViraChip® / ViraStripe® / ViraBlot® Diluent / Wash Buffer</b> Waschpuffer-Konzentrat für ViraChip® Teste, mit Detergenzien und Salzen zum Verhindern unspezifischer Bindungen, 10-fach	(Best.-Nr.: V-UVNUWP)
12 ml	<b>ViraChip® Chromogen / Substrate Solution</b> Chromogen/Substratlösung für ViraChip® Teste, mit BCIP / NBT, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-UVCUCS)

**Zusätzlich erforderlicher Puffer für die Probenverdünnung**, wird separat mitgeliefert

50 ml	<b>ViraChip® Sample Buffer</b> Probenpuffer für ViraChip® Teste, mit Milchpulver, Detergenzien und Salzen zum Verhindern unspezifischer Bindungen, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-UVCUPP)
-------	---	-----------------------

### Optional erhältlich

1 MTP-Riegel à 8 Kavitäten	<b>ANA ViraChip® IgG Antigen Coated Wells (8)</b> Einzelbrechbare Kavitäten mit ViraChip® Microarrays, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-ANCGRT)
330 µl	<b>ANA ViraChip® IgG Positive Control</b> IgG positives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-ANCGPK)
330 µl	<b>ANA ViraChip® IgG Negative Control</b> IgG negatives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-ANCGNK)

### Zusätzlich geforderte Ausrüstung

1. <b>ViraChip Software®</b>	zum Vorbereiten, Durchführen und Auswerten des Testlaufes, ab v1.3.0-1960	(Best.-Nr.: V-VCNUPR)
2. <b>2D-Barcode Scanner</b>	zum Lesen der DataMatrix-Codes	
3. <b>Mikrotiterplatte</b> mit 96 Leerkavitäten	zum Auffüllen angefangener Riegel der Mikrotiterplatte im Halterahmen	(Best.-Nr.: V-UVNMTP)
4. <b>Orbitalschüttler (750 rpm)</b> oder <b>Linearschüttler (20 Hz)</b>	zur Durchmischung von Proben und Reagenzien während der Prozessierung	
5. <b>ViraChip® Scanner</b> oder <b>ViraChip® Reader</b>	zur Digitalisierung / Messung entwickelter ViraChip® Teste, ab ViraChip® Scanner v1.0 bzw. ViraChip® Reader Rev.01	(Best.-Nr.: V-UVCSA) (Best.-Nr.: V-UVCCAM)
6. Optional: <b>Ventilator/ Lüfter</b>	zur schnelleren Trocknung der entwickelten Mikrotiterplatten	

### Vorbereiten der Reagenzien und der Patientenproben

**Alle Reagenzien und die verpackte Mikrotiterplatte vor Gebrauch auf Raumtemperatur (RT: 20-23°C) bringen. Alle Reagenzien vor Gebrauch gut durchmischen.**

<b>Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung:</b>	<b>Waschpuffer-Konzentrat 1:10</b> in destilliertem oder deionisiertem Wasser (H <sub>2</sub> O) verdünnen: 100 ml Waschpuffer-Konzentrat + 900 ml H <sub>2</sub> O
<b>Probenpuffer:</b>	Gebrauchsfertig
<b>Konjugatlösung:</b>	Gebrauchsfertig
<b>Chromogen / Substratlösung:</b>	Gebrauchsfertig

2947\_ANA\_ViraChip\_IgG\_2.0\_AL\_de

© Copyright VIRAMED Biotech AG November 2019 1108/1608

## ANA ViraChip® IgG Test Kit 2.0

- 2 -

- MTP-Kavitäten:** Die Mikrotiterplatte (MTP) vorsichtig aus der Verpackung entnehmen und die benötigte Anzahl an Kavitäten in einen leeren Mikrotiterplattenrahmen stecken (Vorbereiten und Durchführen des Testlaufes, Punkt 3). Nach Entnahme aus der Verpackung Kavitäten sofort verwenden. Nicht benötigte Kavitäten sofort wieder in die Originalverpackung zurückgeben, dicht verschließen und bei 2-8°C lagern.
- Patientenproben:** Die Patientenproben werden in einer **1:76** Verdünnung eingesetzt, z.B. **10 µl Patientenprobe + 750 µl Probenpuffer**. Von der verdünnten Probe werden bei der Prozessierung 100 µl benötigt.
- Kontrollen:** Bei Bedarf wird das positive und das negative Kontrollserum in einer **1:16** Verdünnung eingesetzt, z.B.: **10 µl Kontrollserum + 150 µl Probenpuffer**. Von der verdünnten Kontrolle werden bei der Prozessierung 100 µl eingesetzt.

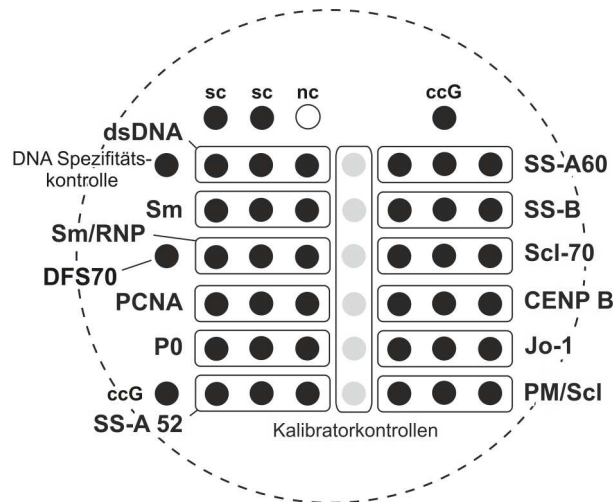
**Aufbau des ANA ViraChip® IgG Microarrays**
**Antigene:**

Folgende Antigene sind drei Mal in identischer Konzentration als Spottriplett aufgetragen: **dsDNA, Sm, Sm/RNP, PCNA, P0, SS-A 52, SS-A 60 (Ro), SS-B (La), Scl-70, CENP B, Jo-1, PM/Scl**. Zusätzlich ist das **DFS70** Antigen als einzelner Spot aufgetragen.

**Kontrollen:**

Jede ViraChip® Kavität enthält folgende integrierten Kontrollen:

Zwei Serumkontrollen (sc), eine Negativkontrolle (nc), zwei IgG Konjugatkontrollen (ccG) und sechs Kalibratorkontrollen (cal). Zusätzlich ist eine **DNA-Spezifitätskontrolle** zur Bewertung der spezifischen Reaktivität des dsDNA Spottriplets aufgetragen.



**Abbildung 1:** Abbildung einer Kavität aus der Mikrotiterplatte mit dem ANA ViraChip® IgG Microarray (vergrößert). Anordnung der Spottriplets für Antigene und der Spots für integrierte Kontrollen.

**Nomenklatur der nukleären und zytoplasmatischen Antigene**

Antigen:	Bemerkungen:
ds DNA	Doppelstrang DNA
Sm	Smith Antigen
Sm/RNP	Smith Antigen/ Ribonukleoprotein
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
P0	Ribosomales Phosphoprotein
SS-A 52	Sjögren Syndrom Antigen A, 52 kDa
SS-A 60	Sjögren Syndrom Antigen A, 60 kDa
SS-B	Sjögren Syndrom Antigen B
Scl-70	Topoisomerase I
CENP B	Centromer B Antigen
Jo-1	Histidyl-t-RNA-Synthetase
PM/Scl	Exoribonuklease
DFS70	Dense Fine Speckled 70 Antigen, 70kDa

## Vorbereiten und Durchführen des Testlaufes

Bei automatisierter Prozessierung können sich Inkubationszeiten, Volumina und die Reihenfolge der einzelnen Arbeitsschritte von der im Folgenden aufgeführten Arbeitsvorschrift unterscheiden. Eine detaillierte Schritt-für-Schritt Anleitung für die verwendete Automationslösung sowie eine Anleitung für die Benutzung der ViraChip® Software wird bei der Einrichtung der Geräte und Schulung durch die Viramed Biotech AG zur Verfügung gestellt. Siehe auch Abschnitt „Hinweise zu Geräten und Software“.

### 1. Belegen

Testauswahl und Eintrag der Probanddaten in den Belegungsplan der ViraChip® Software.

### 2. Bestücken

Scannen der 2D-Barcodes auf den Etiketten des Test Kits und der Mikrotiterplatte, zur Übertragung der Chargennummern und der chargen-spezifischen Faktoren (lot specific factors).

### 3. Prozessieren

Alle Schritte der Prozessierung bei RT durchführen.

#### 3.1 Vorbereitung

- Die gemäß der Belegung definierte Anzahl an Kavitäten in den Halterahmen setzen.
- Leere Positionen eines Riegels der Mikrotiterplatte im Halterahmen mit Leerkavitäten auffüllen. Die Riegel sind auf der Mikrotiterplatte mit 1-12 gekennzeichnet.

Darauf achten, dass beim Brechen der Riegel keine Kunststoffpartikel in die Kavitäten fallen.

#### 3.2 Vorinkubation

- Je Kavität 300 µl Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben.
- 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

#### 3.3 Seruminkubation

- Gemäß dem Belegungsplan 100 µl verdünnte Patientenprobe bzw. 100 µl verdünntes Kontrollserum der entsprechenden Kavität zugeben.
- 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

#### 3.4 3 x waschen

- Je Kavität 300 µl Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben.
- 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

Absaugnadeln so einstellen bzw. Pipetten so verwenden, dass die Kavitätenböden nicht beschädigt werden.

#### 3.5 Konjugatinkubation

- Je Kavität 100 µl Konjugatlösung zugeben.
- 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

Die Kavitätenböden müssen während den Inkubationsschritten vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein.

#### 3.6 3 x waschen

- Je Kavität 300 µl Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben.
- 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

Während der Inkubations- und Waschschriffe einen Orbitalschüttler, einstellbar auf eine Frequenz von ca. 750 rpm, oder einen Linearschüttler, einstellbar auf eine Frequenz von ca. 20 Hz, verwenden.

#### 3.7 1 x waschen

- Je Kavität 300 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser zugeben.
- 1 Minute bei RT inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

#### 3.8 Substratinkubation

- Je Kavität 100 µl Chromogen/Substratlösung zugeben.
- 15 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Stoppen: Flüssigkeit absaugen.

#### 3.9 3 x waschen

- Je Kavität 300 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser zugeben.
- Keine Zwischeninkubation.
- Flüssigkeit absaugen.

#### 3.10 Kavitäten trocknen

20 Minuten bei maximal 60% Luftfeuchtigkeit unter kontinuierlichem Luftstrom trocknen lassen.

Bei höherer Luftfeuchtigkeit kann sich die Trockenzeit verlängern. Alternativ 12 Stunden lichtgeschützt bei RT trocknen lassen.

### 4. Scannen

ViraChip® Microarrays mit dem ViraChip® Scanner oder dem ViraChip® Reader messen.

Messungen der ViraChip® Microarrays sind innerhalb von 24 Stunden nach Prozessierung durchzuführen (Mikrotiterplatte lichtgeschützt aufbewahren). Die genaue Durchführung bitte dem Geräte-Handbuch entnehmen.

## 5. Analysieren

### 5.1 Zuordnung der Antigen-Spottriplets und der Kontrollspots überprüfen (Technisch validieren)

Jeder Spot wird aufgrund seiner Position von der ViraChip® Software automatisch dem entsprechenden Antigen-Spottriolett bzw. dem entsprechendem Kontrollspot zugeordnet.

Die automatische Zuordnung muss visuell mit dem Muster entsprechend Abb. 1 überprüft werden. Zuordnungen, die nicht dem dargestellten Muster entsprechen im Feld „QC“ auf „nicht gültig“ setzen. Die entsprechende Probe muss wiederholt werden.

### 5.2 Gültigkeitsprüfung

Die Gültigkeitsprüfung wird von der ViraChip® Software automatisch durchgeführt.

Ein ViraChip® Microarray ist gültig, wenn folgende Kontrollspots die in der ViraChip® Software hinterlegten Kriterien erfüllen:

- **Serumkontrollen** (sc) über Grenzwert
- **Konjugatkontrollen IgG** (ccG) über Grenzwert  
Die Konjugatkontrollen IgG müssen stärker reagieren als die Kontrollen der anderen Konjugatklassen.
- **Kalibratorkontrollen** (cal) über Grenzwert
- **Negativkontrolle** (nc) unter Grenzwert

Falls eines der genannten Kriterien nicht erfüllt ist, wird der ViraChip® Microarray als „nicht gültig“ klassifiziert. Nicht gültige ViraChip® Microarrays dürfen nicht ausgewertet werden und müssen wiederholt werden.

### 5.3 Auswertung der ViraChip® Microarrays

Die Bewertung der Patientenproben wird von der ViraChip® Software automatisch nach den im Folgenden definierten Auswertekriterien durchgeführt:

Die ViraChip® Einheiten jedes Spottriplets werden unter Berücksichtigung der chargen-spezifischen Faktoren relativ zu den Kalibratorkontrollen durch die ViraChip® Software berechnet.

#### Auswertekriterien

ViraChip®- Einheiten der Spottriplets	Ergebnis	Beurteilung
<b>Mindestens ein</b> Spottriolett $\geq 100$ ViraChip®- Einheiten aus: Sm, Sm/RNP, PCNA, P0, SS-A 52, SS-A 60, SS-B, Scl-70, CENP B, Jo-1, PM/Scl	<b>Positiv</b>	<b>Spezifische Autoantikörper</b> gegen das jeweilige Antigen nachweisbar: <b>Sm, Sm/RNP, PCNA, P0, SS-A 52, SS-A 60, SS-B, Scl-70, CENP B, Jo-1, PM/Scl</b> . Hinweis auf eine Autoimmunerkrankung, die mit den jeweiligen, nachweisbaren nukleären bzw. zytoplasmatischen Autoantikörpern assoziiert ist.
<b>Kein</b> Spottriolett $\geq 100$ ViraChip®- Einheiten aus: Sm, Sm/RNP, PCNA, P0, SS-A 52, SS-A 60, SS-B, Scl-70, CENP B, Jo-1, PM/Scl	<b>Negativ</b>	<b>Keine</b> oder nur geringe Mengen an spezifischen Autoantikörpern nachweisbar.
<b>dsDNA</b> Spottriolett $\geq 100$ ViraChip®- Einheiten wenn dsDNA Spottriolett > DNA-Spezifitätskontrolle	<b>Positiv</b>	<b>Spezifische Autoantikörper</b> gegen dsDNA nachweisbar. Hinweis auf systemischen Lupus erythematoses.
<b>dsDNA</b> Spottriolett $\geq 50$ und $< 100$ ViraChip®- Einheiten wenn dsDNA Spottriolett > DNA-Spezifitätskontrolle	<b>Grenzwertig</b>	<b>Geringe Mengen</b> an spezifischen Autoantikörpern gegen dsDNA vorhanden.
<b>dsDNA</b> Spottriolett $\geq 50$ ViraChip®- Einheiten wenn dsDNA Spottriolett < DNA-Spezifitätskontrolle	<b>dsDNA Spottriolett nicht interpretierbar</b>	Eine Reaktion mit der DNA-Spezifitätskontrolle kann auf unspezifische Reaktionen des dsDNA Spottriplets hinweisen. Das dsDNA Spottriolett ist nicht interpretierbar.
<b>dsDNA</b> Spottriolett $< 50$ ViraChip®- Einheiten	<b>Negativ</b>	<b>Keine</b> spezifischen Autoantikörper gegen dsDNA nachweisbar.
<b>DFS70</b> Spot $\geq 100$ ViraChip®- Einheiten	<b>Positiv</b>	<b>Spezifische Autoantikörper</b> gegen DFS70 nachweisbar.
<b>DFS70</b> Spot $< 100$ ViraChip®- Einheiten	<b>Negativ</b>	<b>Keine</b> oder nur geringe Mengen an spezifischen Autoantikörpern gegen DFS70 nachweisbar.

## Diagnostische Bedeutung von nukleären und zytoplasmatischen Autoantikörpern

- 1. dsDNA (Doppelstrang DNA):** Autoantikörper gegen dsDNA (Doppelstrang DNA, bzw. native DNA) besitzen eine sehr hohe diagnostische und prognostische Bedeutung und dienen als Aktivitätsmarker. Sie kommen bei ca. 90% der Patienten mit SLE vor. Der Nachweis von Autoantikörpern gegen native bzw. dsDNA gilt als eines der elf Kriterien des American College of Rheumatology (ACR Kriterien von 1982, revidiert 1997). Autoantikörper gegen dsDNA sind die am häufigsten nachweisbaren SLE-typischen Autoantikörper. Die Nachweisfrequenz variiert jedoch in Abhängigkeit von Aktivität und Organmanifestation: Aktiver SLE mit Nierenbeteiligung > 95%, aktiver SLE ohne Nierenbeteiligung > 50-70%, inaktiver SLE < 40%. Fehlender dsDNA-Nachweis schließt einen aktiven Schub eines SLE jedoch nicht aus (11,13,7,2,12).
- 2. Sm (Smith Antigen):** Autoantikörper gegen Sm sind hochspezifisch und kommen bei ca. 10-15% der Patienten mit SLE vor. Positive Assoziation mit schweren Organmanifestationen, wie z.B. ZNS Nieren oder Haut. Sie gelten als prognostischer Marker und ihr Nachweis zählt zu den elf ACR Kriterien. Sm positive Seren reagieren oft auch mit dem Sm/RNP-Spottriplekt, die neben dem Hauptantigen RNP auch Epitope von Sm enthält (11,7,2,12,4,6).
- 3. Sm/RNP (Smith Antigen/ Ribonukleoprotein):** Autoantikörper gegen Sm/RNP kommen bei ca. 30-40% der Patienten mit SLE bzw. bei ca. 95% der Patienten mit MCTD und bei 10-15% der Patienten mit Sklerodermie vor. Bei Abwesenheit von Sm und dsDNA Autoantikörpern haben Autoantikörper gegen RNP eine sehr hohe Sensitivität von fast 100% für MCTD. Fehlende RNP Autoantikörper schließen daher eine MCTD aus (11,13,7,2,4,6).
- 4. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen):** Autoantikörper gegen PCNA (identisch mit Autoantikörpern gegen Cyclin) kommen bei ca. 3-7% der Patienten mit SLE vor. Patienten mit PCNA positivem SLE zeigen häufig Nieren- bzw. ZNS-Beteiligung sowie Thrombozytopenie (11,13,7,2).
- 5. P0 (Ribosomales Phosphoprotein):** P0 ist ein ribosomales Phosphoprotein und die Hauptkomponente der 60S Untereinheit des ribosomalen Komplexes. Autoantikörper gegen P0 kommen bei ca. 6-46% der Patienten mit SLE vor auch wenn dsDNA und Sm Autoantikörper nicht nachweisbar sind. Autoantikörper gegen P0 sind hochspezifisch und vorzugsweise bei SLE-Patienten in der aktiven Phase mit einer Nierenbeteiligung assoziiert (7,2,4,9).
- 6. SS-A 52 (Sjögren Syndrom Antigen A):** Autoantikörper gegen SS-A 52 sind häufig bei Myositis Patienten zu finden und haben eine Bedeutung in der Pathogenese des kongenitalen Herzblocks sowie kutaner Lupus-Manifestationen. Autoantikörper gegen SS-A 52 sind weniger spezifisch für das Sjögren-Syndrom (SjS) und systemischen Lupus erythematoses (SLE) als Autoantikörper gegen SS-A 60. Das koinzidente Auftreten von SS-A 52, SS-A 60 und SS-B Autoantikörper ist mit dem kongenitalen Herzblock assoziiert (7,2,4,6,1,3).
- 7. SS-A 60 (Sjögren Syndrom Antigen A):** Autoantikörper gegen SS-A 60 kommen bei ca. 96% der Patienten mit primärem SjS bzw. ca. 80% bei Patienten mit sekundärem SjS, ca. 24-60% der Patienten mit LE, ca. 70-100% der Patienten mit subakut kutanem Lupus erythematoses (SCLE), ca. 85% der Patienten mit neonatalem Lupus erythematoses (NLE), und ca. 5-8% der Patienten mit RA vor. Das koinzidente Auftreten von SS-A 52, SS-A 60 und SS-B Autoantikörper ist mit dem kongenitalen Herzblock assoziiert (11,7,2,4,6,1,3).
- 8. SS-B (Sjögren Syndrom Antigen B):** Autoantikörper gegen SS-B kommen bei ca. 70% der Patienten mit primärem SjS, ca. 50% bei Patienten mit sekundärem SjS, ca. 20% der Patienten mit LE, ca. 50% bei Patienten mit subakut kutanem Lupus erythematoses (SCLE) und ca. 60% bei neonatalem Lupus erythematoses (NLE) vor. Wenn SS-B Autoantikörper gleichzeitig mit SS-A 52 und SS-A 60 Autoantikörpern bei Schwangeren auftreten, besteht ein erhöhtes Risiko von 1-2% für kongenitalen Herzblock beim Neugeborenen (11,7,2,4,1,3).
- 9. Scl-70 (Topoisomerase I):** Autoantikörper gegen Scl-70 kommen bei ca. 40% der Patienten mit SSc vor. In der Regel haben Scl-70 positive Patienten schwerere Verlaufsformen mit ungünstigerer Prognose als Patienten positiv für Centromer Autoantikörper. Es besteht eine Assoziation mit diffusum Hautbefall und dem Auftreten von internen Manifestationen, z.B. Lunge, Herz und Nieren (11,13,7,2,10).
- 10. CENP B (Centromer B Antigen):** Autoantikörper gegen CENP B kommen bei ca. 64-95% der Patienten mit CREST-Syndrom vor und bei ca. 20-35% der Patienten mit diffuser Sklerodermie. Mit über 95% ist CENP B das häufigste Zielantigen bei Patienten mit Sklerodermie. Patienten mit primär biliärer Zirrhose (PBC) weisen ebenfalls Autoantikörper gegen Centromer auf in ca. 30% der Fälle. Die Frequenz von interstitieller Lungenfibrose und Nierenbeteiligung ist bei Centromer positiven Sklerodermie-Patienten sehr gering hingegen Organmanifestationen wie die pulmonale Hypertension und gastrointestinale Komplikationen treten häufiger auf (7,2,4,10).
- 11. Jo-1 (Histidyl-t-RNA-Synthetase):** Autoantikörper gegen Jo-1 kommen bei ca. 60% der Patienten mit PM, ca. 13% der Patienten mit DM bzw. ca. 43% der Patienten mit PM/DM Überlappungssyndrom vor. Die diagnostische Spezifität liegt bei fast 100%. Es besteht eine Assoziation zu SS-A 52 Autoantikörpern. Jo-1 positive Myositis-Patienten haben einen schweren Verlauf, häufig Schübe und eine schlechte Prognose. In über 70% der Fälle besteht eine interstitielle Lungenbeteiligung. Die Mehrheit der Myositis Patienten mit Jo-1 Autoantikörpern hat Symptome des Anti-Synthetase-Syndroms. Bei erfolgreicher Therapie bzw. in Remission verschwinden die Jo-1 Autoantikörper (11,13,7,2,5).
- 12. PM/ScI (Exoribonuklease):** Autoantikörper gegen PM/ScI Exoribonukleasen kommen bei ca. 24-55% der Patienten mit Polymyositis/Sklerodermie Überlappungssyndrom, ca. 8-12% der Patienten mit PM/DM bzw. ca. 1-16% der Patienten mit Sklerodermie vor. Neben der Myositis ist PM/ScI ein prognostischer Marker für Arthritiden in ca. 89%, Raynaud-Symptomatik in ca. 79%, interstitielle Lungen-manifestation in ca. 44% der Fälle und Skleromyositis im Kindesalter. PM/ScI Autoantikörper kommen meist nur isoliert vor und nicht in Kombination mit anderen Markern der idiopathischen Myositis oder Sklerodermie (13,7,2,10,8).
- 13. DFS70 (Dense Fine Speckled 70):** Autoantikörper gegen DFS70 können mit einem dicht fein gesprenkelten, nukleären Muster in der HEp2-IFT korrelieren. Der Nachweis von DFS70 Autoantikörpern kann somit helfen, beobachtete Muster in der HEp2-IFT nachzuvollziehen, insbesondere wenn keine anderen Autoantikörper nachweisbar sind. (15,16,17,18).

## Leistungsdaten

### Übereinstimmung der Reaktivitäten des ANA ViraChip® IgG mit dem ANA ViraStripe® IgG

In den folgenden Tabellen (Tabelle 1 – 11) wird die Übereinstimmung zwischen den Reaktivitäten des ANA ViraChip® IgG und den Reaktivitäten der Vergleichsmethode ANA ViraStripe® IgG dargestellt. Hierzu wurden jeweils Seren verwendet, die für das entsprechende Antigen-Spottriplett des ANA ViraChip® IgG eine positive Reaktivität zeigten.

Sm	ANA ViraStripe®	
ANA ViraChip®	Positiv	Negativ
Positiv	40	2
<b>Korrelation: 95%</b>		

**Tabelle 1:** Übereinstimmung der Reaktivität des Sm Spottriplets auf dem ANA ViraChip® IgG mit der Sm Bande auf dem ANA ViraStripe® IgG

Sm/RNP	ANA ViraStripe®	
ANA ViraChip®	Positiv	Negativ
Positiv	51	1
<b>Korrelation: 98%</b>		

**Tabelle 2:** Übereinstimmung der Reaktivität des Sm/RNP Spottriplets auf dem ANA ViraChip® IgG mit der Sm/RNP Bande auf dem ANA ViraStripe® IgG

PCNA	ANA ViraStripe®	
ANA ViraChip®	Positiv	Negativ
Positiv	4	0
<b>Korrelation: 100%</b>		

**Tabelle 3:** Übereinstimmung der Reaktivität des PCNA Spottriplets auf dem ANA ViraChip® IgG mit der PCNA Bande auf dem ANA ViraStripe® IgG

P0	ANA ViraStripe®	
ANA ViraChip®	Positiv	Negativ
Positiv	16	0
<b>Korrelation: 100%</b>		

**Tabelle 4:** Übereinstimmung der Reaktivität des P0 Spottriplets auf dem ANA ViraChip® IgG mit der P0 Bande auf dem ANA ViraStripe® IgG

SS-A 52	ANA ViraStripe®	
ANA ViraChip®	Positiv	Negativ
Positiv	110	4
<b>Korrelation: 96%</b>		

**Tabelle 5:** Übereinstimmung der Reaktivität des SS-A 52 Spottriplets auf dem ANA ViraChip® IgG mit der SS-A 52 Bande auf dem ANA ViraStripe® IgG

SS-A 60	ANA ViraStripe®	
ANA ViraChip®	Positiv	Negativ
Positiv	115	23
<b>Korrelation: 83%</b>		

**Tabelle 6:** Übereinstimmung der Reaktivität des SS-A 60 Spottriplets auf dem ANA ViraChip® IgG mit der SS-A 60 Bande auf dem ANA ViraStripe® IgG. Der ANA ViraChip® IgG wurde hinsichtlich der Sensitivität für SS-A 60 optimiert.

SS-B	ANA ViraStripe®	
ANA ViraChip®	Positiv	Negativ
Positiv	49	2
<b>Korrelation: 96%</b>		

**Tabelle 7:** Übereinstimmung der Reaktivität des SS-B Spottriplets auf dem ANA ViraChip® IgG mit der SS-B Bande auf dem ANA ViraStripe® IgG

Scl-70	ANA ViraStripe®	
ANA ViraChip®	Positiv	Negativ
Positiv	22	0
<b>Korrelation: 100%</b>		

**Tabelle 8:** Übereinstimmung der Reaktivität des Scl-70 Spottriplets auf dem ANA ViraChip® IgG mit der Scl-70 Bande auf dem ANA ViraStripe® IgG

CENP B	ANA ViraStripe®	
ANA ViraChip®	Positiv	Negativ
Positiv	17	0
<b>Korrelation: 100%</b>		

**Tabelle 9:** Übereinstimmung der Reaktivität des CENP B Spottriplets auf dem ANA ViraChip® IgG mit der CENP B Bande auf dem ANA ViraStripe® IgG

Jo-1	ANA ViraStripe®	
ANA ViraChip®	Positiv	Negativ
Positiv	14	0
<b>Korrelation: 100%</b>		

**Tabelle 10:** Übereinstimmung der Reaktivität des Jo-1 Spottriplets auf dem ANA ViraChip® IgG mit der Jo-1 Bande auf dem ANA ViraStripe® IgG

PM/Scl	ANA ViraStripe®	
ANA ViraChip®	Positiv	Negativ
Positiv	3	0
<b>Korrelation: 100%</b>		

**Tabelle 11:** Übereinstimmung der Reaktivität des PM/Scl Spottriplets auf dem ANA ViraChip® IgG mit der PM/Scl Bande auf dem ANA ViraStripe® IgG

## ANA ViraChip® IgG Test Kit 2.0

- 7 -

In der folgenden Tabelle (Tabelle 12) wird die Übereinstimmung der Reaktivitäten von 31 Seren mit dem dsDNA Spottriplets auf dem ANA ViraChip® IgG gegenüber der Reaktivität der dsDNA Bande auf der Vergleichsmethode ANA ViraStripe® IgG dargestellt.

dsDNA ANA ViraChip®	dsDNA ANA ViraStripe®		
	Positiv	Grenzwertig	Negativ
Positiv	6	0	0
Grenzwertig	0	2	0
negativ	0	0	23
<b>Korrelation 100%</b>			

**Tabelle 12:** Übereinstimmung der Reaktivität des dsDNA Spottriplets auf dem ANA ViraChip® IgG mit der dsDNA Bande auf dem ANA ViraStripe® IgG. Hierbei wurde eine Korrelation von 100% erzielt

**Korrelation mit unabhängigen Referenzseren – Ringversuchsproben**

ANA ViraChip® Antigene		Sollergebnis		
		Positiv	Negativ	Korrelation
dsDNA n = 56	Positiv	9	0	98%
	Grenzwertig	0	1*	
	Negativ	0	46	
Sm n = 24	Positiv	1	0	100%
	Negativ	0	23	
Sm/RNP n = 27	Positiv	8	0	100%
	Negativ	0	19	
PCNA n = 9	Positiv	1	0	100%
	Negativ	0	8	
P0 n = 8	Positiv	0	0	100%
	Negativ	0	8	
SS-A 52 n = 34	Positiv	21	0	100%
	Negativ	0	13	
SS-A 60 n = 34	Positiv	21	0	100%
	Negativ	0	13	
SS-B n = 30	Positiv	15	0	100%
	Negativ	0	15	
Scl-70 n = 23	Positiv	5	0	100%
	Negativ	0	18	
CENP B n = 13	Positiv	6	0	100%
	Negativ	0	7	
Jo-1 n = 25	Positiv	1	0	100%
	Negativ	0	24	
PM/Scl n = 17	Positiv	0	0	94%
	Negativ	1**	16	

\* Diese Probe reagierte in der IFT positiv mit einem homogenen Muster und enthielt keine dsDNA Antikörper. Laut Ringversuchsanbieter handelt es sich um das Serum einer SLE Patientin, welches mit Rinderserum verdünnt wurde.

\*\* Diese Probe wurde durch Verwendung der HEP2 IFT positiv mit nukleolärem Muster bewertet. Laut Ringversuchsanbieter besteht bei dieser Patientin ein Verdacht auf Polymyositis. Das Serum enthielt Autoantikörper gegen PM/Scl und wurde mit Rinderserum verdünnt. Jedoch nur 64% der Teilnehmer bestimmten diese Probe mit anderen Methoden als der IFT richtig.

**Tabelle 13:** Korrelation mit Ringversuchsseren aus den Jahren 2000 bis 2016. In 99% der Fälle stimmen die Ergebnisse des ANA ViraChip® IgG mit den Sollwerten von 71 Ringversuchsseren (Autoimmunerkrankungen Gruppe I Nr. 251, n = 51 und Gruppe III Nr. 255, n = 20) überein.

## ANA ViraChip® IgG Test Kit 2.0

- 8 -

## Spezifität

ANA Antigene	Blutspenderseren n = 139
	ANA ViraChip® positiv
dsDNA	0
Sm	0
Sm/RNP	0
PCNA	0
P0	0
SS-A 52	0
SS-A 60	1
SS-B	0
Scl-70	0
CENP B	0
Jo-1	0
PM/Scl	1
<b>Spezifität 99%</b>	

**Tabelle 14: Spezifität von Autoantikörpern mit dem ANA ViraChip® IgG bei europäischen Blutspendern.**

Bei Blutspendern erzielte der ANA ViraChip® IgG eine Spezifität von 99%. Mit dem ANA ViraChip® IgG wurden bei der Untersuchung von 139 Blutspenderseren in 1% (2 / 139) der Fälle Autoantikörper nachgewiesen.

## Prospektive Serenanalyse – Routineseren

ANA Antigene	Routineseren n = 32		
	ANA ViraChip® positiv	ANA ViraStripe® positiv	Korrelation
dsDNA	2	1 (+1 gw)	97%
Sm	0	0	100%
Sm/RNP	0	0	100%
PCNA	1	1	100%
P0	1	1	100%
SS-A 52	4	5	80%
SS-A 60	6	3	50%
SS-B	3	4	75%
Scl-70	0	0	100%
CENP B	0	0	100%
Jo-1	0	0	100%
PM/Scl	0	0	100%
<b>Gesamtkorrelation</b>			<b>92%</b>

**Tabelle 15:** Bei der Analyse von 32 Routineseren wurde eine Gesamtkorrelation von 92% mit dem ANA ViraChip® IgG gegenüber dem ANA ViraStripe® IgG als Referenztest erzielt. Der ANA ViraChip® IgG wurde hinsichtlich der Spezifität für die Antigene SS-A 52 und SS-B und hinsichtlich der Sensitivität für das Antigen SS-A 60 optimiert.



**Sensitivität des ANA ViraChip® IgG in Bezug auf das DFS70 Antigen**

ANA ViraChip®	Vorcharakterisierte Seren n = 30
DFS70 positiv	30
	Sensitivität >99%

**Tabelle 16:** Bei der Analyse von 30 positiv vorcharakterisierten Seren wurde eine Sensitivität von >99% für das DFS70 Antigen auf dem ANA ViraChip® IgG gegenüber den Vergleichstesten erzielt.

**Spezifität des ANA ViraChip® IgG in Bezug auf das DFS70 Antigen**

ANA ViraChip®	Blutspenderseren n = 91
DFS70 positiv	2
	Spezifität 98%

**Tabelle 17:** Bei der Analyse von 91 Blutspendern wurde eine Spezifität von 98% für das DFS70 Antigen auf dem ANA ViraChip® IgG erzielt. Für die Prävalenz von DFS70 Autoantikörpern in Blutspendern wird in der Literatur je nach Studie ein Bereich von 1%-17% beschrieben (19).

**Anforderungen an den Anwender**

1. Dieser Test ist nur in einem Fachlabor durchzuführen, das die entsprechende Laborausstattung (z.B. nach GLP) und die ggf. erforderlichen behördlichen Genehmigungen zum Umgang mit den zu testenden Proben besitzt.

2. Um ein exaktes Testergebnis zu erhalten, müssen die Gebrauchsanweisung und „Good Laboratory Practice (GLP)“ eingehalten werden.

3. Dieser Test ist nur von Fachpersonal durchzuführen, das bezüglich des Testverfahrens geschult wurde.

**Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien**

1. **ViraChip® Microarrays:** Verschlossen in der Originalverpackung bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

2. **Waschpuffer-Konzentrat, 10-fach:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

3. **Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung:** Bei 2-8°C ca. 2 Wochen haltbar. Bei längerer Aufbewahrung kann die Gebrauchsverdünnung aliquotiert bei -20°C eingefroren werden.

4. **Probenpuffer:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

5. **Konjugatlösung:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

6. **Chromogen/Substratlösung:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum. Vor Lichteinfall schützen!

7. Nach erstmaligem Öffnen der Reagenzien und Kitkomponenten wird bei sachgerechter Anwendung („Good Laboratory Practice“) und Einhaltung der auf dem Etikett angegebenen Lagerungsbedingungen in der Originalverpackung die Haltbarkeit in der Regel bis zum angegebenen Verfallsdatum beibehalten.

**Vorsichtsmaßnahmen / Sicherheitsvorkehrungen**

1. Alle humanen Serumkomponenten wurden auf HCV-, HIV1,2-Antikörper und HBs-Antigen untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kitkomponenten, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös betrachtet und mit entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen verwendet werden. Bei Arbeiten mit potentiell gefährlichen oder infektiösen Materialien sind die entsprechenden nationalen / internationalen Gesetze, Verordnungen und Vorschriften zu beachten. Dies gilt ebenfalls für die Lagerung und Entsorgung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

2. Die Schutzmaßnahmen für das Arbeiten mit Gefahr- und Biostoffen sind gemäß den aktuell gültigen länderspezifischen Richtlinien für Laboratorien zu beachten. Maßnahmen sind unter anderem:

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Einweg-Handschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Am Arbeitsplatz nicht essen, trinken oder rauchen.

3. Die Berührung von Haut und Schleimhäuten mit Chromogen / Substratlösung vermeiden. Bei Berührung mit Haut und Augen sofort mit viel Wasser nachwaschen.

4. Proben und alle möglicherweise kontaminierten Materialien sowie flüssige infektiöse Abfälle sind gemäß allgemein anerkannter Laborrichtlinien zu dekontaminieren, z.B. durch ein mindestens 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C. Zur Entsorgung flüssiger Abfälle können diese z.B. mit Natriumhypochlorit in einem Volumenverhältnis gemischt werden, so dass das Endgemisch 1% Natriumhypochlorit enthält. Zur vollständigen Desinfektion 30 Minuten einwirken lassen.

5. Angaben über mögliche Gefahren, Erste-Hilfe-Maßnahmen, Maßnahmen bei unbeabsichtigter Freisetzung von größeren Mengen, Handhabung und Lagerung, persönliche Schutzausrüstung, Hinweise zur Entsorgung sowie Angaben zur Toxikologie sind in den Sicherheitsdatenblättern dokumentiert.

6. Der Eintritt von Staub und anderen Verschmutzungen in die Kavitäten der MTP ist zu vermeiden, da daraus ungünstige Ergebnisse resultieren können.

### Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Patientenprobe

1. Der ANA ViraChip® IgG Test Kit 2.0 ist mit humanem Serum als Probenmaterial durchzuführen.
2. Die Probengewinnung sollte durch medizinisches Fachpersonal nach den geltenden Standards aus Vollblut erfolgen (14).
3. Proben, die mit Hitze vorbehandelt wurden, hämolytisch, ikterisch oder lipämisch sind, können zu ungünstigen Ergebnissen führen.
4. Proben dürfen nicht mikrobiell kontaminiert sein.
5. In der Regel können unverdünnte Proben bis zu 5 Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden. Für eine Lagerung bis zu 24 Monaten sind die Proben in Aliquots bei mindestens -20°C einzufrieren.
6. Vor Beginn der Testdurchführung sollten die Proben auf Raumtemperatur gebracht werden. Proben nach dem Auftauen vorsichtig mischen und bei Bedarf sichtbare Partikel durch Zentrifugation entfernen.
7. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden

### Einschränkungen des Untersuchungsverfahrens

1. Ein positives Testergebnis der jeweiligen Patientenprobe ist als Symptom zu werten. Eine endgültige Diagnose sollte immer unter Wertung von Anamnese, Klinik und Labordaten durch medizinisches Fachpersonal erfolgen (13).
2. Ein negatives Testergebnis schließt einen Erregerkontakt bzw. eine Infektion nicht aus.
3. Der Nachweis von spezifischen Antikörpern kann bei Untersuchungen mit verschiedenen Testen bzw. mit verschiedenen Herstellern aufgrund von unterschiedlichen Sensitivitäten, Spezifitäten und Testmethoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.
4. Bei Immunsuppression gilt eine eingeschränkte Beurteilbarkeit (13).
5. Medikamente und Immunglobulingaben können unspezifische Antikörperreaktionen hervorrufen (13).
6. *In vitro*-Diagnostika dürfen nicht über das angegebene Verfallsdatum hinaus verwendet werden, da zuverlässige Ergebnisse dann nicht mehr gewährleistet sind.
7. Präzises Befolgen der Arbeitsvorschrift ist essentiell für exakte Testergebnisse. Ungenügendes Durchführen der Waschschriffe kann falsche Ergebnisse verursachen.











### Hinweise zu Geräten und Software

1. Bei automatisierter Durchführung müssen für den jeweiligen Prozessortyp von Viramed Biotech AG validierte Arbeitsschritte programmiert und verwendet werden.
2. Bei Verwendung von Prozessorspezifischen Verbrauchsmaterialien sind die entsprechenden Konfigurationen nach Herstellerangaben von Viramed Biotech AG freizugeben.
3. Die von Viramed Biotech AG bereitgestellte Geräte- und Softwarekonfiguration darf nicht verändert werden. Jegliche Änderung kann falsche Ergebnisse verursachen.
4. Es ist ausschließlich gerätespezifische Software zu verwenden. Änderungen an Konfigurationsdateien dürfen nur von Viramed Biotech AG durchgeführt werden.
5. Als Messgeräte sind nur von Viramed Biotech AG zugelassene Systeme zu verwenden.
6. Die Auswertung der ViraChip® Microarrays erfolgt ausschließlich über die ViraChip® Software. Eine manuelle/visuelle Auswertung ist nicht möglich.

### Literatur

1. BRUCATO, A: Risk of congenital complete heart block in newborns of mothers with anti-Ro/SSA antibodies detected by counterimmunoelectrophoresis: a prospective study of 100 women, Arthritis Rheum, 2001
2. CONRAD, K: Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen, Pabst Science Publishers, 3 Auflage, 2006
3. GORDON, P: Anti-52 kDa Ro; anti-60 kDa Ro and anti-La antibody profiles in neonatal lupus, J Rheumatol, 2004
4. HOFFMANN, MH: Nucleic acid-associated autoantigens: Pathogenic involvement and therapeutical potential, J Autoimmun, 2010
5. KAO, A H: Anti-Signal recognition particle autoantibody in patients with and patients without idiopathic inflammatory myopathy, Journal of experimental Medicine, 2005
6. MIGLIORINI, P: Anti-Sm and Anti-RNP antibodies, Autoimmunity, 2005
7. MÜHLEN, C: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases, Seminars in Arthritis and Rheumatism, 1995
8. REICHLIN, M: Antibodies to a nuclear/nucleolar antigen in patients with polymyositis overlap syndromes, Journal of Clinical Immunology, 1984
9. REICHLIN, M: Serological correlations with nephritis in systemic lupus erythematosus, Clin Immunol, 2005
10. STEEN, V D: Autoantibodies in systemic sclerosis, Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2005
11. TAN, E M: Antinuclear Antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology, Adv Immunol, 1989
12. Hochberg MC: Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus, Arthritis Rheum, 1997
13. THOMAS, L: Labor und Diagnose, Med Verlagsgesellschaft Marburg, 2012
14. TUCK et al: Standard Operating Procedures for Serum and Plasma Collection, J Proteome Res, 2009
15. HEROLD, M et al: ICAP – ein Versuch zur einheitlichen Beschreibung der Fluoreszenzmuster von antizellulären Antikörpern auf HEp-2-Zellen, J Lab Med, 2017
16. BENTOW, C et al: Recognition of the dense fine speckled (DFS) pattern remains challenging: results from an international internet-based survey, Autoimmun Highlights, 2016
17. CARTER, JB et al: Recognition and relevance of anti-DFS70 autoantibodies in routine antinuclear autoantibodies testing at a community hospital, Frontiers in Medicine, 2018
18. CONRAD, K et al: The Clinical Relevance of Anti-DFS70 Autoantibodies, Clin Rev Allerg Immunol, 2017

**Symbolerklärungen**

	Hersteller		Bestell-Nummer
	Gebrauchsanweisung beachten		Verwendbar bis / Mindesthaltbarkeitsdatum
	<i>In-Vitro</i> Diagnostikum		Temperaturbegrenzung (Lagerung)
	Chargen-Nummer		Positives Kontrollserum
	Ausreichend für 96 Ansätze		Negatives Kontrollserum