

Instruction

WIESLAB[®] PR3-ANCA

Enzyme immunoassay for detection of autoantibodies
against proteinase 3

Microtitration 96 wells
Store the kit at +2-8° C
For in vitro diagnostic use only



Document No. E-23-0185-07
May, 2015

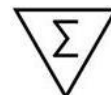
WIESLAB[®] PR3-ANCA

| | | |
|------------|--------------|----|
| English: | page | 2 |
| Français: | page | 12 |
| Español: | página | 19 |
| Deutsch: | Seite | 26 |
| Italiano: | pagina | 33 |
| Português: | página | 40 |
| Dansk: | side..... | 47 |
| Norsk: | side..... | 54 |
| Svenska: | sida..... | 61 |

REF

PR3 IU

IVD



INTENDED USE

The Wieslab® PR3-ANCA test kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection and quantitation of IgG antibodies to proteinase 3 (PR3) in human sera. The assay is used to detect antibodies in a single serum specimen. The results of the assay are to be used as an aid to the diagnosis of Wegener's granulomatosis. The analysis should be performed by trained laboratory professionals.

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

Summary and explanation

ANCAs (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) are a family of autoantibodies related to vasculitis and inflammatory disorders. Since 1985, when c-ANCA was shown to be related to Wegener's granulomatosis (WG) (1), interest in ANCAs has steadily increased, and today these antibodies are considered to be major diagnostic tools for the diagnosis and follow up of systemic vasculitis (13, 14). The first method to detect ANCA was indirect immuno-fluorescence (IIF) performed on ethanol fixed granulocytes (2). This method yields two patterns, a cytoplasmic staining of the granulocyte denoting the presence of c-ANCAs, and a perinuclear staining denoting the presence of p-ANCAs. IIF was followed by ELISAs using the purified proteins (3,4).

The granulocyte is full of granules each with many different proteins. It was early shown that antibodies from systemic vasculitis patients bind to the alpha fraction containing the azurophil granules. The most important proteins were PR3 (5, 6) and myeloperoxidase (MPO) (7, 8). PR3 is a serine protease with a molecular weight of 29kD, and MPO is a dimer with a molecular weight of 140kD. Thus antibodies to proteinase 3 are termed PR3-ANCA, and antibodies to myeloperoxidase are termed MPO-ANCA.

Approximately 80-90% of WG patients manifest PR3-ANCA and 5-15% MPO-ANCA. One category of vasculitis is microscopic polyangiitis (MP). Most patients with active MP are characterised by positive ANCA test results, MPO-ANCA being more frequent than PR3-ANCA (9, 10, 11, 12).

An international workgroup has developed an international standard for PR3-ANCA serology. The Wieslab® PR3-ANCA is standardized against the AF-CDC international standard, code IS2721 (Human Reference Serum 16).

Principle of the Wieslab® PR3-ANCA

The wells of the microtitre plate are coated with purified proteinase 3. During the first incubation, specific antibodies in diluted serum, will bind to the antigen coating.

The wells are then washed to remove unbound antibodies and other components.

A conjugate of alkaline phosphatase-labelled antibodies to human IgG binds to the antibodies in the wells in this second incubation.

After a further washing step, detection of specific antibodies is obtained by incubation with substrate solution. The amount of bound antibodies correlates to the colour intensity and is measured in terms of absorbance (optical density (OD)). The absorbance is then calculated against a calibrator curve and the results are given in IU/mL adapted to the AF-CDC international standard for PR3.

Warnings and precautions

- For in vitro diagnostic use.
- The human serum components used in the preparation of the controls and calibrators in the kit have been tested for the presence of antibodies to human immunodeficiency virus 1 & 2 (HIV 1&2), hepatitis C (HCV) as well as hepatitis B surface antigen by FDA approved methods and found negative. Because no test methods can offer complete assurance that HIV, HCV, hepatitis B virus, or other infectious agents are absent, specimens and human-based reagents should be handled as if capable of transmitting infectious agents.
- The Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health recommend that potentially infectious agents be handled at the Biosafety Level 2.
- All solutions contain ProClin 300 as a preservative. Never pipette by mouth or allow reagents or patient sample to come into contact with skin. Reagents containing ProClin may be irritating. Avoid contact with skin and eyes. In case of contact, flush with plenty of water.
- The concentrations of anti-PR3 in a given specimen determined with assays from different manufacturers can vary due to differences in assay methods and reagent specificity.

- Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Euro Diagnostica.



| | | |
|------|------|-----|
| BUF | WASH | 30X |
| DIL | | |
| CONJ | | |
| CAL | | |

| | |
|---------|------|
| CONTROL | + |
| CONTROL | - |
| SOLN | STOP |
| SUBS | pNPP |

Warning

Contains ProClin 300:
Reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7]
and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

| | |
|-----------|--|
| H317: | May cause an allergic skin reaction. |
| P264: | Wash hands thoroughly after handling. |
| P280: | Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. |
| P302+352: | IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. |
| P333+313: | If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. |

Specimen collection

The PR3-ANCA assay is for use with serum. Handle as if capable of transmitting infectious agents. Avoid using sera which are icteric, lipemic and hemolyzed.

Heat-inactivated sera can yield unspecific reactivities and should not be used.

Store serum between 2-8° C if testing will take place within five days. If specimens are to be kept for longer periods, store at -20° C or colder. Do not use a frost-free freezer because it may allow the specimens to go through freeze-thaw cycles and degrade antibody. Samples that are improperly stored or are subjected to multiple freeze-thaw cycles may yield spurious results.

The CLSI provides recommendations for storing blood specimens, (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Kit components and storage of reagents

- One frame with 96 wells (red coloured) coated with proteinase 3 with lid sealed in a foil pack with a dry pack.
- 1.5 mL negative control (NC) containing human serum in diluent.
- 1.5 mL positive control (PC) containing human serum in diluent.
- 13 mL conjugate containing alkaline phosphatase-labelled antibodies to human IgG (blue colour).
- 2 x 32 mL Diluent (Dil) containing PBS (red colour).
- 13 mL Substrate pNPP.
- 13 mL Stop solution
- 30 mL wash solution 30x concentrated.
- Six calibrators (five calibrators, Cal 2-6, containing human serum) in diluent. 1.5 mL Cal 1 = 0 IU/mL, 1.5 mL Cal 2 = 2 IU/mL, 1.5 mL Cal 3 = 10 IU/mL, 1.5 mL Cal 4 = 30 IU/mL, 1.5 mL Cal 5 = 100 IU/mL, 1.5 mL Cal 6 = 200 IU/mL.

All reagents in the kit are ready for use except wash solution and should be stored at 2-8° C. Remove only the number of strips needed for testing, resealing the aluminium package carefully.

Materials or equipment required but not provided

- Microplate reader with filter 405 nm.
- Precision pipettes with disposable tips.
- Washer for strips, absorbent tissue, tubes and a timer.

PROCEDURE

All solutions should be used at room temperature. Incubate all steps at room temperature (18-25° C) with lid. Incubate serum for 60 minutes, conjugate for 30 minutes and substrate for 30 minutes.

Preparation of washing solution

In case salt crystals are observed in the vial with concentrated wash solution, place the vial at 37°C water bath until the crystals have dissolved before dilution of wash solution. Dilute 10 mL of the 30x concentrated wash solution in 290 mL distilled water. When stored at 2-8° C, the diluted wash solution is stable until the date of expiration of the kit.

Dilution of serum and incubation

Dilute the patient's serum 1/100 with diluent (990 µL diluent + 10 µL serum).

Pipet 100µL/well in duplicate of Calibrator 1, 2, 3, 4, 5, 6, PC, NC and diluted patient's serum (P) according to the diagram below. Incubate for 60 minutes.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-------|-------|-----|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Cal 1 | Cal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| B | Cal 1 | Cal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| C | Cal 2 | Cal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| D | Cal 2 | Cal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| E | Cal 3 | PC | etc | | | | | | | | | |
| F | Cal 3 | PC | | | | | | | | | | |
| G | Cal 4 | NC | | | | | | | | | | |
| H | Cal 4 | NC | | | | | | | | | | |

After serum incubation

Wash 3 times with 300 µL washing solution / well, filling and emptying the wells each time; after the last wash, empty the wells by tapping the strip on an absorbent tissue.

Adding conjugate

Add 100 µL conjugate to each well. Incubate for 30 minutes.

After conjugate incubation

Wash as before.

Adding substrate solution

Add 100 µL substrate pNPP to each well, incubate for 30 minutes.

Adding stop solution

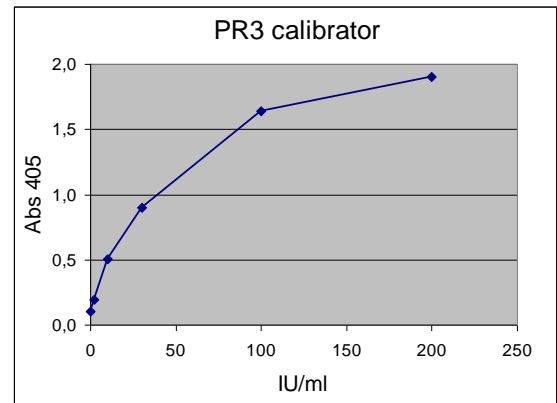
Add 100 µL stop solution to each well and read the absorbance at 405 nm on a microtiterplate reader within 2 hours.

Calculations

Construct a calibrator curve by plotting the OD against the IU/mL values of the 6 calibrators. The six calibrators provided have been titrated to match the AF-CDC standard resulting in the values of 0 IU/mL for calibrator 1, 2 IU/mL for calibrator 2, 10 IU/mL for calibrator 3, 30 IU/mL for calibrator 4, 100 IU/mL for calibrator 5 and 200 IU/mL for calibrator 6. Read the IU/mL value of the patient from the constructed curve. Values greater than 200 should be reported as >200, or reassay them with a higher dilution. The Wieslab® PR3-ANCA is standardized against the AF-CDC international standard.

| <u>Example:</u> | <u>Calibrator</u> | <u>IU/mL</u> | <u>Absorbance</u> |
|-----------------|-------------------|--------------|-------------------|
| | 1 | 0 | 0.102 |
| | 2 | 2 | 0.192 |
| | 3 | 10 | 0.509 |
| | 4 | 30 | 0.902 |
| | 5 | 100 | 1.640 |
| | 6 | 200 | 1.906 |

A sample with an absorbance value of 0.886 will read on the X-axis as having 27 IU/mL of PR3-ANCA. In this example a 4 parameter logistic curve fit has been applied.



Important: The curve is an example and should not be used for actual patient interpretation.

Quality Control

The OD for calibrator 1 should be < 0.2.

The OD for calibrator 6 should be > 1.0

The value for the positive and negative controls see lot certificate.

The negative and positive controls are intended to monitor for substantial reagent failure. The positive control will not ensure precision at the assay cut-off. It is recommended to assay an additional control at the assay cut-off. As the positive control is ready-to-use it does not indicate an eventual dilution error by the user. It is recommended to use an internal control for this purpose.

If any of the values are not within their respective ranges, the test should be considered invalid and the test should be repeated. Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organisations. Refer to CLSI C24-A for guidance on appropriate QC practices.

Interpretation of results

< 4 IU/mL = **Negative**

4-6 IU/mL = **Equivocal**; Retest, if still equivocal retest by an alternative method or test a new sample

> 6 IU/mL = **Positive**

Limitations

The individual patient's antibody titre can not be used as a measure of disease severity, as antibodies from different patients may differ from each other in affinity. Thus, it is difficult to obtain an absolute standardisation of results.

The test should not be relied upon as the sole basis of decisions on clinical therapy, but should be used as an adjunct to clinical symptoms and the results of other available tests.

Sera from patients with other autoimmune diseases and from normal individuals may contain potentially cross-reactive autoantibodies. Some individuals may be positive for PR3 antibodies with little or no evidence of clinical disease. On the other hand, some patients with active disease may have undetectable levels of these antibodies.

Immunosuppressive therapy should not be started on basis of a positive ANCA result. Initiation or changes in treatment should not be based on changes in ANCA concentration alone, but rather on careful clinical observation.

Expected results

PR3-ANCA are rarely found in normal healthy individuals. The PR3-ANCA was tested with 120 normal sera, of which all were found to be negative. One new patient with PR3-ANCA is expected per 100000 individuals per year. Around 10% of patients with WG are negative in both IIF and ELISA. The PR3-ANCA was tested with 83 WG sera, 64 were found to be positive. PR3-ANCA are found in approximately one half of the sera of MP (microscopic polyangiitis) patients. The PR3-ANCA was tested with 55 MP sera, 21 were found to be positive.

Performance characteristics

Table 1. Clinical sensitivity and specificity. A total of 353 frozen retrospective sera with clinical characterisation were assayed. The following table summarises the results

| Control and Disease groups | Total number | Negative <4 IU/mL | Equivocal 4-6 IU/mL | Positive >6 IU/mL |
|----------------------------|--------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| Blood donors | 120 | 120 | 0 | 0 |
| WG | 83 | 12 | 6 | 65 |
| MP | 55 | 30 | 4 | 21 |
| SLE | 14 | 13 | 1 | 0 |
| Others | 26 | 25 | 0 | 1 |
| Anti-GBM | 55 | 52 | 2 | 1 |

WG = Wegener's granulomatosis,
 MP = microscopic polyangiitis
 SLE = systemic lupus erythematosus
 Others = RA, Sjögren's syndrome
 GBM = glomerular basement membrane

Clinical sensitivity (equivocal samples excluded from calculations)

WG = $65/77 = 84.4\%$ 95% CI = 74.4-91.7 %
 MP = $21/51 = 41.2\%$ 95% CI = 27.6-55.8 %

Clinical specificity (equivocal samples excluded from calculations)

GBM = $52/53 = 98.1\%$ 95% CI = 89.9-100 %
 SLE = $13/13 = 100\%$ 95% CI = 75.3-100 %
 Others = $25/26 = 96.2\%$ 95% CI = 80.4-99.9 %
 Donors = $120/120 = 100\%$ 95% CI = 97.0-100 %

The 95% confidence interval (CI) was calculated using the exact method.

Table 2. Agreement between the Wieslab® PR3-ANCA and an alternative ELISA. A total of 353 frozen retrospective sera were assayed. The following table summarises the results.

| Wieslab® PR3-ANCA | | | | | |
|-------------------|-----------|----------|-----------|----------|-------|
| Alternative ELISA | | Positive | Equivocal | Negative | Total |
| | Positive | 77 | 0 | 0 | 77 |
| | Equivocal | 10 | 4 | 2 | 16 |
| | Negative | 1 | 9 | 250 | 260 |
| | Total | 88 | 13 | 252 | 353 |

Sera falling in the equivocal range were excluded from the following calculations.

Positive Percent Agreement = $77/77 = 100\%$ 95% CI = 95.3-100 %
 Negative Percent Agreement = $250/251 = 99.6\%$ 95% CI = 97.8-100 %
 Overall Percent Agreement = $327/328 = 99.7\%$ 95% CI = 98.3-100 %

The 95% confidence interval (CI) was calculated using the exact method.

Table 3. Batch to batch variation was determined by testing six different samples in eight replicates on three different batches.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------|------|------|------|------|------|-------|
| Mean value (IU/mL) | 8 | 12 | 17 | 20 | 23 | 65 |
| SD | 0.39 | 0.02 | 0.27 | 0.99 | 1.86 | 10.70 |
| % CV | 5 | 0.1 | 2 | 5 | 8 | 16 |

Table 4. Inter-assay precision was determined by testing six different samples in eight replicates at three separate occasions.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------|------|------|------|------|------|-------|
| Mean value (IU/mL) | 8 | 13 | 15 | 20 | 35 | 60 |
| SD | 0.41 | 0.75 | 3.16 | 1.47 | 6.12 | 11.69 |
| % CV | 5 | 6 | 21 | 7 | 17 | 19 |

Table 5. Intra-assay precision was determined by testing six different samples in eight replicates at one occasion.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|
| Mean value (IU/mL) | 7 | 12 | 16 | 19 | 21 | 58 |
| SD | 0.45 | 0.75 | 1.74 | 0.92 | 0.75 | 6.62 |
| % CV | 6 | 6 | 11 | 5 | 4 | 11 |

Table 6. Dilution recovery was determined by testing five serial dilutions for three different samples.

| Sample | Dilution | Mean Measured Concentration (IU/mL) | Calculated Concentration (IU/mL) | Dilution Corrected % Recovery |
|--------|----------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 1/100 | 62 | 62 | 100 |
| | 1/200 | 29 | 31 | 94 |
| | 1/400 | 14 | 16 | 90 |
| | 1/800 | 7 | 8 | 90 |
| | 1/1600 | 3 | 4 | 77 |
| Sample | Dilution | Mean Measured Concentration (IU/mL) | Calculated Concentration (IU/mL) | Dilution corrected % Recovery |
| 2 | 1/100 | 118 | 118 | 100 |
| | 1/200 | 54 | 59 | 92 |
| | 1/400 | 26 | 30 | 88 |
| | 1/800 | 12 | 15 | 81 |
| | 1/1600 | 6 | 7 | 81 |
| Sample | Dilution | Mean Measured Concentration (IU/mL) | Calculated Concentration (IU/mL) | Dilution corrected % Recovery |
| 3 | 1/100 | 139 | 139 | 100 |
| | 1/200 | 58 | 70 | 83 |
| | 1/400 | 27 | 35 | 78 |
| | 1/800 | 14 | 17 | 81 |
| | 1/1600 | 7 | 9 | 81 |

Since patient sera contain heterogeneous antibody populations some samples may exhibit non-linearity, especially at very high sample dilutions.

Troubleshooting

| Problem: | Possible causes: | Solution: |
|------------------------------|--|--|
| Control values out of range. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Incorrect temperature, timing or pipetting; reagents not mixed. 2. Cross contamination of controls. 3. Improper dilution. 4. Optical pathway not clean. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Check that the time and temperature was correct. See "Poor precision" below. Repeat test. 2. Pipette carefully. 3. Repeat test. 4. Check for dirt or air bubbles in the wells. Wipe bottom and reread. |
| All test results negative. | <ol style="list-style-type: none"> 1. One or more reagents not added, or added in wrong sequence. 2. Antigen coated plate inactive. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Recheck procedure. Check for unused reagent. Repeat test. 2. Check for obvious moisture in unused wells. Wipe bottom and reread. |
| All test results yellow. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Contaminated buffers or reagents. 2. Washing solution contaminated. 3. Improper dilution of serum. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Check all solutions for turbidity. 2. Use clean container. Check quality of water solution used to prepare. 3. Repeat test. |
| Poor precision. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Pipette delivery CV greater than 5%. 2. Serum or reagents not mixed sufficiently or not equilibrated to room temperature. 3. Reagent addition taking too long; inconsistency in timing intervals. 4. Optical pathway not clean. 5. Washing not consistent; trapped bubbles; washing solution left in the wells. 6. Improper pipetting. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Check calibration of pipette. Use reproducible technique. 2. Mix all reagents gently but thoroughly and equilibrate to room temperature. 3. Develop consistent uniform technique and use multi-tip device or auto dispenser to decrease time. 4. Check for air bubbles in the wells. Wipe bottom and reread. 5. Check that all wells are filled and aspirated uniformly. Dispense liquid above level of reagent in well. After the last wash, empty the wells by tapping the strip on an absorbent tissue. 6. Avoid air bubbles in pipette tips. |

References:

1. **van der Woude FJ, et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985, i 425-429.
2. **Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease*. Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
3. **Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
4. **Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
5. **Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
6. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
7. **Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
8. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
9. **Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. I. *Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
10. **Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
11. **Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
12. **Savigne J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
13. **Savigne J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
14. **Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.
15. **Neumann, I, et al.** Glomerular immune deposits are associated with increased proteinuria in patients with ANCA-associated crescentic nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2003, 18, 524-531.
16. **Csernok E, Ahlquist D, Ullrich S, Gross W.L.** A critical evaluation of commercial immunoassays for antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 and myeloperoxidase in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Rheumatology* 2002;41:1313-1317.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

| | |
|---|---|
|  | Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer. |
|  | Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer. |
|  | Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före. |
|  | Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur. |
|  | Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk. |
|  | Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen. |
|  | In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning. |
|  | Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning. |
|  | Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare. |
|  96 | Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test. |
|  | Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter. |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Ag | Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen. |
| DIL | Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert. |
| CONJ | Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat. |
| BUF WASH 30X | Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc. |
| SUBS pNPP | Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. |
| SOLN STOP | Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning |
| CAL X | Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. |
| CONTROL X | Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll. |

INSTRUCTION EN ABRÉGÉ

Utilisation

La trousse d'analyse Wieslab® PR3-ANCA est un dosage immunoenzymatique (ELISA) destiné à la détection et à la détermination quantitative des anticorps IgG dirigés contre la protéinase 3 (PR3) dans le sérum humain. Le dosage est utilisé pour détecter les anticorps dans un échantillon unique de sérum. Les résultats du dosage constituent un aide dans le diagnostic d'une granulomatose de Wegener. L'analyse ne doit être réalisée que par du personnel de laboratoire qualifié.

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

Précautions

- Pour le diagnostic in vitro uniquement.
- Les composants à base de sérum humain utilisés dans la préparation des contrôles et des étalons de la trousse ont été analysés suivant des méthodes approuvées par la FDA pour dépister la présence d'anticorps dirigés contre le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et 2 (VIH 1 et 2), contre le virus de l'hépatite C (VHC) et pour dépister la présence l'antigène de surface de l'hépatite B et ils ont produit un résultat négatif. Étant donné qu'aucune méthode de dépistage ne peut garantir complètement l'absence du VIH, du VHC, du virus de l'hépatite B ou d'autres agents infectieux, les échantillons et les réactifs d'origine humaine doivent être manipulés comme des produits potentiellement infectieux. Les Centre de prévention et de contrôle de maladies (CDC) et l'Institut national de santé (NIH) recommandent de traiter les agents potentiellement infectieux avec précaution, conformément au niveau de biosécurité 2.
- Toutes les solutions contiennent du ProClin 300 comme conservateur. Ne jamais pipeter à la bouche ; ne pas laisser les réactifs ou les échantillons patients entrer en contact avec la peau. Les réactifs contenant du ProClin peuvent être irritants. Éviter le contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, rincer abondamment avec de l'eau.
- Les concentrations en anticorps anti-PR3 d'un échantillon donné, déterminées avec des dosages des différents fabricants, peuvent varier en raison des différences de méthodes de dosage et de spécificité des réactifs.
- On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le coffret sur demande auprès d'Euro Diagnostica.



| | | |
|------|------|-----|
| BUF | WASH | 30X |
| DIL | | |
| CONJ | | |
| CAL | | |

| | |
|---------|------|
| CONTROL | + |
| CONTROL | - |
| SOLN | STOP |
| SUBS | pNPP |

Attention

Contient ProClin 300:

Masse de réaction de: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

| | |
|-----------|--|
| H317: | Peut provoquer une allergie cutanée. |
| P264: | Se laver soigneusement les mains après manipulation. |
| P280: | Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. |
| P302+352: | EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon. |
| P333+313: | En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin. |

Prélèvement des échantillons

Le dosage PR3-ANCA utilise du sérum. Manipuler comme étant potentiellement infectieux.

Éviter d'utiliser des sérums ictériques, lipémiques et hémolysés.

Les sérums inactivés par la chaleur peuvent donner lieu à des réactions non spécifiques et ne doivent pas être utilisés.

Conserver le sérum entre 2 °C et 8 °C si le dosage doit être réalisé dans les cinq jours suivant le prélèvement. Si les échantillons doivent être conservés pendant plus longtemps, les conserver à une température inférieure ou égale à -20 °C. Ne pas utiliser de congélateur sans givre car les échantillons risqueraient d'être soumis à des cycles de congélation-décongélation, ce qui dégraderait les anticorps. Les échantillons qui ne sont pas conservés correctement ou qui sont soumis à de multiples cycles de congélation-décongélation peuvent produire des résultats erronés.

Le CLSI donne des recommandations sur la conservation des échantillons de sang (document H18A, Procédures standard approuvées pour la manipulation et le traitement des échantillons de sang, 1990).

Composants de la trousse et conservation de réactifs

- Un cadre avec 96 puits (couleur rouge) recouverts de protéinase 3, un couvercle emballé dans un sachet en aluminium avec un dessicant.
- Contrôle négatif (CN) de 1,5 ml contenant du sérum humain dans du diluant.
- Contrôle positif (CP) de 1,5 ml contenant du sérum humain dans du diluant.
- Conjugué de 13 ml contenant des anticorps anti-IgG humaines marqués à la phosphatase alcaline (couleur bleue).
- Diluant (Dil) de 2 x 32 ml contenant du PBS (couleur rouge).
- Substrat de pNPP de 13 ml.
- Solution d'arrêt de 13 ml.
- Solution de lavage de 30 ml (concentrée 30x).
- Six étalons (cinq étalons, Étal 2-6, contenant du sérum humain) dans du diluant. Étalon 1 de 1,5 ml (Étal 1) = 0 UI/mL, étalon 2 de 1,5 ml (Étal 2) = 2 UI/mL, étalon 3 de 1,5 ml (Étal 3) = 10 UI/mL, étalon 4 de 1,5 ml (Étal 4) = 30 UI/mL, étalon 5 de 1,5 ml (Étal 5) = 100 UI/mL, étalon 6 de 1,5 ml (Étal 6) = 200 UI/mL.

Tous les réactifs de la trousse sont prêts à l'emploi, à l'exception de la solution de lavage, et ils doivent être conservés entre 2 °C et 8 °C. Retirer de l'emballage en aluminium uniquement le nombre de barrettes nécessaires pour le dosage, puis le refermer avec soin.

Matériel ou équipement nécessaire mais non fourni

- Lecteur de microplaques avec filtre de 405 nm.
- Pipettes de précision avec embouts jetables.
- Laveur de plaque pour les barrettes de puits, papier absorbant, tubes à essai et chronomètre.

PROCÉDURE

Toutes les solutions doivent être à température ambiante. Les incubations de toutes les étapes doivent être réalisées à température ambiante (18-25 °C) avec le couvercle. Incuber le sérum pendant 60 minutes, le conjugué pendant 30 minutes et le substrat pendant 30 minutes.

Préparation de la solution de lavage

En cas d'observation de cristaux de sel dans le flacon contenant la solution de lavage concentrée, placer le flacon dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à dissolution complète des cristaux avant de procéder à la dilution de la solution de lavage. Diluer 10 ml de solution de lavage concentrée (30x) dans 290 ml d'eau distillée. La solution de lavage diluée est stable jusqu'à la date de péremption de la trousse si elle est conservée entre 2 °C et 8 °C.

Dilution du sérum et incubation

Diluer le sérum du patient au 1/100 avec du diluant (990 µl de diluant + 10 µl de sérum).

Pipeter 100 µl/puits, en double, d'étalon 1, 2, 3, 4, 5, 6, de contrôle positif (CP), de contrôle négatif (CN) et de sérum du patient dilué (P) conformément au diagramme suivant. Incuber pendant 60 minutes.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|--------|--------|------|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Étal 1 | Étal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| B | Étal 1 | Étal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| C | Étal 2 | Étal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| D | Étal 2 | Étal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| E | Étal 3 | CP | etc. | | | | | | | | | |
| F | Étal 3 | CP | | | | | | | | | | |
| G | Étal 4 | CN | | | | | | | | | | |
| H | Étal 4 | CN | | | | | | | | | | |

Après l'incubation du sérum

Laver 3 fois avec 300 µl de solution de lavage / puits, en remplissant et en vidant les puits chaque fois ; après le dernier lavage, vider les puits en tapotant les barrettes sur du papier absorbant.

Ajout du conjugué

Pipeter 100 µl de conjugué dans chaque puits. Incuber pendant 30 minutes.

Après l'incubation du conjugué

Laver comme auparavant.

Ajout de la solution du substrat

Pipeter 100 µl de substrat de pNPP dans chaque puits ; incuber pendant 30 minutes.

Ajout de la solution d'arrêt

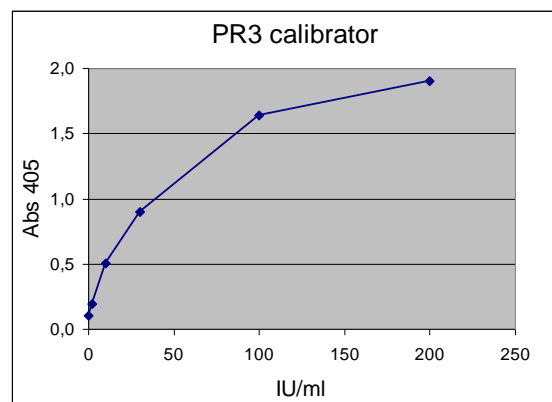
Pipeter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits, puis lire l'absorbance dans les 2 heures suivantes à 405 nm sur un lecteur de microplaques.

Calculs

Tracer une courbe d'étalonnage représentant la DO en fonction des concentrations en UI/mL des 6 étalons. Les six étalons fournis ont été titrés conformément à la norme AF-CDC, ce qui correspond à une concentration de 0 UI/mL pour l'étalon 1, de 2 UI/mL pour l'étalon 2, de 10 UI/mL pour l'étalon 3, de 30 UI/mL pour l'étalon 4, de 100 UI/mL pour l'étalon 5 et de 200 UI/mL pour l'étalon 6. Extrapoler la concentration en UI/mL de l'échantillon patient à l'aide de la courbe tracée. Les concentrations supérieures à 200 UI/mL doivent être communiquées comme > 200 UI/mL ou bien répéter l'analyse avec une dilution plus grande. La trousse Wieslab® PR3-ANCA est étalonnée par rapport à l'étalon international de l'AF-CDC.

| <u>Exemple :</u> | <u>Étalon</u> | <u>UI/mL</u> | <u>Absorbance</u> |
|------------------|---------------|--------------|-------------------|
| | 1 | 0 | 0,102 |
| | 2 | 2 | 0,192 |
| | 3 | 10 | 0,509 |
| | 4 | 30 | 0,902 |
| | 5 | 100 | 1,640 |
| | 6 | 200 | 1,906 |

Un échantillon dont l'absorbance est de 0,886 donne une concentration en PR3-ANCA de 27 UI/mL, lue sur l'axe des abscisses. Dans cet exemple, un lissage par la méthode des 4 paramètres logistiques est appliqué.



Important : La courbe est un exemple qui ne doit pas être utilisé pour interpréter des échantillons patients réels.

Contrôle qualité

La DO de l'étalon 1 doit être $< 0,2$.

La DO de l'étalon 6 doit être $> 1,0$.

Consulter le certificat du lot pour connaître la valeur des contrôles négatif et positif.

Les contrôles positif et négatif servent à surveiller qu'il n'existe pas d'échec substantiel des réactifs. Le contrôle positif ne garantit pas la précision du seuil du dosage. Il est recommandé de doser un contrôle supplémentaire correspondant au seuil du dosage. Comme le contrôle positif est prêt à l'emploi, il n'indique pas une éventuelle erreur de dilution de l'utilisateur. Il est recommandé d'utiliser un contrôle interne pour cela.

Si l'une des valeurs se situe hors de son intervalle, le dosage doit être considéré comme invalide et doit être répété. Des contrôles supplémentaires peuvent être analysés conformément aux recommandations ou aux exigences de la réglementation nationale, régionale et/ou locale ou des organismes d'accréditation. Se référer au document C24-A du CLSI pour obtenir des recommandations sur les bonnes pratiques de CQ.

Interprétation des résultats

< 4 UI/mL = **Négatif**

$4-6$ UI/mL = **Indéterminé** ; répéter l'analyse, si le résultat est encore indéterminé, répéter l'analyse avec une autre méthode ou analyser un nouvel échantillon.

> 6 UI/mL = **Positif**

Limites

La concentration en anticorps d'un échantillon patient ne peut pas servir à évaluer la gravité de la maladie, car les anticorps de patients différents peuvent avoir des affinités différentes. Par conséquent, il est difficile d'obtenir une normalisation absolue des résultats.

Le dosage ne doit pas servir de base unique pour décider un traitement clinique, mais il doit être utilisé en combinaison avec les symptômes cliniques et les résultats d'autres tests disponibles.

Le sérum de patients souffrant d'autres maladies auto-immunes et d'individus normaux peut contenir des auto-anticorps pouvant donner lieu à des réactions croisées. Certains individus peuvent donner un résultat positif pour les anticorps anti-PR3 avec peu ou aucun signe clinique de la maladie. D'autre part, certains patients avec une maladie active peuvent avoir une concentration indétectable de ces anticorps.

Aucun traitement immunosuppresseur ne doit être démarré sur la base d'un résultat positif pour les ANCA. Le démarrage ou le changement de traitement ne doit pas se baser uniquement sur les variations des concentrations en ANCA, mais plutôt sur un examen clinique minutieux.

References:

1. **van der Woude FJ, et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985, i 425-429.
2. **Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease*. Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
3. **Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
4. **Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
5. **Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
6. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
7. **Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
8. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
9. **Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. I. *Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
10. **Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
11. **Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
12. **Savigne J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
13. **Savigne J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
14. **Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.
15. **Neumann, I, et al.** Glomerular immune deposits are associated with increased proteinuria in patients with ANCA-associated crescentic nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2003, 18, 524-531.
16. **Csernok E, Ahlquist D, Ullrich S, Gross W.L.** A critical evaluation of commercial immunoassays for antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 and myeloperoxidase in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Rheumatology* 2002;41:1313-1317.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

| | |
|---|---|
|  | Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer. |
|  | Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer. |
|  | Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före. |
|  | Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur. |
|  | Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk. |
|  | Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen. |
|  | In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning. |
|  | Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning. |
|  | Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare. |
|  96 | Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test. |
|  | Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter. |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Ag | Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen. |
| DIL | Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert. |
| CONJ | Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat. |
| BUF WASH 30X | Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc. |
| SUBS pNPP | Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. |
| SOLN STOP | Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning |
| CAL X | Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. |
| CONTROL X | Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll. |

INSTRUCCIONES DE USO EN VERSIÓN BREVE AL ESPAÑOL

Utilización del producto

El Test Wieslab® PR3-ANCA es una prueba inmunológica de acoplamiento de enzimas (Elisa) para la determinación de Anticuerpos IgG los cuales están dirigidos en contra de proteína 5 en suero humano. El resultado puede ser un sospechoso indicio de Granulomatosis de Wegeners. El análisis debe ser realizado por personal calificado.

PARA USO DEL DIAGNOSTICO EN VITRO

Toma de muestras

El análisis PR3- ANCA está concebido para las pruebas de suero. Considere que diferentes reactivos sobre todo las pruebas de suero pueden tener componentes potencialmente infecciosos. No analice pruebas que sean ictericas, lípidas o hemolíticas. El suero no activado por calor puede mostrar actividad inespecífica y por tanto no debe ser analizado. Las pruebas pueden ser conservadas entre 2-8°C cuando los análisis sean realizados en los próximos días. La conservación a largo plazo debe realizarse a -20°C o más. Los congeladores con sistemas de autodescongelación no son indicados para éstos casos debido al riesgo de autodescongelación de las pruebas. Las pruebas que no han sido debidamente almacenadas pueden arrojar resultados erróneos.

CLSI proporciona recomendaciones para la conservación de muestras de sangre, (Approved Standard- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Información de seguridad

- Sólo para uso del diagnóstico en vitro
- El suero para la preparación de controles y calibración fue probado negativamente en antígenos de superficie contra anticuerpos de la debilidad inmunológica humana Virus 1 & 2 (HIV 1&2), Hepatitis C (HCV), Hepatitis B Es de considerarse en todo caso que ningún método puede garantizar la ausencia de HIV, HCV, Hepatitis B-Virus, u otros componentes infecciosos.
- Todas las muestras humanas deben ser consideradas potencialmente infecciosas y manipularse con el cuidado requerido.
- Los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) y los National Institutes of Health (NIH) en Estados Unidos recomiendan que materiales potencialmente infecciosos deben ser investigados en laboratorios de nivel de seguridad 2.
- Todas las soluciones contienen ProClin 300 como conservante. No manipule nunca la pipeta con la boca. Evite el contacto directo de la piel con los reactivos o las muestras de los pacientes. Reactivos con ProClin 300 actúan de forma irritante, por eso es indispensable evitar el contacto con la piel y los ojos. En caso de que un reactivo entre en contacto con la piel o los ojos, enjuague inmediatamente y con cuidado la zona afectada con gran cantidad de agua.
- Pueden solicitarse a Euro Diagnostica las hojas de datos de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.



| | | |
|------|------|-----|
| BUF | WASH | 30X |
| DIL | | |
| CONJ | | |
| CAL | | |

| | |
|---------|------|
| CONTROL | + |
| CONTROL | - |
| SOLN | STOP |
| SUBS | pNPP |

Atención

Contiene ProClin 300:

Masa de reacción de: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

| | |
|-----------|---|
| H317: | Puede provocar una reacción alérgica en la piel. |
| P264: | Lávese bien las manos después de manipular. |
| P280: | Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. |
| P302+352: | EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. |
| P333+313: | En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. |

Equipo adicional requerido que no es parte integrante del set:

- Espectrofotómetro con filtro de 405nm.
- Pipeta de precisión con unidad desechable.
- Instalación de lavado para placas de Microtiter, papel secante, tubos de ensayo y cronómetro.

Conservación

- Un marco con 96 pocillos (de color rojo) revestidos con proteinasa 3, una tapa cerrada en un envase de aluminio con un envase seco.
- 1,5 ml de control negativo (CN) con suero humano en diluyente.
- 1,5 ml de control positivo (CP) con suero humano en diluyente.
- 13 ml de conjugado con anticuerpos frente a la IgG HUMANA marcados con fosfatasa alcalina (color azul).
- 2 x 32 ml de diluyente (Dil) con PBS (color rojo).
- 13 ml de sustrato pNPP.
- 13 ml de solución de parada
- 30 ml de solución de lavado concentrada 30x.
- Seis calibradores (cinco calibradores, Cal 2-6, con suero humano) en diluyente. 1,5 ml de Cal 1 = 0 UI/mL, 1,5 ml de Cal 2 = 2 UI/mL, 1,5 ml de Cal 3 = 10 UI/mL, 1,5 ml de Cal 4 = 30 UI/mL, 1,5 ml de Cal 5 = 100 UI/mL, 1,5 ml de Cal 6 = 200 UI/mL.

Todos los componentes anteriormente nombrados, excepto el set de solución de lavado están preparados para uso inmediato. Conserve el set en el refrigerador a temperatura entre +2-8° C. Por favor manténgase tapado para evitar la evaporación. Extraiga solamente las tiras de muestra que necesita. Las restantes conservarlas en una bolsa cerrada.

Procedimiento

Antes de usarse las soluciones dejarlas que tomen la temperatura ambiente. Incube todos los pasos a temperatura ambiente (18-25° C) con tapa. Incube el suero durante 60 minutos, el conjugado durante 30 minutos y el sustrato durante 30 minutos.

Solución de lavado

Si observa cristales de sal en el frasco con solución de lavado concentrada, coloque el frasco en un baño de agua a 37 °C hasta que los cristales se hayan disuelto, antes de la dilución de la solución de lavado. Diluya 10 ml de una la solución de lavado 30 veces concentrada en 290 ml de agua destilada. La solución diluída puede conservarse entre 2-8° C hasta la fecha de vencimiento del set.

Dilución del suero e incubación

Diluya el suero del paciente 1/100 con diluyente (990 µl de diluyente + 10 µl de suero).

Pipetee 100 µl/pocillo por duplicado de Calibrador 1, 2, 3, 4, 5, 6, CP, CN y suero del paciente (P) diluido de acuerdo con el diagrama siguiente. Incube durante 60 minutos.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|------|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Cal 1 | Cal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| B | Cal 1 | Cal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| C | Cal 2 | Cal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| D | Cal 2 | Cal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| E | Cal 3 | CP | etc. | | | | | | | | | |
| F | Cal 3 | CP | | | | | | | | | | |
| G | Cal 4 | CN | | | | | | | | | | |
| H | Cal 4 | CN | | | | | | | | | | |

Después de la prueba de incubación

Lávese 3 veces con 300µl de solución de lavado. Con cada ciclo de lavado sea muy cuidadoso al vaciar y rellenar las probetas. Después del último lavado debe extraerse el líquido restante mediante papel absorbente (tiras de muestra).

Anadir solución conjugat

Anada 100 µl de solución conjugat a cada reactivo. Incúbese durante 30 minutos.

Después de la incubación

Lave como se indica anteriormente.

Añada solución de sustrato

Añada 100µl de solución de sustrato pNPP a cada set de reactivo. Incúbese durante 30 minutos.

Adición de la solución de parada

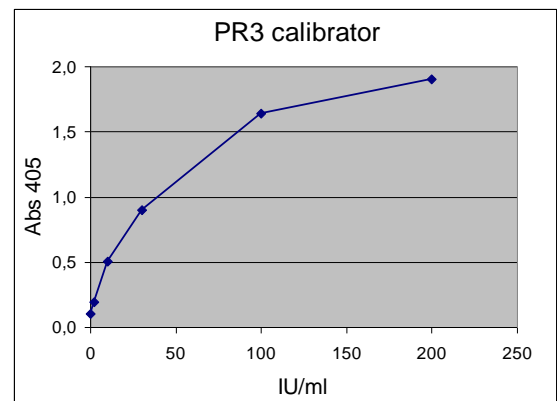
Añada 100 µl de solución de parada a cada pocillo y lea la absorbancia a 405 nm en un lector de títulos de microplacas en el plazo de 2 horas.

Calculación

Construya una curva calibradora representando la DO frente a los valores de UI/mL de los 6 calibradores. Los seis calibradores facilitados se han titulado para ajustarse al estándar AF-CDC, lo que da como resultado los valores de 0 UI/mL para el calibrador 1, 2 UI/mL para el calibrador 2, 10 UI/mL para el calibrador 3, 30 UI/mL para el calibrador 4, 100 UI/mL para el calibrador 5 y 200 UI/mL para el calibrador 6. Lea el valor de UI/mL del paciente a partir de la curva construida. Los valores mayores de 200 deben comunicarse como >200 o reanalizarse con una dilución mayor. El Wieslab® PR3-ANCA está estandarizado frente al patrón internacional AF-CDC.

| Ejemplo: | <u>Calibrador</u> | <u>UI/mL</u> | <u>Absorbancia</u> |
|----------|-------------------|--------------|--------------------|
| | 1 | 0 | 0.102 |
| | 2 | 2 | 0.192 |
| | 3 | 10 | 0.509 |
| | 4 | 30 | 0.902 |
| | 5 | 100 | 1.640 |
| | 6 | 200 | 1.906 |

Una muestra con un valor de absorbancia de 0,886 se leerá en el eje X como con 27 UI/mL de PR3-ANCA. En este ejemplo, se ha aplicado una curva logística de 4 parámetros.



Importante : La curva indicada es sólo un ejemplo y no debe ser utilizada para la lectura de muestras de pacientes.

Control de calidad

La DO para el calibrador 1 debe ser $< 0,2$.

La DO del calibrador 6 debe ser $> 1,0$

El valor para los controles positivos y negativos se extrae del certificado de las sondas.

Los controles positivo y negativo se utilizan para determinar si el Set ha funcionado técnicamente. El control positivo no garantiza seguridad de medición fuera de las IU/mL de medición aquí expuestas.

Recomendamos en estos casos efectuar un control adicional.

Como el control positivo está listo para usar, no indica un posible error de dilución por parte del usuario. Se recomienda usar un control interno con este fin.

Si uno o varios de los valores no se encuentran dentro de los parámetros indicados el test debe declararse nulo y repetirse. Si las autoridades locales así lo exigen, pueden realizarse controles adicionales. Recomendaciones referentes al control de calidades pueden obtenerse del NCCLSs Dokument C24-A.

Significado de los resultados

< 4 UI/mL = **Negativo**

$4-6$ UI/mL = **Equívoco**; Repita la prueba, si sigue siendo equívoca, realícela con un método alternativo o estudie una nueva muestra

> 6 UI/mL = **Positivo**

Límites del análisis

-El concentrado de anticuerpos de un solo paciente no puede ser utilizado para dictaminar la gravedad de la enfermedad, debido a que los anticuerpos de diferentes pacientes presentan diferentes afinidades (del antígeno aquí utilizado) y es por eso que el análisis es difícil de tipificar. La utilización de los resultados de este análisis no son suficientes para un dictamen clínico. En lugar de éstos deben considerarse los análisis del Test conjuntamente con otros parámetros relevantes como por ejemplo parámetro clínico (síntomas, etc) para la valoración correcta y específica de la situación clínica. Es conocido que sueros de pacientes con otras enfermedades autoinmunes y generalmente individuos sanos muestran reacción cruzada () en los resultados de los análisis sin que se tengan pruebas de indicio de enfermedad. En otras palabras un individuo puede reaccionar positivamente para Anticuerpos PR3-ANCA sin que haya pruebas clínicas para señalar una enfermedad. Al mismo tiempo se sabe que pacientes que padecen la enfermedad pueden reaccionar en forma negativa con Anticuerpos PR3-ANCA. Un tratamiento tampoco debe iniciarse o modificarse por cambios de la concentración PR3 -ANCA, pero sí debe basarse en el cuadro clínico general. La concentración PR3-ANCA de un suero específico puede variar después del análisis con diferentes métodos de prueba. Esto se debe a las diferentes características y sensibilidad de los reactivos que provienen de diferentes Sets y diferentes fabricantes.

References:

1. **van der Woude FJ, et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985, i 425-429.
2. **Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease*. Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
3. **Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
4. **Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
5. **Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
6. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
7. **Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
8. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
9. **Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. I. *Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
10. **Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
11. **Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
12. **Savigne J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
13. **Savigne J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
14. **Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.
15. **Neumann, I, et al.** Glomerular immune deposits are associated with increased proteinuria in patients with ANCA-associated crescentic nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2003, 18, 524-531.
16. **Csernok E, Ahlquist D, Ullrich S, Gross W.L.** A critical evaluation of commercial immunoassays for antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 and myeloperoxidase in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Rheumatology* 2002;41:1313-1317.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

| | |
|---|---|
|  | Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer. |
|  | Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer. |
|  | Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före. |
|  | Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur. |
|  | Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk. |
|  | Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen. |
|  | In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning. |
|  | Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning. |
|  | Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare. |
|  | Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test. |
|  | Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter. |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Ag | Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen. |
| DIL | Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert. |
| CONJ | Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat. |
| BUF WASH 30X | Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc. |
| SUBS pNPP | Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. |
| SOLN STOP | Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning |
| CAL X | Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. |
| CONTROL X | Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll. |

GEBRAUCHSANWEISUNG IN DEUTSCHER KURZFORM

Benutzung des Produktes

Der Wieslab® PR3-ANCA Kit ist ein *enzymgekoppelter Immunnachweis (ELISA)* für die Bestimmung und Quantifizierung von IgG Antikörper, welche gegen Proteine 3 in Humanserum gerichtet sind. Das Resultat kann als Hinweis bei Verdacht von Wegener's Granulomatosis dienen. Die Analyse soll von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

NUZUNG IN DER *IN-VITRO-DIAGNOSTIK*:

Probenentnahme

Die PR3-ANCA-Analyse ist für Serumproben gedacht. Bitte bedenken Sie, dass verschiedene Reagenzien und die Serumproben potentiell infektiöse Bestandteile beinhalten könnten. Analysieren Sie keine Proben, die ikterisch, lipämisch oder hämolysiert sind. Wärmeinaktiviertes Serum kann unspezifische Aktivität zeigen und sollte deswegen nicht analysiert werden. Proben können bei 2-8° C aufbewahrt werden, wenn die Analyse innerhalb der nächsten Tage gemacht wird. Eine langfristige Aufbewahrung sollte bei -0° C oder kälter erfolgen. Gefrierschränke mit automatischer Abtaueinrichtung sind nicht für die Aufbewahrung geeignet, da das Risiko des Auftauens der Proben besteht. Proben, die nicht ordnungsgemäß gelagert worden sind, können falsche Ergebnisse hervorrufen. Das CLSI hat Empfehlungen zur Lagerung von Blutproben herausgebracht, (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Sicherheitsinformation

- Nur für die in-vitro-Diagnostik zu benutzen.
- Das Serum für die Präparierung von Kontrollen und Kalibrierung wurde auf Antikörper gegen die menschliche Immunschwäche-Viren 1 & 2 (HIV 1&2), Hepatitis C (HCV), Hepatitis B Oberflächenantigen getestet, sie Sera sind negativ. Es ist jedoch in jedem Fall zu bedenken, dass keine Methode die Abwesenheit von HIV, HCV, Hepatitis B-Virus, oder andere infektiöse Bestandteile zur Gänze garantieren kann.
- Alle humanen Proben müssen deswegen als potentiell infektiös betrachtet und mit Sorgfalt behandelt werden.
- Das Centers for Disease Control and Prevention (CDC) und das National Institutes of Health (NIH) in den USA empfehlen, dass potentiell infektiöse Materialien in Labors mit der Sicherheitsstufe 2 untersucht werden sollten.
- Alle Lösungen beinhalten ProClin 300 als Konservierungsstoff. Pipetieren Sie niemals mit dem Mund. Vermeiden Sie direkten Kontakt beim Umgang mit Reagenz- oder Patientenproben mit der Haut. Reagenzien mit ProClin 300 wirken reizend. Deswegen sind der Kontakt mit Haut und Augen unbedingt zu vermeiden. Für den Fall dass Reagenzien mit Haut oder Augen in Berührung gekommen sind, spülen Sie sofort die betroffenen Stellen viel Mengen Wasser sorgfältig ab.
- Sicherheitsdatenblätter sind für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile auf Anfrage von Euro Diagnostica erhältlich.



| | | |
|------|------|-----|
| BUF | WASH | 30X |
| DIL | | |
| CONJ | | |
| CAL | | |

| | |
|---------|------|
| CONTROL | + |
| CONTROL | - |
| SOLN | STOP |
| SUBS | pNPP |

Achtung

Enthält ProClin 300:
 Reaktionsmasse aus: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7]
 and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

| | |
|-----------|--|
| H317: | Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen. |
| P264: | Gründlich die Hände waschen nach Gebrauch. |
| P280: | Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden. |
| P302+352: | BEI HAUT KONTAKT: Mit sehr viel Seife und Wasser waschen. |
| P333+313: | Im Falle einer Hautreizung oder -ausschlags: Ärztlichen Rat einholen, bzw. zur Kenntnis bringen. |

Zusätzlich erforderliche Ausrüstung, die nicht Bestandteile des Set´s sind:

- Spektrophotometer mit Filter für 405nm.
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen.
- Waschvorrichtung für Microtiterplatten, Papier zum Abtrocknen, Reagenzgläser, Zeitschaltuhr.

Verpackungsinhalt des Sets und dessen Aufbewahrung

- Ein Rahmen mit 96 Kavitäten (rot gefärbt), die mit Proteinase 3 beschichtet sind, ein Deckel in einer Folienverpackung mit Trockenmittel versiegelt.
- 1,5 ml Negativkontrolle (NK), die Humanserum in Verdünnungspuffer enthält.
- 1,5 ml Positivkontrolle (PK), die Humanserum in Verdünnungspuffer enthält.
- 13 ml Konjugat, das mit alkalischer Phosphatase markierte Antikörper gegen Human-IgG (blau) enthält.
- 2 x 32 ml Verdünnungspuffer (Dil.), der PBS enthält (rot).
- 13 ml pNPP-Substrat.
- 13 ml Stopplösung
- 30 ml Waschlösung, 30-fach konzentriert.
- Sechs Kalibratoren in Verdünnungspuffer. Fünf Kalibratoren, Kal 2-6, die Humanserum enthalten. 1,5 ml Kal 1 = 0 IE/mL, 1,5 ml Kal 2 = 2 IE/mL, 1,5 ml Kal 3 = 10 IE/mL, 1,5 ml Kal 4 = 30 IE/mL, 1,5 ml Kal 5 = 100 IE/mL, 1,5 ml Kal 6 = 200 IE/mL.

Alle zuvor genannten Bestandteile, außer der Waschlösungen im Kit, sind für den sofortigen Gebrauch fertig vorbereitet. Bewahren Sie das Set im Kühlschrank bei +2-8° C auf. Bitte benutzen Sie einen Deckel um Verdunstung zu verhindern. Bitte entnehmen Sie nur so viele Probestreifen wie nötig. Die restlichen Probestreifen müssen in dem geschlossenen Beutel aufbewahrt werden.

TESTPROZEDUR

Alle Lösungen vor Gebrauch auf Zimmertemperatur erwärmen lassen. Alle Inkubationen bei allen Schritten mit aufgelegtem Deckel bei Raumtemperatur durchführen (18-25 C). Serum 60 Minuten, Konjugat 30 Minuten und Substrat 30 Minuten inkubieren.

Zubereitung der Waschlösung

Falls sich in dem Röhrchen mit der konzentrierten Waschlösung Salzkristalle gebildet haben, dieses vor Verdünnung der Waschlösung in ein 37°C warmes Wasserbad stellen, bis sich die Salzkristalle aufgelöst haben. Verdünnen Sie 10 mL der 30-fach konzentrierte Waschlösung mit 290 mL destilliertem Wasser. Die verdünnte Waschlösung ist bei Aufbewahrung bei 2-8° C bis zum Verfallsdatum des Sets haltbar.

Probeverdünnung und Inkubationszeiten

Das Patientenserum mit Verdünnungspuffer 1:100 (990 µl Verdünnungspuffer + 10 µl Serum) verdünnen.

Im Doppelansatz 100 µL/Kavität der Kalibratoren 1, 2, 3, 4, 5, 6, PK, NK und das verdünnte Patientenserum (P) gemäß der untenstehenden Übersicht pipettieren. 60 Minuten inkubieren.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-----|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Kal 1 | Kal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| B | Kal 1 | Kal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| C | Kal 2 | Kal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| D | Kal 2 | Kal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| E | Kal 3 | PK | usw | | | | | | | | | |
| F | Kal 3 | PK | | | | | | | | | | |
| G | Kal 4 | NK | | | | | | | | | | |
| H | Kal 4 | NK | | | | | | | | | | |

Nach der Probeninkubation

Waschen Sie 3 mal mit 300µl Waschlösung /Ansatz. Bitte sehr sorgfältig die Probengefäße entleeren und befüllen bei jedem Waschzyklus vornehmen. Nach dem letzten Waschen müssen alle verbleibenden Flüssigkeiten durch Abklopfen der Probestreifen auf absorbierendem Papier entfernt werden.

Zusatz von Konjugatlösung

Fügen Sie 100 µl Konjugatlösung zu jedem Reaktionsansatz hinzu. Inkubieren Sie für 30 Minuten.

Nach der Konjugatinkubation

Waschen Sie wie oben angegeben

Hinzufügen der Substrat pNPP lösung

Fügen Sie 100µl Substratlösung pNPP zu jedem Reaktionsansatz hinzu. Für 30 Minuten inkubieren.

Stopplösung hinzufügen

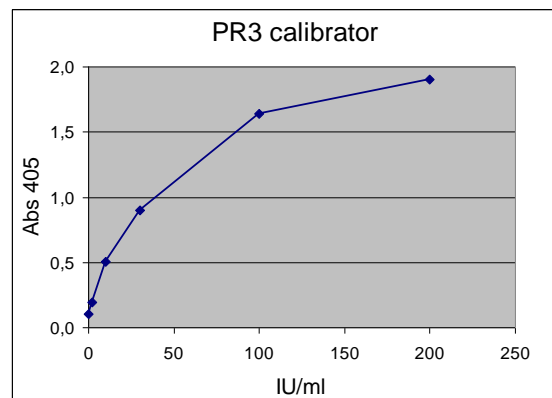
100 µL Stopplösung in jede Kavität geben und die Extinktion innerhalb von 2 Stunden bei 405 nm mit einem Lesegerät für Mikrotiterplatten ablesen.

Auswertung

Eine Kalibratorkurve erstellen, indem die OD gegen die IE/mL-Werte der 6 Kalibratoren eingetragen werden. Die sechs zur Verfügung gestellten Kalibratoren wurden titriert, damit sie dem AF-CDC-Standard entsprechen, womit sich die folgenden Werte ergeben: 0 IE/mL für Kalibrator 1, 2 IE/mL für Kalibrator 2, 10 IE/mL für Kalibrator 3, 30 IE/mL für Kalibrator 4, 100 IE/mL für Kalibrator 5 und 200 IE/mL für Kalibrator 6. Den IE/mL-Wert für den Patienten aus der erstellten Kurve ablesen. Werte über 200 sollten als > 200 angegeben werden oder mit einer höheren Verdünnung noch einmal getestet werden. Wieslab® PR3-ANCA wurde gegen die internationale Norm AF-CDC titriert.

| Beispiel: | <u>Kalibrator</u> | <u>IE/mL</u> | <u>Extinktion</u> |
|-----------|-------------------|--------------|-------------------|
| | 1 | 0 | 0,102 |
| | 2 | 2 | 0,192 |
| | 3 | 10 | 0,509 |
| | 4 | 30 | 0,902 |
| | 5 | 100 | 1,640 |
| | 6 | 200 | 1,906 |

Für eine Probe mit einem Extinktionswert von 0,886 ist auf der x-Achse ein Wert von 27 IE/mL für PR3-ANCA abzulesen. In diesem Beispiel wurde eine 4-Parameter-Logistik-Kurve verwendet.



Wichtig: Die gezeigte Kurve ist nur ein Beispiel und darf nicht für die Ablesung von Patientenproben benutzt werden.

Qualitätskontrolle

Die OD für Kalibrator 1 sollte $< 0,2$ sein.

Die OD für Kalibrator 6 sollte $> 1,0$ sein.

Der Wert für die Positiv- und die Negativkontrolle, wird aus dem Lot-Zertifikat entnommen. Positiv- und Negativkontrolle werden benutzt, um festzustellen, ob das Set technisch funktioniert hat. Die Positivkontrolle garantiert keine Messsicherheit außerhalb des hier angegebenen Messbereiches. Es wird geraten, in diesem Bereich eine zusätzliche Kontrolle durchzuführen.

Da die Positivkontrolle gebrauchsfertig ist, zeigt sie einen eventuellen Verdünnungsfehler durch den Nutzer nicht an. Es wird empfohlen für diesen Zweck eine interne Kontrolle zu verwenden.

Falls eine oder mehrere Werte nicht innerhalb der angegebenen Größenordnung liegen, sollte der Test als nicht gültig erklärt und die Analyse wiederholt werden. Sollten lokale Behörden es fordern, können weitere Kontrollen analysiert werden. Siehe CLSI C24-A für Informationen über entsprechende Verfahren zur Qualitätskontrolle.

Auswertung der Resultate

< 4 IE/mL = **Negativ**

$4 - 6$ IE/mL = **Nicht eindeutig**; Erneut testen, wenn Ergebnis noch immer nicht eindeutig, mit einer alternativen Methode erneut testen oder eine neue Probe testen.

> 6 IE/mL = **Positiv**

Grenzen der Analyse

Der Antikörpertiter eines einzelnen Patienten kann für die Beurteilung von dem Schweregrad der Krankheit nicht benutzt werden, da die Antikörper von unterschiedlichen Patienten unterschiedliche Affinitäten (zum hier verwendeten Antigen) aufweisen können. Die Analyse ist deshalb schwer zu standardisieren.

Die ausschließliche Verwendung der Ergebnisse der Analyse dieses Testes sind für eine klinische Beurteilung nicht ausreichend. Stattdessen müssen die Ergebnisse der Analyse zusammen mit anderen relevanten Parametern benutzt werden, wie z.B. klinische Parameter (Symptome etc.), um eine korrekte Beurteilung der spezifischen klinischen Situation erfassen zu können. Es ist bekannt, dass Sera von Patienten mit anderen autoimmunen Krankheiten und generell gesunden Individuen eine gewisse Kreuzreaktion in der Analyse aufweisen können. Mit anderen Worten, einige Individuen können also positiv für PR3-ANCA Antikörper reagieren, ohne dass sonstige klinische Belege für die Krankheit angezeigt werden. Gleichzeitig ist es auch bekannt, dass Patienten mit aktiver Krankheit negativ PR3-ANCA-Antikörper reagieren können. Mit der Behandlung von Immunsuppressiva darf nicht nur auf Grund eines positiven PR3-ANCA Resultates begonnen werden. Eine Behandlung darf auch nicht aufgrund von Veränderungen des PR3-ANCA Titers initiiert oder geändert werden, sondern muss in jedem Fall auf das klinische Gesamtbild basieren. Die PR3-ANCA Konzentrationen in einem spezifischen Serum kann nach Analyse mit unterschiedlichen Testmethoden variieren. Das beruht primär auf unterschiedliche Eigenschaften und Empfindlichkeiten der Reagenzien, die aus unterschiedlichen Sets verschiedener Hersteller stammen.

References:

1. **van der Woude FJ, et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985, i 425-429.
2. **Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease.* Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
3. **Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
4. **Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
5. **Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
6. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease.* Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
7. **Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
8. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease.* Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
9. **Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. I. *Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
10. **Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
11. **Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
12. **Savigne J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
13. **Savigne J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
14. **Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.
15. **Neumann, I, et al.** Glomerular immune deposits are associated with increased proteinuria in patients with ANCA-associated crescentic nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2003, 18, 524-531.
16. **Csernok E, Ahlquist D, Ullrich S, Gross W.L.** A critical evaluation of commercial immunoassays for antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 and myeloperoxidase in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Rheumatology* 2002;41:1313-1317.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

| | |
|---|---|
|  | Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer. |
|  | Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer. |
|  | Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före. |
|  | Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur. |
|  | Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk. |
|  | Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen. |
|  | In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning. |
|  | Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning. |
|  | Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare. |
|  | Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test. |
|  | Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter. |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Ag | Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen. |
| DIL | Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert. |
| CONJ | Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat. |
| BUF WASH 30X | Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc. |
| SUBS pNPP | Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. |
| SOLN STOP | Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning |
| CAL X | Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. |
| CONTROL X | Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll. |

ISTRUZIONI D'USO ABBREVIATE

Uso previsto

Wieslab® PR3 -ANCA è un Kit immunoenzimatico, (ELISA) per la determinazione e la quantificazione degli anticorpi IgG e nel siero umano. Il test si usa per la rivelazione degli anticorpi in un singolo campione di siero. I risultati del test sono di aiuto per la diagnosi della granulomatosi di Wegener. Le analisi dovranno essere eseguite da laboratori professionali specializzati.

USO PER LE DIAGNOSTICHE IN VITRO

Raccolta dei campioni

Per il test PR3 - ANCA si usano campioni di siero. Agisce come se fosse capace di comunicare agenti infetti.

Evitare di usare campioni che sono itterici, lipenici o emolizzati.

Si sconsiglia l'esecuzione del test su sieri inattivati tramite calore, in quanto possono produrre reattività non specifiche. Conservare il siero tra 2-8° C se il test sarà eseguito entro cinque giorni. Se i campioni saranno conservati per periodi più lunghi, dovranno essere conservati ad una temperatura di -20° C o più bassa, congelatori con sbrinatori automatici non sono adatti in quanto esiste il rischio che i campioni durante lo sbrinamento si scongelino e questo degraderebbe gli anticorpi. I campioni che sono posizionati in modo errato o che sono soggetti a sbrinamenti possono produrre risultati errati. Il CLSI fornisce raccomandazioni per la conservazione dei campioni di sangue, (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Avvertenze e precauzioni

- Da usare solo per diagnostiche in vitro.
- Ciascuna IU/mL di siero umano utilizzata nella preparazione dei controlli e dei calibratori nel kit è stata testata e risultata negativa alla presenza di anticorpi nel sistema immU/mLario dei virus 1 & 2 (HIV 1&2), epatite C (HCV), epatite B, antigeni superficiali dal metodo approvato FDA. È però da considerare che nessun metodo può offrire complete garanzie che agenti dei virus HIV, HCV, Epatite B virus, o altri agenti infettivi siano assenti, tutti i vari campioni e prove devono quindi essere trattati come potenziali vettori di malattie infettive.
- Il Centro per le Malattie Controllate e Prevenzione e l'Istituto Nazionale per la Salute raccomandano che il materiale potenzialmente infettivo sia maneggiato da bio-laboratori di livello di sicurezza 2.
- Tutte le soluzioni contengono ProClin 300 come conservante. Non pipettare mai con la bocca evitare che i reagenti entrino in contatto con gli occhi o la pelle. I reagenti contenenti ProClin possono essere irritanti. In caso di contatto lavare subito con acqua abbondante.
- La concentrazione di PR3 -ANCA in un dato campione può variare nei valori a seconda dei vari produttori a causa della diversità dei metodi e delle specificità dei reagenti.
- Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Euro Diagnostica.



| | | |
|------|------|-----|
| BUF | WASH | 30X |
| DIL | | |
| CONJ | | |
| CAL | | |

| | |
|---------|------|
| CONTROL | + |
| CONTROL | - |
| SOLN | STOP |
| SUBS | pNPP |

Attenzione

Contiene ProClin 300:

Miscela di: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

| | |
|-----------|--|
| H317: | Può provocare una reazione allergica cutanea. |
| P264: | Lavare accuratamente le mani dopo l'uso. |
| P280: | Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. |
| P302+352: | IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone. |
| P333+313: | In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. |

Materiali o accessori necessari che non sono inclusi nel kit

- Lettore di micropiastre con filtro 405 nm.
- Pipette di precisione con puntali monouso.
- Attrezzatura per il lavaggio dei pozzetti, carta assorbente, provette e timer.

Componenti del Kit e conservazione dei reagenti

- Un telaio con 96 pozzetti (di colore rosso) rivestiti con proteinasi 3, e un coperchio, sigillati in una busta dry-pack di alluminio.
- 1,5 ml di controllo negativo (NC) contenente siero umano in diluente.
- 1,5 ml di controllo positivo (PC) contenente siero umano in diluente.
- 13 ml di coniugato contenente anticorpi anti-IgG umane marcati con fosfatasi alcalina (colore blu).
- 2 x 32 ml di diluente (Dil) contenente PBS (colore rosso).
- 13 ml di substrato pNPP.
- 13 ml di soluzione di arresto.
- 30 ml di soluzione di lavaggio concentrata 30x.
- Sei calibratori (cinque calibratori, Cal 2-6, contenenti siero umano) in diluente. 1,5 ml di Cal 1 = 0 IU/mL, 1,5 ml di Cal 2 = 2 IU/mL, 1,5 ml di Cal 3 = 10 IU/mL, 1,5 ml di Cal 4 = 30 IU/mL, 1,5 ml di Cal 5 = 100 IU/mL, 1,5 ml di Cal 6 = 200 IU/mL.

Tutti i reagenti del Kit sono già pronti per l'uso escluso la soluzione di lavaggio che deve essere conservata a +2-8 ° C.

PROCEDURA

Tutte le soluzioni devono essere usate a temperatura ambiente.

Incubare in tutte le fasi a temperatura ambiente (18-25° C) con il coperchio. Incubare il siero per 60 minuti, il coniugato per 30 minuti e il substrato per 30 minuti.

Preparazione della soluzione di lavaggio

Se nella fiala della soluzione di lavaggio concentrata si osserva la formazione di cristalli di sale, scaldare la fiala a bagnomaria a una temperatura di 37°C fino allo scioglimento di tutti i cristalli prima della diluizione della soluzione di lavaggio. Diluite 10 ml della soluzione di lavaggio concentrata 30x in 290 ml di acqua distillata. Se conservata a + 2-8° C, la soluzione di lavaggio diluita è stabile fino alla data di scadenza del Kit.

Diluzione del siero e incubazione.

Diluire il siero del paziente con diluente in rapporto 1/100 (990 µl di diluente 10 µl di siero).

Pipettare 100µl/pozzetto in duplicato di Calibratore 1, 2, 3, 4, 5, 6, PC, NC e di siero diluito del paziente (P) secondo lo schema sotto illustrato. Incubare per 60 minuti.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-------|-------|------|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Cal 1 | Cal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| B | Cal 1 | Cal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| C | Cal 2 | Cal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| D | Cal 2 | Cal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| E | Cal 3 | PC | ecc. | | | | | | | | | |
| F | Cal 3 | PC | | | | | | | | | | |
| G | Cal 4 | NC | | | | | | | | | | |
| H | Cal 4 | NC | | | | | | | | | | |

Dopo l'incubazione del siero

Lavare ogni pozzetto 3 volte con 300 µl della soluzione di lavaggio riempire e svuotare i pozzetti ogni volta, dopo l'ultimo lavaggio svuotare tutti i pozzetti e asportare i residui liquidi tamponando con carta assorbente.

Aggiunta del coniugato

Aggiungere 100 µl di coniugato in ciascun pozzetto. Incubare per 30 minuti.

Dopo l'incubazione del coniugato

Lavare come sopra descritto.

Aggiunta della soluzione di substrato

Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato pNPP in ciascun pozzetto. Incubare per 30 minuti.

Aggiunta della soluzione di arresto

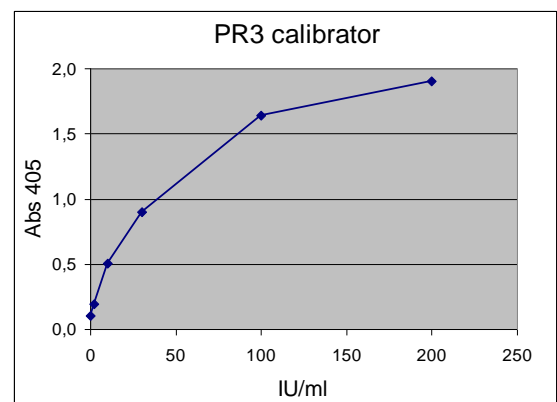
Aggiungere 100 µl di soluzione di arresto in ciascun pozzetto e leggere l'assorbanza a 405 nm con un lettore per piastra di microtitolazione entro 2 ore.

Calcolo dei risultati

Costruire una curva del calibratore tracciando le DO rispetto ai valori IU/mL dei 6 calibratori. I sei calibratori forniti sono stati titolati in modo da corrispondere allo standard AF-CDC risultante nei valori di 0 IU/mL per il calibratore 1, 2 IU/mL per il calibratore 2, 10 IU/mL per il calibratore 3, 30 IU/mL per il calibratore 4, 100 IU/mL per il calibratore 5 e 200 IU/mL per il calibratore 6. Leggere il valore IU/mL del paziente dalla curva costruita. I valori superiori a 200 devono essere registrati come >200, oppure ridosarli con una diluizione maggiore. Il Wieslab® PR3-ANCA è standardizzato rispetto allo standard internazionale AF-CDC.

| Esempio: | <u>Calibratore</u> | <u>IU/mL</u> | <u>Assorbanza</u> |
|----------|--------------------|--------------|-------------------|
| | 1 | 0 | 0.102 |
| | 2 | 2 | 0.192 |
| | 3 | 10 | 0.509 |
| | 4 | 30 | 0.902 |
| | 5 | 100 | 1.640 |
| | 6 | 200 | 1.906 |

Un campione con un valore di assorbanza di 0,886 sarà letto sull'asse X come avente 27 IU/mL di PR3-ANCA. In questo esempio è stato applicato uno schema con curva logistica a 4 parametri.



Importante: il diagramma è solo un esempio e non deve essere tenuto in considerazione per l'interpretazione delle analisi dell'attuale paziente.

Controllo di qualità

La DO per il calibratore 1 deve essere $< 0,2$.

La DO per il calibratore 6 deve essere $> 1,0$.

Per i valori dei controlli positivi e negativi vedere certificato annesso. I controlli negativo e positivo si utilizzano per monitorare l'eventuale malfunzionamento dei reagenti. Il controllo positivo non assicura la precisione per valori vicini al cut-off. In questo caso raccomandiamo di testare un controllo addizionale.

Poiché il controllo positivo è pronto per l'uso, non indica eventuali errori di diluizione da parte dell'utente. A questo fine si raccomanda di utilizzare un controllo interno.

Se uno dei valori non rientra nei range rispettivi, il test deve considerarsi non-valido e pertanto da ripetersi. Controlli addizionali possono essere testati secondo linee guida o richieste locali, nazionali, e/o regolamenti federali o organizzazioni di registrazione. Per le linee guida sulle corrette pratiche di CQ, fare riferimento a CLSI C24-A.

Interpretazione dei risultati

< 4 IU/mL = **Negativo**

$4-6$ IU/mL = **Equivoco**; Ripetere il test; se il risultato è ancora equivoco, utilizzare un metodo alternativo o effettuare il test su un nuovo campione

> 6 IU/mL = **Positivo**

Limitazioni

Il valore degli anticorpi di ogni singolo paziente non può essere utilizzato per misurare la gravità della malattia, in quanto gli anticorpi dei diversi pazienti possono differire l'un l'altro per affinità, pertanto è difficile ottenere una standardizzazione assoluta dei risultati.

Il test non deve essere utilizzato come unico mezzo per decisioni su terapie cliniche, ma deve essere utilizzato in combinazione con i parametri clinici e i risultati di altri test disponibili. Sieri di pazienti con malattie autoimmuni e di individui sani possono contenere potenziali autoanticorpi cross-reattivi. Alcuni individui possono risultare positivi agli anticorpi PR3 - Anca anche con leggere o nessun segno di sintomo della malattia. D'altra parte, alcuni pazienti con patologie attive, possono avere livelli anticorpali non rilevabili. Quindi la terapia non deve iniziare sulla base di un risultato PR3 - ANCA positivo. L'inizio o il cambiamento di un trattamento non devono basarsi solo su variazioni della concentrazione del PR3 - ANCA, ma piuttosto sulla base di osservazioni cliniche accurate.

References:

1. **van der Woude FJ, et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985, i 425-429.
2. **Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease*. Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
3. **Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
4. **Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
5. **Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
6. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
7. **Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
8. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
9. **Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. *I. Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
10. **Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
11. **Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
12. **Savigne J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
13. **Savigne J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
14. **Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.
15. **Neumann, I, et al.** Glomerular immune deposits are associated with increased proteinuria in patients with ANCA-associated crescentic nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2003, 18, 524-531.
16. **Csernok E, Ahlquist D, Ullrich S, Gross W.L.** A critical evaluation of commercial immunoassays for antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 and myeloperoxidase in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Rheumatology* 2002;41:1313-1317.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

| | |
|---|---|
|  | Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer. |
|  | Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer. |
|  | Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före. |
|  | Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur. |
|  | Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk. |
|  | Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen. |
|  | In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning. |
|  | Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning. |
|  | Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare. |
|  | Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test. |
|  | Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter. |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Ag | Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen. |
| DIL | Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert. |
| CONJ | Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat. |
| BUF WASH 30X | Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc. |
| SUBS pNPP | Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. |
| SOLN STOP | Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning |
| CAL X | Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. |
| CONTROL X | Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll. |

BREVES INSTRUÇÕES EM PORTUGUÊS

Utilização prevista

O kit do teste Wieslab® PR3-ANCA é um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção e quantificação de anticorpos IgG anti-proteinase 3 (PR3) em soros humanos. O ensaio é utilizado para detectar anticorpos somente numa amostra de soro. Os resultados do ensaio destinam-se a ser utilizados como meio auxiliar no diagnóstico da granulomatose de Wegener. A análise deve ser realizada por profissionais de laboratório com a formação adequada.

PARA USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

Advertências e precauções

- Para uso em diagnóstico *in vitro*.
- Os componentes de soro humano utilizados na preparação dos controlos e calibradores incluídos no kit foram testados quanto à presença de anticorpos contra os vírus 1 e 2 da imunodeficiência humana (VIH 1 e 2), vírus da hepatite C (VHC), assim como contra o antígeno de superfície da hepatite B por métodos aprovados pela FDA, com resultados negativos. Como não existe nenhum método de teste que ofereça uma garantia total da ausência dos vírus VIH, VHC, da hepatite B ou de outros agentes infecciosos, as amostras e reagentes derivados de produtos humanos devem ser manuseados como materiais capazes de transmitir agentes infecciosos.
- Os Centros para Controlo e Prevenção de Doenças e os Institutos Nacionais de Saúde recomendam que agentes potencialmente infecciosos sejam manuseados no Nível 2 de Biossegurança.
- Todas as soluções contêm ProClin 300 como conservante. Nunca pipetar com a boca nem permitir que reagentes ou amostras de doentes entrem em contacto com a pele. Os reagentes que contêm ProClin podem ser irritantes. Evitar o contacto com a pele e olhos. Em caso de contacto, lavar abundantemente com água.
- As concentrações de anti-PR3 numa dada amostra, determinadas com ensaios de diferentes fabricantes, podem variar devido a diferenças nos métodos de ensaios e especificidade dos reagentes.
- As fichas dos dados de segurança do material relativas a todos os componentes perigosos incluídos neste kit estão disponíveis sob pedido junto da Euro Diagnostica.



| | | |
|------|------|-----|
| BUF | WASH | 30X |
| DIL | | |
| CONJ | | |
| CAL | | |

| | |
|---------|------|
| CONTROL | + |
| CONTROL | - |
| SOLN | STOP |
| SUBS | pNPP |

Atenção

Contém ProClin 300:

A reacção de massa: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

| | |
|-----------|---|
| H317: | Pode provocar uma reacção alérgica cutânea. |
| P264: | Lavar as mãos cuidadosamente após manuseamento. |
| P280: | Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. |
| P302+352: | SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. |
| P333+313: | Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. |

Colheita de amostras

Utilizar o ensaio PR3-ANCA somente com soro. Manusear como capaz de transmitir agentes infecciosos.

Evitar a utilização de soros ictericos, lipemicos e hemolisados.

Soros inactivados pelo calor podem produzir reactividades inespecificas e não devem ser utilizados. Conservar o soro entre 2°C - 8°C se o ensaio for realizado num período de cinco dias. Se as amostras tiverem de ser conservadas durante períodos mais longos, conservar a uma temperatura de -20°C ou inferior. Não utilizar congeladores sem formação de gelo porque podem sujeitar as amostras a ciclos de congelação-descongelação e causar a degradação dos anticorpos. Amostras incorrectamente conservadas ou que foram sujeitas a ciclos de congelação-descongelação podem produzir resultados falsos.

O CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) oferece recomendações para a conservação de amostras de sangue (Padrões-Procedimentos aprovados para o Manuseamento e Processamento de Amostras de Sangue, H18A, 1990).

Componentes do kit e conservação de reagentes

- Uma placa com 96 poços (de cor vermelha) revestidos com proteinase 3 com uma tampa acondicionada numa embalagem selada de folha de alumínio com exsiccante.
- 1,5 ml de controlo negativo (NC) contendo soro humano em diluente.
- 1,5 ml de controlo positivo (PC) contendo soro humano em diluente.
- 13 ml de conjugado contendo anticorpos anti-IgG humana marcados com fosfatase alcalina (cor azul).
- 2 x 32 ml de diluente (Dil) contendo PBS (cor vermelha).
- 13 ml de substrato pNPP.
- 13 ml de solução de paragem
- 30 ml de solução de lavagem concentrada 30x
- Seis calibradores (cinco calibradores, Cal 2-6, contendo soro humano) em diluente. 1,5 ml Cal 1 = 0 UI/ml, 1,5 ml Cal 2 = 2 UI/ml, 1,5 ml Cal 3 = 10 UI/ml, 1,5 ml Cal 4 = 30 UI/ml, 1,5 ml Cal 5 = 100 UI/ml, 1,5 ml Cal 6 = 200 UI/ml.

Todos os reagentes do kit estão prontos a utilizar com excepção da solução de lavagem e devem ser conservados a 2°C - 8°C. Remover apenas o número de tiras necessárias para o ensaio, tornando a selar cuidadosamente a embalagem de alumínio.

Materiais ou equipamento necessários mas não fornecidos

- Leitor de microplacas com filtro de 405 nm.
- Pipetas de precisão com pontas descartáveis.
- Máquina de lavar as tiras, papel absorvente, tubos e um temporizador.

PROCEDIMENTO

Todas as soluções devem ser utilizadas à temperatura ambiente. Efectuar a incubação em todas as etapas à temperatura ambiente (18°C - 25°C) com a tampa. Incubar o soro durante 60 minutos, o conjugado durante 30 minutos e o substrato durante 30 minutos.

Preparação da solução de lavagem

Caso sejam observados cristais de sal no frasco com solução de lavagem concentrada, coloque o frasco num banho de água a 37°C, até os cristais se dissolverem, antes de diluir a solução de lavagem. Diluir 10 ml da solução de lavagem concentrada 30x em 290 ml de água destilada. Quando conservada a 2°C-8°C, a solução de lavagem diluída é estável até ao prazo de validade indicado no kit.

Diluição do soro e incubação

Diluir o soro do doente a 1/100 com diluente (990 µl de diluente + 10 µl de soro).

Pipetar em duplicado 100 µl/poço de Calibradores 1, 2, 3, 4, 5, 6, controlo positivo (PC), controlo negativo (NC) e de soro do doente diluído (P) de acordo com o diagrama seguinte. Incubar durante 60 minutos.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-------|-------|-----|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Cal 1 | Cal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| B | Cal 1 | Cal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| C | Cal 2 | Cal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| D | Cal 2 | Cal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| E | Cal 3 | PC | etc | | | | | | | | | |
| F | Cal 3 | PC | | | | | | | | | | |
| G | Cal 4 | NC | | | | | | | | | | |
| H | Cal 4 | NC | | | | | | | | | | |

Após incubação do soro

Lavar 3 vezes com 300 µl de solução de lavagem/poço, enchendo e esvaziando os poços de cada vez; depois da última lavagem, esvaziar os poços batendo levemente com a tira em papel absorvente.

Adição de conjugado

Adicionar 100 µl de conjugado em cada poço. Incubar durante 30 minutos.

Após incubação do conjugado

Lavar como acima indicado.

Adição da solução de substrato

Adicionar 100 µl do substrato pNPP em cada poço, incubar durante 30 minutos.

Adição da solução de paragem

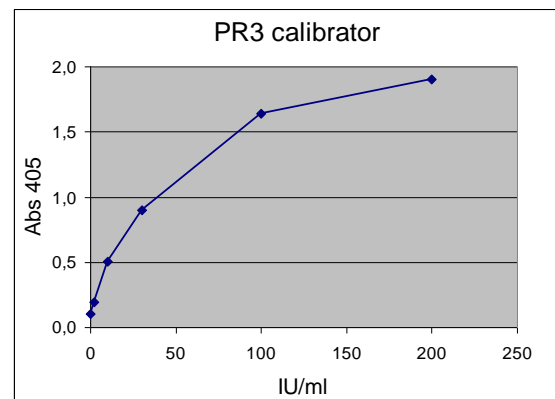
Adicionar 100 µl de solução de paragem em cada poço e ler a absorbância a 405 nm num leitor de placas de microtitulação em menos de 2 horas.

Cálculos

Traçar uma curva de calibração representando os valores da DO em relação aos valores em U/ml dos 6 calibradores. Os seis calibradores fornecidos foram titulados para corresponder ao padrão AF-CDC dando os valores de 0 UI/ml para o calibrador 1, 2 UI/ml para o calibrador 2, 10 UI/ml para o calibrador 3, 30 UI/ml para o calibrador 4, 100 UI/ml para o calibrador 5 e 200 UI/ml para o calibrador 6. Ler o valor em UI/ml do doente a partir da curva traçada. Os valores superiores a 200 devem ser comunicados como >200 ou, então, deverão ser novamente analisados com uma diluição mais alta. O ensaio Wieslab® PR3-ANCA foi normalizado em relação ao padrão internacional AF-CDC.

| <u>Exemplo:</u> | <u>Calibrador</u> | <u>UI/ml</u> | <u>Absorbância</u> |
|-----------------|-------------------|--------------|--------------------|
| | 1 | 0 | 0,102 |
| | 2 | 2 | 0,192 |
| | 3 | 10 | 0,509 |
| | 4 | 30 | 0,902 |
| | 5 | 100 | 1,640 |
| | 6 | 200 | 1,906 |

Uma amostra com um valor de absorbância de 0,886 é lida no eixo X como tendo 27 UI/ml de PR3-ANCA. Neste exemplo foi utilizado um ajuste da curva logística de 4 parâmetros.



Importante: A curva é dada apenas a título de exemplo e não deve ser utilizada para a interpretação efectiva de resultados de um doente em particular.

Controlo de qualidade

A DO do calibrador 1 deve ser $< 0,2$.

A DO do calibrador 6 deve ser $> 1,0$.

No que respeita ao valor dos controlos positivo e negativo, ver certificado do lote.

Os controlos negativo e positivo destinam-se à monitorização de uma falha importante dos reagentes.

O controlo positivo não assegura a precisão no valor limiar (*cut-off*) do ensaio. Aconselha-se que seja analisado um controlo adicional no valor limiar do ensaio. Como o controlo positivo está pronto a utilizar não indica um erro eventual de diluição efectuado pelo utilizador. Recomenda-se a utilização de um controlo interno para este fim.

Se nenhum dos valores estiver nos intervalos respectivos, o ensaio deve ser considerado como não válido, devendo ser repetido. Podem analisar-se controlos adicionais, de acordo com as directrizes ou exigências dos regulamentos locais e/ou nacionais ou das organizações autorizadas. Consultar o C24-A do CLSI para orientação sobre as práticas apropriadas de Controlo de Qualidade.

Interpretação dos resultados

< 4 UI/ml = **Negativo**

4-6 IU/mL = **Equívoco**: repetir o ensaio; se este der novamente um resultado equívoco, repetir o ensaio por um método alternativo ou analisar nova amostra.

< 6 UI/ml = **Positivo**

Limitações

O título de anticorpos de um doente em particular não pode ser utilizado como medida da gravidade da doença, dado que os anticorpos de doentes diferentes podem diferir uns dos outros no que respeita à afinidade. Portanto, é difícil obter uma normalização absoluta de resultados.

Não se pode depender apenas de ensaios deste tipo como base exclusiva para uma tomada de decisões em terapêutica clínica, no entanto, devem ser utilizados como complemento dos sintomas clínicos e resultados de outros ensaios disponíveis.

Os soros de doentes com outras doenças auto-imunes e de indivíduos normais podem conter potencialmente auto-anticorpos com reactividade cruzada. Alguns indivíduos podem ser positivos para anticorpos anti-PR3 com pouca ou nenhuma evidência de doença clínica. Por outro lado, alguns doentes com doença activa podem ter níveis não detectáveis destes anticorpos.

Não se deve iniciar uma terapêutica imunossupressora com base num resultado positivo de ANCA. O início ou as alterações de um tratamento não se devem basear apenas em alterações da concentração de ANCA, mas também numa observação clínica cuidadosa.

References:

1. **van der Woude FJ, et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985, i 425-429.
2. **Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease.* Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
3. **Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
4. **Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
5. **Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
6. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease.* Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
7. **Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
8. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease.* Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
9. **Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. I. *Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
10. **Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
11. **Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
12. **Savige J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
13. **Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
14. **Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.
15. **Neumann, I, et al.** Glomerular immune deposits are associated with increased proteinuria in patients with ANCA-associated crescentic nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2003, 18, 524-531.
16. **Csernok E, Ahlquist D, Ullrich S, Gross W.L.** A critical evaluation of commercial immunoassays for antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 and myeloperoxidase in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Rheumatology* 2002;41:1313-1317.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

| | |
|---|---|
|  | Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer. |
|  | Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer. |
|  | Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före. |
|  | Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur. |
|  | Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk. |
|  | Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen. |
|  | In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning. |
|  | Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning. |
|  | Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare. |
|  | Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test. |
|  | Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter. |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Ag | Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen. |
| DIL | Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert. |
| CONJ | Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat. |
| BUF WASH 30X | Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc. |
| SUBS pNPP | Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. |
| SOLN STOP | Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning |
| CAL X | Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. |
| CONTROL X | Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll. |

KORTFATTET DANSK INSTRUKTION.**Produktets anvendelse**

Wieslab® PR3-ANCA testkit er en enzymkoblet immunosorbentanalyse (ELISA) til påvisning og kvantificering af IgG-antistoffer over proteinase 3 (PR3) i human sera.

Resultatet kan give vejledning ved udredning af mistanke om Wegeners granulomatose. Analysen skal udføres af uddannede laboranter.

Må kun anvendes til *in vitro* teknik.

Prøvetagning

PR3-ANCA analysen anvendes på serumprøver. Vær opmærksom på at flere reagenser og ikke mindst serumpøver kan indeholde infektiøst materiale. Undlad at analysere sera som er ikteriske, lipidholdige eller hæmolyserede. Varme inaktiverede sera kan give uspecifikke reaktioner og bør derfor ikke analyseres. Prøverne kan opbevares ved 2-8° C hvis analysen sker indenfor nogle få dage.

Langtidsopbevaring af sera skal ske ved – 20° C eller koldere. Anvend ikke fryserer med automatisk afrimning, da man risikere at sera bliver tøet og frosset og dermed nedbryder antistofferne. Prøver som opbevares forkert kan give forkerte resultater. CLSI har givet anbefalinger om hvordan man opbevarer blodprøver. (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Sikkerhedsinformation

- Kun for *in vitro* diagnostik.

- Serum som anvendes ved præparation af kontroller og kalibratorer er testet negative for human immunodeficiency virus 1 og 2 (HIV 1 og 2), hepatitis C (HCV) og hepatitis B antigen. Bemærk at ingen metode helt kan garantere fravær af HIV, HCV, hepatitis B virus og andre infektiøse agens. Alle humane prøver må derfor betragtes som potentielt infektiøse og håndteres med forsigtighed.

- Center for Disease Control and Prevention (CDC) og National Institutes of Health (NIH) i USA anbefaler at potentielt infektiøse materialer håndteres i overensstemmelse med Biosafety Level 2.

- Alle opløsninger indeholder ProClin 300 som konserveringsmiddel. Brug aldrig mundpipette. Undgå at få reagens eller serum direkte på huden. Reagenser med ProClin 300 er irriterende og derfor skal kontakt med hun og øjne undgås. Hvis det sker at reagens kommer i kontakt med hud eller øjne, skyl med store mængder vand.

- Materiale-sikkerhedsdatablade for alle farlige komponenter i dette kit fås ved henvendelse til Euro Diagnostica.



| | | |
|------|------|-----|
| BUF | WASH | 30X |
| DIL | | |
| CONJ | | |
| CAL | | |

| | |
|---------|------|
| CONTROL | + |
| CONTROL | - |
| SOLN | STOP |
| SUBS | pNPP |

Advarsel

Indeholder ProClin 300:

Blanding af: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

| | |
|-----------|--|
| H317: | Kan forårsage allergisk hudreaktion. |
| P264: | Vask hænderne grundigt efter håndtering. |
| P280: | Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjnebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. |
| P302+352: | VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt sæbe og vand. |
| P333+313: | Ved hudirritation eller udslæt: Søg lægehjælp. |

Nødvendig udstyr og materiale som ikke indgår i kittet.

- Spektrofotometer med filter på 405 nm.

- Præcisionspipetter med engangsspidser.
- Vaskemaskine til mikrotiterplader, filtrepapir, prøverør, minutur.

KIT komponenter og opbevaring af reagenser.

- Et stativ med 96 brønde (rødfarvet) belagt med proteinase 3 med et låg forseget i en foliepakke med en tørpakke.
- 1,5 ml negativ kontrol (NC), der indeholder human serum i diluent.
- 1,5 ml positiv kontrol (PC), der indeholder human serum i diluent.
- 13 ml konjugat, der indeholder alkalisk fosfatase-mærkede antistoffer mod humant IgG (blå farve).
- 2 x 32 ml diluent (Dil), der indeholder PBS (rød farve).
- 13 ml pNPP-substrat
- 13 ml stopopløsning
- 30 ml vaskeopløsning 30x koncentreret.
- Seks kalibratorer (fem kalibratorer, Kal 2-6, der indeholder human serum) i diluent. 1,5 ml Kal 1 = 0 IU/mL, 1,5 ml Kal 2 = 2 IU/mL, 1,5 ml Kal 3 = 10 IU/mL, 1,5 ml Kal 4 = 30 IU/mL, 1,5 ml Kal 5 = 100 IU/mL, 1,5 ml Kal 6 = 200 IU/mL.

Alle reagenser i kittet er færdige til brug undtagen vaskebufferen. Opbevar kittet i køleskab ved (2 – 8°C)

Tag kun det antal strips ud som behøves. Resten skal opbevares i aluminiumsposen, som opbevares tillukket.

TESTPROCEDURE

Alle opløsningerne skal have stuetemperatur før de anvendes. På alle trin skal der inkuberes ved stuetemperatur (18-25° C) med låg. Inkubér serum i 60 minutter, konjugat i 30 minutter og substrat i 30 minutter.

Tilberedning af vaskebuffer

Hvis der observers saltkrystal udfælding i flasken med koncentreret vaskeopløsning, skal flasken placeres i et 37°C vandbad indtil krystallerne er opløste. Derefter fortyndes vaskeopløsningen. 10 ml af den 30 x koncentrerede vaskebuffer tilsættes 290 ml destilleret vand. Den færdigfortyndede vaskebuffer holder til kittets udløbsdato, hvis den opbevares ve 2 – 8° C.

Prøvefortynding og inkubationstider.

Fortynd patientens serum 1/100 med diluent (990 µl diluent +10 µl serum).

Pipetter 100 µl/brønd i duplikat af kalibrator 1, 2, 3, 4, 5, 6, PC, NC og fortyndet patientserum (P) i henhold til nedenstående diagram. Inkubér i 60 minutter.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-------|-------|------|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Kal 1 | Kal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| B | Kal 1 | Kal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| C | Kal 2 | Kal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| D | Kal 2 | Kal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| E | Kal 3 | PC | Etc. | | | | | | | | | |
| F | Kal 3 | PC | | | | | | | | | | |
| G | Kal 4 | NC | | | | | | | | | | |
| H | Kal 4 | NC | | | | | | | | | | |

Efter inkubering

Vask 3 gange med 300 µl vaskebuffer / brønd, vær omhyggelig med at tømme og fylde brøndene helt ved hver vaske cyclus .Efter sidste vask skal alle rester af buffer fjernes ved at slå mikrotiter stripsene mod absorberende papir.

Tilsætning af konjugat

Tilsæt 100 µl konjugatopløsning til hver brønd. Inkuber i 30 minutter.

Efter konjugat inkubering

Der vaskes som tidligere.

Tilsætning af substrat pNPP

Tilsæt 100 µl substrat pNPP i hver brønd, inkuber i 30 minutter

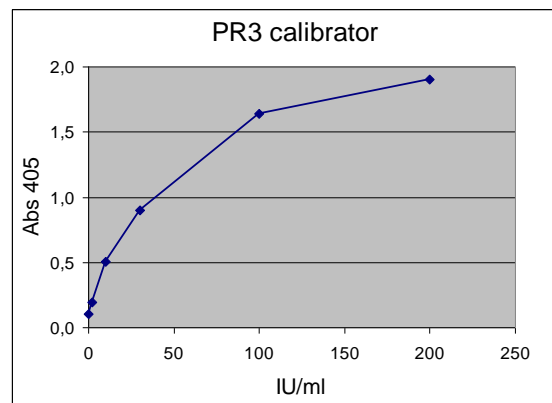
Tilsætning af stopopløsning

Tilsæt 100 µl stopopløsning til hver brønd og aflæs absorbansen ved 405 nm på en mikroploadelæser indenfor 2 timer.

Bemærkninger

Konstruer en kalibratorkurve ved at afsætte OD mod IU/mL-værdier for de 6 kalibratorer. De seks medfølgende kalibratorer er blevet titreret til at matche AF-CDC-standard, hvilket resulterer i værdien 0 IU/mL for kalibrator 1, 2 IU/mL for kalibrator 2, 10 IU/mL for kalibrator 3, 30 IU/mL for kalibrator 4, 100 IU/mL for kalibrator 5 og 200 IU/mL for kalibrator 6. Aflæs IU/mL-værdien for patienten fra den konstruerede kurve. Værdier højere end 200 skal rapporteres som >200, eller reanalyseres med en højere fortynding. Wieslab® PR3-ANCA er standardiseret overfor AF-CDC international standard.

| Eksempel: | Kalibrator | IU/mL | Absorbans |
|-----------|------------|-------|-----------|
| | 1 | 0 | 0,102 |
| | 2 | 2 | 0,192 |
| | 3 | 10 | 0,509 |
| | 4 | 30 | 0,902 |
| | 5 | 100 | 1,640 |
| | 6 | 200 | 1,906 |



En prøve med en absorbansværdi på 0,886 vil blive aflæst på X-aksen som havene 27 IU/mL PR3-ANCA. I dette eksempel er en 4-parameter logistikkurvetilpasning blevet anvendt.

Vigtigt: Den viste kurve er kun et eksempel og må ikke anvendes til aflæsning af patientprøver.

Kvalitetskontrol

OD for kalibrator 1 skal være < 0,2.

OD for kalibrator 6 skal være > 1,0

Enhedsværdien for den positive og negative kontrol ses på lot certifikatet.

De negative og positive kontroller er beregnet til at monitorere væsentlig reagenssvigt. Den positive kontrol vil ikke forsikre nøjagtigheden af analysens cutoff. Det anbefales at analysere en ekstra kontrol ved analysens cutoff. Da den positive kontrol er klar til brug, vil den ikke vise en eventuel fortyndingsfejl udført af brugeren. Det anbefales, at der anvendes en intern kontrol til dette formål. Hvis nogen af kontrolværdierne ikke er indenfor deres respektive områder, skal testen anses for ugyldig og skal gentages. Yderligere kontroller kan testes i overensstemmelse med lokale, nationale og/eller statslige forordninger eller akkrediterende organisationer.

Der henvises til CLSI C24-A for vejledning om behørig kvalitetskontroller.

Tolkning af resultaterne

< 4 IU/mL = **Negativ**

4-6 IU/mL = **dobbelttydig**; Test igen, hvis stadig dobbelttydig, test igen med en anden metode eller test en ny prøve

> 6 IU/mL = **Positiv**

Tolkning af resultaterne

En enkelt patients antistof værdi kan ikke anvendes til at bedømme graden af sygdom idet antistoffer fra forskellige patienter adskiller sig med hensyn til affinitet, specificitet osv. Det er derfor svært at standardiserer denne type analyse. Man må ikke basere klinisk bedømmelse kun på analyseresultatet fra denne test. I stedet for skal analyseresultatet anvendes sammen med andre relevante parametre, ikke mindst almene kliniske (symptomer osv.) for korrekt at bedømme den specifikke kliniske situation. Det er kendt at sera fra patienter med andre autoimmune sygdomme og selv generelt raske personer kan vise krydsreaktivitet i analysen. Nogle individer kan med andre ord være positiv for PR3-ANCA uden at have klinisk tegn på sygdom. Samtidig ved man, at der også forekommer patienter med aktiv sygdom, som er negativ for PR3-ANCA. Immunsuppressiv behandling må ikke begyndes kun baseret på positivt ANCA resultat. Heller ikke må behandling påbegyndes eller ændres kun på grund af ændringer i ANCA titeren, men skal baseres på det totale kliniske billede.

PR3-ANCA koncentrationen i et specifikt serum kan variere ved analyse med forskellige testmetoder. Dette beror primært på forskelle i reagensers egenskaber og specificitet/sensitivitet som forekommer mellem de forskellige kit fra forskellige fabrikanter.

References:

1. **van der Woude FJ, et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985, i 425-429.
2. **Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease.* Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
3. **Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
4. **Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
5. **Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
6. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease.* Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
7. **Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
8. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease.* Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
9. **Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. I. *Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
10. **Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
11. **Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
12. **Savigne J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
13. **Savigne J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
14. **Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.
15. **Neumann, I, et al.** Glomerular immune deposits are associated with increased proteinuria in patients with ANCA-associated crescentic nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2003, 18, 524-531.
16. **Csernok E, Ahlquist D, Ullrich S, Gross W.L.** A critical evaluation of commercial immunoassays for antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 and myeloperoxidase in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Rheumatology* 2002;41:1313-1317.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

| | |
|---|---|
|  | Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer. |
|  | Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer. |
|  | Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före. |
|  | Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur. |
|  | Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk. |
|  | Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen. |
|  | In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning. |
|  | Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning. |
|  | Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare. |
|  | Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test. |
|  | Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter. |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Ag | Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen. |
| DIL | Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert. |
| CONJ | Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat. |
| BUF WASH 30X | Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc. |
| SUBS pNPP | Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. |
| SOLN STOP | Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning |
| CAL X | Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. |
| CONTROL X | Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll. |

KORTFATTET NORSK INSTRUKSJON

Bruksområde

Wieslab® PR3-ANCA-testsett er en ELISA-metode (enzyme-linked immunosorbent assay) for påvisning og kvantisering av IgG-antistoffer mot proteinase 3 (PR3) i humant serum. Assayet brukes til å påvise antistoffer i en enkelt serumprøve. Resultatene fra assayet skal brukes som en hjelp i diagnostiseringen av Goodpastures syndrom. Analysen bør utføres av opplært laboratoriepersonell.
FOR BRUK VED IN VITRO DIAGNOSTISKE FORMÅL.

Advarsler og forsiktighetsregler

- For bruk ved in vitro diagnostiske formål.
- Komponentene i det humane serumet som brukes i klargjøringen av kontrollene og kalibratorene i settet er blitt testet for tilstedeværelse av antistoffer mot human immunsviktvirus 1 & 2 (HIV 1&2), hepatitt C (HCV) samt hepatitt B-overflateantigen etter FDA-godkjente metoder og funnet negative. Fordi ingen testmetoder kan gi fullstendig garanti om at HIV, HCV, hepatitt B-virus eller andre smittestoffer er fraværende, bør prøver og menneskebaserte reagenser håndteres som om de kan overføre smittestoffer.
- Sentra for sykdomskontroll og forebygging og helsemyndighetene anbefaler at smittestoffer håndteres på sikkerhetsnivå (biosafety level) 2.
- Alle løsninger inneholder ProClin 300 som konserveringsmiddel. Pipetter aldri med munnen og la aldri reagenser eller pasientprøver komme i kontakt med huden. Reagenser som inneholder ProClin kan være irriterende. Unngå kontakt med huden og øynene. Ved kontakt, skyll med store mengder vann.
- Konsentrasjonene av anti-PR3 i en gitt prøve som er fremkommet med assayer fra forskjellige produsenter kan variere på grunn av ulikheter i analysemetoder og reagensspesifisitet.
- På forespørsel Euro Diagnostica gi HMS-datablad på alle farlige komponenter som inngår i settet.



| | | |
|------|------|-----|
| BUF | WASH | 30X |
| DIL | | |
| CONJ | | |
| CAL | | |

| | |
|---------|------|
| CONTROL | + |
| CONTROL | - |
| SOLN | STOP |
| SUBS | pNPP |

Advarsel

Inneholder ProClin 300:
Reaksjonsmasse av: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7]
and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

| | |
|-----------|---|
| H317: | Kan utløse en allergisk hudreaksjon. |
| P264: | Vask hendene grundig etter behandling. |
| P280: | Bruk vernehansker/ verneklær / vernebriller / ansiktsskjerm . |
| P302+352: | VED HUDKONTAKT: Vask grundig med såpe og vann. |
| P333+313: | Ved hudirritasjon eller utslett: Søk legehjelp. |

Innsamling av prøver

PR3-ANCA-assayet er beregnet for bruk med serum. Håndteres som om de kan overføre smittestoffer. Unngå bruk av sera som er ikteriske, lipemiske og hemolyserte. Varmedeaktiverede sera kan gi uspesifisert reaktivitet og bør ikke brukes. Oppbevar serum mellom 2-8 °C hvis testing skal finne sted i løpet av fem dager. Hvis prøver skal oppbevares over lang tid, bør de oppbevares ved -20 °C eller kaldere. Frostfri fryser må ikke brukes fordi den kan la prøvene gå gjennom frysetiningssykluser og forringe antistoffene. Prøver som er ukorrekt oppbevart eller utsettes for flere frysetiningssykluser kan gi falske resultater. CLSI gir anbefalinger for oppbevaring av blodprøver, (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Komponenter i settet og oppbevaring av reagenser

En ramme med 96 brønner (rødfargede) dekket med proteinase 3, ett lokk forseglet i foliepakning med tørkepakke.

- 1,5 ml negativ kontroll (NC) som inneholder humant serum i fortynning.
- 1,5 ml positiv kontroll (PC) som inneholder humant serum i fortynning.
- 13 ml konjugat som inneholder alkaliske forfatasemerkeede antistoffer mot human IgG (blå farge).
- 2 x 32 ml fortynning (Dil) som inneholder PBS (rød farge).
- 13 ml substrat pNPP.
- 13 ml stoppløsning
- 30 ml vaskeløsning konsentrert 30x.
- Seks kalibratorer (fem kalibratorer, Cal 2-6, som inneholder humant serum) i fortynning. 1,5 ml Cal 1 = 0 IE/mL, 1,5 ml Cal 2 = 2 IE/mL, 1,5 ml Cal 3 = 10 IE/mL, 1,5 ml Cal 4 = 30 IE/mL, 1,5 ml Cal 5 = 100 IE/mL, 1,5 ml Cal 6 = 200 IE/mL.

Alle reagenser i settet er klare til bruk, bortsett fra vaskeløsningen og bør oppbevares ved 2-8 °C. Fjern bare det antall remser som er nødvendig for testing. Forsegle aluminiumspakningen nøye igjen.

Nødvendige materialer/utstyr som ikke følger med

- Mikroplateleser med filter, 405 nm.
- Presisjonspipetter med engangstupper.
- Vasker for remser, absorberende stoff, rør og en tidsmåler.

PROSEDYRE

Alle løsninger bør brukes ved romtemperatur. Inkuber alltid ved romtemperatur (18-25° C) med lokk. Inkuber serumet i 60 minutter, konjurer i 30 minutter og aktiver substratet i 30 minutter.

Klargjøring av vaskeløsning

Dersom det observeres saltkrystaller i flasken med konsentrert vaskeløsning, plasseres flasken i et vannbad på 37°C til krystallene har løst seg opp før vaskeløsningen fortynnes. Fortynn 10 ml av den 30x konsentrerte vaskeløsningen i 290 ml destillert vann. Ved oppbevaring ved 2-8 °C er den fortyndede vaskeløsningen stabil til utløpsdatoen for settet.

Fortynning av serum og inkubasjon

Fortynn pasientserumet 1/100 med fortynning (990 µl fortynning + 10 µl serum).

Pipetter 100 µl/brønn i duplikat av kalibrator 1, 2, 3, 4, 5, 6, PC, NC og fortynt pasientserum (P) i henhold til skjemaet nedenfor. Inkuber i 60 minutter.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-------|-------|-----|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Cal 1 | Cal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| B | Cal 1 | Cal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| C | Cal 2 | Cal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| D | Cal 2 | Cal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| E | Cal 3 | PC | etc | | | | | | | | | |
| F | Cal 3 | PC | | | | | | | | | | |
| G | Cal 4 | NC | | | | | | | | | | |
| H | Cal 4 | NC | | | | | | | | | | |

Etter seruminkubasjon

Vask 3 ganger med 300 µl vaskeløsning/brønn, ved å fylle og tømme brønnene hver gang; etter siste vasking tømmes brønnene ved å banke remsene mot det absorberende stoffet.

Tilsette konjugat

Tilsett 100 µl konjugat i hver brønn. Inkuber i 30 minutter.

Etter konjugatinkubasjon

Vask som tidligere.

Tilsette substratløsning

Tilsett 100 µl substrat pNPP i hver brønn, inkuber i 30 minutter.

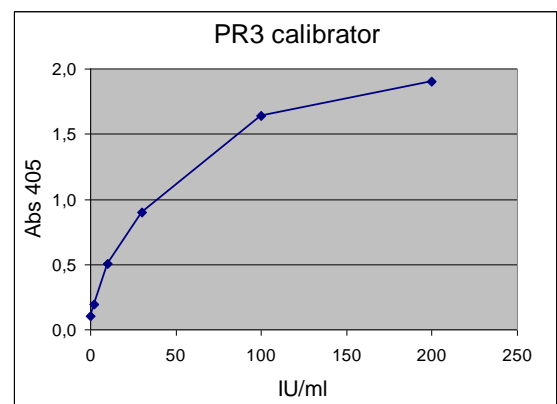
Tilsette stoppløsning

Tilsett 100 µl stoppløsning i hver brønn og les av absorbansen ved 405 nm på en mikrotiterplateleser i løpet av 2 timer.

Beregninger

Trekk opp en kalibratorkurve ved å plote OD mot IE/mL-verdiene for de 6 kalibratorene. De seks kalibratorene som følger med, er titrert for å passe AF-CDC-standardene for å oppnå verdiene 0 IE/mL for kalibrator 1, 2 IE/mL for kalibrator 2, 10 IE/mL for kalibrator 3, 30 IE/mL for kalibrator 4, 100 IE/mL for kalibrator 5 og 200 IE/mL for kalibrator 6. Les av IE/mL-verdien til pasienten fra den optrukne kurven. Verdier over 200 skal registreres som >200, eller analyseres på nytt med høyere fortykning. Wieslab PR3-ANCA er standardisert mot AF-CDC internasjonal standard.

| <u>Eksempel:</u> | <u>Kalibrator</u> | <u>IE/mL</u> | <u>Absorbans</u> |
|------------------|-------------------|--------------|------------------|
| | 1 | 0 | 0.102 |
| | 2 | 2 | 0.192 |
| | 3 | 10 | 0.509 |
| | 4 | 30 | 0.902 |
| | 5 | 100 | 1.640 |
| | 6 | 200 | 1.906 |



En prøve med en absorbansverdi på 0.886 vil avleses på X-aksen som å ha 27 IE/mL PR3-ANCA.

I dette eksemplet er det anvendt en 4-parameters logistikkurvefitting.

Viktig: Kurven er et eksempel og må ikke anvendes for faktisk pasienttolking.

Kvalitetskontroll

OD for kalibrator 1 skal være < 0,2

OD for kalibrator 6 skal være > 1,0

Verdien for den positive og negative kontrollen står på lot-etiketten.

De negative og positive kontrollene er beregnet på å overvåke betydelig reagensfeil. Den positive kontrollen vil ikke sikre presisjon ved cut-off for assayet. Det anbefales å analysere en ekstra kontroll ved cut-off for assayet. Siden den positive kontrollen er klar til bruk, indikerer den ikke en eventuell feil ved brukerens fortykning. Det anbefales å bruke en intern kontroll til dette formål.

Hvis noen av verdiene ikke ligger innenfor sine respektive områder, bør testen betraktes som ugyldig og testen gjennomføres på nytt. Flere kontroller kan testes i henhold til retningslinjene eller krav fra lokale eller statlige forskrifter eller godkjenningensorganer. Se CLSI C24-A for veiledning om korrekte kvalitetskontrollrutiner.

Tolking av resultatene

< 4 IE/mL = **Negativ**

4-6 IE/mL = **Tvetydig**; test på nytt, hvis fremdeles tvetydig, test på nytt med en annen metode eller test en ny prøve

> 6 IE/mL = **Positiv**

Begrensninger

Den enkelte pasients antistofftiter kan ikke brukes som et mål på alvorlighetsgraden for en sykdom siden antistoffer fra forskjellige pasienter kan avvike fra hverandre med hensyn til affinitet. Derfor er det vanskelig å oppnå en absolutt standardisering av resultater.

Testen bør ikke brukes som det eneste grunnlaget for beslutninger om klinisk behandling, men bør brukes som et supplement til kliniske symptomer og resultater fra andre tilgjengelige tester.

Sera fra pasienter med andre autoimmune sykdommer og fra normale personer kan inneholde potensielt kryssreaktive autoantistoffer. Noen personer kan være positive for PR3-antistoffer med få eller ingen tegn på klinisk sykdom. På den annen side kan noen pasienter med aktiv sykdom ha uoppdagede nivåer av disse antistoffene.

Immunsuppressiv behandling må ikke startes på grunnlag av et positivt ANCA-resultat. Oppstart eller endringer av behandling bør ikke baseres på endringer i ANCA-konsentrasjon alene, men på grundig klinisk observasjon.

References:

1. **van der Woude FJ, et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985, i 425-429.
2. **Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease.* Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
3. **Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
4. **Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
5. **Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
6. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease.* Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
7. **Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
8. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease.* Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
9. **Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. I. *Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
10. **Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
11. **Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
12. **Savigne J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
13. **Savigne J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
14. **Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.
15. **Neumann, I, et al.** Glomerular immune deposits are associated with increased proteinuria in patients with ANCA-associated crescentic nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2003, 18, 524-531.
16. **Csernok E, Ahlquist D, Ullrich S, Gross W.L.** A critical evaluation of commercial immunoassays for antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 and myeloperoxidase in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Rheumatology* 2002;41:1313-1317.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

| | |
|---|---|
|  | Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer. |
|  | Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer. |
|  | Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före. |
|  | Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur. |
|  | Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk. |
|  | Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen. |
|  | In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning. |
|  | Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning. |
|  | Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare. |
|  | Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test. |
|  | Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter. |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Ag | Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen. |
| DIL | Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert. |
| CONJ | Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat. |
| BUF WASH 30X | Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc. |
| SUBS pNPP | Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. |
| SOLN STOP | Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning |
| CAL X | Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. |
| CONTROL X | Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll. |

KORTFATTAD SVENSK INSTRUKTION

Produktens användning

Wieslab® PR3-ANCA test kit är en enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) för bestämning och kvantifiering av IgG antikroppar riktade mot proteinas 3 (PR3) i humant serum. Resultatet kan ge vägledning vid utredning av misstänkt Wegeners granulomatos. Analysen skall utföras av behörig personal.

FÖR *IN VITRO* DIAGNOSTIK ANVÄNDNING.

Provtagning

PR3-ANCA analysen är avsedd för serumprover. Tänk på att flera reagens och inte minst serumprovet potentiellt kan innehålla infektiösa agens. Analysera inte sera som är ikteriska, lipemiska eller hemolyserade. Värmeinaktiverat serum kan ge ospecifik reaktivitet och bör därför ej analyseras. Prover kan förvaras vid 2-8° C om analys sker inom några dagar. Långtidsförvaring skall ske vid -20° C eller kallare. Använd inte frysar med automatisk avfrostning då risk finns att prover tinar under avfrostningarna. Prover som förvarats oriktigt kan ge felaktiga resultat.

CLSI har gett ut rekommendationer på hur man förvarar blodprover (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Säkerhetsinformation

- Endast för *in vitro* diagnostik.
- Serum som använt vid preparation av kontroller och kalibratorer har testat negativt för antikroppar mot humant immunodeficiency virus 1 & 2 (HIV 1&2), hepatit C (HCV) och hepatit B ytantigen. Tänk dock på att ingen metod kan helt garantera frånvaron av HIV, HCV, hepatit B virus, eller andra infektiösa agens. Alla humana prov måste därför betraktas som potentiellt infektiösa och hanteras med försiktighet.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) och National Institutes of Health (NIH) i USA rekommenderar att potentiellt infektiösa material hanteras i enlighet med Biosafety Level 2.
- Alla lösningar innehåller ProClin 300 som konserveringsmedel. Pipettera aldrig med munnen. Undvik att få reagens eller patientprov direkt på huden. Reagens med ProClin 300 är irriterande och därför skall kontakt med hud och ögon undvikas. I händelse av att reagens kommit i kontakt med hud eller ögon, skölj med stora mängder vatten.
- På begäran kan Euro Diagnostica tillhandahålla säkerhetsdatablad om alla farliga komponenter som ingår i kitet.



| | | |
|------|------|-----|
| BUF | WASH | 30X |
| DIL | | |
| CONJ | | |
| CAL | | |

| | |
|---------|------|
| CONTROL | + |
| CONTROL | - |
| SOLN | STOP |
| SUBS | pNPP |

Varning

Innehåller ProClin 300:
Reaktionsmassa bestående av: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

| | |
|-----------|--|
| H317: | Kan orsaka allergisk hudreaktion. |
| P264: | Tvätta händerna grundligt efter användning. |
| P280: | Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. |
| P302+352: | VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten. |
| P333+313: | Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp. |

Nödvändig utrustning och material som ej ingår i kittet

- Spektrofotometer med filter för 405 nm.
- Precisionspipetter med engångsspetsar.
- Tvättmaskin för mikrotiterplattor, torkpapper, provrör, timer

Ingående reagens och förvaring

- En ram med 96 brunnar (rödmärkta) belagda med proteinas 3 (PR3), ett lock. Allt förpackat i en återförslutningsbar foliepåse med torkmedel.
- 1,5 mL negativ kontroll (NC), humant serum färdigspätt i "diluent".
- 1,5 mL positiv kontroll (PC), humant serum färdigspätt i "diluent".
- 13 mL konjugatlösning, alkaliskt fosfatas-märkta anti-IgG antikroppar (blå färg)
- 2 x 32 mL spädningslösning "Diluent"(Dil), PBS (röd färg).
- 13 mL substrat pNPP
- 13 mL stopplösning
- 30 mL tvättlösning, 30x koncentrerad.
- Sex kalibratorer (fem kalibratorer, Cal 2-6, med humant serum) i spädningslösning. 1,5 mL Cal 1: 0 IU/mL, 1,5 mL Cal 2: 2 IU/mL, 1,5 mL Cal 3: 10 IU/mL, 1,5 mL Cal 4: 30 IU/mL, 1,5 mL Cal 5: 100 IU/mL, 1,5 mL Cal 6: 200 IU/mL.

Alla reagens i kittet är färdiga att användas utom tvättlösningen. Förvara kittet i kyl (+ 2-8° C).

Tag endast ut det antal brunnar som behövs. Resten skall förvaras i aluminiumpåsen som förvaras tillsluten.

TESTPROCEDUR

Alla lösningar skall vara rumstempererade innan man använder dem. Alla inkubationer skall ske vid rumstemperatur (18-25°C). Använd lock för att undvika avdunstning. Följande inkubationstider gäller: provinkubationen 60 minuter, inkubation med konjugat 30 minuter, substratinkubation 30 minuter.

Beredning av tvättlösning

Om saltkristaller observeras i flaskan med koncentrerad tvättlösning, placeras flaskan i 37 °C vattenbad tills kristallerna är upplösta, detta görs innan utspädning av tvättlösningen. Späd 10 mL av den 30x koncentrerade tvättlösningen med 290 mL destillerat vatten. Den spädda tvättlösningen håller till kittets utgångsdatum om man förvarar den vid 2-8° C.

Provspädning och inkubationstider

Späd patientprovet 1/100 med spädningsbuffert (990 µL diluent +10 µL serum).

Pipettera 100 µL/brunn i duplikat av följande: Kalibrator 1, 2, 3, 4, 5, 6, PC, NC, and patientprov (P) enligt nedanstående schema. Inkubera i 60 minuter.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-------|-------|-----|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Cal 1 | Cal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| B | Cal 1 | Cal 5 | P1 | | | | | | | | | |
| C | Cal 2 | Cal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| D | Cal 2 | Cal 6 | P2 | | | | | | | | | |
| E | Cal 3 | PC | etc | | | | | | | | | |
| F | Cal 3 | PC | | | | | | | | | | |
| G | Cal 4 | NC | | | | | | | | | | |
| H | Cal 4 | NC | | | | | | | | | | |

Efter provinkubering

Tvätta 3 gånger med 300 µL tvättlösning / brunn, var noga med att helt tömma och fylla brunnarna i varje tvättcykel. Efter sista tvätten skall alla rester av vätska avlägsnas genom att slå mikrotiterstripsen mot ett absorberande papper.

Tillsättning av konjugat

Tillsätt 100 µL konjugatlösning till varje brunn. Inkubera i 30 minuter.

Efter konjugat inkubering

Tvätta som tidigare.

Tillsättande av substratlösning

Tillsätt 100 µL substratlösning i varje brunn, inkubera i 30 minuter.

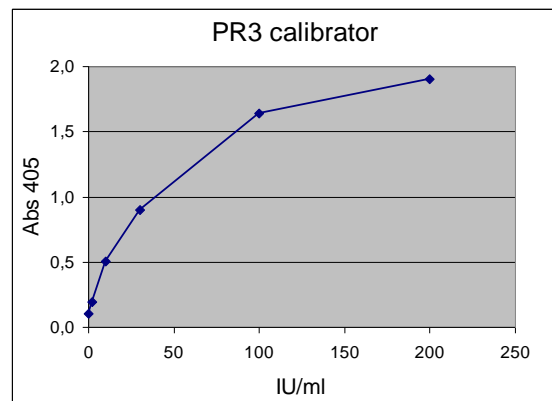
Tillsättande av stopplösning

Tillsätt 100 µL stopplösning i varje brunn, Avläs absorbansen i en spektrofotometer vid 405 nm inom 2 timmar.

Beräkningar

Rita en kalibreringskurva genom att plotta de 6 kalibratorernas absorbansvärden mot deras respektive givna IU/mL. De 6 kalibratorerna har titrerats för att motsvara AF-CDC standarden vilket ger 0 IU/mL för kalibrator 1, 2 IU/mL för kalibrator 2, 10 IU/mL för kalibrator 3, 30 IU/mL för kalibrator 4, 100 IU/mL för kalibrator 5 och 200 IU/mL för kalibrator 6. Avläs patientprovets värde från kurvan. Värden större än 200 IU/mL skall anges som >200 IU/mL, alternativt analysera om provet med större provspädning. Wieslab® PR3-ANCA har standardiserats mot den internationella standarden från AF-CDC.

| Exempel: | Kalibrator | IU/mL | Absorbans |
|----------|------------|-------|-----------|
| | 1 | 0 | 0.102 |
| | 2 | 2 | 0.192 |
| | 3 | 10 | 0.509 |
| | 4 | 30 | 0.902 |
| | 5 | 100 | 1.640 |
| | 6 | 200 | 1.906 |



Ett prov med absorbansen 0.886 kan läsas av mot x-axeln som 27 IU/mL PR3-ANCA. I detta exempel har en 4 parameters logistisk kurvpassning använts.

Viktigt: Den visade kurvan är endast ett exempel och får inte användas för avläsning av patientprover.

Kvalitetskontroll

Absorbansen för kalibrator 1 skall vara < 0,2

Absorbansen för kalibrator 6 skall vara > 1,0

Enhetsvärdet för den positiva och negativa kontrollen se lot certifikatet. De negativa och positiva kontrollerna används för att kontrollera att kitet fungerar tekniskt. Om något/några värden inte faller inom angivet område bör testen ej godkännas och man skall göra om analysen.

Då den positiva kontrollen är färdigspädd så indikerar den inte en eventuell felsepädning hos användaren. En ytterligare kontroll rekommenderas för detta syfte.

Ytterligare kontroller kan analyseras, om så krävs av lokala myndigheter. Rekommendationer angående kvalitetskontroll kan fås ur CLSIs dokument C24-A.

Tolkning av resultaten

< 4 IU/mL = **Negativ**

> 6 IU/mL = **Positiv**

4-6 IU/mL = **Gränsvärde**; Testa om. Om samma resultat uppnås, använd en alternativ metod eller ta ett nytt prov.

Analysens begränsningar

- En enskild patients antikroppstiter kan inte användas för att bedöma graden av sjukdom då antikroppar från olika patienter skiljer sig med avseende på affinitet, specificitet etc. Det är därför svårt att standardisera denna typ av analys.
- Man får inte basera kliniska bedömningar enbart med ledning av analysresultat från detta test. Istället skall analysresultatet användas tillsammans med andra relevanta parametrar, inte minst allmänkliniska (symptom etc), för att korrekt bedöma den specifika kliniska situationen. Det är känt att sera från patienter med andra autoimmuna sjukdomar och även generellt friska individer kan uppvisa viss korsreaktivitet i analysen. Vissa individer kan med andra ord vara positiva för PR3-ANCA utan övriga kliniska belägg för sjukdom. Samtidigt vet man att det också förekommer patienter med aktiv sjukdom som är negativa för PR3-ANCA. Immunosuppressiv behandling får inte påbörjas enbart baserat på ett positivt PR3-ANCA resultat. Inte heller får behandling initieras eller ändras enbart på grund av ändringar i PR3-ANCA titern utan skall istället baseras på den totala kliniska bilden.
- PR3-ANCA koncentrationen i ett specifikt serum kan variera efter analys med olika testmetoder. Detta beror primärt på skillnader i reagensers egenskaper och specificitet/sensitivitet som förekommer mellan kit från olika tillverkare.

References:

1. **van der Woude FJ, et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985, i 425-429.
2. **Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease*. Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
3. **Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
4. **Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
5. **Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
6. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
7. **Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
8. **Wieslander J, Wik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
9. **Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. I. *Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
10. **Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
11. **Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
12. **Savigne J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
13. **Savigne J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
14. **Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.
15. **Neumann, I, et al.** Glomerular immune deposits are associated with increased proteinuria in patients with ANCA-associated crescentic nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2003, 18, 524-531.
16. **Csernok E, Ahlquist D, Ullrich S, Gross W.L.** A critical evaluation of commercial immunoassays for antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 and myeloperoxidase in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Rheumatology* 2002;41:1313-1317.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

| | |
|---|---|
|  | Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer. |
|  | Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer. |
|  | Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före. |
|  | Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur. |
|  | Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk. |
|  | Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen. |
|  | In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning. |
|  | Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning. |
|  | Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare. |
|  | Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test. |
|  | Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter. |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Ag | Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen. |
| DIL | Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert. |
| CONJ | Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat. |
| BUF WASH 30X | Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc. |
| SUBS pNPP | Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. |
| SOLN STOP | Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning |
| CAL X | Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. |
| CONTROL X | Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll. |

EURO DIAGNOSTICA AB

Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden

Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88

E-mail: info@eurodiagnostica.com

www.eurodiagnostica.com