

EN



**Immuli**™

# **PR3 Antibody ELISA**

## **Proteinase 3 (PR3) Antibody ELISA**

[IVD] For *in vitro* diagnostic use

### **PRODUCT INSERT**

[REF] 5162 PR3 Antibody ELISA96 Determinations

### **INTENDED USE**

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and semi-quantitation of antibodies to proteinase 3 (PR3) in human serum to aid in the diagnosis of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) associated vasculitides, including Wegener's granulomatosis, in conjunction with other laboratory and clinical findings.

### **SUMMARY AND EXPLANATION**

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) are a group of antibodies directed against proteins in the granules of neutrophils. The presence of ANCA in patients with vasculitis was first observed in 1982 by Davies.<sup>1</sup> These antibodies can be detected by indirect immunofluorescence on ethanol fixed neutrophils, producing a characteristic cytoplasmic staining pattern (cANCA) or by ELISA. cANCA reactions target Proteinase 3 (PR3) and to some extent minor antigens such as cathepsin G and elastase. PR3 is a neutral serine proteinase localized in the azurophilic granules of the neutrophils with a MW of 28kD.<sup>2</sup> Antibodies against the PR3 antigen serve as a marker for Wegener's Granulomatosis (WG), a systemic necrotising vasculitis.<sup>3</sup> WG is systemic small vessel vasculitis characterized by necrotizing granulomatous inflammation of the upper and lower respiratory tract with pauci-immune necrotizing crescentic glomerulonephritis. Early diagnosis is of paramount importance, since Wegner's granulomatosis often has a progressive course rapidly increasing extent and severity of organ involvement. PR3 antibodies have clinical importance in the diagnosis and monitoring of disease activity, and predicting relapse. Several studies have established a direct correlation between PR3 antibody levels and the active phase of WG. The concentration of serum PR3 antibodies rise dramatically during disease exacerbations, and relapses are usually accompanied by significant increases in antibody levels.<sup>6,7</sup>

### **PRINCIPLES OF PROCEDURE**

The test is performed as a solid phase immunoassay. Microwells are coated with purified PR3 antigen followed by a blocking step to reduce non-specific binding during the assay run. Controls, calibrators and patient sera are incubated in the antigen coated wells to allow specific antibodies present in the serum to bind to the PR3 antigen. Unbound antibodies and other serum proteins are removed by

## EN

washing the microwells. Bound antibodies are detected by adding an enzyme labeled anti-human IgG conjugate to the microwells. Unbound conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (TMB) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of TMB substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 450 nm. Results are expressed in International Units per milliliter (IU/ml) and reported as positive or negative.

## REAGENTS

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Reagents are stable until the expiration date when stored and handled as directed.

Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use.

Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date.

Coated microwell strips are for one time use only. Unused microwell strips should be carefully resealed in the pouch containing desiccants to prevent condensation and stored at 2-8°C.

## Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials.<sup>10</sup>

***Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results.*** Do not interchange kit components with those from other sources. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use kit components beyond expiration date on the labels.

## Materials provided

ImmuLisa™ PR3 Antibody ELISA

[REF] 5162

Kits contains sufficient reagents to perform 96 determinations.

12 x 8	[MICROPLATE PR3]	Microplate with individual breakaway microwells. Coated with purified PR3 antigen. Ready for use.
1 x 1.75 ml	[CONTROL+ PR3]	Ready to use <b>Positive Control</b> (red cap). Contains human serum positive for PR3 antibodies. The expected concentration range in IU/ml is printed on the label.
1 x 1.75 ml	[CONTROL- ]	Ready to use <b>Negative Control</b> (white cap). Contains human serum.






## EN

<b>5 x 1.75 ml</b>	[CALIBRATOR A PR3] [CALIBRATOR B PR3] [CALIBRATOR C PR3] [CALIBRATOR D PR3] [CALIBRATOR E PR3]	Ready to use set of 5 <b>Calibrators</b> . Calibrator A (green cap) 156 IU/ml, Calibrator B (violet cap) 62.5 IU/ml, Calibrator C (blue cap) 25 IU/ml, Calibrator D (yellow cap) 10 IU/ml, and Calibrator E (orange cap) 1 IU/ml. Derived from human serum containing PR3 antibodies. Concentrations in IU/ml are printed on the labels.
<b>1 x 15 ml</b>	[IgG-CONJ HRP]	HRP goat anti-human <b>IgG Conjugate</b> . Ready for use. Color coded pink.
<b>1 x 60 ml</b>	[DIL]	Serum Diluent. Ready for use. Color coded purple.
<b>1 x 15 ml</b>	[SUBSTRATE TMB]	TMB enzyme substrate. Ready for use. <b>Protect from light</b> .
<b>1 x 15 ml</b>	[STOP H2SO4]	Stop Solution. Ready for use.
<b>2 x</b>	[BUF WASH]	Powder Wash Buffer. <b>Reconstitute to one liter each</b> .
<b>1 x</b>		Protocol Sheets

## Optional Components

<b>1 x 60ml</b>	[BUF WASH]	Liquid concentrated Wash Buffer. <b>Reconstitute to one liter</b> .
-----------------	------------	---

## Symbols used on labels

[LOT]	Lot number
[REF]	Catalog number
[IVD]	In vitro diagnostic use
	Use by
	Storage temperature
	Read instructions before use
	Number of tests
	Manufacturer

## Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 450 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

## SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. It is recommended that frozen specimens be tested within one year. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

## PROCEDURE

### Procedural Notes

- Carefully read the product insert before starting the assay.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Let patient specimens and test reagents equilibrate to room temperature before starting with the test procedure. It is suggested that reagents be left on the bench out of the box for 30 minutes prior to use. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.
- ***Good washing technique is critical.*** If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. ***An automated microplate washer is recommended.***
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 or 12 wells simultaneously. This speeds the process and provides more uniform incubation times.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.

### Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate to room temperature.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** For a **qualitative determination** use Calibrator D (*vial with yellow cap*) only.
- or**

For a **semi-quantitative determination** use Calibrators A through E as depicted in the sample layout below.

Qualitative				Semi-Quantitative			
A	Blank	S5	Etc.	A	Blank	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **500µl** of Serum Diluent.
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples (**1:101**) to the appropriate microwells as per protocol sheet.
- Note:** Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** ( $\pm 5$  min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** ( $\pm 5$  min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** ( $\pm 5$  min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within **30 minutes** of adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **450 nm** using a single or at **450/630nm** using a dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

## Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <10 IU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining IU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of Calibrator D must be greater than that of the negative control and less than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations the positive control must give values in the range stated on the vial.

## RESULTS

### Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

#### 1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{IU/ml of Calibrator D} = \text{IU/ml Test Sample}$$

It is recommended that qualitative results be reported as “positive” or “negative.” Sample results greater than or equal to Calibrator D are considered positive.

#### 2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot the absorbance of Calibrator A through E against their respective concentrations on linear-log graph paper. Plot the concentrations in IU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw a point-to-point curve fit. Determine the concentrations of the patient samples from the curve according to corresponding absorbance values. Alternately, a four parameter curve may be used to plot the standard curve.

It is recommended that semi-quantitative results be reported as “positive,” “negative,” or “indeterminate” with IU/ml unit values. Indeterminate/borderline results should be retested and evaluated along with other laboratory methods, such as assays for detection of ANCA by IFA.

### Interpretation

Interpretation values were determined by testing 136 normal blood donors and non-autoimmune vasculitides disease control specimens. The mean of the normal subjects plus 3 SD was established as the assay cutoff and assigned a value of 10 IU/ml derived from the CDC international standard for PR3. MPO disease controls were not included in the cut-off determination of the PR3 assay. IMMCO suggests use of the reference range below. Each laboratory should validate assay values for their own conditions.

<b>anti-PR3 Ab value</b>	<b>Interpretation</b>
<10 IU/ml	Negative
10-12.5 IU/ml	Indeterminate (Borderline)
>12.5 IU/ml	Positive

### **Calibrator**

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing high antibody levels may give absorbance values greater than that of Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values, such specimens should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining IU/ml values, multiply the units obtained by the dilution factor.

### **LIMITATIONS OF PROCEDURE**

The assay should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. This method should be used for testing human serum samples only. The results obtained serve only as an aid in the diagnosis. Taken alone, these results should not be interpreted as diagnostic. This assay has not been validated in a pediatric population. MPO disease controls were not included in the cut-off determination of the PR3 assay

### **EXPECTED VALUES**

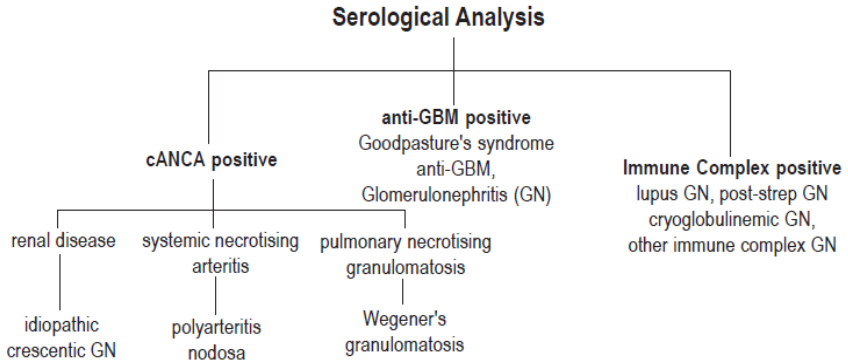
The expected values in a normal population are negative. However, 2-4% of apparently healthy, asymptomatic individuals may test positive for PR3 antibodies. In contrast, some patients with active disease may have undetectable levels of these antibodies. Immunosuppressive therapy, initiation or alteration in treatment should not be started on the basis of just positive PR3 antibody results, but rather on careful clinical observations.

The following table depicts the frequency of PR3 and MPO specific ANCA in sera from 112 ANCA associated vasculitides patients.<sup>11</sup> The incidence of PR3 antibodies varies depending upon the patient population. A compilation of incidence taken from the literature appears below.

#### **Incidence of anti-PR3 and anti-MPO in ANCA associated vasculitides**

<b>Antibody association</b>	<b>Wegener's granulomatosis</b>	<b>Microscopic polyangiitis</b>	<b>Churg-Strauss syndrome</b>
ANCA positive by IFA	78%	59%	67%
anti-PR3 positive	90%	0%	10%
anti-MPO positive	0%	62%	17%

The clinical utility of ANCA detection with cANCA specificity with positive anti-PR3 antibody specificity in various vasculitic disorders is illustrated below.<sup>5</sup>



Sets of clinical samples were tested on the Immulisa™ PR3 Antibody ELISA and another commercially available MPO antibody ELISA. Results demonstrating incidence in the populations for this study are provided below.

Patient Group	n	IMMCO		Other PR3 Ab ELISA		
		n Pos	% Pos	n	n Pos	% Pos
<b>Disease Associated</b>						
Wegener's granulomatosis	59	57	96.6%	59	56	94.9%
Glomerulonephritis	29	2	6.9%	29	2	6.9%
Undifferentiated ANCA positive	11	0	0.0%	11	0	0.0%
<b>Disease Control</b>						
Non-ANCA associated vasculitis	24	1	4.2%			
Inflammatory bowel disease	16	0	0.0%			
Systemic lupus erythematosus	32	1	3.1%	32	0	0.0%
Rheumatoid arthritis	8	0	0.0%	8	0	0.0%
Other autoimmune disease	16	0	0.0%	16	0	0.0%
Healthy normals	80	0	0.0%	80	0	0.0%

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

The utility of the Immulisa™ PR3 Antibody ELISA was evaluated by testing well-characterized PR3 antibody positive serum specimens from cANCA antibody positive subjects alongside disease controls and “normal” human sera. These specimens were also tested on commercially available ELISA kits. These results are summarized below.

- A. Method Comparison: Immulisa™ PR3 Antibody ELISA vs. other PR3 antibody ELISA:



EN

**Other PR3 ELISA**

		Positive	Negative	Total
<b>IMMCO</b>	Positive	41	4	45
<b>PR3</b>	Negative	2	58	60
<b>ELISA</b>	Total	43	62	105

Positive Percent Agreement: 95.3% (95% CI 82.9% to 99.2%)  
 Negative Percent Agreement: 93.5% (95% CI 83.5% to 97.9%)  
 Overall Percent Agreement: 94.3% (95% CI 87.5% to 97.7%)

B. Cross Reactivity: A total of 136 potentially cross-reactive specimens from individuals with other autoimmune disorders or positive for other autoantibodies were tested for PR3 antibodies using the Immulisa™ PR3 Antibody ELISA.

Condition	n	Positive n
Glomerulonephritis	29	2
Undifferentiated pANCA positive	11	0
Non-ANCA associated vasculitis	24	1
Inflammatory bowel disease	16	0
Systemic lupus erythematosus	32	0
Rheumatoid Arthritis	8	0
Other autoimmune disease	16	0
<b>Total</b>	<b>136</b>	<b>3 (2.2%)</b>

**Precision**

Precision was tested with 6 positive specimens selected throughout the range of the assay. Assay runs of three replicates of each specimen were conducted on three days. Repeatability was determined with 6 replicates of each specimen.

Sample	Mean (IU/ml)	Total Imprecision		Between days		Within run (Repeatability)	
		SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%
1	8.7	0.809	9.3%	0.809	9.5%	0.758	8.4%
2	12.2	0.812	6.7%	0.974	8.0%	0.547	4.5%
3	27.2	2.211	8.1%	2.183	8.3%	1.218	4.2%
4	57.0	3.017	5.3%	2.872	5.0%	3.458	6.1%
5	112.4	4.211	3.7%	5.059	4.5%	2.821	2.5%
6	139.3	6.199	4.4%	6.654	4.8%	6.043	4.3%

**Reproducibility**

Six replicates of samples in the negative range, ~10% below cutoff, ~20% above cutoff and in the moderate positive range of the assay were performed to determine intra-assay qualitative reproducibility. Three replicates of the same samples were tested in three runs to determine inter-assay reproducibility. Assay results for these specimens produced 100% qualitative agreement.

EN

### Linearity

Studies were performed using equidistant dilution series of positive samples with values throughout the calibrator range to determine linear range of the assay. The linear range of the assay was determined to be from 2.2 – 156 IU/ml. Results are summarized below. It is suggested that samples producing results greater than the top calibrator be diluted and retested.

Sample	Test Range	Slope (95% CI)	Y-Intercept (95% CI)	R <sup>2</sup>	% Recovery
1	3.7 to 77.2	1.07 (0.94 to 1.20)	-0.031 (-0.134 to 0.071)	0.986	89.8 to 111.9
2	3.8 to 158.2	1.012 (0.934 to 1.090)	-0.053 (-0.153 to 0.047)	0.994	88.9 to 102.2
3	3.4 to 43.4	1.023 (0.929 to 1.118)	0.009 (-0.045 to 0.063)	0.991	100 to 112.3

### Limit of Detection

The limit of detection (LoD) for PR3 antibody using this assay was determined to be 2.2 IU/ml based on 60 replicates of the blank and 10 replicates each of 6 low-level (NHS) samples.

### Interference

Interference was studied by mixing sera with known PR3 antibody levels with potentially interfering serum samples and studying deviation from expected results. No significant interference was demonstrated for the following substances at the levels indicated: Hemoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 µmol/L), and Rheumatoid Factor (100 EU/ml).

**ImmuLisa™**

# PR3 Antibody ELISA

**Πρωτεΐνάση 3 (PR3) Antibody ELISA**

[IVD]

**ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ**

[REF] 5162 PR3 Antibody ELISA96 Προσδιορισμοί

**ΣΚΟΠΟΥΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ**

Ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης (ELISA) για την ανίχνευση κα τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων στην πρωτεΐνάση 3 (PR3) στον ανθρώπινο ορό ως βοήθημα στη διάγνωση αντισώματος έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων (ANCA) συσχετισμένου με αγγειίτιδες συμπεριλαμβανομένης κοκκιωμάτωσης Wegener σε συνδυασμό με άλλα εργαστηριακά και κλινικά ευρήματα.

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ**

Τα αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων (ANCA) είναι μια ομάδα αυτοαντισωμάτων καθοδηγούμενων κατά των πρωτεϊνών στα κοκκίδια των ουδετεροφίλων. Η παρουσία των ANCA σε ασθενείς με αγγειίτιδα παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1982 από τον Davies.<sup>1</sup> Αυτά τα αντισώματα μπορούν να ανιχνευθούν με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε μονιμοποιημένα με αιθανόλη ουδετερόφιλα, παράγοντας ένα χαρακτηριστικό κυτταροπλασματικό πρότυπο ανίχνευσης (cANCA) ή από την ELISA. Οι αντιδράσεις cANCA στοχεύουν στην Πρωτεΐνάση 3 (PR3) κα σε κάποιο βαθμό σε ήσσονα αντιγόνα όπως καθεψίνη G και ελαστάση. Η PR3 είναι μια ουδέτερη σερινοπρωτεάση που εντοπίζεται στα αζουρόφιλα κοκκία των ουδετεροφίλων με MB (μοριακό βάρος) 28kD.<sup>2</sup> Αντισώματα κατά του αντιγόνου PR3 εξυπηρετούν ως δείκτης για την κοκκιωμάτωση Wegener (WG), μια συστηματική νεκρωτική αγγειίτιδα.<sup>3</sup> Η WG είναι συστηματική αγγειίτιδα μικρών αγγείων που χαρακτηρίζεται από νεκρωτική κοκκιωματώδη φλεγμονή του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος με εστιακή τμηματική ανοσοπενική νεκρωτική ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα. Η πρώιμη διάγνωση είναι υψίστης σημασίας, καθώς συχνά η κοκκιωμάτωση Wegener έχει προοδευτική πορεία ταχέως αυξανόμενη σε βαθμό και δριμύτητα περιπλοκής οργάνων. Τα PR3 αντισώματα έχουν κλινική σημασία στη διάγνωση και παρακολούθηση της δραστηριότητας της νόσου, και στην πρόβλεψη ύφεσης. Αρκετές μελέτες έχουν εξακριβώσει άμεσο συσχετισμό ανάμεσα σε επίπεδα αντισώματος PR3 και την ενεργή φάση της WG. Η συγκέντρωση ορού αντι-PR3 ανεβαίνει δραματικά κατά τη διάρκεια παροξυσμών της νόσου (90% συχνότητα), και οι υποτροπές συνήθως συνοδεύονται από σημαντικές αυξήσεις τίτλου.<sup>6,7</sup>

**ΑΡΧΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ**

Η δοκιμασία εκτελείται ως στερεά φάση ανοσοβιολογικής δοκιμασίας. Τα βυθίσματα (microwells) επενδύονται με καθαρό PR3 αντιγόνο και ακολουθεί το βήμα μπλοκαρίσματος για τη μείωση μη ειδικής δέσμευσης κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της δοκιμασίας. Έλεγχοι, βαθμονομητές και οροί ασθενών επωάζονται στα επενδεδυμένα βυθίσματα αντιγόνου για να επιτραπεί σε συγκεκριμένα αντισώματα παρόντα στον ορό για να δεσμεύουν το PR3 αντιγόνο. Αδέσμευτα αντισώματα και άλλες πρωτεΐνες ορού αφαιρούνται με την πλύση των βυθισμάτων. Δεσμευμένα αντισώματα ανιχνεύονται προσθέτοντας σύζευξη ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης με ενζυμική σήμανση (enzyme labeled anti-human IgG conjugate) στα βυθίσματα. Η αδέσμευτη σύζευξη απομακρύνεται με την πλύση. Συγκεκριμένο υπόστρωμα ενζύμου (TMB) προστίθεται στη συνέχεια στις κοιλότητες και η παρουσία αντισωμάτων ανιχνεύεται με χρωματική αλλαγή που παράγεται από την μετατροπή του υποστρώματος TMB σε προϊόν χρωματικής αντίδρασης. Η αντίδραση διακόπτεται και η ακεραιότητα της χρωματικής αλλαγής, η οποία είναι ανάλογη με την πυκνότητα του αντισώματος, διαβάζεται με ένα φασματοφωτόμετρο στα 450 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε Διεθνείς Μονάδες ανά χιλιοστόλιτρο (IU/ml) και αναφέρονται ως θετικά ή αρνητικά.

**ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

Αποθηκεύστε όλα τα αντιδραστήρια στους 2-8°C. **Μην καταψύχετε.** Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης, όταν αποθηκεύονται και μεταχειρίζονται σύμφωνα με την καθοδήγηση.

Μην χρησιμοποιείτε αν το αντιδραστήριο δεν είναι διαυγές ή υπάρχει ένζυμο παρόν. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν τη χρήση.

Ανασυνθέστε το διάλυμα πλύσης στο 1 λίτρο με απεσταγμένο ή απιοντισμένο νερό. Όταν αποθηκεύεται στους 2-8°C, το ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης του kit.

Οι λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων προορίζονται για χρήση μιας μόνο φοράς. Οι μη χρησιμοποιηθείσες λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων θα πρέπει να επανασφραγίζονται προσεκτικά στη σακούλα που περιέχει αποξηραντικές ουσίες για να αποφευχθεί υγραποίηση και να αποθηκεύονται στους 2-8°C.

**Προφυλάξεις**

Όλα τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν, τα προερχόμενα από τον άνθρωπο, έχουν δοκιμαστεί για HBsAg, HCV, HIV-1 και 2 και HTLV-I και βρέθηκαν αρνητικά από δοκιμασίες που απαιτούνται από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Ωστόσο, παράγωγα ανθρώπινου αίματος και δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά μολυσματικά. Τηρείτε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για την αποθήκευση, χορήγηση και διάθεση αυτών των υλικών.

**Οι οδηγίες θα πρέπει να τηρούνται ακριβώς όπως εμφανίζονται στο ένθετο του παρόντος kit για να διασφαλιστούν έγκυρα αποτελέσματα.** Μην εναλλάσσετε στοιχεία του kit με εκείνα από άλλες πηγές. Τηρήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιήσετε μικροβιακή και αλληλο-

EL

μόλυνση αντιδραστηρίων κατά τον χειρισμό. Μην χρησιμοποιείται στοιχεία του kit μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

### Υλικά που παρασχέθηκαν

ImmuliSia™ PR3 Antibody ELISA

[REF] 5162


Το kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8	[MICROPLATE PR3]	Μικροπλάκα με ατομικά βυθίσματα εκκίνησης (breakaway microwells). Επενδεδυμένα με καθαρό PR3 αντιγόνο. Έτοιμο προς χρήση.
1 x 1.75 ml	[CONTROL + PR3]	Έτοιμος προς χρήση <b>Θετικός Έλεγχος (Positive Control)</b> (κόκκινο πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για PR3 αντισώματα. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας σε IU/ml εμφανίζεται στην ετικέτα.
1 x 1.75 ml	[CONTROL -]	Έτοιμος προς χρήση <b>Αρνητικός Έλεγχος (Negative Control)</b> (λευκό πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό.
5 x 1.75 ml	[CALIBRATOR A PR3] [CALIBRATOR B PR3] [CALIBRATOR C PR3] [CALIBRATOR D PR3] [CALIBRATOR E PR3]	Έτοιμο προς χρήση σε 5 <b>Βαθμονομητών</b> . Βαθμονομητής A (πράσινο πώμα) 156 IU/ml, Βαθμονομητής B (μωβ πώμα) 62.5 IU/ml, Βαθμονομητής Γ (μπλε πώμα) 25 IU/ml, Βαθμονομητής Δ (κίτρινο πώμα) 10 IU/ml και Βαθμονομητής E (πορτοκαλί πώμα) 1 IU/ml. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα PR3. Συγκεντρώσεις σε IU/ml αναγράφονται στις ετικέτες.
1 x 15 ml	[IgG-CONJ HRP]	Σύζευξη ορού ανθρώπινης <b>αντι-ανοσοσφαιρίνης</b> από υπεροξειδάση από ραφανίδα. (HRP goat anti-human IgG Conjugate). Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένο με ροζ χρώμα.
1 x 60 ml	[DIL]	Αραιωτικό ορού (Serum Diluent). Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένο με μωβ χρώμα.
1 x 15 ml	[SUBSTRATE TMB]	Ενζυμο-υπόστρωμα τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB enzyme substrate). Έτοιμο προς χρήση. <b>Προστατέψτε από το φως.</b>
1 x 15 ml	[STOP H2SO4]	Διάλυμα παύσης (Stop Solution). Έτοιμο προς χρήση.
2 x	[BUF WASH]	Διάλυμα Πλύσης σε μορφή Σκόνης (Powder Wash Buffer). <b>Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο έκαστο.</b>
1 x		Φύλλα Πρωτοκόλλου

### Optional Components

1 x 60ml	[BUF WASH]	Υγρό Συμπυκνωμένο Διάλυμα Πλύσης. <b>Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο.</b>
----------	------------	---

### Σύμβολα που χρησιμοποιούνται σε ετικέτες

[LOT]	Αριθμός Παρτίδας
[REF]	Αριθμός καταλόγου
[IVD]	Διαγνωστική χρήση in vitro
	Χρήση έως

EL



Θερμοκρασία αποθήκευσης



Διαβάστε τις οδηγίες πριν τη χρήση



Αριθμός δοκιμών



Κατασκευαστής

### **Υλικά Που Απαιτούνται Αλλά Δεν Παρέχονται**

- Απιοντισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτο πλαστικό μπουκάλι για το αραιωμένο διάλυμα πλύσης
- Πιπέτες ικανές να απελευθερώνουν 5 μl έως 1000 μl
- Ρύγχη πιπετών (pipette tips) μιας χρήσεως
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες 12 x 75 mm και στηρίγματα δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομέτρης
- Απορροφητικές χάρτινες χειροπετσέτες
- Αναγνώστης μικροπλάκας ικανός για την ανάγνωση τιμών απορροφητικότητας στα 450 nm. Εάν είναι διαθέσιμος αναγνώστης μικροπλάκας διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να οριστεί στα 600-650 nm
- Αυτόματο πλυντήριο μικροπλάκας ικανό να διανέμει 200 μl

### **ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Μόνον δείγματα ορού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σ' αυτήν τη διαδικασία. Αιμολυμένα, λιπαιμικά ή βακτηριδιακά επιμολυσμένα δείγματα μπορούν να παρεμβληθούν στην εκτέλεση της δοκιμασίας και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα δεν θα πρέπει να φυλάσσονται για παραπάνω από μία εβδομάδα στους 2°- 8°C. Για αποθήκευση μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Συνιστάται τα κατεψυγμένα δείγματα να υποβάλλονται σε έλεγχο εντός ενός έτους. Να αποφεύγετε επανειλημμένη απόψυξη και νέα ψύξη των δειγμάτων.

### **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

#### **Διαδικαστικές Σημειώσεις**

- Διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος πριν ξεκινήσετε τη δοκιμασία.
- Όλα τα διαλύματα των δειγμάτων του ασθενούς θα πρέπει να προετοιμάζονται πριν την έναρξη της δοκιμασίας.
- Αφήστε τα δείγματα ασθενών και τα αντιδραστήρια δοκιμασίας να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη της διαδικασίας δοκιμασίας. Προτείνεται τα αντιδραστήρια να παραμείνουν στον πάγκο έξω από το κουτί για 30 λεπτά πριν τη χρήση. Βάζετε πίσω όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια που δεν χρησιμοποιήσατε στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση.
- Αφαιρείτε τις απαιτούμενες λωρίδες βυθισμάτων από τη σακούλα και προσεκτικά σφραγίζετε ξανά τη σακούλα για να αποφύγετε υγραποίηση στα μη χρησιμοποιηθέντα βυθίσματα. Βάζετε τη σακούλα πίσω στο ψυγείο αμέσως.

EL

- **Η τεχνική καλής πλύσης είναι πολύ σημαντική.** Αν η πλύση εκτελείται με το χέρι, η σωστή πλύση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας δυνατή ροή διαλύματος πλύσης με φιάλη πλύσης με ανοιχτό στόμιο σε ολόκληρη τη μικροπλάκα. **Συνιστάται αυτόματη συσκευή πλύσης μικροπλάκας.**
- Χρησιμοποιείτε πολυκάναλη πιπέτα ικανή να απελευθερώνει 8 ή 12 κοιλότητες ταυτόχρονα. Αυτό επιταχύνει τη διαδικασία και παρέχει χρόνους πιο ομοιόμορφης επώασης.
- Σε όλα τα βήματα, ο προσεκτικός έλεγχος χρονισμού είναι σημαντικός. Η έναρξη όλων των περιόδων επώασης γίνεται με την ολοκλήρωση της προσθήκης αντιδραστηρίου.
- Προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων θα πρέπει να εκτελείται με τον ίδιο ρυθμό και την ίδια ακολουθία.

### Μέθοδος Δοκιμής

**Βήμα 1** Αφήνετε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

**Βήμα 2** Τοποθετείτε ετικέτα στο φύλλο πρωτοκόλλου για να υποδηλώσετε την τοποθέτηση δείγματος στις κοιλότητες. Αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική να εκτελείτε τα δείγματα εις διπλούν.

**Βήμα 3** Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο Βαθμονομητή Δ (φιαλίδιο με κίτρινο πώμα).

ή

Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε Βαθμονομητές Α έως Ε, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διάταξη δείγματος.

	Ποιοτικός		
A	Κενός	S5	Κ.λπ.
B	-	S6	
C	+	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

	Ημι-Ποσοτικός		
A	Κενός	S1	Κ.λπ.
B	-	S2	
C	+	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

**Βήμα 4** Προετοιμάζετε διάλυμα **1:101** από τα δείγματα ασθενών αναμειγνύοντας **5 μl** των ορών των ασθενών με **500ul** Ορού Αραίωσης.

**Βήμα 5** Αφαιρείτε τα απαιτούμενα βυθίσματα από το σάκο και βάζετε πίσω τις λωρίδες που δεν έχετε χρησιμοποιήσει στη σφραγισμένη σακούλα στο ψυγείο. Τοποθετείτε ασφαλώς τα βυθίσματα στην επιπλέον βάση που παρέχεται.

**Βήμα 6** Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** τους Έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές, τους Θετικούς και Αρνητικούς ελέγχους και τα

EL

αραιωμένα δείγματα ασθενών (**1:101**) στα κατάλληλα βυθίσματα σύμφωνα με το φύλλο πρωτοκόλλου.

**Σημείωση:** Συμπεριλαμβάνετε μία κοιλότητα που περιέχει **100 μl** Ορού Αραίωσης ως κενό αντιδραστήριο. Μηδενίζετε την συσκευή ανάγνωσης ELISA έναντι του κενού αντιδραστηρίου.

**Βήμα 7** Επωάζετε για **30 λεπτά** ( $\pm$  5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

**Βήμα 8** Πλένετε **4 φορές** με διάλυμα πλύσης. Για πλύσιμο με το χέρι, γεμίζετε κάθε βύθισμα με ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης. Πετάξτε το υγρό αναστρέφοντας και κτυπώντας ελαφρά ώστε να βγουν τα περιεχόμενα κάθε κοιλότητας ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κοιλότητα. Για να κάνετε αποτύπωση στο τέλος της τελευταίας πλύσης, αναστρέψτε τις λωρίδες και κτυπήστε τοις κοιλότητες έντονα πάνω σε απορροφητικές χάρτινες χειροπετέτες. Για αυτόματες συσκευές πλυσίματος, προγραμματίστε την συσκευή πλύσης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

**Βήμα 9** Βάζετε με την πιπέτα **100 μl** της σύζευξης σε βυθίσματα.

**Βήμα 10** Επωάζετε για **30 λεπτά** ( $\pm$  5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

**Βήμα 11** Πλένετε όλα τα βυθίσματα, όπως περιγράφεται στο Βήμα 8.

**Βήμα 12** Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** Ενζυμικού Υποστρώματος σε κάθε βύθισμα με την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για τη Σύζευξη.

**Βήμα 13** Επωάζετε για **30 λεπτά** ( $\pm$  5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

**Βήμα 14** Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** Διαλύματος Παύσης σε κάθε βύθισμα χρησιμοποιώντας την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για την προσθήκη του Ενζυμικού Υποστρώματος. Διαβάζετε τις τιμές απορροφητικότητας εντός **30 λεπτών** από την προσθήκη του Διαλύματος Παύσης.

**Βήμα 15** Διαβάστε την απορροφητικότητα κάθε βυθίσματος σε **450 nm** χρησιμοποιώντας μονού ή στα 450/630nm χρησιμοποιώντας διπλού μήκους κύματος συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας έναντι του σετ κενού αντιδραστηρίου σε μηδενική απορροφητικότητα.

### Ποιοτικός Έλεγχος

Οι Βαθμονομητές, ο Θετικός και Αρνητικός Έλεγχος και ένα κενό αντιδραστήριο πρέπει να εκτελούνται με κάθε δοκιμασία για την εξακρίβωση της ακεραιότητας και ακρίβειας της δοκιμασίας. Η ένδειξη απορροφητικότητας του κενού αντιδραστηρίου θα πρέπει να είναι μικρότερη του 0,3. Ο Βαθμονομητής A θα πρέπει να έχει ένδειξη απορροφητικότητας όχι μικρότερη του 1,0, άλλως η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί. Ο αρνητικός έλεγχος πρέπει να είναι μικρότερος από 10 IU/ml. Εάν η δοκιμασία διεξάγεται εις διπλούν, ο μέσος όρος των δύο ενδείξεων θα πρέπει να λαμβάνεται για τον προσδιορισμό IU/ml. Κατά την εκτέλεση των Ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή Δ πρέπει να είναι μεγαλύτερη από εκείνην του αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από την απορροφητικότητα του θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς ο θετικός έλεγχος πρέπει να δίνει τιμές εντός του φάσματος που δηλώνεται στο φυλλάδιο.



**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ****Υπολογισμοί**

Οι πυκνότητες των δειγμάτων των ασθενών μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις δύο μεθόδους:

**1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ**

Απορ. του Δείγματος Δοκιμασίας

----- X IU/ml Βαθμονομητή Δ =IU/ml Δείγμα Δοκιμασίας

Απορ. Βαθμονομητή Δ

Συνιστάται τα ποιοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά” ή “αρνητικά.” Τα αποτελέσματα δειγμάτων που είναι μεγαλύτερα από ή ίσα με τον Βαθμονομητή Δ θεωρούνται θετικά.

**2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ**

Αποτυπώστε την απορροφητικότητα των Βαθμονομητών Α έως Ε έναντι των αντίστοιχων συγκεντρώσεων σε χαρτί γραφημάτων γραμμικού αρχείου καταγραφής (linear-log graph paper). Αποτυπώστε τις συγκεντρώσεις σε IU/ml στον Χ-άξονα έναντι της απορροφητικότητας στον Υ-άξονα και σχεδιάστε μια καμπύλη προσαρμογής από σημείο σε σημείο. Καθορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενών από την καμπύλη σύμφωνα με τις αντίστοιχες τιμές απορροφητικότητας. Εναλλακτικά, μια καμπύλη τεσσάρων παραμέτρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποτύπωση της πρότυπης καμπύλης.

Συνιστάται τα ημι-ποσοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά,” “αρνητικά,” ή “απροσδιόριστα” με τιμές μονάδας IU/ml. Τα απροσδιόριστα/οριακά αποτελέσματα θα πρέπει να επανελέγχονται και αξιολογούνται μαζί με άλλες εργαστηριακές μεθόδους, όπως δοκιμασίες για ανίχνευση ANCA από IFA.

**Ερμηνεία**

Οι τιμές ερμηνείας προσδιορίστηκαν με δοκιμή 136 απλών δοτών αίματος και δείγματα ελέγχου μη αυτοάνοσης νόσου αγγειιτίδων. Ο μέσος όρος των συνήθων αντικειμένων συν 3 SD καθιερώθηκε ως το έσχατο όριο της δοκιμασίας και καθόρισε την τιμή των 10 IU/ml που προκύπτει από το διεθνές πρότυπο CDC για την PR3. Δεν συμπεριελήφθησαν έλεγχοι νόσου MPO στον καθορισμό του σημείου διαχωρισμού της δοκιμασίας PR3. Η IMMCO προτείνει τη χρήση του παρακάτω εύρους αναφοράς. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να επικυρώνει τις τιμές δοκιμασίας για τις δικές τους συνθήκες.

<b>τιμή αντι-PR3 Ab</b>	<b>Ερμηνεία</b>
<10 IU/ml	Αρνητικό
10-12,5 IU/ml	Απροσδιόριστο (Οριακό)
>12,5 IU/ml	Θετικό

## Βαθμονομητής

Οι Έτοιμοι προς Χρήση Βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για να παρέχουν ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε εκτέλεση. Δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων μπορούν να δώσουν τιμές απορροφητικότητας μεγαλύτερες από εκείνη του Βαθμονομητή Α. Για τον προσδιορισμό ακριβών ημι-ποσοτικών τιμών, αυτά τα δείγματα θα πρέπει να αραιώνονται περαιτέρω ώστε να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης του βαθμονομητή όταν επανεξετάζονται. Για τον προσδιορισμό τιμών IU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που αποκτήθηκαν με τον διαλύτη.

## ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία δεν θα πρέπει να εκτελείται σε αιμολυμένα, βακτηριδιακά επιμολυσμένα ή λιπαιμικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο δειγμάτων ανθρώπινου ορού μόνον. Τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν εξυπηρετούν μόνο ως βοήθημα στη διάγνωση. Μόνα τους, αυτά τα αποτελέσματα δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται ως διαγνωστικά. Αυτή η δοκιμασία δεν έχει επικυρωθεί σε παιδιατρικό πληθυσμό. Δεν συμπεριελήφθησαν έλεγχοι νόσου MPO στον καθορισμό του σημείου διαχωρισμού της δοκιμασίας PR3.

## ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Οι αναμενόμενες τιμές σε φυσιολογικό πληθυσμό είναι αρνητικές. Ωστόσο, 2-4% των εμφανώς υγιών, ασυμπτωματικών ατόμων μπορεί να αποδειχθούν θετικά για PR3 αντισώματα. Αντιθέτως, κάποιοι ασθενείς με ενεργή νόσο μπορεί να έχουν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα αυτών των αντισωμάτων. Ανοσοκατασταλτική θεραπεία, έναρξη ή μεταβολή ης θεραπείας δεν θα πρέπει να ξεκινά επί τη βάσει αποτελέσματος απλής θετικού PR3 αντισώματος, αλλά μάλλον προσεκτικών κλινικών παρατηρήσεων.

Ο ακόλουθος πίνακας απεικονίζει τη συχνότητα PR3 και MPO ειδικών ANCA σε ορούς από 112 ασθενείς με πολυαγγειίτιδες συσχετισμένες με ANCA.<sup>11</sup> Η επίπτωση των PR3 αντισωμάτων ποικίλλει ανάλογα με τον πληθυσμό των ασθενών. Η συλλογή επίπτωσης που ελήφθη από τη βιβλιογραφία εμφανίζεται κατωτέρω.

Επίπτωση αντι-PR3 και αντι-MPO σε αγγειίτιδες συσχετισμένες με ANCA

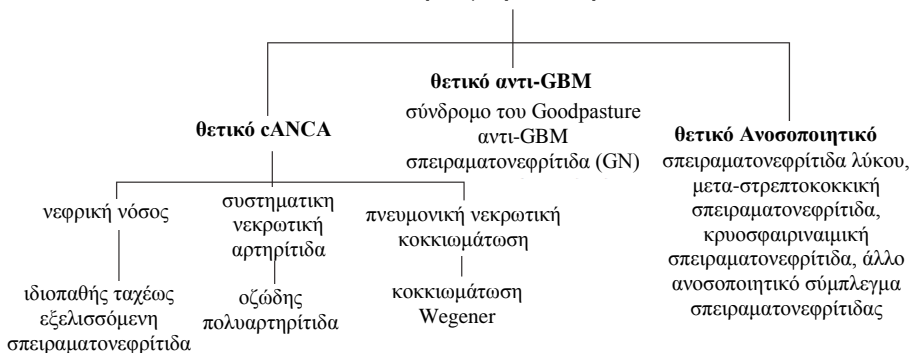
Συνάφεια αντισώματος	Κοκκιωμάτωση Wegener	Μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα	Σύνδρομο Churg-Strauss
ANCA θετικά από IFA	78%	59%	67%
αντι-PR3 θετικό	90%	0%	10%
αντι-MPO θετικό	0%	62%	17%

Η κλινική χρησιμότητα της ανίχνευσης ANCA με ειδικότητα cANCA με θετική ειδικότητα αντι-PR3 αντισώματος σε διάφορες αγγειιδικές διαταραχές απεικονίζεται κατωτέρω.<sup>5</sup>

EL

Σετ κλινικών δειγμάτων δοκιμάστηκαν στο ImmuLISA™ PR3 Antibody ELISA και με άλλο εμπορικά διαθέσιμο MPO antibody ELISA. Τα αποτελέσματα που καταδεικνύουν επίπτωση στους πληθυσμούς γι' αυτήν την μελέτη παρέχονται κατωτέρω.

### Ορολογική Ανάλυση



Ομάδα Ασθενών	n	IMMCO		Άλλο PR3 Ab ELISA		
		n Pos	% Pos	n	n Pos	% Pos
Νόσος Συσχετισμένη						
Κοκκιωμάτωση Wegener	59	57	96,6%	59	56	94,9%
Κοκκιωμάτωση Wegener	29	2	6,9%	29	2	6,9%
Αδιαφοροποίητο ANCA θετικό	11	0	0,0%	11	0	0,0%
Έλεγχος Νόσου						
Μη-ANCA συσχετισμένη αγγειίτιδα	24	1	4,2%			
Φλεγμονώδης εντερική νόσος	16	0	0,0%			
Συστηματικός ερυθρεματώδης λύκος	32	1	3,1%	32	0	0,0%
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	8	0	0,0%	8	0	0,0%
Άλλη αυτοάνοση νόσος	16	0	0,0%	16	0	0,0%
Υγιή Συνήθη	80	0	0,0%	80	0	0,0%

### ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα του ImmuLISA™ PR3 Antibody ELISA αξιολογήθηκε με δοκιμή καλώς χαρακτηρισμένων δειγμάτων ορού θετικού σε PR3 αντίσωμα από υποκείμενα θετικού αντισώματος cANCA μαζί με ελέγχους νόσων και “φυσιολογικούς” ανθρώπινους ορούς. Αυτά τα δείγματα δοκιμάστηκαν επίσης σε εμπορικά διαθέσιμα kit ELISA. Αυτά τα αποτελέσματα συνοψίζονται κατωτέρω.

A. Σύγκριση Μεθόδου: ImmuLISA™ PR3 Antibody ELISA έναντι άλλου PR3 antibody ELISA:

**Άλλο PR3 ELISA**

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
<b>IMMCO</b>	Θετικό	41	4	45
<b>PR3</b>	Αρνητικό	2	58	60
<b>ELISA</b>	Σύνολο	43	62	105

Συμφωνία Θετικού Ποσοστού: 95,3% (95% CI 82,9% έως 99,2%)

Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού: 93,5% (95% CI 83,5% έως 97,9%)

Συμφωνία Γενικού Ποσοστού: 94,3% (95% CI 87,5% έως 97,7%)

**B. Διασταυρωτή Αντιδραστικότητα:** Ένα σύνολο από 136 δείγματα με πιθανή διασταυρούμενη αντίδραση από άτομα με άλλες αυτόνοσες διαταραχές ή θετικά για άλλα αυτοαντισώματα εξετάστηκαν για αντισώματα PR3 χρησιμοποιώντας το σύστημα ImmuLisa™ PR3 Antibody ELISA.

Πάθηση	n	Θετικό n
Σπειραματονεφρίτις	29	2
Αδιαφοροποίητο pANCA θετικό	11	0
Μη-ANCA συσχετισμένη αγγειίτιδα	24	1
Φλεγμονώδης Εντερική Νόσος	16	0
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	32	0
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	8	0
Άλλη αυτόνοση νόσος	16	0
<b>Σύνολο</b>	<b>136</b>	<b>3 (2,2%)</b>

**Ακρίβεια**

Η ακρίβεια δοκιμάστηκε με 6 θετικά δείγματα που επιλέχθηκαν από όλο το φάσμα της δοκιμασίας. Σειρές δοκιμασιών τριών επαναλήψεων πειράματος (replicates) διεξήχθησαν σε κάθε δείγμα σε διάστημα τριών ημερών. Η επαναληψιμότητα προσδιορίστηκε με 6 επαναλήψεις πειράματος κάθε δείγματος.

Δείγμα	Μέσος όρος (IU/ml)	Ολική Ανακρίβεια		Μεταξύ ημερών		Εντός προσδιορισμού (Επαναληψιμότητα)	
		SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%
1	8,7	0,809	9,3%	0,809	9,5%	0,758	8,4%
2	12,2	0,812	6,7%	0,974	8,0%	0,547	4,5%
3	27,2	2,211	8,1%	2,183	8,3%	1,218	4,2%
4	57,0	3,017	5,3%	2,872	5,0%	3,458	6,1%
5	112,4	4,211	3,7%	5,059	4,5%	2,821	2,5%
6	139,3	6,199	4,4%	6,654	4,8%	6,043	4,3%

**Αναπαραγωγιμότητα**

Έξι δοκιμασίες δειγμάτων στο αρνητικό εύρος, ~10% κάτω του σημείου διαχωρισμού, ~20% άνω του σημείου διαχωρισμού και στο μέτρια θετικό εύρος της δοκιμασίας εκτελέστηκαν για να προσδιορίσουν την ποιοτική

EL

αναπαραγωγιμότητα στο ίδιο δείγμα (intra-assay). Τρεις επαναλήψεις των ίδιων δειγμάτων δοκιμάστηκαν σε τρεις εκτελέσεις για να προσδιορίσουν την αναπαραγωγιμότητα στο ίδιο δείγμα (inter-assay). Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας γι' αυτά τα δείγματα παρήγαν 100% ποιοτική συμφωνία.

### Γραμμικότητα

Εκτελέστηκαν μελέτες με τη χρήση ισαπέχουσας αραιώσης σειράς θετικών δειγμάτων με τιμές σε όλο το εύρος του βαθμονομητή για να προσδιορίσει το γραμμικό εύρος της δοκιμασίας. Το γραμμικό εύρος της δοκιμασίας προσδιορίστηκε ότι θα είναι από 2,2 – 156 IU/ml. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω. Συνιστάται τα δείγματα που παράγουν αποτελέσματα μεγαλύτερα από τον κορυφαίο βαθμονομητή να αραιώνονται και επανεξετάζονται.

Δείγμα	Εύρος Δοκιμής (IU/ml)	Κλίση (95% CI)	Σημείο τομής Y (95% CI)	R <sup>2</sup>	% Ανάκαμψη
1	3,7 έως 77,2	1,07 (0,94 έως 1,20)	-0,031 (-0,134 έως 0,071)	0,986	89,8 έως 111,9
2	3,8 έως 158,2	1,012 (0,934 έως 1,090)	-0,053 (-0,153 έως 0,047)	0,994	88,9 έως 102,2
3	3,4 έως 43,4	1,023 (0,929 έως 1,118)	0,009 (-0,045 έως 0,063)	0,991	100 έως 112,3

### Όριο Ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (LoD) για αντίσωμα PR3 με τη χρήση αυτής της δοκιμασίας καθορίστηκε να είναι 2,2 IU/ml επί τη βάση 60 πανομοιότυπων κενού και 10 πανομοιότυπων καθένα από 6 δείγματα χαμηλού επιπέδου (NHS).

### Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε με την ανάμειξη ορών με γνωστά επίπεδα αντισωμάτων PR3 με δείγματα ορού πιθανώς παρεμβαλλόμενα και με την μελέτη απόκλισης από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Καμία σημαντική παρέμβαση δεν εκδηλώθηκε για τις ακόλουθες ουσίες στα επίπεδα που δηλώνονται: Αιμοσφαιρίνη (2 g/L), Χολερυθρίνη (342 μmol/L), και Ρευματοειδής Παράγοντας (100 EU/ml).

ES



**Immuli**<sup>TM</sup>

# **ELISA Anticuerpos PR3**

**ELISA Anticuerpos Proteinasa 3 (PR3)**

[IVD]

## **ETIQUETA DEL PRODUCTO**

[REF] 5162 ELISA Anticuerpos PR3 96 Determinaciones

## **UTILIZACIÓN PREVISTA**

Un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección y semicuantificación de anticuerpos anti-proteinasa 3 (PR3) en el suero humano para ayudar en el diagnóstico de vasculitis asociadas con anticuerpos anticitoplasmáticos de neutrófilos (ANCA), entre ellas la granulomatosis de Wegener en conjunción con otras pruebas clínicas y de laboratorio.

## **RESUMEN Y EXPLICACIÓN**

Los anticuerpos anticitoplasmáticos de neutrófilos (ANCA) son un grupo de anticuerpos dirigidos contra las proteínas de los gránulos de los neutrófilos. La presencia de los ANCA en pacientes con vasculitis fue observada por primera vez en 1982 por Davies.<sup>1</sup> Estos anticuerpos pueden ser detectados por inmunofluorescencia indirecta en neutrófilos tratados con etanol, que produce patrones de manchas característicos (cANCA) o mediante el ensayo ELISA. Las reacciones de cANCA van dirigidas contra la Proteinasa 3 (PR3) y en cierto grado contra antígenos menores como la catepsina G y la elastasa. La PR3 es una proteinasa serina neutral localizada en los gránulos azurófilos de los neutrófilos con un peso molecular de 28kD.<sup>2</sup> Los anticuerpos contra el antígeno PR3 sirven como marcador de la Granulomatosis de Wegener (GW), una vasculitis netrosante sistémica.<sup>3</sup> La GW es una vasculitis sistémica de vasos pequeños caracterizada por la inflamación granulomatosa necrosante del tracto respiratorio superior e inferior con glomerulonefritis crescéntrica necrosante paucimune. Un diagnóstico temprano es de gran importancia, ya que la granulomatosis de Wegener a menudo progresa rápidamente y aumenta la extensión de la enfermedad por los órganos afectados y su gravedad. Los anticuerpos PR3 tienen una importancia crítica en el diagnóstico y el control de la actividad de la enfermedad, y a la hora de predecir recaídas. Varios estudios han demostrado una correlación directa entre los niveles de anticuerpos PR3 y la fase activa de la GW. La concentración de anticuerpos PR3 en el suero incrementa drásticamente durante las fases más graves de la enfermedad, y las recaídas suelen ir acompañadas de aumentos importantes en los niveles de anticuerpos.<sup>6,7</sup>

ES

## PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El análisis es realizado como un inmunoensayo de fase sólida. Los micropocillos son recubiertos con antígeno PR3 purificado y a continuación se realiza una fase de bloqueo para reducir los vínculos no específicos durante el ensayo. Se incuban en los pozos recubiertos con el antígeno controles, calibradores y el suero del paciente para que los anticuerpos específicos puedan presentarse en el suero para unirse al antígeno PR3. Los anticuerpos separados y otras proteínas del suero son eliminados lavando los micropocillos. Se detectan los anticuerpos unidos añadiendo a los micropocillos una enzima etiquetada conjugado anti-humano IgG. El conjugado no unido es eliminado lavándolo. A continuación se añade a los pocillos sustrato de enzima específica (TMB) y se detecta la presencia de anticuerpos gracias a un cambio de color producido por la conversión del sustrato de TMB en un producto de reacción de color. Se detiene la reacción y la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, es leída por un espectrofotómetro a 250 nm. Los resultados son expresados en unidades internacionales por milímetro (IU/ml) y consignados como positivos o negativos.

## REACTIVOS

Guarde todos los reactivos a entre 2 y 8°C. **No los congele.** Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si se los maneja y almacena de acuerdo con estas instrucciones.

No lo utilice si el reactivo no está limpio o si contiene un precipitado. Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (20-25°C) antes de su utilización.

Reconstituya el tampón de lavado hasta un litro con agua destilada o desionizada. Si lo guarda entre 2 y 8°C, el tampón de lavado reconstituido es estable hasta la fecha de caducidad del equipo.

Las tiras de micropocillos recubiertos son de un solo uso. Las tiras de micropocillos no utilizadas deberían ser recolocadas con cuidado en la bolsa con desecantes para evitar la condensación y ser almacenadas a 2-8°C.

## Precauciones

Todos los componentes provenientes de seres humanos utilizados han sido analizados en busca de HBsAg, HCV, HIV-1 y 2 y HTLV-I y han dado negativo de acuerdo con los exámenes necesarios de la FDA. Sin embargo, los derivados de sangre humana y las muestras de pacientes deberían considerarse potencialmente infecciosas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio a la hora de guardar, preparar y desechar estos materiales.<sup>10</sup>

***Deben seguirse las instrucciones exactamente tal como aparecen aquí para garantizar unos resultados válidos.*** No cambie los componentes del equipo por otros de fuentes externas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio para minimizar la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos a la hora de manejarlos. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas.

ES

## Materiales proporcionados

ELISA ImmuLisa™ Anticuerpos PR3

[REF] 5162






El equipo contiene suficientes reactivos para realizar 96 determinaciones.

12 x 8	[MICROPLATE PR3]	Microplaca con micropocillos individuales escindibles. Revestida con un antígeno PR3 purificado. Lista para su utilización.
1 x 1.75 ml	[CONTROL+ PR3]	<b>Control Positivo</b> listo para su utilización ( <i>tapón rojo</i> ). Contiene suero humano positivo en anticuerpos PR3. El registro de concentración esperado en IU/ml está impreso en la etiqueta.
1 x 1.75 ml	[CONTROL-]	<b>Control Negativo</b> listo para su utilización ( <i>tapón blanco</i> ). Contiene suero humano.
5 x 1.75 ml	[CALIBRATOR A PR3] [CALIBRATOR B PR3] [CALIBRATOR C PR3] [CALIBRATOR D PR3] [CALIBRATOR E PR3]	<b>Juego de 5 calibradores</b> listos para su utilización. Calibrador A (tapón verde) 156 IU/ml, Calibrador B (tapón violeta) 62,5 IU/ml, Calibrador C (tapón azul) 25 IU/ml, Calibrador D (tapón amarillo) 10 IU/ml, y Calibrador E (tapón naranja) 1 IU/ml. Provenientes de suero humano con anticuerpos PR3. Las concentraciones en IU/ml están impresas en las etiquetas.
1 x 15 ml	[IgG-CONJ HRP]	<b>Conjugado IgG</b> antihumano de cabra HRP. Listo para su utilización. De color rosa.
1 x 60 ml	[DIL]	Diluyente de suero. Listo para su utilización. De color morado.
1 x 15 ml	[SUBSTRATE TMB]	Sustrato de enzima TMB. Listo para su utilización. <b>Proteger de la luz.</b>
1 x 15 ml	[STOP H2SO4]	Solución de parada. Lista para su utilización.
2 x	[BUF WASH]	Tampón de lavado en polvo. <b>Reconstituir a un litro cada uno.</b>
1 x		Hojas de protocolo

## Componentes opcionales

1 x 60ml	[BUF WASH]	Tampón de lavado líquido concentrado. <b>Reconstituir a un litro.</b>
----------	------------	--

## Símbolos utilizados en las etiquetas

[LOT]	Número de lote
[REF]	Número de catálogo
[IVD]	Utilización diagnóstica in vitro
	Utilizar antes de
	Temperatura de almacenamiento
	Leer las instrucciones antes de utilizar
	Número de análisis
	Fabricante



ES

### **Materiales necesarios pero no suministrados**

- Agua desionizada o destilada
- Botella de plástico blando para el tampón de lavado diluido
- Pipetas capaces de suministrar de 5 µl a 1000 µl
- Extremos de pipeta desechables
- Tubos de ensayo limpios de 12 x 75 mm y rejilla para tubos de ensayo
- Temporizador
- Toallitas de papel absorbentes
- Lector de microplaca capaz de leer valores de absorbencia a 450 nm. Si está disponible el lector de microplaca de longitud de onda dual, el filtro de referencia debería fijarse a 600-650 nm
- Lavador de microplaca automático capaz de suministrar 200 µl

### **RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE ESPECIMENES**

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes muy hemolizados, lipémicos o contaminados microbiológicamente pueden afectar al funcionamiento del análisis y no deberían ser utilizados. Guarde los especímenes entre 2° y 8°C durante un máximo de una semana. Para periodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Es recomendable que los especímenes congelados sean analizados al cabo de un año. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente.

### **PROCEDIMIENTO**

#### **Notas del procedimiento**

- Lea detenidamente la etiqueta del producto antes de empezar el ensayo.
- Todas las diluciones de las muestras del paciente deberían prepararse antes de empezar con el ensayo.
- Deje que los especímenes del paciente y los reactivos de los análisis se adapten a la temperatura ambiente antes de empezar con el procedimiento de análisis. Le sugerimos que deje los reactivos sobre la mesa de trabajo y fuera de la caja unos 30 minutos antes de su utilización. Vuelva a meter todos los especímenes y reactivos no utilizados en la nevera después de su utilización.
- Saque las tiras de micropocillos necesarias de la bolsa y vuelva a cerrarla cuidadosamente para evitar la condensación de los pocillos no utilizados. Vuelva a meter la bolsa a la nevera inmediatamente.
- ***Una buena técnica de lavado es fundamental.*** Si el lavado va a ser realizado a mano, aplique una corriente fuerte de tampón de lavado con una botella de lavado de boca ancha por toda la microplaca. ***Se recomienda utilizar un lavador de microplacas automático.***
- Utilice una pipeta multicanal capaz de proveer a 8 a 12 pozos simultáneamente. Esto acelera el proceso y proporciona tiempos de incubación más uniformes.

ES

- En todos los pasos es necesario controlar cuidadosamente el tiempo. El inicio de todos los periodos de incubación empieza al terminar de añadir el reactivo.
- Todas las muestras y reactivos deberían ser añadidos a la misma velocidad y en el mismo orden.

### Método de análisis

**Paso 1** Deje que los reactivos y especímenes se adapten a la temperatura ambiente.

**Paso 2** Etiquete la hoja de protocolo para indicar que se han colocado muestras en los micropocillos. Una buena práctica de laboratorio es analizar las muestras por duplicado.

**Paso 3** Para una **determinación cualitativa** utilice únicamente el Calibrador D (*vial con tapón amarillo*).

o

Para una **determinación semi-cuantitativa** utilice los Calibradores A a E tal como aparece en el plan de muestras siguiente.

	Cualitativo				Semi-cuantitativo		
A	Base	S5	Etc.	A	Base	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

**Paso 4** Prepare una dilución **1:101** de las mezclas del paciente mezclando **5 µl** del suero del paciente con **500µl** de Diluyente de Suero.

**Paso 5** Saque los micropocillos necesarios de la bolsa y vuelva a meter en la nevera las tiras no utilizadas dentro de la bolsa cerrada. Coloque los micropocillos en la funda adicional proporcionada.

**Paso 6** Vierta **100 µl** de Calibradores listos para usar, controles positivos y negativos y muestras del paciente diluidas (**1:101**) en los micropocillos adecuados en base a la hoja de protocolo.

**Nota:** Incluya un pocillo con **100 µl** del Diluyente de Suero como reactivo base. Ajuste el medidor ELISA en función del reactivo base.

**Paso 7** Incúbelo **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.

**Paso 8** Lávelo **4x** con tampón de lavado. Para un lavado manual, llene cada micropocillo con tampón de lavado reconstituido. Deseche el fluido volcando y vertiendo el contenido de cada pocillo o aspirando el líquido de cada pocillo. Para secar el final del último lavado, vuelque las tiras y golpee los pocillos con fuerza con toallitas de papel absorbentes. Para lavadores automáticos, programe el lavador siguiendo las instrucciones del fabricante.

ES

**Paso 9** Vierta **100 µl** de Conjugado en los micropocillos.

**Paso 10** Incúbelo **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.

**Paso 11** Lave todos los micropocillos siguiendo las instrucciones del Paso 8.

**Paso 12** Vierta **100 µl** de Sustrato de Enzimas en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Conjugado.

**Paso 13** Incúbelo **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.

**Paso 14** Vierta **100 µl** de Solución de Parada en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Sustrato de Enzimas. Lea los valores de absorbencia a los **30 minutos** de añadir la Solución de Parada.

**Paso 15** Lea la absorbencia de cada micropocillo a **450 nm** si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda simple o a 450/630nm si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda dual con el reactivo base fijado a absorbencia cero.

### Control de calidad

Los Calibradores, los Controles Positivo y Negativo y el reactivo base deben comprobarse en cada ensayo para verificar la integridad y la precisión del análisis. La medición de absorbencia del reactivo base debería ser  $<0,3$ . El Calibrador A debería tener una lectura de absorbencia de no menos de 1,0, de lo contrario la prueba debe repetirse. El control negativo debe ser  $<10$  IU/ml. Si se realiza la prueba por duplicado, debería tomarse la media de ambas lecturas para determinar la lectura en IU/ml. Al realizar determinaciones cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser mayor que la del control negativo y menor que la absorbencia del control positivo. Para las determinaciones semicuantitativas el control positivo debe arrojar valores dentro del registro estipulado en el vial.

## RESULTADOS

### Cálculos

Las concentraciones de las muestras del paciente pueden ser determinadas utilizando dos métodos:

#### 1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. muestra de análisis

----- X IU/ml de Calibrador D = IU/ml Muestra Análisis

Abs. de Calibrador D

Es recomendable indicar si los resultados cualitativos son “positivos” o “negativos”. Los resultados de los análisis iguales o superiores al Calibrador D son considerados positivos.

## 2. DETERMINACIÓN SEMI-CUANTITATIVA

Determine la absorbencia de los Calibradores A a E en base a sus concentraciones respectivas sobre papel para gráficos lineales logarítmicos. Determine las concentraciones en IU/ml en el eje X y la absorbencia en el eje Y y dibuje una curva de punto a punto. Determine las concentraciones de las muestras del paciente desde la curva de acuerdo con los valores de absorbencia correspondientes. Como alternativa, puede utilizar una curva de cuatro parámetros para trazar la curva estándar.

Es recomendable indicar si los resultados semi-cuantitativos son “positivos”, “negativos” o “indeterminados” con valores en unidades IU/ml. Los resultados indeterminados/en el límite deberían ser reanalizados y evaluados junto con otros métodos de laboratorio, como los ensayos para la detección de ANCA de IFA.

### Interpretación

Los valores de interpretación fueron determinados analizando 136 especímenes de control de donantes de sangre normales y sin vasculitis autoinmunes. La media de los sujetos normales más 3 SD fue establecida como límite del ensayo y se le asignó un valor de 10 IU/ml derivado del estándar internacional de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades para los PR3. Los controles de enfermedades MPO no se incluyeron en la determinación del límite del ensayo PR3. IMMCO recomienda la utilización del registro de referencia siguiente. Cada laboratorio debería validar los valores del ensayo para sus propias condiciones.

<b>Valor anticuerpos anti-PR3</b>	<b>Interpretación</b>
<10 IU/ml	Negativo
10-12,5 IU/ml	Indeterminado (Límite)
>12,5 IU/ml	Positivo

### Calibrador

Los calibradores listos para utilizar vienen incluidos para proporcionar una determinación semi-cuantitativa y deben ser utilizados en cada análisis. Las muestras de pacientes que contienen niveles altos de anticuerpos pueden arrojar unos valores de absorbencia superiores que los del Calibrador A. Para determinar unos valores semi-cuantitativos precisos, esos especímenes deberían diluirse más para que entren en el registro de la curva del calibrador al volver a analizarlos. Para determinar los valores en IU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo no debería ser realizado en muestras muy hemolizadas, con contaminación microbiana o lipémicas. Este método debería ser utilizado únicamente para analizar muestras de suero humano. Los resultados obtenidos solo sirven como ayuda en el diagnóstico. Independientemente, estos resultados no deberían ser interpretados como diagnósticos. Este ensayo no ha sido validado en una población pediátrica. Los controles de enfermedades MPO no se incluyeron en la determinación del límite del ensayo PR3.

**VALORES ESPERADOS**

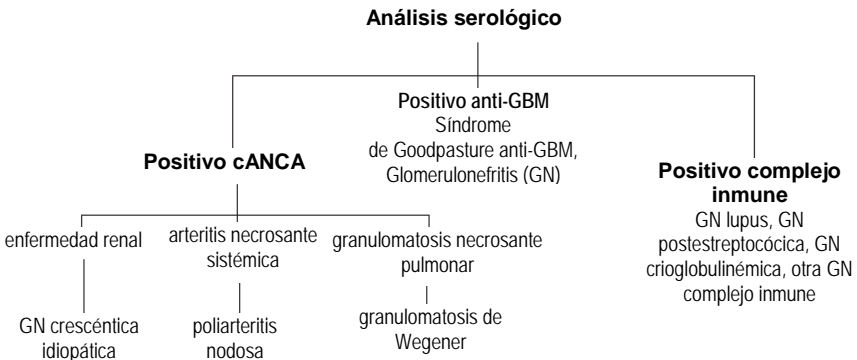
Los valores esperados en una población normal son negativos. Sin embargo, el 2-4% de los individuos aparentemente sanos y asintomáticos puede dar positivo en anticuerpos anti-PR3. En cambio, algunos pacientes con enfermedades activas pueden tener niveles indetectables de estos anticuerpos. No debería empezarse una terapia con inmunosupresores, ni iniciarse o alterarse el tratamiento sobre la única base de unos resultados positivos de anticuerpos PR3, sino que deberían realizarse observaciones clínicas cuidadosas.

La tabla siguiente muestra la frecuencia con la que encontramos ANCA específicos de PR3 y MPO en 112 pacientes de vasculitis asociada a ANCA.<sup>11</sup> La incidencia de los anticuerpos PR3 varía en función del paciente. A continuación incluimos un resumen de la incidencia realizado a partir de la documentación.

**Incidencia de anti-PR3 y anti-MPO en vasculitis asociada a ANCA**

Asociación de anticuerpos	Granulomatosis de Wegener	Poliangeítis microscópica	Síndrome de Churg-Strauss
Positivo en ANCA por IFA	78%	59%	67%
Positivo en anti-PR3	90%	0%	10%
Positivo en anti-MPO	0%	62%	17%

La utilidad clínica de la detección de ANCA con especificidad de cANCA con especificidad positiva de anticuerpos anti- PR3 en varias afecciones vasculíticas se muestra a continuación.<sup>5</sup>



Se analizaron conjuntos de muestras clínicas de pacientes con los ELISA ImmuLisa™ para anticuerpos PR3 y otros ELISA para anticuerpos MPO disponibles comercialmente. A continuación incluimos unos resultados que demuestran la incidencia en la población para este estudio:

ES

Grupo de pacientes	IMMCO			Otro ELISA PR3		
	n	n Inc	% Inc	n	n Inc	% Inc
Asociado a enfermedades						
Granulomatosis de Wegener	59	57	96,6%	59	56	94,9%
Glomerulonefritis	29	2	6,9%	29	2	6,9%
Positivo en ANCA sin diferenciar	11	0	0,0%	11	0	0,0%
Control de enfermedades						
Vasculitis no asociada a ANCA	24	1	4,2%			
Enfermedad intestinal	16	0	0,0%			
Lupus eritematoso sistémico	32	1	3,1%	32	0	0,0%
Artritis reumatoide	8	0	0,0%	8	0	0,0%
Otra enfermedad autoinmune	16	0	0,0%	16	0	0,0%
Sujetos sanos normales	80	0	0,0%	80	0	0,0%

## CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La utilidad de las pruebas ELISA ImmuLis<sup>TM</sup> Anticuerpos PR3 fue evaluada analizando especímenes de suero positivos característicos PR3 de sujetos que daban positivo en anticuerpos cANCA junto con controles de enfermedades y sueros humanos "normales". Estos especímenes también fueron analizados con equipos ELISA disponibles comercialmente. Los resultados se resumen a continuación.

A. Comparación de métodos: ELISA ImmuLis<sup>TM</sup> anticuerpos PR3 vs. otros ELISA anticuerpos PR3:

		Otro ELISA PR3		
		Positivo	Negativo	Total
<b>IMMCO</b>	Positivo	41	4	45
<b>PR3</b>	Negativo	2	58	60
<b>ELISA</b>	Total	43	62	105

Concordancia de porcentaje positivo: 95,3% (95% CI 82,9% a 99,2%)

Concordancia de porcentaje negativo: 93,5% (95% CI 83,5% a 97,9%)

Concordancia de porcentaje total: 94,3% (95% CI 87,5% a 97,7%)

B. Reactividad cruzada: Un total de 136 especímenes potencialmente reactivos cruzados de individuos con otras afecciones autoinmunes o que dieron positivo en otros autoanticuerpos fueron analizados en anticuerpos de PR3 utilizando el sistema ELISA ImmuLis<sup>TM</sup> Anticuerpos PR3.

Enfermedad	n	Positivo n
Glomerulonefritis	29	2
Positivo en pANCA sin diferenciar	11	0
Vasculitis no asociada a ANCA	24	1
Enfermedad intestinal inflamatoria	16	0
Lupus eritematoso sistémico	32	0
Artritis reumatoide	8	0
Otra enfermedad autoinmune	16	0
<b>Total</b>	<b>136</b>	<b>3 (2,2%)</b>

ES

## Precisión

La precisión fue analizada con 6 especímenes positivos seleccionados en todo el registro del ensayo. Se realizaron análisis de tres muestras duplicadas de cada espécimen durante tres días. La repetibilidad fue determinada con 6 muestras duplicadas de cada espécimen.

Muestra	Media (IU/ml)	Imprecisión total		Entre días		Dentro de serie (Repetibilidad)	
		SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%
1	8,7	0,809	9,3%	0,809	9,5%	0,758	8,4%
2	12,2	0,812	6,7%	0,974	8,0%	0,547	4,5%
3	27,2	2,211	8,1%	2,183	8,3%	1,218	4,2%
4	57,0	3,017	5,3%	2,872	5,0%	3,458	6,1%
5	112,4	4,211	3,7%	5,059	4,5%	2,821	2,5%
6	139,3	6,199	4,4%	6,654	4,8%	6,043	4,3%

## Reproducibilidad

Se realizaron seis muestras duplicadas en el registro negativo, ~10% por debajo del límite, ~20% por encima del límite y en el registro positivo moderado del ensayo para determinar la reproducibilidad cualitativa dentro del ensayo. Se analizaron tres muestras duplicadas de las mismas muestras en tres series para determinar la reproducibilidad dentro del ensayo. Los resultados de los análisis de estos especímenes dieron una concordancia cualitativa 100%.

## Linealidad

Se realizaron estudios utilizando series de dilución equidistantes de muestras positivas con valores de todo el ámbito del calibrador para determinar el ámbito lineal del ensayo. Se determinó que el ámbito lineal del ensayo era de 2,2 – 156 IU/ml. Los resultados se resumen a continuación. Sugerimos que las muestras que produzcan resultados superiores al calibrador mayor sean diluidas y analizadas de nuevo.

Muestra	Ámbito del análisis	Inclinación (95% CI)	Corte Y (95% CI)	R <sup>2</sup>	% Recuperación
1	3,7 a 77,2	1,07 (0,94 a 1,20)	-0,031 (-0,134 a 0,071)	0,986	89,8 a 111,9
2	3,8 a 158,2	1,012 (0,934 a 1,090)	-0,053 (-0,153 a 0,047)	0,994	88,9 a 102,2
3	3,4 a 43,4	1,023 (0,929 a 1,118)	0,009 (-0,045 a 0,063)	0,991	100 a 112,3

## Límite de detección

Se calculó que el límite de detección (LD) para anticuerpos PR3 utilizando este ensayo era de 2,2IU/ml en base a 60 duplicados de la base y 10 duplicados de 6 muestras de nivel bajo (NHS).

ES

### **Interferencia**

La interferencia fue estudiada mezclando sueros con niveles de anticuerpos PR3 conocidos con muestras de suero con interferencia potencial y estudiando la desviación respecto a los resultados esperados. No se demostró una interferencia importante para las siguientes sustancias en los niveles indicados: Hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342  $\mu\text{mol/L}$ ), y Factor Reumatoide (100 EU/ml).



# PR3-Antikörper-ELISA

## Proteinase 3 (PR3) Antikörper-ELISA

[IVD]

### PRODUKTBEILAGE

[REF] 5162      PR3-Antikörper-ELISA      96 Bestimmungen

### VERWENDUNGSZWECK

Ein enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) für die Erfassung und Halbquantifizierung von Antikörpern zu Proteinase 3 (PR3) im Humanserum, um in der Diagnose der antineutrophilen cytoplasmatischen Antikörper-(ANCA)-assoziierten Vaskulitiden, einschließlich Wegener-Granulomatose, in Verbindung mit anderen klinischen und Laborbefunden zu unterstützen.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Antineutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA) ist eine Gruppe von Antikörpern, die gegen Eiweißstoffe in den Körnchen von Neutrophilen gerichtet ist. Das Vorhandensein von antineutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) bei Patienten mit Vasculitis wurde zuerst 1982 durch Davies beobachtet.<sup>1</sup> Diese Antikörper können durch die indirekte Immunfluoreszenz auf äthanolfixierten Neutrophilen erkannt werden, indem sie ein charakteristisches cytoplasmatisches Färbemuster (cANCA) erzeugen, oder durch ELISA. cANCA-Reaktionen zielen auf Proteinase 3 (PR3) und in gewissem Grade auf weniger bedeutende Antigene wie z. B. Kathepsin G und Elastase ab. PR3 ist eine neutrale Serinproteinase, die in den azurophilen Körnchen der Neutrophilen lokalisiert ist mit einem MW von 28kD.<sup>2</sup> Antikörper gegen das PR3-Antigen dienen als ein Marker für die Wegener-Granulomatose (WG), ein systemisches nekrotisierendes Vasculitis.<sup>3</sup> WG ist eine systemische Entzündung der kleinen Blutgefäße gekennzeichnet durch nekrotisierende granulomatöse Entzündung des oberen und unteren Atemtrakts mit pauci-immuner nekrotisierender crescentischer Glomerulonephritis. Eine Frühdiagnose ist von höchster Bedeutung, da die Wegener Granulomatose häufig einen progressiven Verlauf schnell ansteigenden Ausmaßes und eine ernste Organbeteiligung aufweist. PR3-Antikörper haben klinische Wichtigkeit in der Diagnose und Überwachung der Erkrankungsaktivität, und der Voraussage von Rezidiven. Mehrere Studien haben eine direkte Korrelation zwischen PR3-Antikörperspiegeln und der aktiven Phase von WG ermittelt. Die Konzentration von Serum-PR3-Antikörpern steigt während Krankheitsexazerbationen drastisch an und Rezidive sind gewöhnlich von bedeutenden Anstiegen an Antikörperspiegeln begleitet.<sup>6,7</sup>

DE

## GRUNDSÄTZE DES VERFAHRENS

Der Test wird als ein Festphasenimmunoassay ausgeführt. Mikrovertiefungen werden mit gereinigtem PR3-Antigen beschichtet. Dem folgt ein Blockierungsschritt, um eine nichtspezifische Proteinbindung während des Prüfungsablaufs zu reduzieren. Kontrollen, Kalibratoren und Patientenserum werden in den mit Antigen beschichteten Vertiefungen inkubiert, um im Serum vorhandenen spezifischen Antikörpern zu ermöglichen, sich an das PR3-Antigen zu binden. Ungebundene Antikörper und andere Serumproteine werden durch Waschen der Mikrovertiefungen entfernt. Bestimmte Antikörper werden durch Hinzufügen von einem enzymmarkierten anti-menschlichen IgG-Konjugat zu den Mikrovertiefungen erkannt. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Spezifisches Enzymsubstrat (TMB) wird dann zu den Vertiefungen hinzugefügt und das Vorhandensein von Antikörpern wird durch einen Farbwechsel, erzeugt durch die Umwandlung des TMB-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt, erkannt. Die Reaktion wird gestoppt und die Intensität des Farbwechsels, der zur Konzentration an Antikörpern proportional ist, wird durch ein Spektralphotometer bei 450 nm abgelesen. Die Resultate werden in Internationalen Einheiten pro Milliliter (IU/ml) ausgedrückt und als positiv oder negativ berichtet.

## REAGENZIEN

Alle Reagenzien bei 2-8°C lagern. **Nicht einfrieren.** Die Reagenzien sind bis zum Ablaufdatum stabil, wenn sie wie angewiesen gelagert und behandelt werden.

Verwenden Sie das Reagenz nicht, wenn es nicht farblos oder wenn ein Präzipitat vorhanden ist. Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) gebracht werden.

Den Waschpuffer zu 1 Liter mit destilliertem oder vollentsalztem Wasser herstellen. Bei Lagerung mit 2-8°C bleibt der hergestellte Waschpuffer bis zum Kit-Ablaufdatum stabil.

Beschichtete Mikrovertiefungsstreifen sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Ungebrauchte Mikrovertiefungsstreifen sollten im Trocknungsmittel enthaltenden Beutel sorgfältig wieder versiegelt werden, um Kondensation zu verhindern, und bei 2-8°C gelagert werden.

## Vorsichtsmaßnahmen

Alle verwendeten menschlichen Komponenten sind auf HBsAg, HCV, HIV 1 und 2 und HTLV-I geprüft und durch erforderliche Tests anhand FDA als negativ festgestellt worden. Menschliche Blutderivate und Patientenproben sollten jedoch als potenziell ansteckend betrachtet werden. Gute Laborpraktiken bei der Lagerung, beim Abgeben und dem Entsorgen dieser Materialien befolgen.<sup>10</sup>

**Die Anweisungen wie sie in dieser Kit-Beilage angegeben sind sollten genau befolgt werden, um gültige Resultate sicherzustellen.** Tauschen Sie Kit-Komponenten nicht mit denjenigen von anderen Quellen aus. Gute Laborpraktiken befolgen, um mikrobiische und Querkontamination von Reagenzien beim Handling zu minimieren. Verwenden Sie die Kit-Komponenten nicht über das auf den Etiketten angegebene Ablaufdatum hinaus.

DE

## Bereitgestellte Materialien

ImmuLisa™ PR3 Antikörper-ELISA

[REF] 5162






Kits enthalten ausreichende Reagenzien, um 96 Bestimmungen auszuführen.

12 x 8	[MICROPLATE PR3]	Mikroplatte mit individuell abbrechbaren Mikrovertiefungen. Beschichtet mit gereinigtem PR3 Antigen. Gebrauchsfertig.
1 x 1.75 ml	[CONTROL + PR3]	Einsatzbereite <b>Positivkontrolle</b> (roter Verschlussdeckel) Enthält für PR3-Antikörper positives Humanserum. Der erwartete Konzentrationsbereich in IU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt.
1 x 1.75 ml	[CONTROL -]	Einsatzbereite <b>Negativkontrolle</b> (weißer Verschlussdeckel). Enthält Humanserum.
5 x 1.75 ml	[CALIBRATOR A PR3] [CALIBRATOR B PR3] [CALIBRATOR C PR3] [CALIBRATOR D PR3] [CALIBRATOR E PR3]	Einsatzbereiter Satz von 5 <b>Kalibratoren</b> . Kalibrator A (grüner Verschlussdeckel) 156 IU/ml, Kalibrator B (violetter Verschlussdeckel) 62,5 IU/ml, Kalibrator C (blauer Verschlussdeckel) 25 IU/ml, Kalibrator D (gelber Verschlussdeckel) 10 IU/ml und Kalibrator E (oranger Verschlussdeckel) 1 IU/ml. Abgeleitet aus Humanserum, das PR3-Antikörper enthält. Konzentrationen in IU/ml sind auf den Etiketten aufgedruckt.
1 x 15 ml	[IgG-CONJ HRP]	HRP-Ziege anti-menschliches <b>IgG-Konjugat</b> . Gebrauchsfertig. Farbcode rosa.
1 x 60 ml	[DIL]	Serumverdünnungsmittel. Gebrauchsfertig. Farbcode violett.
1 x 15 ml	[SUBSTRATE TMB]	TMB-Enzymsubstrat. Gebrauchsfertig. <b>Vor Licht schützen</b> .
1 x 15 ml	[STOP H2SO4]	Stopp-Lösung. Gebrauchsfertig.
2 x	[BUF WASH]	Pulver Waschpuffer. <b>Zu je einem Liter wiederherstellen</b> .
1 x		Protokollblätter

## Optionale Komponenten

1 x 60ml	[BUF WASH]	Flüssiger konzentrierter Waschpuffer. <b>Zu einem Liter herstellen</b> .
----------	------------	--

## Auf Etiketten verwendete Symbole

[LOT]	Chargen nummer
[REF]	Katalognummer
[IVD]	In vitro diagnostischer Gebrauch
	Verwenden bis
	Lagertemperatur
	Die Anleitung vor dem Gebrauch durchlesen
	Anzahl an Tests
	Hersteller

DE

## **Erforderliche Aber Nicht Bereitgestellte Materialien**

- Entsalztes oder destilliertes Wasser
- Quetschflasche, um verdünnten Waschpuffer aufzunehmen
- Pipetten für 5 µl bis 1000 µl
- Einwegpipettenspitzen
- Saubere Reagenzgläser 12 x 75 mm und Reagenzglasgestell
- Zeitmesser
- Saugfähige Papierhandtücher
- Mikroplattenleser, fähig Absorptionswerte bei 450 nm abzulesen. Wenn ein Zweiwellenlängen-Mikroplattenleser verfügbar ist, sollte der Referenzfilter bei 600-650 nm eingestellt werden
- Automatischer Mikroplattenwascher, fähig 200 µl zu dispensieren

## **PROBENENTNAHME UND HANDLING**

Bei diesem Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Grob hämolisierte, lipämisch oder mikrobisch verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinträchtigen und sollten nicht verwendet werden. Die Proben bei 2-8°C für nicht länger als eine Woche lagern. Bei längerer Lagerung sollten die Serumproben eingefroren werden. Es wird empfohlen, eingefrorene Proben innerhalb eines Jahres zu prüfen. Das wiederholte Einfrieren und Auftauen von Proben vermeiden.

## **VERFAHREN**

### **Verfahrenshinweise**

- Die Produktbeilage vor dem Beginn der Untersuchung sorgfältig durchlesen.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor dem Beginn der Untersuchung vorbereitet werden.
- Die Patientenproben und Testreagenzien auf Raumtemperatur bringen, bevor mit dem Prüfverfahren begonnen wird. Es wird empfohlen, dass Reagenzien vor dem Gebrauch auf dem Labortisch außerhalb des Kastens für 30 Minuten verbleiben. Alle ungebrauchten Proben und Reagenzien sofort nach dem Gebrauch wieder in den Kühlschrank stellen.
- Erforderliche Mikrovertiefungsstreifen aus dem Beutel entnehmen und den Beutel sorgfältig wieder versiegeln, um Kondensation in den ungebrauchten Vertiefungen zu verhindern. Den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank stellen.
- ***Eine gute Waschtechnik ist entscheidend.*** Bei manuellem Waschen wird adäquates Waschen dadurch erreicht, dass ein kräftiger Waschpufferstrom mit einer breitspitzigen Spritzflasche über die komplette Mikroplatte gerichtet wird. ***Ein automatisierter Mikroplattenwascher wird empfohlen.***
- Eine Mehrkanalpipette verwenden, die 8 oder 12 Vertiefungen gleichzeitig versorgen kann. Das beschleunigt den Prozess und ermöglicht einheitlichere Inkubationszeiten.

DE

- Bei allen Schritten ist die sorgfältige Kontrolle der Zeitmessung wichtig. Der Start aller Inkubationszeiten beginnt mit der Beendigung der Reagenzzugabe.
- Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte bei der gleichen Geschwindigkeit und in der gleichen Reihenfolge ausgeführt werden.

### Prüfmethode

**Schritt 1** Alle Reagenzien und Proben bei Raumtemperatur ins Gleichgewicht bringen.

**Schritt 2** Protokollblatt kennzeichnen, um die Probenanordnung in den Vertiefungen anzuzeigen. Es ist gute Laborpraktik, mit einer zweifachen Ausführung der Proben zu arbeiten.

**Schritt 3** Für eine **qualitative Bestimmung** nur den Kalibrator D (*Phiole mit gelbem Verschlussdeckel*) verwenden

**oder**

für eine **semiquantitative Bestimmung** die Kalibratoren A bis E, wie im nachfolgenden Proben-Layout verwenden.

	Qualitativ			Semiquantitativ			
A	Leerprobe	S5	usw.	A	Leerprobe	S1	usw.
B	-Kontrolle	S6		B	-Kontrolle	S2	
C	+ Kontrolle	S7		C	+ Kontrolle	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3	1	2	3	

**Schritt 4** **1:101** Verdünnung der Patientenproben durch Mischen von **5 µl** der Patientenseren mit **500ul** des Serumverdünnungsmittels vorbereiten.

**Schritt 5** Die erforderlichen Mikrovertiefungen aus dem Beutel entnehmen und ungebrauchte Streifen im versiegelten Beutel wieder zurück in den Kühlschrank stellen. Die Mikrovertiefungen sicher im extra bereitgestellten Halter platzieren.

**Schritt 6** Mit der Pipette **100 µl** von einsatzbereiten Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrollen und verdünnte Patientenproben (**1:101**) gemäß dem Protokollblatt in die zugehörigen Mikrovertiefungen geben.

**Hinweis:** Eine Vertiefung, die **100 µl** an Serumverdünnungsmittel enthält, als eine Reagenz-Leerprobe einschließen. Den ELISA-Leser gegen die Reagenz-Leerprobe nullen.

**Schritt 7** **30 Minuten** ( $\pm 5$  Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.

**Schritt 8** **4x** mit dem Waschpuffer waschen. Um manuell zu waschen, füllen Sie jede Mikrovertiefung mit dem wiederhergestellten Waschpuffer. Die Flüssigkeit durch Umkehren und Ausklopfen des Inhalts jeder Vertiefung oder durch Ansaugen der Flüssigkeit aus jeder

DE

Vertiefung entsorgen. Die Streifen umkehren und die Vertiefungen kräftig auf saugfähigen Papierhandtüchern ausklopfen, um am Ende des letzten Waschens zu blotten. Bei einer automatischen Wascheinrichtung programmieren Sie diese gemäß den Anweisungen des Herstellers.

- Schritt 9** Mit der Pipette **100 µl** des Konjugats in die Mikrovertiefungen geben.
- Schritt 10** **30 Minuten** (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.
- Schritt 11** Alle Mikrovertiefungen wie in Schritt 8 waschen.
- Schritt 12** Mit der Pipette **100 µl** des Enzymsubstrats in jede Mikrovertiefung in der gleichen Reihenfolge und Zeitabfolge wie für das Konjugat zugeben.
- Schritt 13** **30 Minuten** (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.
- Schritt 14** Mit der Pipette **100 µl** der Stopp-Lösung in jede Mikrovertiefung unter Verwendung der gleichen Reihenfolge und Zeitabfolge wie für die Zugabe des Enzymsubstrats zugeben. Die Absorptionswerte innerhalb von **30 Minuten** nach Hinzufügen der Stopp-Lösung ablesen.
- Schritt 15** Die Absorbtion jeder Mikrovertiefung bei **450 nm** unter Verwendung eines Ein- oder bei 450/630nm unter Verwendung eines Zweiwellenlängen-Mikroplattenlesers gegen die auf Null-Absorption gesetzte Reagenz-Leerprobe ablesen.

### Qualitätskontrolle

Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrollen und eine Reagenz-Leerprobe müssen mit jeder Prüfung eingesetzt werden, um die Vollständigkeit und Genauigkeit des Tests zu verifizieren. Die Absorptionsanzeige der Reagenz-Leerprobe sollte <0.3 sein. Der Kalibrator A sollte eine Absorptionsanzeige von nicht weniger als 1.0 haben, andernfalls muss der Test wiederholt werden. Die Negativkontrolle muss <10 IU/ml sein. Wenn der Test als zweifache Ausführung durchgeführt wird, sollte der Mittelwert der zwei Messdaten aufgenommen werden, um IU/ml zu bestimmen. Beim Durchführen von Qualitativen Bestimmungen muss die optische Dichte von Kalibrator D größer sein als die der Negativkontrolle und kleiner als die Absorption der Positivkontrolle. Für semiquantitative Bestimmungen muss die Positivkontrolle Werte im auf der Phiole angegebenen Bereich ergeben.

## RESULTATE

### Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können durch zwei Methoden bestimmt werden:

#### 1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

$$\frac{\text{Abs. des Prüfmusters}}{\text{Abs. von Kalibrator D}} \times \text{IU/ml von Kalibrator D} = \text{IU/ml Testprobe}$$

DE

Es wird empfohlen, dass qualitative Resultate als "positiv" oder "negativ" berichtet werden. Probenresultate größer oder gleich Kalibrator D werden als positiv angesehen.

## 2. SEMIQUANTITATIVE BESTIMMUNG

Die Absorption von Kalibrator A bis E gegen ihre jeweiligen Konzentrationen auf dem linear-logarithmischen Millimeterpapier aufnehmen. Die Konzentrationen in IU/ml auf der X-Achse gegenüber der Absorption auf der Y-Achse aufnehmen und eine Punkt-Zu-Punkt-Kurvenanpassung zeichnen. Die Konzentrationen der Patientenproben von der Kurve gemäß den entsprechenden Absorptionswerten bestimmen. Alternativ kann eine Vier-Parameter-Kurve verwendet werden, um die Standardkurve aufzunehmen.

Es wird empfohlen, dass semiquantitative Resultate als "positiv", "negativ", oder "unbestimmt" mit IU/ml Einheitswerten berichtet werden. Unbestimmte/Grenz-Resultate sollten erneut getestet und zusammen mit anderen Labormethoden, wie z. B. Prüfungen für die Erfassung von ANCA durch IFA bewertet werden.

### Ausdeutung

Die Ausdeutungswerte wurden durch Prüfen von 136 normalen Blutspendern und nichtautoimmuner Vaskulitiden-Krankheitsbekämpfungsproben bestimmt. Der Mittelwert des normalen Probanden plus 3 SD wurde als der Prüfungs-Cutoff ermittelt und einem Wert von 10 IU/ml, abgeleitet vom internationalen Standard für PR3, zugeordnet. PR3-Krankheitsbekämpfungen wurden in die Cutoff-Bestimmung der PR3-Prüfung nicht aufgenommen. IMMCO empfiehlt den Gebrauch des nachstehenden Referenzbereichs. Jedes Labor sollte Prüfungswerte für seine eigenen Bedingungen validieren.

<b>anti-PR3 Ab Wert</b>	<b>Ausdeutung</b>
<10 IU/ml	Negativ
10-12,5 IU/ml	Unbestimmt (Grenzlinie)
> 12,5 IU/ml	Positiv

### Kalibrator

Die einsatzbereiten Kalibratoren sind enthalten, um Semiquantifizierung zu ermöglichen, und müssen mit jedem Durchgang verwendet werden. Patientenproben, die hohe Antikörperspiegel enthalten, können größere Absorptionswerte ergeben als die von Kalibrator A. Um genaue semiquantitative Werte festzulegen, sollte man solche Proben weiter verdünnen, damit sie sich innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve befinden, wenn erneut getestet wird. Um IU/ml-Werte zu bestimmen, multiplizieren Sie die durch den Verdünnungsfaktor erhaltenen Einheiten.

## BEGRENZUNGEN DES VERFAHRENS

Die Prüfung sollte nicht bei äußerst hämolisierten, mikrobisch verunreinigten oder lipämischen Proben ausgeführt werden. Diese Methode sollte nur zur Prüfung von Humanserum-Proben verwendet werden. Die erhaltenen Resultate

DE

dienen nur als eine Hilfe bei der Diagnose. Für sich alleine genommen, sollten diese Resultate nicht als diagnostisch interpretiert werden. Diese Prüfung wurde nicht an einer pädiatrischen Population validiert. PR3-Krankheitsbekämpfungen wurden in die Cutoff-Bestimmung der PR3-Prüfung nicht aufgenommen.

## ERWARTETE WERTE

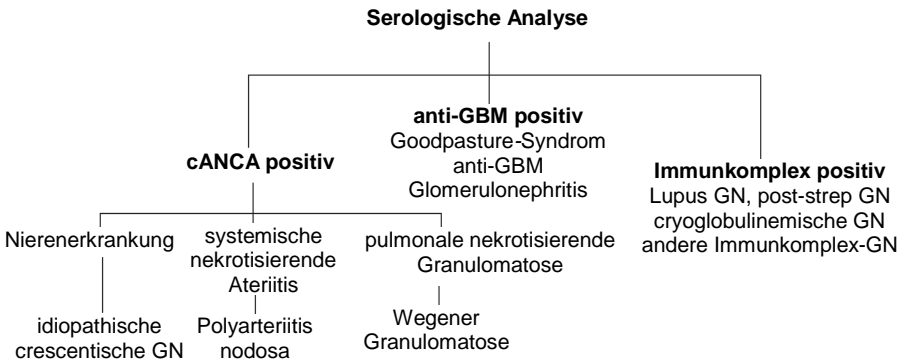
Die erwarteten Werte bei einer normalen Population sind negativ. Jedoch können 4% von anscheinend gesunden asymptomatischen Personen ein positives Ergebnis bei PR3-Antikörpern aufweisen. Im Gegensatz dazu können einige Patienten mit aktiver Erkrankung nicht nachweisbare Spiegel dieser Antikörper aufweisen. Immunsuppressive Heilverfahren, Einleitung oder Abänderung der Behandlung sollten nicht nur basierend auf einem positiven PR3-Antikörper-Resultat begonnen werden, sondern eher aufgrund sorgfältiger klinischer Beobachtungen.

Die folgende Tabelle zeichnet die Häufigkeit von PR3- und MPO-spezifischen ANCA in Serien von 112 ANCA-assoziierten Vaskulitiden-Patienten auf.<sup>11</sup> Die Inzidenz von PR3-Antikörpern ändert sich abhängig von der Patientenpopulation. Eine Zusammenstellung der Inzidenz, die der Literatur entnommen wurde ist nachfolgend aufgeführt.

Die Inzidenz von anti-PR3 und anti-MPO bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden

Antikörper-Assoziation	Wegener Granulomatose	Mikroskopisch Polyangiitis	Churg-Strauss Syndrom
ANCA positiv durch IFA	78%	59%	67%
anti-PR3 positiv	90%	0%	10%
anti-MPO positiv	0%	62%	17%

Die klinische Nützlichkeit der ANCA-Erfassung mit der cANCA-Spezifität mit positiver Anti-PR3-Antikörper-Spezifität bei verschiedenen vaskulitischen Erkrankungen ist unten dargestellt.<sup>5</sup>





DE

Sätze klinischer Proben wurden auf Immulisa™ PR3-Antikörper-ELISA und ein anderes handelsübliches PR3-Antikörper-ELISA geprüft. Resultate, welche die Inzidenz in den Populationen für diese Studie demonstrieren, sind nachstehend aufgeführt.

Patientengruppe	IMMCO			And. PR3 Ab ELISA		
	n	n Pos	% Pos	n	n Pos	% Pos
Zugehörige Erkrankung						
Wegener-Granulomatose	59	57	96,6 %	59	56	94,9 %
Glomerulonephritis	29	2	6,9 %	29	2	6,9 %
Undifferenziert ANCA positiv	11	0	0,0 %	11	0	0,0 %
Krankheitsbekämpfung						
Nicht ANCA-assoziierte Vasculitis	24	1	4,2 %			
Entzündliche Darmerkrankung	16	0	0,0 %			
System. Lupus erythematodes	32	1	3,1 %	32	0	0,0 %
Rheumatoidarthrit	8	0	0,0 %	8	0	0,0 %
Andere Autoimmunerkrankung	16	0	0,0 %	16	0	0,0 %
Gesunde Normale	80	0	0,0 %	80	0	0,0 %

## LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Die Nützlichkeit des Immulisa™ PR3 Antikörper-ELISA wurde durch Prüfen gut charakterisierter PR3-Antikörper Positivserumproben neben Krankheitsbekämpfungen und "normalen" Humanseren bewertet. Diese Proben wurden auch bei handelsüblichen ELISA-Kits geprüft. Die Resultate sind nachstehend zusammengefasst.

A. Methodenvergleich: Immulisa™ PR3-Antikörper-ELISA gegenüber anderen PR3-Antikörper-ELISA.

		Andere PR3 ELISA		
		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	41	4	45
PR3	Negativ	2	58	60
ELISA	Gesamt	43	62	105

Positive Prozent-Übereinstimmung: 95,3% (95% CI 82,9% bis 99,2%)  
Negative Prozent-Übereinstimmung: 93,5% (95% CI 83,5% bis 97,9%)  
Gesamte Prozent-Übereinstimmung: 94,3% (95% CI 87,5% bis 97,7%)

B. Insgesamt 136 potenziell kreuzreaktive Proben von Personen mit anderen autoimmunen Störungen oder positiv für andere Autoantikörper wurden auf PR3-Antikörper unter Verwendung des Immulisa™ PR3-Antikörper-ELISA geprüft.

Zustand	n	Positiv n
Glomerulonephritis	29	2
Undifferenziert pANCA positiv	11	0
Nicht mit ANCA verbundene Vasculitis	24	1
Entzündliche Darmerkrankung	16	0
Systemischer Lupus erythematodes	32	0
Rheumatoidarthritis	8	0
Andere Autoimmunerkrankung	16	0
<b>Gesamt</b>	<b>136</b>	<b>3 (2,2%)</b>

### Präzision

Die Präzision wurde mit 6 aus dem gesamten Bereich der Prüfung ausgewählten positiven Proben geprüft. Prüfungsabläufe von drei Replikaten jeder Probe wurden an drei Tagen durchgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde mit 6 Replikaten jeder Probe bestimmt.

Probe	Mittelwert IU/ml	Gesamtungenauigkeit		Zwischen Tagen		Innerhalb des Ablaufs (Wiederholbarkeit)	
		SD IU/ml	CV %	SD IU/ml	CV %	SD IU/ml	CV %
1	8,7	0,809	9,3%	0,809	9,5%	0,758	8,4%
2	12,2	0,812	6,7%	0,974	8,0%	0,547	4,5%
3	27,2	2,211	8,1%	2,183	8,3%	1,218	4,2%
4	57,0	3,017	5,3%	2,872	5,0%	3,458	6,1%
5	112,4	4,211	3,7%	5,059	4,5%	2,821	2,5%
6	139,3	6,199	4,4%	6,654	4,8%	6,043	4,3%

### Reproduzierbarkeit

Sechs Replikate von Proben im negativen Bereich, ~10 % unter dem Cutoff, ~20 % über dem Cutoff und im mittelmäßigen positiven Bereich der Prüfung wurden ausgeführt, um qualitative Intra-Assay-Reproduzierbarkeit zu bestimmen. Drei Replikate der gleichen Proben wurden in drei Durchgängen geprüft, um die Inter-Assay-Reproduzierbarkeit zu bestimmen. Resultate der Prüfung für diese Proben erzeugten qualitative Übereinstimmung von 100 %.

### Linearität

Studien wurden unter Verwendung von abstandsgleichen Verdünnungsreihen von positiven Proben mit Werten überall im Bereich des Kalibrators ausgeführt, um den linearen Bereich der Prüfung zu bestimmen. Der lineare Bereich der Prüfung wurde bestimmt mit 2,2 - 156 IU/ml. Die Resultate sind nachstehend zusammengefasst. Es wird empfohlen, dass Proben, die Resultate größer als der obere Kalibrator ergeben, verdünnt und erneut getestet werden.

## DE

Probe	Prüfbereich	Anstieg (95 % CI)	Y-Achsenabschnitt (95 % CI)	R <sup>2</sup>	% Rückgewinnung
1	3,7 bis 77,2	1,07 (0,94 bis 1,20)	-0,031 (-0,134 bis 0,071)	0,986	89,8 bis 111,9
2	3,8 bis 158,2	1,012 (0,934 bis 1,090)	-0,053 (-0,153 bis 0,047)	0,994	88,9 bis 102,2
3	3,4 bis 43,4	1,023 (0,929 bis 1,118)	0,009 (-0,045 bis 0,063)	0,991	100 bis 112,3

### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (LoD) für PR3-Antikörper unter Verwendung dieser Prüfung wurde bestimmt zu 2,2 IU/ml basierend auf 60 Replikaten der Leerprobe und 10 Replikaten von je 6 Proben auf niedriger Stufe (NHS).

### Interferenz

Interferenz wurde durch Mischen von Seren mit bekannten PR3-Antikörperspiegeln mit sich potenziell gegenseitig beeinflussenden Serumproben und der Abweichung von erwarteten Resultaten studiert. Es wurde keine bedeutende Interferenz für die folgenden Substanzen bei den angezeigten Spiegeln demonstriert: Hämoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 µmol/L) und Rheumafaktor (100 EU/ml).

# PR3 Anticorps ELISA

## Protéinase 3 (PR3) Anticorps ELISA

[IVD]

### ENCART PRODUIT

[REF] 5162 PR3 Anticorps ELISA

96 Déterminations

### UTILISATION VISEE

Une analyse immunoabsorbante par liaison enzymique (ELISA) pour la détection et la semi-quantification des anticorps au protéinase 3 (PR3) dans le sérum humain afin d'aider au diagnostic de l'anticorps anti-neutrophile cytoplasmique (AANC) associé à l'angéite dont la granulomatosis de Wegener en conjonction avec d'autres résultats de laboratoire et cliniques.

### RESUME ET EXPLICATION

Les anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques (AANC) sont un groupe d'anticorps dirigés contre les protéines dans les grains de neutrophile. La présence d'anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques (AANC) chez les patients atteints d'angéite a été observée pour la première fois par Davies en 1982<sup>1</sup>. Ces anticorps peuvent être détectés par une immunofluorescence indirecte avec des neutrophiles fixés à l'éthanol qui produit un modèle de coloration cytoplasmique caractéristique (cAANC) ou par la réaction cANCA ELISA qui cible la Protéinase 3 (PR3) ainsi que dans une moindre mesure des antigènes mineurs tels que le cathepsine G et l'élastase. PR3 est une protéinase sérine neutre localisée dans les grains azurophiles des neutrophiles avec un MW de 28kD<sup>2</sup>. Des anticorps contre l'antigène PR3 servent de marqueur pour la Granulomatosis de Wegener (GW), une angéite necrotise systémique<sup>3</sup>. La GW est une angéite systémique des petits vaisseaux caractérisée par une inflammation granulomateuse necrotique du tractus respiratoire supérieur et inférieur avec une glomérulonéphrite pauci-immune croissante. Un diagnostic rapide est crucial dans la mesure où la granulomatosis de Wegner a souvent une trajectoire progressive en augmentant rapidement le degré et la sévérité de l'implication des organes. Les anticorps PR3 ont une importance clinique dans le diagnostic et le suivi de l'activité de la maladie et dans la prévision des rechutes. Plusieurs études ont démontré une corrélation directe entre les niveaux de l'anticorps PR3 et la phase active de la GW. La concentration des anticorps PR3 dans le sérum augmente de façon significative durant les exacerbations de la maladie et les rechutes sont généralement accompagnés d'une forte hausse dans les niveaux d'anticorps<sup>6,7</sup>.

### PRINCIPE DE LA PROCEDURE

Le test est réalisé en tant que immunoessai en phase solide. Les micro-récepteurs sont couverts d'antigènes purifiés PR3 suivi d'une mesure de blocage

FR

pour réduire l'union non-spécifique durant la phase d'essai. Les contrôles, les calibreurs et le sérum patient sont incubés dans les récipients couverts d'antigènes pour permettre à des anticorps spécifiques présents dans le sérum de se relier à l'antigène PR3. Les anticorps non-reliés et les autres protéines de sérum sont enlevés en lavant les micro-récipients. Les anticorps reliés sont détectés en ajoutant un conjugué d'enzyme étiquetée associée anti-humain IgG aux micro-récipients. Le conjugué non-relié est enlevé par lavage. Un substrat d'enzyme spécifique (TMB) est alors ajouté aux récipients et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur produit par la conversion du substrat TMB en un produit à réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est mesurée par un spectrophotomètre à 450 nm. Les résultats sont donnés en International Units par millilitre (UI/ml) et signalés comme positifs ou négatifs.

## LES REACTIFS

Stockez tous les réactifs entre 2 et 8°C. **A ne pas congeler.** Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration lorsqu'ils sont stockés et manipulés comme indiqué.

A ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20-25°C) avant utilisation.

Réhydratez le tampon à eau jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée ou déminéralisée. Lorsque stocké entre 2 et 8°C, le tampon à eau réhydraté est stable jusqu'à la date d'expiration du kit.

Les lamelles enduites des micro-récipients sont pour un usage unique. Les lamelles de micro-récipients non utilisées doivent être réapposés avec précaution dans le sachet contenant les déshydratants pour empêcher une condensation et stockés entre 2 et 8°C.

## Précautions

Tous les composants de dérivée humaine utilisés ont été testés pour le HBsAg, HCV, HIV-1 et 2 et le HTLV-1 et les résultats ont été négatifs en accord avec les tests obligatoires de la FDA. Cependant, les dérivés de sang humain et les spécimens patient doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Suivez de bonnes pratiques de laboratoire pour le stockage, la délivrance et l'écoulement de ces matériaux<sup>10</sup>.

***Les instructions doivent être suivies à la lettre telles qu'elles apparaissent dans cet encart d'utilisation afin d'assurer des résultats valides.*** N'échangez pas les composants de l'encart avec ceux d'autres sources. Suivez de bonnes pratiques de laboratoire afin de minimiser la contamination microbienne et croisée des réactifs lors de la manipulation. N'utilisez pas les composants de l'encart après la date d'expiration indiquée sur les étiquettes.

FR

## Les matériaux fournis

ImmuLISA™ PR3 Anticorps ELISA

[REF] 5162






Les kits contiennent assez de réactifs pour réaliser 96 déterminations.

12 x 8	[MICROPLATE PR3]	Microplaque avec des micro-réceptifs individuels séparés. Enduite avec des antigènes purifiés PR3. Prête à l'emploi.
1 x 1.75 ml	[CONTROL+ PR3]	<b>Contrôle positif</b> (capsule rouge) prêt à l'emploi. Contient du sérum humain positif aux anticorps PR3. L'éventail de concentration espéré en IU/ML est imprimé sur l'étiquette.
1 x 1.75 ml	[CONTROL-]	<b>Contrôle négatif</b> (capsule blanche) prêt à l'emploi. Contient du sérum humain.
5 x 1.75 ml	[CALIBRATOR A PR3] [CALIBRATOR B PR3] [CALIBRATOR C PR3] [CALIBRATOR D PR3] [CALIBRATOR E PR3]	Série de <b>5 Calibreurs</b> prêts à l'emploi. Calibreur A (capsule verte) 156 IU/ml, Calibreur B (capsule violette) 62,5 IU/ml, Calibreur C (capsule bleu) 25 IU/ml, Calibreur D (capsule jaune) 10 IU/ml, et Calibreur E (capsule orange) 1 IU/ml. Dérivées de sérum humain contenant des anticorps PR3. Les concentrations en IU/ml sont imprimées sur les étiquettes.
1 x 15 ml	[IgG-CONJ HRP]	<b>Conjugué IgG</b> de HRP goat antihumain. Prêt à l'emploi. Code couleur rose.
1 x 60 ml	[DIL]	Diluant sérum. Prêt à l'emploi. Code couleur violet.
1 x 15 ml	[SUBSTRATE TMB]	Substrat d'enzyme TMB. Prêt à l'emploi. <b>A protéger de la lumière.</b>
1 x 15 ml	[STOP H2SO4]	Solution stop. Prête à l'emploi.
2 x	[BUF WASH]	Tampon de lavage en poudre. <b>Réhydratez jusqu'à un litre chacun.</b>
1 x		Feuilles de protocole

## Composants optionnels

1 x 60ml	[BUF WASH]	Tampon de lavage en liquide concentré. <b>Réhydratez jusqu'à un litre.</b>
----------	------------	--

## Symboles utilisés sur les étiquettes.

[LOT]	Numéro de Lot
[REF]	Numéro catalogue
[IVD]	Utilisation à diagnostic in vitro
	A utiliser avant le:
	Température de stockage
	Lire les instructions avant utilisation
	Nombre de tests
	Fabricant

## Matériaux nécessaires mais non fournis

- Eau déminéralisée ou distillée
- Bouteille comprimée pour tenir le tampon de lavage
- Pipettes capables de distribuer de 5 µl à 1000 µl
- Embouts de pipettes jetables
- Des tubes test 12 x 75 mm propres et un casier pour tubes test
- Un compte-minutes
- Des serviettes en papier absorbantes
- Un lecteur de microplaques capable de lire des valeurs d'absorbance à 450 nm. Si un lecteur de microplaques à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm
- Un laveur de microplaques automatique capable de distribuer 200 µl

## COLLECTE ET MANIUPULATION DES SPECIMENS

Seuls les spécimens de sérum doivent être utilisés lors de cette procédure. Des spécimens largement contaminés d'hématolizes, de lipémiques et de microbes peuvent interférer avec la réalisation du test et ne doivent pas être utilisés. Stockez les spécimens entre 2° et 8°C pour une période n'excédant pas une semaine. Pour un stockage plus long, les spécimens de sérum doivent être congelés. Il est recommandé de tester les spécimens congelés dans un délai d'un an. Evitez la congélation répétée et le dégel des échantillons.

## PROCEDURE

### Notes concernant la procédure

- Lire avec attention l'encart du produit avant de commencer l'analyse.
- Toutes les dilutions avec les échantillons patient doivent être préparés avant le début de l'analyse.
- Laissez les spécimens patient et les réactifs test s'équilibrer à la température ambiante avant de commencer avec la procédure test. Il est suggéré de laisser les réactifs sur la banquette en dehors de la boîte pendant 30 minutes avant utilisation. Remplacez tous les spécimens et réactifs non utilisés dans le réfrigérateur immédiatement après utilisation.
- Enlevez les lamelles obligatoires des micro-récipients du sachet et recollez avec précaution le sachet pour éviter la condensation des puits non utilisés. Remplacez le sachet dans le réfrigérateur immédiatement.
- ***Une bonne technique de lavage est cruciale.*** Si le lavage est effectué manuellement, un lavage adéquat est réalisé en dirigeant un flot fort de tampon de lavage accompagné d'une bouteille de lavage avec un embout large sur l'intégralité de la microplaque. ***Une laveuse automatique de microplaques est recommandée.***
- Utilisez une pipette multicanaux capable de distribuer 8 à 12 récipients en même temps. Cela accélère le processus et génère des temps d'incubation plus uniformes.

FR

- Pour toutes les étapes, un contrôle minutieux du minutage est important. Le début de toute période d'incubation commence avec la réalisation de l'addition de réactif.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit être réalisé au même rythme et dans le même ordre.

### Méthode de test

**Etape 1** Laissez tous les réactifs et tous les spécimens s'adapter à la température ambiante.

**Etape 2** Etiquetez les feuilles de protocole pour indiquer l'emplacement des échantillons dans les récipients. Une bonne pratique de laboratoire est de réaliser les échantillons en double.

**Etape 3** Pour **une détermination qualitative** utilisez uniquement le Calibreur D (fiole avec la capsule jaune).

**ou**

Pour une **détermination semi-quantitative** utilisez les Calibreurs A jusqu'à E tels que représentés dans la présentation échantillon ci-dessous.

	Qualitative			Semi-quantitative			
A	Vierge	S5	Etc.	A	Vierge	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

**Etape 4** Préparez une dilution **1:101** des échantillons patient en mélangeant **5 µl** du sérum patient avec **500µl** de diluant sérum.

**Etape 5** Enlevez les micro-récipients requis du sachet et replacez les lamelles non utilisées dans le sachet refermé dans le réfrigérateur. Placez fermement les micro-récipients dans le support supplémentaire fournis.

**Etape 6** Pipetez **100 µl** de calibreurs prêts à l'emploi, de contrôles positifs et négatifs et d'échantillon patient dilués (**1:101**) aux micro-récipients appropriés selon la feuille de protocole.

**A noter :** inclure un récipient contenant **100 µl** de sérum diluant en tant que réactif vierge. Mettez sur zéro le lecteur ELISA contre le réactif vierge.

**Etape 7** Incubez 30 minutes ( $\pm 5$  min) à température ambiante.

**Etape 8** Laver **4x** avec le tampon à lavage. Pour un lavage manuel, remplir chaque micro-récipient avec du tampon à lavage reconstitué. Débarrassez-vous du fluide en inversant et en tapotant le contenu de chaque récipient ou bien en aspirant le liquide de chaque récipient. Afin de buvarder à la fin du dernier lavage, inversez les lamelles et



FR

tapotez vigoureusement les récipients sur des serviettes de papier absorbantes. Pour les laveuses automatiques, programmez la laveuse selon les instructions du fabricant.

**Etape 9** Pipetez **100 µl** de conjugué dans les micro-récipients.

**Etape 10** Incubez **30 minutes** ( $\pm 5$  min) à température ambiante.

**Etape 11** Lavez tous les micro-récipients comme lors de l'étape 8.

**Etape 12** Pipetez **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque micro-récipient dans le même ordre et selon le même minutage que pour le conjugué.

**Etape 13** Incubez 30 minutes ( $\pm 5$  min) à température ambiante.

**Etape 14** Pipetez **100 µl** de solution stop dans chaque micro-récipient en utilisant le même ordre et le même minutage que pour l'addition de substrat d'enzyme. Lisez les valeurs d'absorbance dans un délai de **30 minutes** à partir du moment où la solution stop a été ajoutée.

**Etape 15** Lisez l'absorbance de chaque micro-récipient pour **450 nm** en utilisant un lecteur de microplaque simple ou à double longueur d'onde pour 450/630nm contre le réactif vierge placé sur zéro absorbance.

### Contrôle qualité

Les calibreurs, les contrôles positif et négatif et un réactif vierge doivent être utilisés pour chaque analyse afin de vérifier l'intégrité et la précision du test. La lecture d'absorbance du réactif vierge doit être  $<0,3$ . Le calibreur A doit avoir une lecture d'absorbance supérieur à 1,0 sinon le test devra être répété. Le contrôle négatif doit être  $<10$  IU/ml. Si le test est lancé en double, la moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer IU/ml. Lors de la réalisation de déterminations qualitatives, la densité optique du Calibreur D doit être supérieure à celle du contrôle négatif et inférieure à l'absorbance du contrôle positif. Pour les déterminations semi-quantitatives, le contrôle positif doit donner des valeurs comprises dans l'éventail mentionné sur la fiole.

## RESULTATS

### Calculs

La concentration des échantillons patients peut être déterminée par l'une des deux méthodes suivantes :

#### 1. DÉTERMINATION QUALITATIVE

Abs. Echantillon test  
..... X IU/ml du Calibreur D = IU/ml Echantillon test  
Abs. du Calibreur D

Il est recommandé que les résultats qualitatifs soient signalés comme « positif » ou « négatif ». Les résultats d'échantillon supérieurs ou égaux au Calibreur D sont considérés comme positifs.

## 2. DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Relevez l'absorbance du Calibreur A jusqu'au Calibreur E par rapport à leurs concentrations respectives sur un papier graphique à logarithme linéaire. Relevez les concentrations en IU/ml sur la base X par rapport à l'absorbance sur la base Y et tracez une courbe point par point. Déterminez les concentrations des échantillons patient en se basant sur la courbe en accord avec les valeurs d'absorbance correspondantes. Alternativement, une courbe à quatre paramètres peut être utilisée pour tracer la courbe standard.

Il est recommandé que les résultats semi-quantitatifs soient signalés comme « positif », « négatif » ou « indéterminé » avec les valeurs unitaires IU/ml. Les résultats indéterminés/limite doivent être testés de nouveau et évalués selon d'autres méthodes de laboratoire, telles que les analyse de détection des AANC par IFA.

### Interprétation

Les valeurs d'interprétation ont été déterminées en testant 136 donneurs de sang normaux et spécimens de contrôle de l'angéite non-auto-immune. La moyenne des sujets normaux plus 3 SD a été établie comme limite supérieure de l'analyse et une valeur de 10 IU/ml lui a été assignée à partir du standard international CDC pour les PR3. Les contrôles maladie MPO n'ont pas été pris en compte lors de la détermination de l'analyse PR3. L'IMMCO suggère l'utilisation de l'éventail de référence ci-dessous. Chaque laboratoire devrait valider les valeurs d'analyse pour leurs propres conditions.

<b>valeur anti-PR3 Ab</b>	<b>Interprétation</b>
<10 IU/ml	Négatif
10-12,5 IU/ml	Indéterminé (Limite)
>12,5 IU/ml	Positif

### Calibreur

Les calibreurs prêts-à-l'emploi sont fournis pour permettre la semi-quantitation et doivent être utilisés avec chaque exécution. Les échantillons patient contenant des niveaux d'anticorps élevés peuvent donner des valeurs d'absorbances supérieures à celles du Calibreur A. Afin de déterminer des valeurs semi-quantitatives exactes, de tels spécimens doivent être dilués encore plus afin de rentrer dans l'éventail de la courbe du calibreur lorsqu'ils seront testés de nouveau. Pour déterminer les valeurs IU/ml, multipliez les unités obtenues par le facteur de dilution.

## LIMITES DE LA PROCEDURE

L'analyse ne doit pas être réalisée sur des échantillons extrêmement hémolisés, contaminés de microbes ou lipémiques. Cette méthode ne doit être utilisée que pour le test de sérum humain. Les résultats obtenus ne servent que d'aide au diagnostic. Pris de manière indépendante, les résultats ne doivent pas être interprétés comme un diagnostic. Cette analyse n'a pas été validée auprès d'une population pédiatrique. Les contrôles maladie MPO n'ont pas été pris en compte dans la détermination de la limite supérieure pour l'analyse PR3.

**VALEURS ATTENDUES**

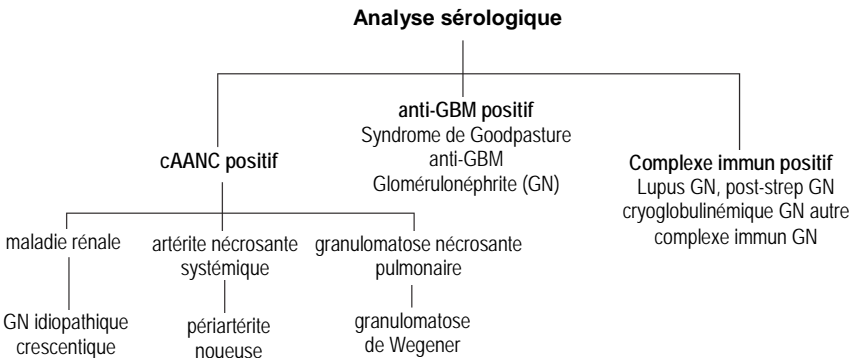
Les valeurs attendues chez une population normale sont négatives. Néanmoins, 4% des individus apparemment en bonne santé et asymptomatique peuvent tester positif pour les anticorps PR3. Par contraste, certains patients avec des maladies actives peuvent avoir des niveaux indétectables de ces anticorps. Une thérapie immunosuppressive, l'initiation ou l'altération dans le traitement ne doit pas être commencée sur la base uniquement de résultats positifs à l'anticorps PR3 mais plutôt sur des observations cliniques précises.

Le tableau suivant représente la fréquence des PR3 et MPO spécifiques AANC dans le sérum chez 112 patients atteints d'angéite associés à l'AANC<sup>11</sup>. Le taux des anticorps PR3 varie en fonction du nombre de patients. Une compilation des taux tirés de la littérature sur le sujet est visible ci-dessous.

Fréquence des anti-PR3 et des anti-MPO dans les angéites associés à l'AANC

Association anticorps	Granulomatosis de Wegener	Polyangiitis microscopique	syndrome de Churg-Strauss
AANC positif par IFA	78%	59%	67%
anti-PR3 positif	90%	0%	10%
anti-MPO positif	0%	62%	17%

L'utilisé clinique de la détection d'AANC avec une spécificité cAANC et une spécificité positive à l'anticorps anti-PR3 pour divers désordres liés à l'angéite est illustrée ci-dessous.<sup>5</sup>



Des séries d'échantillons cliniques ont été testés avec l'Immuliisa™ PR3 Anticorps ELISA et comparés avec un autre kit MPO anticorps ELISA disponible dans le commerce. Les résultats démontrant l'incidence dans les populations testés sont disponibles ci-dessous.

Groupe patient	n	IMMCO		Autre PR3 ELISA		
		n Pos	% Pos	n	n Pos	% Pos
Maladie Associée						
Granulomatosis de Wegener	59	57	96,6%	59	56	94,9%
Glomérulonéphrite	29	2	6,9%	29	2	6,9%
AANC positive indifférenciée	11	0	0,0%	11	0	0,0%
Contrôle maladie :						
Angéite non-AANC associée	24	1	4,2%			
Maladie d'inflammation des	16	0	0,0%			
Lupus Erythémateux Disséminé	32	1	3,1%	32	0	0,0%
Arthrite Rhumatoïde	8	0	0,0%	8	0	0,0%
Autre maladie auto-immune	16	0	0,0%	16	0	0,0%
Cas normaux en bonne santé	80	0	0,0%	80	0	0,0%

## CHARACTERISTIQUES DE LA PERFORMANCE

L'utilité de la solution ImmuLisa™ PR3 Anticorps ELISA a été évaluée en testant des spécimens de sérum bien-caractérisés positifs à l'anticorps PR3 provenant de sujets positifs à l'anticorps cAANC avec des contrôles de maladie et du sérum humain « normal ». Ces spécimens ont également été testés avec des kits ELISA disponibles dans le commerce. Ces résultats sont résumés ci-dessous.

A. Comparaison de la méthode : l'ImmuLisa™ PR3 Anticorps ELISA contre d'autres PR3 anticorps ELISA:

		Autre PR3 ELISA		
		Positif	Négatif	Total
<b>IMMCO</b>	Positif	41	4	45
<b>PR3</b>	Négatif	2	58	60
<b>ELISA</b>	Total	43	62	105

Concordance en pourcentage cas positifs: 95.3% (95% CI 82.9% à 99.2%)

Concordance en pourcentage cas négatifs: 93.5% (95% CI 83.5% à 97.9%)

Concordance en pourcentage globale: 94.3% (95% CI 87.5% à 97.7%)

B. Réactivité croisée Un total de 136 spécimens potentiellement à réactivité-croisée provenant d'individus avec d'autres désordres auto-immunitaires ou positifs à d'autres auto-anticorps ont été testés à la recherche d'anticorps PR3 en utilisant l'ImmuLisa™ PR3 Anticorps ELISA.

Condition	n	n positif
Glomérulonéphrite	29	2
pAANC positif indifférencié	11	0
Angéite non-AANC associée	24	1
Maladie d'inflammation des intestins	16	0
Lupus Erythémateux Disséminé	32	0
Arthrite Rhumatoïde	8	0
Autre maladie auto-immune	16	0
<b>Total</b>	<b>136</b>	<b>3 (2,2%)</b>

FR

## Précision

La précision a été testée avec 6 spécimens positifs sélectionnés à travers l'échantillon utilisé pour l'analyse. Des exécutions d'analyses ont été conduites sur trois mesures de chaque spécimen durant trois jours. La fidélité des résultats a été déterminée avec 6 mesures de chaque spécimen.

Echantillon	Moyenne (IU/ml)	Imprécision totale		Entre les jours		En cours d'exécution	
		SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%	Fidélité	
						SD (IU/ml)	CV%
1	8,7	0,809	9,3%	0,809	9,5%	0,758	8,4%
2	12,2	0,812	6,7%	0,974	8,0%	0,547	4,5%
3	27,2	2,211	8,1%	2,183	8,3%	1,218	4,2%
4	57,0	3,017	5,3%	2,872	5,0%	3,458	6,1%
5	112,4	4,211	3,7%	5,059	4,5%	2,821	2,5%
6	139,3	6,199	4,4%	6,654	4,8%	6,043	4,3%

## Reproductibilité

Six mesures des échantillons dans l'éventail négatif, ~20% sous la limite, ~20% au-dessus de la limite et dans l'éventail des résultats positifs modérés dans le cadre de l'analyse, ont été réalisés pour déterminer la reproductibilité qualitative intra-analyse. Trois mesures des mêmes échantillons ont été testées lors de trois exécutions afin de déterminer la reproductibilité intra-analyse. Les résultats des analyses sur ces spécimens ont donné une concordance qualitative de 100%.

## Linéarité

Des études ont été menées en utilisant des séries de dilution équidistantes d'échantillons positifs avec des valeurs comprises tout au long de l'éventail des calibreurs afin de déterminer l'étendue linéaire de l'analyse. L'étendue linéaire de l'analyse a été déterminée entre 2,2 – 156 IU/ml. Les résultats sont résumés ci-dessous. Il est suggéré que les échantillons produisant des résultats supérieurs au plus haut calibreur soient dilués et testés de nouveau.

Echantillon	Etendue du test	Pente (95% CI)	Segment sur l'axe Y		R <sup>2</sup>	% de rétablissement
			(95% CI)			
1	3,7 à 772	1,07 (0,94 à 1,20)	-0,031 (-0,134 à 0,071)		0,986	89,8 à 111,9
2	3,8 à 1582	1,012 (0,934 à 1,090)	-0,053 (-0,153 à 0,047)		0,994	88,9 à 102,2
3	3,4 à 434	1,023 (0,929 à 1,118)	0,009 (-0,045 à 0,063)		0,991	100 à 112,3

## Limite de détection

La limite de détection (LoD) pour l'anticorps PR3 en utilisant cette analyse a été évaluée à 2,2 IU/ml basé sur 60 mesures des échantillons vierges et 10 mesures pour chacun des 6 échantillons de niveau bas (NHS).

FR

### **Interférence**

L'interférence a été étudiée en mélangeant du sérum avec des niveaux d'anticorps PR3 connus avec des échantillons de sérum potentiellement interférant puis en étudiant la déviation par rapport aux résultats escomptés. Aucune interférence significative n'a été démontrée pour les substances suivantes aux niveaux indiqués : Hémoglobine (2 g/L), Bilirubine (342  $\mu\text{mol/L}$ ), et facteur rhumatoïde (100 EU/ml).

**Immuli**<sup>TM</sup>

# PR3 Antibody ELISA

**ELISA per il rilevamento degli anticorpi anti-proteinasi 3 (PR3)**

[IVD]

**FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO**

[REF] 5162 PR3 Antibody ELISA96 determinazioni

**USO PREVISTO**

Dosaggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il rilevamento e la determinazione semiquantitativa degli anticorpi anti-proteinasi 3 (PR3) nel siero umano, come ausilio nella diagnosi delle vasculiti associate agli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA), tra cui la granulomatosi di Wegener, in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

**RIASSUNTO E SPIEGAZIONE**

Gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) sono un gruppo di anticorpi diretti contro proteine presenti nei granuli dei neutrofili. La presenza degli ANCA nei pazienti con vasculite è stata osservata per la prima volta nel 1982 da Davies.<sup>1</sup> Questi autoanticorpi possono essere rilevati mediante immunofluorescenza indiretta su neutrofili fissati con etanolo, producendo uno schema di colorazione citoplasmatica caratteristico (cANCA) o mediante ELISA. Le reazioni cANCA sono indirizzate alla proteinasi 3 (PR3) e in parte ad antigeni minori come ad esempio la catepsina G e l'elastasi. PR3 è una proteinasi serica neutra localizzata nei granuli azzurrofilari dei neutrofili, con peso molecolare di 28 kD.<sup>2</sup> Gli anticorpi diretti contro l'antigene PR3 servono come marcatori per la granulomatosi di Wegener (WG), una vasculite necrotizzante sistemica.<sup>3</sup> La WG è una vasculite sistemica dei piccoli vasi caratterizzata dall'infiammazione granulomatosa necrotizzante del tratto respiratorio superiore e inferiore, con glomerulonefrite falciforme necrotizzante pauci-immune. La diagnosi precoce è di primaria importanza, dato che la granulomatosi di Wegener ha spesso un decorso progressivo che aumenta rapidamente l'estensione e la gravità del coinvolgimento organico. Gli anticorpi anti-PR3 sono clinicamente importanti nella diagnosi e nel monitoraggio dell'attività della malattia e nella predizione della ricaduta. Numerosi studi hanno stabilito una correlazione diretta fra i livelli di anticorpi anti-PR3 e la fase attiva della WG. La concentrazione degli anticorpi anti-PR3 serici sale radicalmente durante le riacutizzazioni della malattia e le ricadute sono solitamente accompagnate da aumenti significativi nei livelli anticorpali.<sup>6,7</sup>

IT

## PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il test viene eseguito come dosaggio immunoenzimatico in fase solida. I micropozzetti sono rivestiti con antigene PR3 purificato, cui segue un passaggio di arresto per ridurre il legame non specifico durante l'esecuzione del dosaggio. Controlli, calibratori e sieri del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti con l'antigene per consentire agli anticorpi specifici presenti nel siero di legarsi all'antigene PR3. Gli anticorpi non legati e le altre proteine seriche vengono rimossi tramite lavaggio dei micropozzetti. Gli anticorpi legati sono rilevati aggiungendo ai micropozzetti un coniugato anti-IgG umane marcato enzimaticamente. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Viene quindi aggiunto ai pozzetti un substrato enzimatico specifico (TMB) e la presenza degli anticorpi viene rilevata tramite una variazione di colore prodotta dalla conversione del substrato TMB in un prodotto di reazione colorato. La reazione viene arrestata e l'intensità della variazione di colore, che è proporzionale alla concentrazione anticorpale, viene letta con uno spettrofotometro a 450 nm. I risultati sono espressi in unità internazionali per millilitro (UI/ml) e refertati come positivi o negativi.

## REAGENTI

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. **Non congelare.** I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza, quando conservati e maneggiati secondo le indicazioni.

Non utilizzare se il reagente non è limpido o in presenza di un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25 °C) prima dell'uso.

Ricostituire il tampone di lavaggio a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Quando conservato a 2-8 °C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit.

Le strisce di micropozzetti rivestiti sono monouso. Le strisce di micropozzetti non utilizzate devono essere risigillate accuratamente in buste contenenti essiccanti per impedire la formazione di condensa e conservati a 2-8 °C.

## Precauzioni

Tutti i componenti di origine umana utilizzati sono stati testati per HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 e HTLV-I, risultando negativi in base ai test richiesti dalla FDA. Gli emoderivati umani e i campioni dei pazienti vanno tuttavia considerati potenzialmente infettivi. Seguire le buone pratiche di laboratorio durante la conservazione, la preparazione, la distribuzione e lo smaltimento di questi materiali.<sup>10</sup>

***Per garantire la validità dei risultati, seguire le istruzioni esattamente come appaiono nel presente foglio illustrativo del kit.*** Non scambiare i componenti del kit con quelli di altre fonti. Seguire le buone pratiche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e crociata dei reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza segnata sulle etichette.



IT

## Materiali forniti

ImmuLisa™ PR3 Antibody ELISA

[REF] 5162






I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 96 determinazioni.

12 x 8	[MICROPLATE PR3]	Micropiastra con micropozzetti separabili singolarmente. Rivestimento con antigene PR3 purificato. Pronta per l'uso.
1 x 1.75 ml	[CONTROL+ PR3]	<b>Controllo positivo</b> ( <i>tappo rosso</i> ), pronto per l'uso. Contiene siero umano positivo per gli anticorpi anti-PR3. L'intervallo di concentrazione previsto in UI/ml è stampato sull'etichetta.
1 x 1.75 ml	[CONTROL-]	<b>Controllo negativo</b> ( <i>tappo bianco</i> ), pronto per l'uso. Contiene siero umano.
5 x 1.75 ml	[CALIBRATOR A PR3] [CALIBRATOR B PR3] [CALIBRATOR C PR3] [CALIBRATOR D PR3] [CALIBRATOR E PR3]	Serie di 5 <b>calibratori</b> pronti per l'uso. Calibratore A ( <i>tappo verde</i> ) 156 UI/ml, calibratore B ( <i>tappo viola</i> ) 62,5 UI/ml, calibratore C ( <i>tappo blu</i> ) 25 UI/ml, calibratore D ( <i>tappo giallo</i> ) 10 UI/ml, e calibratore E ( <i>tappo arancione</i> ) 1 UI/ml. Derivati da siero umano contenente anticorpi anti-PR3. Le concentrazioni in UI/ml sono stampate sulle etichette.
1 x 15 ml	[IgG-CONJ HRP]	<b>Coniugato</b> HRP di montone anti- <b>IgG</b> umane. Pronto per l'uso. Colore codificato rosa.
1 x 60 ml	[DIL]	Diluente per siero. Pronto per l'uso. Colore codificato porpora.
1 x 15 ml	[SUBSTRATE TMB]	Substrato enzimatico TMB. Pronto per l'uso. <b>Proteggere dalla luce.</b>
1 x 15 ml	[STOP H2SO4]	Soluzione di arresto. Pronta per l'uso.
2 x	[BUF WASH]	Tampone di lavaggio in polvere. <b>Ricostituire a un litro ciascuno.</b>
1 x		Schede del protocollo

## Componenti facoltativi

1 x 60 ml	[BUF WASH]	Tampone di lavaggio concentrato liquido. <b>Ricostituire a un litro.</b>
-----------	------------	--

## Simboli utilizzati sulle etichette

[LOT]	Codice del lotto
[REF]	Numero di catalogo
[IVD]	Per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Utilizzare entro
	Temperatura di conservazione
	Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso
	Numero di test
	Fabbricante

**Materiali necessari ma non forniti**

- Acqua deionizzata o distillata.
- Boccetta comprimibile per contenere il tampone di lavaggio diluito.
- Pipette con capacità di erogazione da 5 µl a 1000 µl.
- Puntali monouso per pipette.
- Provette pulite 12 x 75 mm e rastrelliera per provette.
- Contaminuti.
- Salviette di carta assorbente.
- Lettore per micropiastre capace di leggere valori di assorbanza a 450 nm. Se è disponibile un lettore per micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm.
- Lavatrice automatica per micropiastre capace di erogare 200 µl.

**PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE**

Per questa procedura utilizzare solo campioni di siero. I campioni che mostrano emolisi macroscopica, lipemia o contaminazione microbica possono interferire con le prestazioni del test e non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a 2-8 °C per una settimana al massimo. Per conservazioni più prolungate, congelare i campioni di siero. Si raccomanda di analizzare i campioni congelati entro un anno. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni.

**PROCEDURA****Note sulla procedura**

- Prima di iniziare il dosaggio, leggere attentamente il foglio illustrativo del prodotto.
- Tutte le diluizioni dei campioni del paziente vanno preparate prima di iniziare il dosaggio.
- Prima di avviare la procedura del test, attendere che i campioni del paziente e i reagenti del test raggiungano l'equilibrio a temperatura ambiente. Prima dell'uso, si consiglia di lasciare i reagenti sul piano di lavoro e fuori dalla scatola per 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso, rimettere nel frigorifero tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
- Rimuovere le strisce di micropozzetti necessarie dalla busta e risigillare accuratamente quest'ultima per evitare la formazione di condensa nei pozzetti non utilizzati. Rimettere immediatamente la busta nel frigorifero.
- ***È fondamentale una tecnica di lavaggio valida.*** Se il lavaggio viene effettuato manualmente, è adeguato se viene eseguito dirigendo un energico getto di tampone di lavaggio con una boccetta di lavaggio a bocca larga sull'intera micropiastra. ***Si raccomanda l'uso di una lavatrice automatica per micropiastre.***
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di riempire 8 o 12 pozzetti allo stesso tempo. Questo strumento accelera il lavoro e fornisce tempi di incubazione più uniformi.

IT

- Per tutti i passaggi è importante controllare accuratamente i tempi. L'inizio di tutti i periodi di incubazione corrisponde al completamento dell'aggiunta del reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e dei reagenti deve avvenire alla stessa velocità e con la stessa sequenza.

### Metodo del test

**Passaggio 1** Lasciar equilibrare a temperatura ambiente tutti i reagenti e i campioni.

**Passaggio 2** Etichettare la scheda del protocollo per indicare l'inserimento del campione nei pozzetti. La buona pratica di laboratorio richiede di analizzare i campioni in duplicato.

**Passaggio 3** Per una **determinazione qualitativa** utilizzare unicamente il calibratore D (*flaconcino con tappo giallo*).

#### oppure

Per una **determinazione semiquantitativa** utilizzare i calibratori da A fino a E come illustrato nel seguente schema esemplificativo.

	Qualitativa				Semiquantitativa		
A	Bianco	S5	Ecc.	A	Bianco	S1	Ecc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

**Passaggio 4** Preparare una diluizione **1:101** dei campioni del paziente miscelando **5 µl** dei sieri del paziente con **500 µl** di diluente per siero.

**Passaggio 5** Rimuovere i micropozzetti richiesti dalla busta e rimettere in frigorifero le strisce non utilizzate nella busta sigillata. Posizionare perfettamente i micropozzetti nel supporto aggiuntivo fornito.

**Passaggio 6** Pipettare **100 µl** di calibratori pronti all'uso, controllo positivo, controllo negativo e campioni diluiti del paziente (**1:101**) nei micropozzetti appropriati in base alla scheda del protocollo.

**Nota:** includere un pozzetto contenente **100 µl** del diluente per siero come reagente bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il reagente bianco.

**Passaggio 7** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  minuti) a temperatura ambiente.

IT

**Passaggio 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ogni micropozzetto con tampone di lavaggio ricostituito. Gettare il fluido presente nei pozzetti capovolgendo questi ultimi e picchiettandone il fondo oppure aspirando il liquido contenuto. Per asciugare al termine dell'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e picchiettare energicamente i pozzetti su salviette di carta assorbente. Per le lavatrici automatiche, programmare la macchina in base alle istruzioni del produttore.

**Passaggio 9** Pipettare **100 µl** di coniugato nei micropozzetti.

**Passaggio 10** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  minuti) a temperatura ambiente.

**Passaggio 11** Lavare tutti i micropozzetti come al Passaggio 8.

**Passaggio 12** Pipettare **100 µl** di substrato enzimatico in ogni micropozzetto utilizzando lo stesso ordine e gli stessi tempi adottati per il coniugato.

**Passaggio 13** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  minuti) a temperatura ambiente.

**Passaggio 14** Pipettare **100 µl** di soluzione di arresto in ogni micropozzetto utilizzando lo stesso ordine e gli stessi tempi adottati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere valori di assorbanza entro **30 minuti** dell'aggiunta della soluzione di arresto.

**Passaggio 15** Leggere l'assorbanza di ogni micropozzetto a **450 nm** utilizzando un lettore per micropiastre a lunghezza d'onda singola (450/630 nm se si utilizza un lettore a lunghezza d'onda doppia), contro il reagente bianco impostato ad assorbanza zero.

### Controllo di qualità

Inserire in ogni dosaggio i calibratori, il controllo positivo, quello negativo e un reagente bianco per verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza per il reagente bianco deve essere  $<0,3$ . Il calibratore A deve avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti il test deve essere ripetuto. Il controllo negativo deve essere  $<10$  UI/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, utilizzare la media di due letture per determinare il valore in UI/ml. Durante l'esecuzione delle determinazioni qualitative, la densità ottica del calibratore D deve essere superiore a quella del controllo negativo e inferiore all'assorbanza del controllo positivo. Per le determinazioni semiquantitative, il controllo positivo deve fornire valori compresi nell'intervallo dichiarato sul flaconcino.

**RISULTATI****Calcoli**

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere stabilite con uno dei due metodi seguenti:

**1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA**

Ass. campione test

----- X UI/ml del calibratore D = UI/ml del campione test

Ass. calibratore D

Si raccomanda di refertare i risultati qualitativi come "positivi" o "negativi". Risultati del campione superiori o pari al calibratore D sono considerati positivi.

**2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA**

Tracciare su carta illimitata lineare-logaritmica l'assorbanza dal calibratore A fino al calibratore E rispetto alle loro concentrazioni. Tracciare le concentrazioni in UI/ml sull'asse X rispetto all'assorbanza sull'asse Y e disegnare una curva interpolante punto per punto. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva in base ai valori di assorbanza corrispondenti. In alternativa, è possibile utilizzare una curva a quattro parametri per tracciare la curva standard.

Si raccomanda di refertare i risultati semiquantitativi come "positivi", "negativi" o "indeterminati" con i valori delle unità in UI/ml. In presenza di risultati indeterminati/borderline, ripetere il test e valutare unitamente ad altri metodi di laboratorio, come ad esempio i dosaggi per il rilevamento degli ANCA mediante IFA.

**Interpretazione**

I valori di interpretazione sono stati determinati testando 136 donatori di sangue normali e campioni di controllo senza vasculiti autoimmuni. La media dei soggetti normali più 3 DS è stata fissata come cut-off del dosaggio ed è stato assegnato un valore di 10 UI/ml in base allo standard internazionale CDC per la PR3. Non sono stati inclusi controlli di malattia per MPO nella determinazione del cut-off del dosaggio PR3. IMMCO suggerisce l'uso dell'intervallo di riferimento riportato di seguito. Ogni laboratorio deve convalidare i valori del dosaggio in base alle proprie condizioni.

**Valore antic. anti-PR3 Interpretazione**

<10 UI/ml	Negativo
10-12,5 UI/ml	Indeterminato (borderline)
>12,5 UI/ml	Positivo

**Calibratore**

Il kit include calibratori pronti all'uso per fornire in ogni sessione una determinazione semiquantitativa. Campioni del paziente contenenti livelli anticorpali elevati possono fornire valori di assorbanza superiori a quello del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, questi campioni devono essere ulteriormente diluiti in modo da rientrare

IT

nell'intervallo della curva del calibratore alla ripetizione del test. Per determinare i valori UI/ml, moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

### LIMITI DELLA PROCEDURA

Non eseguire il dosaggio su campioni che presentano emolisi macroscopica, contaminazione microbica o lipemia. Questo metodo deve essere utilizzato solo per testare campioni di siero umano. I risultati ottenuti servono solo come ausilio nella diagnosi. Considerati da soli, questi risultati non devono essere interpretati come diagnostici. Questo dosaggio non è stato convalidato nella popolazione pediatrica. Non sono stati inclusi controlli di malattia MPO nella determinazione del cut-off del dosaggio PR3.

### VALORI PREVISTI

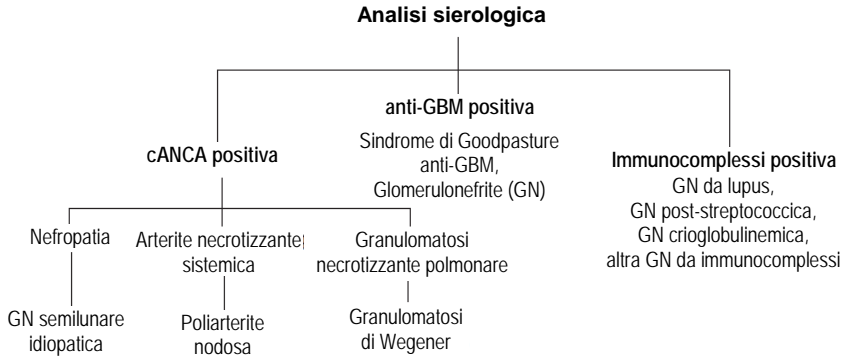
I valori previsti nella popolazione normale sono negativi. Il 2-4% dei soggetti asintomatici apparentemente sani, può tuttavia risultare positivo al test per gli anticorpi anti-PR3. Al contrario, alcuni pazienti con la malattia attiva possono avere livelli non rilevabili di questi anticorpi. Non avviare una terapia immunosoppressiva, né iniziare o modificare un trattamento, unicamente in base a risultati positivi degli anticorpi anti-PR3, ma basarsi piuttosto su accurate osservazioni cliniche.

La seguente tabella illustra la frequenza di specifici ANCA anti-PR3 e anti-MPO nei sieri di 112 pazienti con vasculiti ANCA-associate.<sup>11</sup> L'incidenza degli anticorpi anti-PR3 varia in base alla popolazione di pazienti. La seguente tabella mostra i dati sull'incidenza ricavati dalla letteratura.

#### Incidenza degli anticorpi anti-PR3 e anti-MPO nelle vasculiti ANCA-associate

Associazione anticorpale	Granulomatosi di Wegener	di Poliangite microscopica	Sindrome di Churg-Strauss
ANCA positiva mediante IFA	78%	59%	67%
Anti-PR3 positiva	90%	0%	10%
Anti-MPO positiva	0%	62%	17%

L'immagine seguente mostra l'utilità clinica del rilevamento degli ANCA, con specificità cANCA e specificità anticorpale anti-PR3 positiva, in vari disturbi vasculitici.<sup>5</sup>



Le serie di campioni clinici sono state testate con il dosaggio ImmuLISA™ PR3 Antibody ELISA e un altro test ELISA per il rilevamento degli anticorpi anti-MPO commercialmente disponibile. La tabella seguente fornisce i risultati dell'incidenza nelle popolazioni per questo studio.

Gruppo di pazienti	IMMCO			Altro ELISA antic. anti-PR3		
	n	n pos.	% pos.	n	n pos.	% pos.
<b>Malattia associata</b>						
Granulomatosi di Wegener	59	57	96,6%	59	56	94,9%
Glomerulonefrite	29	2	6,9%	29	2	6,9%
ANCA positiva non differenziata	11	0	0%	11	0	0%
<b>Controllo di malattia</b>						
Vasculite non ANCA-associata	24	1	4,2%			
Malattia intestinale infiammatoria	16	0	0%			
Lupus eritematoso sistemico	32	1	3,1%	32	0	0%
Artrite reumatoide	8	0	0%	8	0	0%
Altra malattia autoimmune	16	0	0%	16	0	0%
Soggetti normali	80	0	0%	80	0	0%

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

L'utilità del test ImmuLISA™ PR3 Antibody ELISA è stata valutata testando campioni serici positivi per gli anticorpi anti-PR3 ben caratterizzati, da soggetti positivi per gli anticorpi cANCA, accanto a controlli di malattia e sieri umani "normali". Questi campioni sono anche stati testati su kit ELISA commercialmente disponibili. Questi risultati sono riepilogati nella seguente tabella.

IT

A. Confronto dei metodi: ImmuLISA™ PR3 Antibody ELISA vs. altro ELISA per il rilevamento degli anticorpi anti-PR3.

#### Altro ELISA PR3

		Positivo	Negativo	Totale
<b>IMMCO</b>	Positivo	41	4	45
<b>ELISA PR3</b>	Negativo	2	58	60
	Totale	43	62	105

Concordanza percentuale positiva: 95,3% (CI al 95%: da 82,9% a 99,2%)

Concordanza percentuale negativa: 93,5% (CI al 95%: da 83,5% a 97,9%)

Concordanza percentuale totale: 94,3% (CI al 95%: da 87,5% a 97,7%)

B. Reattività crociata: 136 campioni totali con reattività crociata potenziale, provenienti da soggetti con altri disturbi autoimmuni o positivi per altri autoanticorpi, sono stati testati per gli anticorpi anti-PR3 utilizzando il dosaggio ImmuLISA™ PR3 Antibody ELISA.

Condizione	n	n positivi
Glomerulonefrite	29	2
pANCA positiva non differenziata	11	0
Vasculite non ANCA-associata	24	1
Malattia intestinale infiammatoria	16	0
Lupus eritematoso sistemico	32	0
Artrite reumatoide	8	0
Altra malattia autoimmune	16	0
<b>Totale</b>	<b>136</b>	<b>3 (2,2%)</b>

#### Precisione

La precisione è stata testata con 6 campioni positivi selezionati attraverso l'intervallo del dosaggio. In tre giorni sono state condotte sessioni analitiche di tre replicati di ogni campione. La ripetibilità è stata determinata con 6 replicati di ogni campione.

Campio ne	Media (UI/ml)	Imprecisione totale		Tra i giorni		Tra le sessioni (Ripetibilità)	
		DS (UI/ml)	CV %	DS (UI/ml)	CV %	DS (UI/ml)	CV %
1	8,7	0,809	9,3%	0,809	9,5%	0,758	8,4%
2	12,2	0,812	6,7%	0,974	8%	0,547	4,5%
3	27,2	2,211	8,1%	2,183	8,3%	1,218	4,2%
4	57	3,017	5,3%	2,872	5%	3,458	6,1%
5	112,4	4,211	3,7%	5,059	4,5%	2,821	2,5%
6	139,3	6,199	4,4%	6,654	4,8%	6,043	4,3%



IT

## Riproducibilità

Per determinare la riproducibilità qualitativa intra-dosaggio, sono stati eseguiti sei replicati dei campioni nell'intervallo negativo, ~10% sotto il cut-off, ~20% sopra il cut-off e nell'intervallo positivo moderato del dosaggio. Per determinare la riproducibilità inter-dosaggio, sono stati analizzati in tre sessioni analitiche tre replicati degli stessi campioni. I risultati del dosaggio per questi campioni hanno prodotto una concordanza qualitativa del 100%.

## Linearità

Per determinare l'intervallo lineare del dosaggio, sono stati effettuati studi utilizzando serie di diluizioni equidistanti dei campioni positivi con i valori attraverso l'intervallo del calibratore. L'intervallo lineare determinato del dosaggio era pari a 2,2-156 UI/ml. I risultati sono riepilogati di seguito. Si raccomanda di diluire e ripetere il test sui campioni che producono risultati maggiori al calibratore superiore.

Campio ne	Intervallo del test	Pendenza (CI al 95%)	Intercetta Y (CI al 95%)	R <sup>2</sup>	% recupero
1	da 3,7 a 77,2	1,07 (da 0,94 a 1,2)	-0,031 (da -0,134 a 0,071)	0,986	da 89,8 a 111,9
2	da 3,8 a 158,2	1,012 (da 0,934 a 1,09)	-0,053 (da -0,153 a 0,047)	0,994	da 88,9 a 102,2
3	da 3,4 a 43,4	1,023 (da 0,929 a 1,118)	0,009 (da -0,045 a 0,063)	0,991	da 100 a 112,3

## Limite di rilevamento

Il limite di rilevamento (LoD) per gli anticorpi anti-PR3 utilizzando questo dosaggio è stato determinato pari a 2,2 UI/ml, in base a 60 replicati del bianco e 10 replicati ciascuno dei 6 campioni a basso livello (NHS).

## Interferenza

L'interferenza è stata studiata mescolando sieri con livelli noti di anticorpi anti-PR3 con campioni di siero potenzialmente interferenti e studiando la deviazione dai risultati previsti. Non è stata dimostrata un'interferenza significativa per le seguenti sostanze ai livelli indicati: emoglobina (2 g/l), bilirubina (342 µmol/l) e fattore reumatoide (100 UE/ml).



# ImmuLisa™ Anticorpos anti-PR3 ELISA

## Proteinase 3 Anticorpos (PR3) ELISA

[IVD]

### FOLHETO DO PRODUTO

[REF] 5162    Anticorpos anti-PR3 ELISA    96 Determinações

### ÂMBITO DE UTILIZAÇÃO

Ensaio imuno-enzimático (ELISA) para a detecção e semi-quantificação de anticorpos anti proteinase 3 (PR3) no soro humano, para ajudar no diagnóstico das vasculites associadas ao anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA), incluindo a glomerulonefrite e a poliarterite nodosa, em conjunto com outras descobertas laboratoriais e clínicas

### RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos (ANCA) são um grupo de autoanticorpos dirigidos contra as proteínas contidas nos grânulos dos neutrófilos. A presença de ANCA em pacientes com vasculite foi observada pela primeira vez em 1982 por Davies.<sup>1</sup> Estes anticorpos podem ser detectados por imunofluorescência indirecta em neutrófilos fixados em etanol, produzindo um padrão de coloração perinuclear característico (cANCA) ou pelo ELISA. As reacções de cANCA têm como alvo a Proteinase 3 (PR3) e em determinada medida antígenos menores, como a catepsina G e a elastase. A PR3 é uma serina proteinase neutral, localizada nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos com um MW de 28kD.<sup>2</sup> Os anticorpos contra o antígeno PR3 servem de marcador para a Granulomatose de Wegener (WG), uma vasculite sistémica necrosante.<sup>3</sup> A WG é uma vasculite sistémica dos pequenos vasos caracterizada pela inflamação granulomatosa necrosante do tracto respiratório superior e inferior, com glomerulonefrite crescêntica necrosante pauci-imune. O diagnóstico precoce é de importância fundamental, pois a granulomatose de Wegener tem muitas vezes um percurso de progressão que aumenta rapidamente a extensão e a gravidade do envolvimento dos órgãos. Os anticorpos anti-PR3 têm importância clínica para o diagnóstico e acompanhamento da actividade da doença e das reincidências previstas. Diversos estudos estabeleceram uma directa correlação entre os níveis de anticorpos anti-PR3 e a fase activa da WG. A concentração do soro anti-PR3 aumenta dramaticamente durante as exacerbações da doença, sendo as recaídas normalmente acompanhadas por aumentos significativos dos níveis de anticorpos.<sup>6,7</sup>

### PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é realizado como um imunoensaio de base sólida. Os micropoços são revestidos de antígenos purificados de PR3, seguido por um passo bloqueador para reduzir a ligação não-específica durante a realização do ensaio. Os controlos, os calibradores e o soro do paciente são incubados em poços

PT

revestidos com antígenos, permitindo que os anticorpos específicos presentes no soro se liguem ao antígeno PR3. Os anticorpos não ligados e as outras proteínas do soro são eliminados através da lavagem dos micropoços. Os anticorpos ligados são detectados pela adição de uma enzima conhecida como IgA anti-humana ou conjugado IgG aos micropoços. O conjugado não ligado é eliminado através de lavagem. Posteriormente, é adicionado aos poços um substrato de uma enzima específica (TMB) e a presença de anticorpos é detectada, através de uma mudança de cor produzida pela conversão do substrato TMB para um produto de reação colorido. A reação é interrompida e a intensidade da mudança de cor, que é proporcional à concentração de anticorpos, é lida através de um espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados são expressos em Unidades Internacionais por mililitro (IU/ml) e comunicados como positivos ou negativos.

## REAGENTES

Armazenar todos os reagentes a 2-8°C. **Não congelar.** Os reagentes são estáveis até à data de expiração, quando são armazenados e manuseados conforme as orientações.

Não utilizar reagentes se estes não apresentarem uma cor transparente ou se houver presença de um precipitado. Todos os reagentes devem ser guardados a uma temperatura ambiente (20-25°C) antes da sua utilização.

Reconstituir o tampão de lavagem a 1 litro com água destilada ou desionizada. Quando armazenado a 2-8°C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade do kit.

As tiras de revestimento dos micropoços destinam-se a uma única utilização. As tiras dos micropoços não utilizadas devem ser cuidadosamente novamente seladas na bolsa com dessecantes, a fim de prevenir a condensação e ser armazenadas a 2-8°C.

## Precauções

Todos os componentes humanos utilizados foram testados para HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e considerados negativos pelos testes exigidos pela FDA. No entanto, os derivados do sangue humano e as amostras de pacientes devem ser consideradas potencialmente infecciosas. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais de armazenamento, distribuição e eliminação destes materiais.<sup>10</sup>

***As instruções devem ser seguidas exactamente conforme constam no presente folheto deste kit, a fim de assegurar resultados válidos.*** Não trocar os componentes do kit com componentes provenientes de outras fontes. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais, a fim de minimizar a contaminação microbiana e cruzada dos reagentes aquando do seu manuseamento. Não utilizar os componentes do kit para além da data de validade impressa nas etiquetas.

PT

## Material fornecido

ImmuLisa™ Anticorpo anti-PR3 ELISA [REF] 5162






O kit contém reagentes suficientes para realizar 96 determinações.

12 x 8	[MICROPLATE PR3]	Microplaca com micropoços individuais separados. Revestidos com um antígeno purificado de PR3. Pronta a utilizar,
1 x 1.75 ml	[CONTROL+ PR3]	<b>Controlo Positivo</b> (tampa vermelha) pronto a utilizar. Contém soro humano positivo para anticorpos anti-PR3. A faixa de concentração esperada em IU/ml está impressa na etiqueta.
1 x 1.75 ml	[CONTROL-]	<b>Controlo Negativo</b> pronto a utilizar (tampa branca). Contém soro humano.
5 x 1.75 ml	[CALIBRATOR A PR3] [CALIBRATOR B PR3] [CALIBRATOR C PR3] [CALIBRATOR D PR3] [CALIBRATOR E PR3]	Conjunto de <b>5 Calibradores</b> pronto a utilizar. Calibrador A (tampa verde) 156 IU/ml, Calibrador B (tampa violeta) 62.5 IU/ml, Calibrador C (tampa azul) 25 IU/ml, Calibrador D (tampa amarela) 10 IU/ml, e Calibrador E (tampa laranja) 1 IU/ml. Derivado do soro humano contendo anticorpos anti-PR3. As concentrações em IU/ml estão impressas nas etiquetas.
1 x 15 ml	[IgG-CONJ HRP]	<b>Conjugado</b> HRP de cabra <b>IgG</b> anti humano. Pronto a utilizar, Código de cor rosa.
1 x 60 ml	[DIL]	Diluinte de Soro. Pronto a utilizar, Código de cor púrpura.
1 x 15 ml	[SUBSTRATE TMB]	Substrato enzimático TMB. Pronto a utilizar, <b>Proteger da luz.</b>
1 x 15 ml	[STOP H2SO4]	Solução de Paragem. Pronta a utilizar,
2 x	[BUF WASH]	Tampão de lavagem de pó. <b>Reconstituir para um litro cada.</b>
1 x		Folhas de Protocolo

## Componentes Opcionais

1 x 60ml	[BUF WASH]	Tampão de Lavagem Líquido concentrado. <b>Reconstituir para um litro.</b>
----------	------------	---

## Símbolos utilizados nas etiquetas

[LOT]	Número de lote
[REF]	Número de catálogo
[IVD]	Para utilização diagnóstica in vitro
	Utilização por
	Temperatura de armazenamento
	Ler as instruções antes de utilizar
	Número de testes
	Fabricante

PT

## Material Exigido Mas Não Fornecido

- Água desionizada ou destilada
- Garrafa de plástico para conter o tampão de lavagem diluído
- Pipetas com capacidade de libertação de 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis
- Tubos de ensaio limpos de 12 x 75 mm e suporte para tubo de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorventes
- Leitor de microplacas capaz de ler valores de absorvância a 450 nm. Se estiver disponível um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda, o filtro de referência deve ser definido para 600-650 nm
- Lavador automático de microplacas capaz de distribuir 200 µl

## RECOLHA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só deverão ser utilizadas amostras de soro. As amostras excessivamente hemolizadas, lipémicas ou contaminadas microbiologicamente, podem interferir nos resultados do teste, não devendo ser utilizadas. Armazenar as amostras a uma temperatura entre 2° a 8°C durante o máximo de uma semana. Para um armazenamento de maior duração, as amostras de soro deverão ser congeladas. Recomenda-se que as amostras congeladas sejam testadas no prazo de um ano. Evitar o repetido congelamento e derretimento das amostras.

## PROCEDIMENTO

### Notas de Procedimento

- Ler cuidadosamente o folheto do produto antes de iniciar o ensaio.
- Todas as diluições das amostras dos pacientes devem ser preparadas antes de iniciar o ensaio.
- Permitir que as amostras dos pacientes e os reagentes de teste se equilibrem a uma temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento de teste. Sugere-se que os reagentes sejam deixados em cima da bancada, no exterior da caixa, durante 30 minutos antes da sua utilização. Voltar a colocar todas as amostras e reagentes no frigorífico imediatamente após a sua utilização.
- Eliminar as tiras necessárias dos micropoços da embalagem, voltando a fechá-la cuidadosamente, a fim de prevenir a condensação nos poços não utilizados. Voltar a colocar a embalagem de imediato no frigorífico.
- ***Uma boa técnica de lavagem é fundamental*** Se a lavagem for realizada manualmente, consegue-se uma lavagem adequada direccionando o fluxo energético do tampão de lavagem por toda a microplaca, através de um frasco de lavagem de ponta larga. ***Recomenda-se a utilização de uma lavadora automática de microplacas.***
- Utilizar uma pipeta multicanal capaz de libertar 8 ou 12 poços em simultâneo. Este procedimento acelera o processo, fornecendo tempos de incubação mais uniformes.

PT

- É importante o controlo cuidadoso do tempo para todos os passos. O início de todos os períodos de incubação começa com a conclusão da adição do reagente.
- A adição de todas as amostras e reagentes deve ser realizada na mesma proporção e na mesma sequência.

### Método de Teste

- 1º Passo** Permitir que todos os reagentes e amostras se equilibrem a uma temperatura ambiente
- 2º Passo** Etiquetar folha de protocolo indicando a colocação da amostra nos poços. A execução das amostras em duplicado constitui uma boa prática laboratorial.
- 3º Passo** Utilizar apenas o Calibrador D (*ampola com tampa amarela*) para obter uma **determinação qualitativa**.

**ou**

Utilizar os Calibradores A até E para uma **determinação semi-quantitativa**, conforme se descreve no esquema de amostras seguinte.

Qualitativa				Semi-Quantitativa			
A	Branca	S5	Etc.	A	Branca	S1	Etc.
B	-Control	S6		B	-Control	S2	
C	+ Control	S7		C	+ Control	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

- 4º Passo** Preparar uma diluição **1:101** das amostras dos pacientes, misturando **5 µl** do soro do paciente com **500µl** de Diluente de Soro.
- 5º Passo** Remover os micropoços necessários da embalagem, recolocando as tiras não utilizadas na embalagem fechada, colocada no frigorífico. Colocar os micropoços com firmeza no suporte extra fornecido.
- 6º Passo** Pipetar **100 µl** de Calibradores prontos a utilizar, controlos Positivo e Negativo e amostras de pacientes diluídas (**1:101**) nos micropoços apropriados, conforme a folha de protocolo.
- Nota:** Incluir um poço que contenha **100 µl** do Diluente de Soro como um reagente branco. Ajustar o leitor de ELISA para zero em relação ao reagente branco.
- 7º Passo** Incubar durante **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- 8º Passo** Lavar **4x** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Descartar o líquido por inversão retirando os conteúdos de cada poço ou

PT

aspirando o líquido de cada poço. Para absorver o líquido da última lavagem, inverter as tiras e limpar os poços, vigorosamente, com toalhas de papel absorvente. Para lavadores automáticos, programar o lavador conforme as instruções do fabricante.

- 9º Passo** Pipetar **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- 10º Passo** Incubar durante **30 minutos** ( $\pm$  5 min) a uma temperatura ambiente.
- 11º Passo** Lavar todos os micropoços conforme descrito no 8º Passo.
- 12º Passo** Pipetar **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempo utilizados para o Conjugado.
- 13º Passo** Incubar durante **30 minutos** ( $\pm$  5 min) a uma temperatura ambiente.
- 14º Passo** Pipetar **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço, utilizando a mesma ordem e tempo utilizados na adição do Substrato Enzimático. Ler os valores de absorvância, no espaço de **30 minutos**, da adição da solução de paragem.
- 15º Passo** Ler a absorvância de cada micropoço a **450 nm**, utilizando um único, ou, a 450/630nm, utilizando um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda contra o reagente branco fixado em absorvância zero.

### Controlo de Qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivos e Negativos e um reagente branco devem ser executados em cada ensaio, a fim de verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura de absorvância do reagente branco deve ser  $<0,3$ . O Calibrador A deve possuir uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário, o teste deve ser repetido. O controlo negativo deve ser  $<10$  IU/ml. Se o teste for realizado em duplicado, deve ser retirada a média das duas leituras, a fim de determinar IU/m. Quando se realizam determinações Qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. Para as determinações semi-quantitativas, o controlo positivo deve apresentar valores na faixa indicada na ampola.

## RESULTADOS

### Cálculos

As concentrações das amostras do paciente podem ser determinadas por qualquer um dos seguintes métodos:

#### 1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

$$\frac{\text{Abs. da Amostra de Teste}}{\text{Abs. do Calibrador D}} \times \text{IU/ml do Calibrador D} = \text{IU/ml Amostra de Teste}$$

Recomenda-se que os resultados qualitativos sejam comunicados como “positivos” ou “negativos.” Amostras com resultados superiores ou iguais ao Calibrador D são consideradas positivas.

## 2. DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA

Traçar a absorvância do Calibrador A até E, consoante as respectivas concentrações em papel gráfico de registo linear. Traçar as concentrações em IU/ml no eixo X, consoante a absorvância no eixo Y, e desenhar uma curva que ligue os pontos. Determinar as concentrações das amostras do paciente a partir da curva, de acordo com os valores de absorvância correspondentes. Em alternativa, pode ser utilizada uma curva de quatro parâmetros para traçar uma curva padrão.

Recomenda-se que os resultados semi-quantitativos sejam comunicados como “positivos,” “negativos,” ou “indeterminados” com valores unitários IU/ml. Os resultados indeterminados/linha divisória devem ser novamente testados e avaliados a par de outros métodos laboratoriais, como os ensaios para a deteção de ANCA mediante IFA.

### **Interpretação**

Os valores de interpretação foram determinados, testando 136 doadores de sangue normal e amostras de controlo da doença não auto-imune vasculite. A média dos indivíduos normais mais 3 SD foi estabelecida como o corte do ensaio e foi atribuído um valor arbitrário de 10 IU/ml produzido pelo padrão internacional CDC para o PR3. Os controlos da doença MPO não foram incluídos na determinação do corte do ensaio PR3. A IMMCO sugere a utilização da série de referência abaixo. Cada laboratório deve validar valores de ensaio para as suas próprias condições.

<b>Valor Ab anti-PR3</b>	<b>Interpretação</b>
<10 IU/ml	Negativo
10-12,5 IU/ml	Indeterminado (Linha Divisória)
>12,5 IU/ml	Positivo

### **Calibrador**

São incluídos Calibradores Prontos a Utilizar para fornecer a semi-quantificação, devendo ser utilizados em cada ensaio. As amostras de pacientes que contenham elevados níveis de anticorpos podem apresentar valores de absorvância superiores aos do Calibrador A. Para determinar valores semi-quantitativos rigorosos, essas amostras devem ser ainda diluídas de modo a recaírem na série da curva do calibrador quando forem novamente testadas. Para determinar valores IU/ml, multiplicar as unidades obtidas pelo factor de diluição.



## LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O ensaio não deve ser realizado em amostras excessivamente hemolizadas, contaminadas microbiologicamente ou lipémicas. Este método só deve ser utilizado para testar amostras de soro humano. Os resultados obtidos servem exclusivamente como ajuda ao diagnóstico. Caso sejam considerados isoladamente, estes resultados não devem ser interpretados como um diagnóstico. Este ensaio não foi validado numa população pediátrica. Os controlos da doença MPO não foram incluídos na determinação do corte do ensaio PR3.

## VALORES ESPERADOS

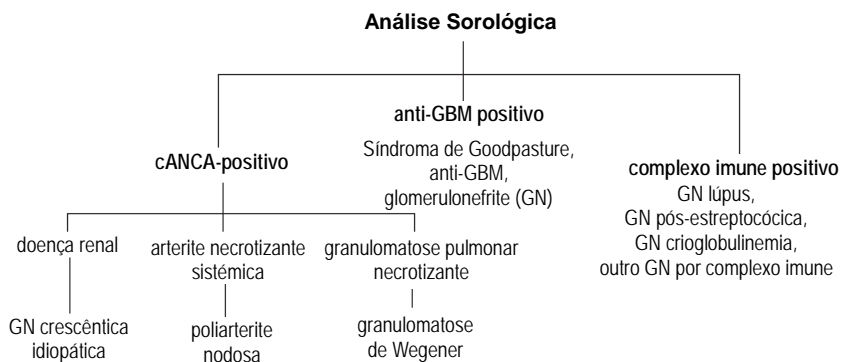
Os valores esperados numa população normal são negativos. No entanto, 2-4% dos indivíduos assintomáticos aparentemente saudáveis podem apresentar testes positivos para anticorpos anti-PR3. Em contraste, alguns pacientes com doença activa podem possuir níveis não detectáveis destes anticorpos. A terapia imunossupressora, iniciação ou alteração no tratamento não deve ser começada apenas com base no resultado positivo do anticorpo anti-PR3, mas sim em observações clínicas cuidadosas.

A seguinte tabela ilustra a frequência do ANCA específico PR3 e MPO no soro de 112 pacientes com vasculite associada ao ANCA.<sup>11</sup> A Incidência de anticorpos anti-PR3 varia dependendo da população de pacientes. Abaixo segue-se uma compilação de incidências retiradas da literatura.

Incidência do anti-PR3 e anti-MPO nas vasculites associadas ao ANCA.

Anticorpos associação	Granulomatose de Wegener	Poliangeite microscópica	Síndrome de Churg-Strauss
ANCA positivo mediante IFA	78%	59%	67%
anti-PR3 positivo	90%	0%	10%
anti-MPO positivo	0%	62%	17%

A utilidade clínica da detecção de ANCA com a especificidade do cANCA com especificidade positiva de anticorpos anti-PR3 em diversos distúrbios vasculíticos é ilustrada abaixo.<sup>5</sup>



Foram testados conjuntos de amostras clínicas com o ImmuLisa™ Anticorpos anti-PR3 ELISA e com outro kit de anticorpos MPO comercialmente disponível. Os resultados demonstrativos da incidência nas populações para este estudo são revelados em seguida:

Grupo de Pacientes	IMMCO			Ab Outro ELISA PR3		
	n	n Pos	% Pos	n	n Pos	% Pos
<b>Doença Associada</b>						
Granulomatose de Wegener	59	57	96,6%	59	56	94,9%
Glomerulonefrite	29	2	6,9%	29	2	6,9%
ANCA positivo indiferenciado	11	0	0,0%	11	0	0,0%
<b>Controlo da Doença</b>						
Vasculite não associada a ANCA	24	1	4,2%			
Doença inflamatória intestinal	16	0	0,0%			
Lúpus Eritematoso Sistémico	32	1	3,1%	32	0	0,0%
Artrite Reumatóide	8	0	0,0%	8	0	0,0%
Outra doença auto-imune	16	0	0,0%	16	0	0,0%
Normais saudáveis	80	0	0,0%	80	0	0,0%

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade da ImmuLisa™ Anticorpos anti-PR3 ELISA foi avaliada ao testar amostras de soro de anticorpos anti-PR3 positivos bem caracterizadas de indivíduos anticorpos cANCA positivos, a par de controlos de doenças e soro humano «normal». Estas amostras foram igualmente testadas em kits de teste ELISA comercialmente disponíveis. Estes resultados são seguidamente resumidos.

PT

A. Método Comparativo: Immulisa™ Anticorpos anti-PR3 ELISA vs. Outros Anticorpos anti-PR3 ELISA.

#### Outro ELISA PR3

		Positivo	Negativo	Total
<b>IMMCO</b>	Positivo	41	4	45
<b>PR3</b>	Negativo	2	58	60
<b>ELISA</b>	Total	43	62	105

Acordo percentual positivo: 95,3% (95% CI 82,9% a 99,2%)

Acordo percentual negativo: 93,5% (95% CI 83,5% a 97,9%)

Acordo percentual global: 94,3% (95% CI 87,5% a 97,7%)

B. Reactividade Cruzada: Foram testadas um total of 136 amostras com potencial de reatividade cruzada de indivíduos com outros distúrbios auto-imunes ou positivas para outros autoanticorpos para anticorpos anti-PR3 utilizando o Immulisa™ Anticorpos anti-PR3 ELISA.

Condição	n	Positivo n
Glomerulonefrite	29	2
pANCA positivo indiferenciado	11	0
Vasculite não associada a ANCA	24	1
Doença inflamatória intestinal	16	0
Lúpus Eritematoso Sistêmico	32	0
Artrite Reumatóide	8	0
Outra doença auto-imune	16	0
<b>Total</b>	<b>136</b>	<b>3 (2,2%)</b>

#### Precisão

A precisão foi testada com 6 amostras positivas seleccionadas ao longo de todo o intervalo de ensaio. Foram conduzidos ensaios a 3 réplicas de cada amostra em 3 dias. A repetitibilidade foi determinada com 6 réplicas de cada amostra.

Amostra	Média (IU/ml)	Imprecisão Total		Entre dias		Na Experiência (Repetitibilidade)	
		SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%	SD (IU/ml)	CV%
1	8,7	0,809	9,3%	0,809	9,5%	0,758	8,4%
2	12,2	0,812	6,7%	0,974	8,0%	0,547	4,5%
3	27,2	2,211	8,1%	2,183	8,3%	1,218	4,2%
4	57,0	3,017	5,3%	2,872	5,0%	3,458	6,1%
5	112,4	4,211	3,7%	5,059	4,5%	2,821	2,5%
6	139,3	6,199	4,4%	6,654	4,8%	6,043	4,3%

#### Reproducibilidade

Foram realizadas seis réplicas de amostras na série negativa, ~10% abaixo do corte, ~20% acima do corte e na série positiva moderada do ensaio, para determinar a reproducibilidade qualitativa intra-ensaio. Foram testadas três réplicas das mesmas amostras em três ensaios para determinar a reproducibilidade inter-ensaio. Os resultados dos ensaios para estas amostras produziram 100% de concordância qualitativa.

PT

### Linearidade

Foram realizados estudos que utilizaram séries de diluições equidistantes de amostras positivas com valores por toda a série do calibrador para determinar a série linear do ensaio. A série linear dos ensaios foi determinada como 2,2 – 156 IU/ml. Os resultados são seguidamente resumidos. Sugere-se que as amostras que produziram resultados superiores ao top calibrador sejam diluídas e novamente testadas.

Amostra	Série de Teste	Inclinação (95% CI)	Y-intercepção (95% CI)	R <sup>2</sup>	% de Recuperação
1	3,7 a 77,2	1,07 (0,94 a 1,20)	-0,031 (-0,134 a 0,071)	0,986	89,8 a 111,9
2	3,8 a 158,2	1,012 (0,934 a 1,090)	-0,053 (-0,153 a 0,047)	0,994	88,9 a 102,2
3	3,4 a 43,4	1,023 (0,929 a 1,118)	0,009 (-0,045 a 0,063)	0,991	100 a 112,3

### Limite de Detecção

O limite de detecção (LoD) para os anticorpos anti-PR3 através deste ensaio foi determinado em 2,2 IU/ml, com base em 60 réplicas das amostras em branco e em 10 réplicas de cada uma das 6 amostras de baixo nível (NHS).

### Interferência

A interferência foi estudada, misturando o soro com os níveis conhecidos de anticorpos anti-PR3 com amostras de soro potencialmente interferentes, e estudando o desvio dos resultados previstos. Não foi demonstrada interferência significativa para as seguintes substâncias nos níveis indicados: Hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342 µmol/L), e Factor Reumatóide (100 EU/ml).

## REFERENCES


1. Davies DJ, Moran JE, Niall JF et al. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus etiology? *Br Med J*; 1982, 285:606.
2. Kao RC, Wehner NG, Stubitz KM et. al. Proteinase 3: a distinct human polymorphonuclear leucocyte proteinase that produces emphysema in hamster. *J Clin Invest*; 1988, 82:1963-1973.
3. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S et. al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet*; 1985, 1:425-429.
4. Cohen Tervaert JW, van der Woude FJ, Fauci AS et. al. Association between active Wegener's granulomatosis and anti-cytoplasmic antibodies. (ACPA). *Arch Int Med*; 1989, 149: 2461-2465.
5. Gross WL, Schmitt WH, Csernok E. ANCA and associated diseases: immunodiagnostic and pathogenetic aspects. *Clin Exp Imm*; 1993, 91:1-12.
6. Nölle B, Specks U, Lüdemann J et. al. Anticytoplasmic autoantibodies, their immunodiagnostic value in Wegener's granulomatosis. *Ann Int Med*; 1989, 111:28-40.
7. Cohen Tervaert J W, Huitema MG, Hene RJ et. al. Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre; *Lancet*; 1990, 336:709-711.
8. Kallenberg CG, Mulder AH, Cohen Tervaert JW. Antineutrophil cytoplasmic antibodies: a still-growing class of autoantibodies in inflammatory disorders. *Am J Med*; 1992, 93:675-682.
9. Hagen EC, Ballieux BE, van Es LA et al. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: a review of the antigens involved, the assays, and the clinical and possible pathogenetic consequences. *Blood*; 1993, 81:1996-2002.
10. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health. 2007; (HHS Pub No [CDC] 93-8395).
11. Stoffel MP, Csernok C, Herzberg T et. al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against bactericidal/permeability increasing protein (BPI): a new seromarker for inflammatory bowel disease and associated disorders. *Clin Exp Immunol*; 1996, 104:54-59.
12. Jennette JC, Falk RJ. Diagnosis and management of glomerulonephritis presenting as acute renal failure. In. *Renal failures and transplantation, Medical clinics of North America* Eds. Mandal AK, and Hebert LA. Saunders Co; 1990, 74:893-908.





*For technical assistance please contact:*



 **IMMCO Diagnostics, Inc.**  
60 Pineview Drive  
Buffalo, NY 14228-2120 USA  
Telephone: (716) 691-0091  
Fax: (716) 691-0466  
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST  
E-Mail: [info@immcodiagnostics.com](mailto:info@immcodiagnostics.com)

*or your local product distributor*



EMERGO Europe  
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,  
The Netherlands  
[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)

NOV2014

Document No. PI5162