

Instruction

WIESLAB[®] Anti-GBM, ANCA screen kit

Enzyme immunoassay for detection of
autoantibodies against GBM, Proteinase 3 (PR3-ANCA)
and Myeloperoxidase (MPO-ANCA)

Double microtitration strips (6x16) 96 wells
Store the kit at +2-8° C
For in vitro diagnostic use only



Document No. E-23-0158-06
May, 2015

WIESLAB[®] Anti-GBM, ANCA screen kit

English:	page	2
Français:	page	12
Español:	página	23
Deutsch:	Seite	30
Italiano:	pagina	37
Dansk:	side.....	43
Norsk:	side.....	49
Svenska:	sida.....	56

INTENDED USE

The Wieslab[®] Anti-GBM, ANCA Screening Test Kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative detection of antibodies to glomerular basement membrane (GBM), Proteinase-3 (PR3) and Myeloperoxidase (MPO) in human sera. The assay is used to detect antibodies in a single serum specimen. The results of the assay are to be used as an aid to the diagnosis of reno-pulmonary syndromes and rapidly progressive glomerulonephritis, especially Goodpasture syndrome (GP), Wegener's granulomatosis (WG) and microscopic polyangiitis (MP). The assay is intended for use in patients with signs and symptoms consistent with GP, WG, and MP. It is not intended for screening a healthy population.

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

A positive result should always be confirmed by a semi-quantitative assay.

Summary and explanation

Goodpasture syndrome is characterised by lung haemorrhage, renal failure and the presence of anti-GBM antibodies. The diagnosis is based on clinical signs of lung haemorrhage and rapidly progressive glomerulonephritis combined with findings of anti-GBM antibodies. As there are several other autoimmune diseases which may present with similar symptoms, this kit is a useful aid in differentiation. Less than one third of patients with reno-pulmonary syndromes have antibodies against the Goodpasture antigen, the majority having either proteinase 3-ANCA or myeloperoxidase-ANCA (1). Indirect immunofluorescence was formerly used to detect anti-GBM antibodies. When the first ELISA based on a collagenase digest was published in 1981, assays using crude extracts were the only alternative. In 1984, the specific antigen was shown to derive from the C-terminal domain of type IV collagen ($\alpha 3$ chain) (2, 3) and sensitive and specific assays were subsequently developed (4). The molecular nature of the Goodpasture antigen is reviewed in (5). The antigen is characterised by a restricted tissue distribution, occurring mainly in kidney and lungs.

ANCAs (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) are a family of autoantibodies related to vasculitis and inflammatory disorders. Since 1985, when c-ANCA was shown to be related to Wegener's granulomatosis (6), interest in ANCAs has steadily increased, and today these antibodies are considered to be major diagnostic tools for the investigation of systemic vasculitis.

The first method to detect ANCA was indirect immunofluorescence (IIF) performed on ethanol fixed granulocytes (7). This method yields two patterns, a cytoplasmic staining of the granulocyte denoting the presence of c-ANCAs, and a perinuclear staining denoting the presence of p-ANCAs. IIF was followed by ELISAs using the purified proteins (8).

The granulocyte is full of granules each with many different proteins. It was early shown that antibodies from systemic vasculitis patients bind to the alpha fraction containing the azurophil granules. The most important proteins were proteinase 3 (PR3)(9,10) and myeloperoxidase (MPO)(11,12). PR3 is a serine protease with a molecular weight of 29kD, and MPO is a dimer with a molecular weight of 140kD. Thus antibodies to proteinase 3 are termed PR3-ANCA, and antibodies to myeloperoxidase are termed MPO-ANCA.

Approximately 80-90% of WG patients manifest PR3-ANCA and 5-15% MPO-ANCA. One category of vasculitis is microscopic polyangiitis (MP). Most patients with active MP are characterised by positive ANCA test results, MPO-ANCA being more frequent than PR3-ANCA (13).

The Wieslab[®] anti-GBM, ANCA screening kit has been clinically evaluated (14).

Principle of the Wieslab[®] ANCA screen kit

The wells of a double microtiterstrip are coated with purified (Bovine) GP antigen (A1, A2, B1 and B2), purified (Human Neutrophils) proteinase 3 (C1, C2, D1 and D2), purified (Human Neutrophils) myeloperoxidase (E1, E2, F1 and F2), HSA (Human Serum Albumin) (G1, G2) and empty (H1, H2). G and H are blank wells. During the first incubation, specific antibodies in diluted serum will bind to the antigen coating. The wells are then washed to remove unbound antibodies and other components. A conjugate of alkaline phosphatase labelled (goat) antibodies to human IgG binds to the antibodies in the wells in the second incubation. After a further washing step, detection of specific antibodies is obtained by incubation with substrate solution. The amount of bound antibodies correlates to the colour intensity and is measured as absorbance (optical density (OD)).

Warnings and precautions

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



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Warning

Contains ProClin 300:

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

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

Specimen collection

The anti-GBM, ANCA screen assay is for use with serum. Handle as if capable of transmitting infections agents.

Avoid using sera which are icteric, lipemic and hemolyzed.

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

Store serum between 2-8 °C if testing will take place within five days. If specimens are to be kept for longer periods, store at -20 °C or colder.

Do not use a frost-free freezer because it may allow the specimens to go through freeze-thaw cycles and degrade antibody. Samples that are improperly stored or are subjected to multiple freeze-thaw cycles may yield spurious results.

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

Kit components and storage of reagents

- One frame with doublestrips (6x (2x8) wells) coated with Goodpasture antigen (Bovine source), purified proteinase 3 (Human Neutrophil source) and myeloperoxidase (Human Neutrophil source), one lid sealed in a foil pack with a dry pack.
- 0.75 mL negative control (NC) containing human serum in diluent (green colour).
- 0.75 mL positive control (PC) containing human serum in diluent (red colour).
- 13 mL conjugate containing alkaline phosphatase-labelled (Goat) antibodies to human IgG (blue colour).
- 32 mL Diluent (Dil) containing PBS (reddish colour).
- 13 Substrate pNPP.
- 30 mL Wash solution 30x concentrated.

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

Materials or equipment required but not provided

Microplate reader with filter 405 nm. NaCl, Tween 20 and distilled water for preparing more washing solution.

Washer for strips, absorbent tissue, tubes and a timer. Precision pipettes with disposable tips.

PROCEDURE

All solutions should be used at room temperature.

Remove only the number of wells needed for testing, resealing the aluminium package carefully.

If the assay is performed without a shaker, incubation times should be adjusted as follows: serum incubation 10 minutes, no change; conjugate incubation 20-30 minutes; substrate incubation 20-30 minutes.

Preparation of washing solution

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

Dilution of serum and incubation

1. Pipet 75 µL diluent (Dil) into each well of a double microtitre strip (not G2+H2).
2. Pipet 25 µL negative control (NC) into each of wells A2, C2 and E2.
3. Pipet 25 µL positive control (PC) into each of wells B2, D2 and F2.
4. Pipet 25 µL patient serum into each well of column 1 according to the schema below. Put on the lid and incubate for 10 minutes on a shaker.

	Column 1	Column 2	Antigen coat
A	75 µL Dil + 25 µL serum	75 µL Dil + 25 µL NC	GP antigen
B	75 µL Dil + 25 µL serum	75 µL Dil + 25 µL PC	GP antigen
C	75 µL Dil + 25 µL serum	75 µL Dil + 25 µL NC	PR3 antigen
D	75 µL Dil + 25 µL serum	75 µL Dil + 25 µL PC	PR3 antigen
E	75 µL Dil + 25 µL serum	75 µL Dil + 25 µL NC	MPO antigen
F	75 µL Dil + 25 µL serum	75 µL Dil + 25 µL PC	MPO antigen
G	75 µL Dil + 25 µL serum		HSA as blank
H	75 µL Dil + 25 µL serum		Empty as blank

After serum incubation

Wash 4 times with washing solution, filling and emptying the wells each time; after the last wash, empty the wells by tapping the strip on an absorbent tissue.

Adding conjugate

Add 100 µL conjugate to each well. Put on the lid and incubate for 10 minutes on a shaker (without a shaker, incubate 20-30 minutes).

After conjugate incubation

Wash 4 times with washing solution, filling and emptying the wells each time; after the last wash, empty the wells by tapping the strip on an absorbent tissue.

Adding substrate

Add 100 µL substrate pNPP to each well, incubate for 10-20 minutes (without a shaker, incubate 20-30 minutes). Read the absorbance at 405 nm on a microplate reader at 10-20 minutes after substrate addition and 20-30 minutes after substrate addition without a shaker.

Calculations

An optical density (OD) ratio for each patient sample is calculated as follows:

$$\text{OD ratio} = \frac{\text{OD patient sample}}{\text{OD of negative control}}$$

The patient sample is negative if the OD ratio is < 3.0. Equivocal if the OD ratio is 3.0-4.0 and positive if the OD ratio is > 4.0.

Quality Control

The OD for the NC for each antigen should be < 0.3.

The OD for the PC for each antigen should be > 0.9

If the PC or NC values are not within their respective ranges, the test should be considered invalid and the test should be repeated.

The OD value for the patient sample in the HSA and in the uncoated wells should be < 0.3.

If the OD value for the patient sample is >0.3 in some of the HSA or uncoated wells or positive on more than one antigen the sample may contain unspecific reactivities.

Sometimes unspecific reactivities will disappear with a higher dilution.

The negative and positive controls are intended to monitor for substantial reagent failure. The positive control will not ensure precision at the assay cut-off. It is recommended to assay an additional control at the assay cut-off.

Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organisations. Refer to NCCLS C24-A for guidance on appropriate QC practices.

Interpretation of results

A sample with a OD ratio of:

< 3.0 = **Negative** 3.0 – 4.0 = **Equivocal**; Retest, if still equivocal retest by an alternative method
> 4.0 = **Positive**

Owing to the high sensitivity of the screening kit, in a few percent of cases samples with an OD ratio > 3 may be found to be negative in a quantitative assay.

An equivocal or a positive test result should always be confirmed by a quantitative assay.

Limitations

The individual patient's OD ratio can not be used as a measure of disease severity, as antibodies from different patients may differ from each other in affinity. Thus, it is difficult to obtain an absolute standardization of results. The test should not be relied upon as the sole basis of decisions on clinical therapy, but should be used in combination with clinical symptoms and the results of other available tests.

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

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

Expected results

ANCA and anti-GBM are rarely found in normal healthy individuals. The anti-GBM, ANCA screening kit was tested with 133 normal sera. 126 were found to be negative, 7 sera were in the equivocal range. The annual incidence of Goodpasture syndrome is one per million and one new patient with PR3-ANCA is expected per 100,000 inhabitants per year. Around 10% of patients with WG are negative in both IIF and ELISA.

Anti-GBM was tested with 38 GP sera, 38 were found to be positive.

The MPO-ANCA was tested with 42 WG sera, 4 were found to be positive. The MPO-ANCA was tested with 43 MP sera, 20 were found to be positive. The PR3-ANCA was tested with 42 WG sera, 39 were found to be positive. The PR3-ANCA was tested with 43 MP sera, 21 were found to be positive. (Table 1)

Performance characteristics

Table 1. Clinical sensitivity and specificity. A total of 326 frozen retrospective sera with clinical characterisation were assayed. The following table summarises the results

Control and Disease groups	Total	Negative < 3			Equivocal 3-4			Positive >4		
		GBM	PR3	MPO	GBM	PR3	MPO	GBM	PR3	MPO
Blood donors: (NS)	131	128	131	127	3	0	4	0	0	0
WG:	42	-	3	37	-	0	1	-	39	4
MP:	43	-	20	23	-	2	0	-	21	20
SLE:	31	31	31	24	0	0	2	0	0	*5
RA:	41	41	41	40	0	0	1	0	0	0
GP:	38	0	-	-	0	-	-	38	-	-

WG = Wegener's granulomatosis,
SLE = systemic lupus erythematosus

MP = microscopic polyangiitis
GBM = glomerular basement membrane

RA = rheumatoid arthritis

* All 5 sera was positive in quantitative MPO-ANCA test.

Clinical sensitivity (Equivocal samples are not included in the calculation)

PR3-ANCA

WG = 39/42 = 92.9 % 95% CI = 84.9 – 100%. MP = 21/41 = 51.2 % 95% CI = 35.6 – 66.8%

MPO-ANCA

WG = 4/41 = 9.8 % 95% CI = 4.9 – 19.0%. MP = 20/43 = 46.5 % 95% CI = 31.3 – 61.7%

Anti-GBM

GP = 38/38 = 100 % 95% CI = 92.2 – 100%

Clinical specificity (Equivocal samples are not included in the calculation)

PR3-ANCA

SLE = 31/31 = 100 % 95% CI = 90.4 – 100%. NS = 131/13 = 100 % 95% CI = 97.7 – 100%
RA = 41/41 = 100 % 95% CI = 92.7 – 100%.

MPO-ANCA

SLE = 24/29 = 82.8 % 95% CI = 68.7 – 96.8% RA = 40/40 = 100 % 95% CI = 92.6 – 100%
NS = 127/127 = 100 % 95% CI = 97.6 – 100%

Anti-GBM

SLE = 31/3 = 100 % 95% CI = 90.4 – 100%. RA = 41/41 = 100 % 95% CI = 92.7 – 100%
NS = 128/128 = 100 % 95% CI = 97.6 – 100%

Table 2. Relative sensitivity and specificity of the Wieslab® anti-GBM, ANCA screen kit compared to an alternative semi-quantitative ELISA. A total of 216 frozen retrospective sera were assayed on the Wieslab® anti-GBM, ANCA screen kit and a semi-quantitative ELISA for PR-3 and MPO. Also, a total of 169 frozen retrospective sera were assayed on the Wieslab® anti-GBM, ANCA screen kit and an semi-quantitative ELISA for anti-GBM. The following table summarises the results.

Wieslab® anti-GBM, ANCA screen										
Semi-quantitative ELISA		Negative < 3			Equivocal			Positive >4		
		GBM	PR3	MPO	GBM	PR3	MPO	GBM	PR3	MPO
MPO-ANCA	Positive	0	0	1	0	0	0	0	0	23
PR3-ANCA	Positive	0	1	0	0	0	0	0	59	0
Anti-GBM	Positive	0	-	-	0	-	-	37	-	-
	Negative	128	152	182	3	2	4	0	0	0
	Equivocal	0	1	4	0	0	1	1	1	1
	Total	128	154	187	3	2	5	38	60	24

Relative sensitivity (Equivocal samples are not included in the calculation)

Relative sensitivity PR3-ANCA	= 59/60 = 98.3%	95% CI = 95.0 – 100%
Relative sensitivity MPO-ANCA	= 23/24 = 95.8%	95% CI = 87.7 – 100%
Relative sensitivity anti-GBM	= 37/37 = 100 %	95% CI = 92.0 – 100%

Relative specificity (Equivocal samples are not included in the calculation)

Relative specificity PR3-ANCA	= 152/152 = 100 %	95% CI = 98.0 – 100%
Relative specificity MPO-ANCA	= 182/182 = 100 %	95% CI = 98.4 – 100%
Relative specificity anti-GBM	= 128/128 = 100 %	95% CI = 97.7 – 100%

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

Table 3. Batch to batch variation was determined by testing three different samples. Results were obtained for 4 different batches.

Sample	Mean	SD	CV%	Sample	Mean	SD	CV%	Sample	Mean	SD	CV%
PR3	OD ratio			MPO	OD ratio			GBM	OD ratio		
2	37.5	3.8	10	3	16.8	2.2	13	1	21.8	2.1	9
5	24.3	3.6	15	6	31.5	1.9	6	4	29.0	2.2	4
8	35.5	2.4	7	9	28.3	1.5	5	7	33.8	2.4	7

Table 4. Inter-assay precision was determined by testing one sample. Results were obtained for six different runs.

Sample	Mean	SD	CV %	Sample	Mean	SD	CV %	Sample	Mean	SD	CV%
PR3	OD ratio			MPO	OD ratio			GBM	OD ratio		
PK	27.3	2.9	11	PK	17.3	3.8	21	PK	16.5	1.1	6
K5	12.1	1.2	10	K6	16.5	0.84	5	K4	3.6	0.25	7

Table 5. Intra-assay precision was determined by testing one sample in 22 wells.

Sample	Mean	SD	CV %	Sample	Mean	SD	CV %	Sample	Mean	SD	CV%
PR3	OD			MPO	OD			GBM	OD		
PK	1,3	0,07	6	PK	1,8	0,06	3	PK	1,2	0,19	16
K5	1,3	0,06	5	K6	1,46	0,07	5	K4	0,6	0,03	5

Troubleshooting

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

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

- 1. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Van Es L et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. Lancet 1985;i:425-429.**
- 2. Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): Manual of biological markers of disease. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers; 1993:A9,1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjolín C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). J Immunol Methods 1990;127:139-145.
- 4. Wieslander J.** How are anti neutrophil cytoplasmic autoantibodies detected? Am J Kidney Dis 1991;18:154-158.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Ludemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. Nature 1990;346:520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): Manual of Biological Markers of Disease. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. N Engl J Med 1988;318:1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): Manual of Biological Markers of Disease. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 9. Jennette C, Falk R.** Small vessels vasculitis. N Engl J Med 1997, 337, 1512-1525.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. Kidney Int 1995, 48, 844-850.
- 11. Cohen Tervaert JW, Huitema MG, Hene RJ, Sluiter WJ, The T, van der Hem GK et al.** Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre. Lancet 1990; 336:709-711.
- 12. Savige J, Davis D, Falk DJ, Jennette JC, Wiik A.** ANCA and associated diseases; A review of clinical and laboratory features. Kidney Int 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. Am J Clin. Pathol 1999, 111, 507-513.
- 14. Westman K, Bygren P, Eilert I, Wiik A, Wieslander J.** Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCAs; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndroms. Nephrol Dial transplant 1997, 12, 1863-1868.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Symbolforklaring. Förklaringar till symboler.

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

Ag	Antigen. Antigène. Antigeno, Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontrol. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

INSTRUCTION ABREGEE SUR LE MANIEMENT ET L'EXECUTION

CETTE TROUSSE EST UTILISEE POUR LE DIAGNOSTIC *IN VITRO*

La trousse Wieslab® anti-GBM, ANCA screening test utilise une méthode immuno-enzymatique (ELISA) pour la détermination qualitative *in vitro* des anticorps IgG anti-membrane basale glomérulaire (GBM), anti-protéinase 3 (PR3) et anti-myéloperoxydase (MPO) dans le sérum humain.

Cette technique permet de détecter les anticorps dans un seul échantillon sérique. Les résultats de la détermination sont utilisés comme aide au diagnostic des syndromes pneumo-rénaux et d'une glomérulonéphrite rapidement progressive, notamment le syndrome de Goodpasture (GP), la granulomatose de Wegener (GW) et la périartérite microscopique (PM).

Cette trousse est prévue pour être utilisée chez les patients présentant des symptômes et des signes compatibles avec le syndrome de Goodpasture, la granulomatose de Wegener et la périartérite microscopique. Elle n'est pas prévue pour le dépistage d'une population saine. Un résultat positif devrait être toujours confirmé par un dosage semi-quantitatif.

Résumé et commentaires

Le syndrome de Goodpasture est caractérisé par une hémorragie pulmonaire, une atteinte rénale et la présence d'anticorps anti-GBM. Le diagnostic repose sur des signes cliniques d'hémoptysie et d'une glomérulonéphrite rapidement progressive combinés à la recherche d'anticorps anti-GBM. Puisqu'il existe d'autres maladies auto-immunes graves pouvant présenter des symptômes similaires, cette trousse est utile pour différencier entre ces différentes maladies.

Moins d'un tiers de patients atteints de syndromes pneumo-rénaux ont des anticorps anti-antigène Goodpasture, la majorité possèdent soit protéinase 3-ANCA soit myéloperoxydase-ANCA.

L'immunofluorescence indirecte a été utilisée dans le passé pour détecter les anticorps anti-GBM.

Lorsque le premier test ELISA basé sur une digestion à la collagénase fut publié en 1981, les dosages utilisant des extraits bruts sont devenus la seule méthode alternative. En 1984, on a montré que l'antigène spécifique provient du domaine globulaire C-terminal de la chaîne $\alpha 3$ du collagène IV et des dosages sensibles et spécifiques ont été ensuite développés. La nature moléculaire de l'antigène Goodpasture a été réexaminée par Hudson BG et coll. L'antigène est caractérisé par une distribution limitée du tissu qui apparaît principalement dans les reins et les poumons.

Les ANCAs (anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles) constituent une famille d'autoanticorps liés aux vascularites et aux troubles inflammatoires. Depuis 1985, lorsqu'on a montré la relation entre le c-ANCA et la granulomatose de Wegener, l'intérêt pour les ANCAs a augmenté sans cesse et aujourd'hui ces anticorps sont considérés comme le principal outil diagnostique pour la recherche de la vascularite systémique.

La première méthode pour la détection des ANCAs était l'immunofluorescence indirecte (IFI) réalisée sur des granulocytes fixés à l'éthanol. Cette méthode comporte deux modèles, une coloration cytoplasmique des granulocytes démontrant la présence de c-ANCAs et une coloration périnucléaire démontrant la présence de p-ANCAs. La méthode IFI fut suivie des tests ELISA utilisant des protéines purifiées.

Le granulocyte est rempli de granules contenant chacun plusieurs protéines. On découvrit très tôt que les anticorps de patients atteints de vascularite systémique se liaient à la fraction alpha contenue dans les granules azurophiles. Les plus importantes protéines étaient la protéinase 3 (PR3) et la myéloperoxydase (MPO). La PR3 est une sérine protéase de poids moléculaire 29 kDa et la MPO est un dimère de poids moléculaire 140 kDa. Ainsi, les anticorps anti-protéinase 3 sont dénommés PR3-ANCA et les anticorps anti-myéloperoxydase sont dénommés MPO-ANCA.

Environ 80-90 % des patients atteints de granulomatose de Wegener (GW) présentent des PR3-ANCA et 5-15 % des MPO-ANCA. Une catégorie de vascularite est la périartérite microscopique (PM). La plupart des patients avec PM active sont caractérisés par des résultats positifs du dosage des ANCA, la MPO-ANCA étant plus fréquente que la PR3-ANCA.

La trousse Wieslab® anti-GBM, ANCA screening a été évaluée du point de vue clinique.

Description de la méthode

Cette trousse utilise une technique ELISA basée sur l'utilisation de double barrettes de microtitration avec des puits revêtus d'antigène GBM purifié (d'origine bovine) (puits A1, A2, B1 et B2), de protéinase 3 purifiée (d'origine neutrophile humaine) (puits C1, C2, D1 et D2), de myéloperoxydase purifiée (d'origine neutrophile humaine) (puits E1, E2, F1 et F2), sérum albumine humaine (G1, G2) ou non revêtus (H1, H2). Les puits G et H sont des puits blancs. Le sérum à doser est dilué et mis à incuber dans les puits de la microplaque. Lors de cette étape les anticorps spécifiques anti-GBM, anti-MPO ou anti-PR3 vont se fixer aux antigènes des puits. Les anticorps non fixés et autres éléments sont éliminés par lavage. Ensuite, des immuno-globulines de chèvre anti-IgG humaines conjuguées à la phosphatase alcaline sont ajoutées. Lors de l'incubation, le conjugué se lie au complexe antigène-anticorps fixé au puits. Après un nouveau lavage, la détection des anticorps spécifiques est obtenue par incubation avec la solution de substrat. La quantité d'anticorps liés est proportionnelle à l'intensité de la coloration qui est mesurée en termes d'absorbance (densité optique = D.O.).

Prelevement des echantillons

Le test est à utiliser avec des échantillons sériques. Manipuler comme s'ils étaient capables de transmettre des agents infectieux.

Eviter d'utiliser du sérum ictérique, lipémique ou hémolysé. Le sérum inactivé par la chaleur peut donner des réactivités non spécifiques et ne devrait pas être utilisé.

Conserver le sérum à 2-8° C si le dosage doit être réalisé dans les cinq jours. Pour des plus longues périodes, conserver le sérum à -20° C ou à une température inférieure. Ne pas utiliser de congélateurs à décongélation automatique, qui peuvent faire subir à l'échantillon des cycles de congélation-décongélation dégradant l'anticorps. Les échantillons qui ont été conservés de façon inadéquate ou qui ont subi des cycles de congélation-décongélation peuvent donner des résultats faux.

Precautions d'emploi

Réactifs contenant des substances d'origine humaine

Produit potentiellement infectieux.

Toutes les unités de sérum et de plasma utilisées pour la fabrication des composants de cette trousse ont été analysées et ont été trouvées négatives en Ag HBS, en anticorps anti-VHC et en anticorps anti-VIH 1/2. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux. C'est pourquoi il faudra le manipuler avec précaution.

Toutes les solutions contiennent du ProClin 300 comme conservateur. Ne jamais pipeter avec la bouche et ne pas laisser les réactifs ou les échantillons de patient rentrer en contact avec la peau. Les réactifs contenant du ProClin 300 peuvent être irritants. Eviter le contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, laver avec une grande quantité d'eau.

Les concentrations d'anti GBM, ANCA dans un échantillon donné, déterminées par des trousse provenant de différents fabricants, peuvent varier en raison des différences dans les méthodes de dosage et de la spécificité du réactif.

On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le coffret sur demande auprès d'Euro Diagnostica.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Attention

Contient ProClin 300:

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

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

Matériel nécessaire mais non fourni

Micropipettes de précision avec embouts jetables.

Récipients propres en plastique ou en verre pour la dilution du tampon de lavage et des sérums de patients.

Dispositif de lavage des microplaques, papier absorbant, tubes et minuterie.

Lecteur de plaque avec filtre à 405 nm.

Reactifs

N° de référence MPO 103X : trousse pour 96 déterminations.

Dès réception, conserver tous les réactifs entre 2 et 8°C.

Microplaques revêtues. Une plaque de 96 puits (6 x (2 x 8)), revêtus d'antigène Goodpasture (bovine), de protéinase 3 (humaine) et de myeloperoxydase (MPO) d'origine humaine purifiée et un couvercle hermétique, conditionnés dans un sachet d'aluminium contenant un déshydratant.

Tampon diluant (couleur rougeâtre). Un flacon de 32 mL contenant une solution tamponnée PBS, prête à l'emploi, avec 0,05 % de ProClin™ 300 comme conservateur.

Contrôle négatif (couleur verte). Un flacon de 0,75 mL, contenant du sérum humain négatif pour les IgG anti-GBM, anti-PR3 et anti-MPO dans le tampon diluant. Prêt à l'emploi.

Contrôle positif (couleur rouge). Un flacon de 0,75 mL, contenant du sérum humain positif pour les IgG anti-GBM, anti-PR3 et anti-MPO dans le tampon diluant. Prêt à l'emploi.

Conjugué (couleur bleue). Un flacon de 13 mL contenant des immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines purifiées, conjuguées à de la phosphatase alcaline. Prêt à l'emploi.

Substrat. Un flacon de 13 mL contenant de p-nitrophényl phosphate

Tampon de lavage concentré (X 30). Un flacon de 30 mL contenant une solution concentrée, composée de 9 g/l de NaCl et 0,05 % de Tween 20.

Conservation et stabilité des réactifs

•Tous les réactifs de la trousse sont prêts à l'emploi à l'exception du tampon de lavage et doivent être conservés à 2-8° C.

•Retirer uniquement le nombre de barrettes nécessaire au dosage et refermer soigneusement le sachet d'aluminium.

Préparation des réactifs

Avant de démarrer la procédure de dosage, tous les composants de la trousse doivent être amenés à température ambiante pour éviter la condensation. Calculer le nombre de puits nécessaire.

Microplaque. Le sachet d'aluminium avec le déshydratant doit être soigneusement rescellé, après avoir retiré les barrettes nécessaires au dosage.

Solution de lavage. En cas d'observation de cristaux de sel dans le flacon contenant la solution de lavage concentrée, placer le flacon dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à dissolution complète des cristaux avant de procéder à la dilution de la solution de lavage. Diluer 30 mL de solution de lavage concentrée (X30) dans 870 mL d'eau distillée. Conservée à 2-8° C, la solution de lavage diluée est stable jusqu'à la date de péremption de la trousse.

Des résultats valides et reproductibles sont obtenus uniquement en suivant strictement la notice d'emploi et en utilisant les réactifs spécifiques de la trousse.

PROCEDURE DE DOSAGE

1. Couper le sachet d'aluminium et extraire le nombre de barrettes nécessaire (voir « Préparation des réactifs »).
2. Distribuer 75 µL de tampon diluant (Dil) dans chaque puits d'une double barrette (sauf G2 et H2).
3. Distribuer 25 µL de contrôle négatif (CN) dans chacun des puits A2, C2 et E2.
4. Distribuer 25 µL de contrôle positif (CP) dans chacun des puits B2, D2 et F2.
5. Distribuer 25 µL d'échantillon patient dans chaque puits de la colonne 1, selon le tableau de distribution ci-après.

Tableau de distribution des échantillons

	Colonne 1	Colonne 2	Antigène du puits
A	75 µL Dil + 25 µL sérum pat. 1	75 µL Dil + 25 µL CN	GBM
B	75 µL Dil + 25 µL sérum pat. 1	75 µL Dil + 25 µL CP	GBM
C	75 µL Dil + 25 µL sérum pat. 1	75 µL Dil + 25 µL CN	PR3
D	75 µL Dil + 25 µL sérum pat. 1	75 µL Dil + 25 µL CP	PR3
E	75 µL Dil + 25 µL sérum pat. 1	75 µL Dil + 25 µL CN	MPO
F	75 µL Dil + 25 µL sérum pat. 1	75 µL Dil + 25 µL CP	MPO
G	75 µL Dil + 25 µL sérum pat. 1		Sérum albumine humaine (blanc)
H	75 µL Dil + 25 µL sérum pat. 1		Puits non revêtu (blanc)

6. Recouvrir la microplaque et la laisser incuber pendant 10 min (sous agitation) à température ambiante (20-25° C).
7. Après incubation, laver les puits quatre fois avec 300 µL de solution de lavage par puits, en remplissant et vidant les puits à chaque fois. Après le dernier lavage, tapoter délicatement les barrettes sur du papier absorbant.
8. Ajouter 100 µL de conjugué dans chaque puits.
9. Recouvrir la microplaque et la laisser incuber pendant 10 min à température ambiante (20-25°C) sous agitation (incuber 20-30 minutes en statique).
11. Après incubation, laver les puits de nouveau (voir 7.).
12. Ajouter 100 µL de solution de substrat dans chaque puits et incuber la microplaque, pendant 10-20 min à température ambiante (20-25°C) sous agitation (incuber 20-30 minutes en statique).
13. Lire l'absorbance sur un lecteur de microplaque à 405 nm.

	Contrôle négatif	Contrôle positif	Echantillon
Tampon diluant	75 µL	75 µL	75 µL
Contrôle négatif	25 µL	-	-
Contrôle positif	-	25 µL	-
Echantillon	-	-	25 µL
Incuber pendant 10 min à T.A. (sous agitation), laver 4 fois avec la solution de lavage			
Conjugué	100 µL	100 µL	100 µL
Incuber pendant 10 min à T.A. sous agitation (ou 20-30 min en statique). Laver 4 fois avec la solution de lavage			
Substrat	100 µL	100 µL	100 µL
Incuber pendant 10-20 min à T.A. sous agitation (20-30 min en statique)			
Lecture photométrique à 405 nm			

Calcul des resultats

Lire les valeurs d'absorbance à 405 nm.

Le rapport D.O. pour chaque échantillon de patient est calculé de la façon suivante :

DO échantillon patient pour chaque antigène

Rapport DO = _____
DO du contrôle négatif pour chaque antigène

L'échantillon de patient est négatif si le rapport DO est inférieur à 3,0 et positif si le rapport DO est supérieur à 4,0.

Contrôle de qualité

1. La valeur de D.O. du contrôle négatif pour chaque antigène doit être inférieure à 0,3.
2. La valeur du contrôle positif pour chaque antigène doit être supérieure à 0,9.

Si l'une des valeurs ne donne pas les résultats attendus, le test doit être considéré comme non valide et il doit être refait. L'échantillon de patient peut donner des réactions non spécifiques s'il est positif pour les 2 antigènes et doit être dosé de nouveau avec un test quantitatif. Parfois les réactions non spécifiques peuvent disparaître avec une dilution plus élevée.

Interprétation des résultats

Résultat	Interprétation
Rapport D.O. < 3,0	Négatif
$3,0 \leq \text{rapport D.O.} \leq 4,0$	Douteux*
Rapport D.O. > 4,0	Positif

* Doser de nouveau, si encore douteux, doser par une autre méthode ou prélever un nouvel échantillon.

Des échantillons qui ont des valeurs dans la zone grise doivent être confirmés par un dosage quantitatif. En raison de la haute sensibilité de la trousse screening, un faible pourcentage d'échantillons ayant un rapport DO dans la zone des valeurs faiblement positives (rapport DO 3-4) peuvent être trouvés négatifs dans un dosage quantitatif.

Limites du dosage

Le titre d'anticorps d'un patient ne doit pas être utilisé pour mesurer la gravité de la maladie, puisque des anticorps de différents patients peuvent différer les uns des autres par leur affinité. Par conséquent, il est difficile d'obtenir une standardisation absolue des résultats.

Les décisions thérapeutiques ne devraient pas être prises sur la base unique des résultats du test, ceux-ci doivent être utilisés associés aux symptômes cliniques et aux résultats d'autres tests disponibles.

Des sérums provenant de patients atteints d'autres maladies auto-immunes et de sujets sains peuvent contenir d'auto-anticorps pouvant provoquer d'éventuelles réactions croisées. Quelques sujets peuvent être positifs vis à vis des anticorps anti-MPO avec peu ou pas de signes cliniques de maladie. D'autre part, quelques patients atteints de maladie active peuvent avoir des concentrations indétectables de ces anticorps.

La thérapie immunosuppressive ne devrait pas être mise en place sur la base d'un résultat ANCA positif. Le début ou le changement du traitement ne devrait pas reposer sur le seul changement de concentration des ANCA, mais plutôt sur une observation clinique approfondie.

Résultats attendus

On trouve rarement des ANCA et des anti-GBM chez les sujets sains. La trousse anti-GBM, ANCA screening a été évaluée sur 133 sérums « normaux ». 126 sérums ont donné un résultat négatif et 7 ont donné un résultat douteux. L'incidence annuelle du syndrome de Goodpasture est d'un nouveau cas par million d'individus et un nouveau patient portant des PR3-ANCA est attendu par 100.000 individus et par an. Environ 10 % des patients atteints de granulomatose de Wegener (GW) sont négatifs aussi bien par immunofluorescence indirecte (IFI) que par ELISA.

Les anti-GBM ont été dosés dans 38 sérums de patients atteints du syndrome de Goodpasture, 38 ont été trouvés positifs.

Les MPO-ANCA ont été dosés dans 42 sérums de patients atteints de GW, 4 ont été trouvés positifs. Les MPO-ANCA ont été dosés dans 43 sérums de patients atteints de PM, 20 ont été trouvés positifs. Les PR3- ANCA ont été dosés dans 42 sérums de patients atteints de GW, 39 ont été trouvés positifs. Les PR3- ANCA ont été dosés dans 43 sérums de patients atteints de PM, 21 ont été trouvés positifs (tableau 1).

PERFORMANCES DU DOSAGE

Tableau 1. Spécificité et sensibilité diagnostiques

Une étude rétrospective sur un total de 326 échantillons congelés, cliniquement caractérisés (par IFA, biopsie et cadre clinique), a été réalisée avec la trousse anti-GBM, ANCA screening. Le tableau suivant résume les résultats :

Contrôles et groupes de maladie	n	Négatif (<3)			Douteux (3-4)			Positif (>4)		
		GBM	PR3	MPO	GBM	PR3 3	MPO	GBM	PR3	MPO
Donneurs sains (DS)	131	128	131	127	3	0	4	0	0	0
Granulomatose de Wegener (GW)	42	-	3	37	-	0	1	-	39	4
Périartérite microscopique (PM)	43	-	20	23	-	2	0	-	21	20
Lupus érythémateux disséminé (LED)	31	31	31	24	0	0	2	0	0	*5
Polyarthrite rhumatoïde (PR)	41	41	41	40	0	0	1	0	0	0
Syndrome de Goodpasture (GP)	38	0	-	-	0	-	-	38	-	-

* Tous les échantillons étaient positifs avec la méthode semi-quantitative MPO-ANCA.

Sensibilité diagnostique (les échantillons douteux ont été exclus des calculs)

PR3-ANCA : GW = 39/42 = 92,9 % **MPO-ANCA:** GW = 4/41 = 9,8 %
 PM = 21/41 = 51,2 % PM = 20/43 = 46,5 %
Anti-GBM: GP = 38/38 = 100 %

Spécificité diagnostique (les échantillons douteux ont été exclus des calculs)

PR3-ANCA : LED = 31/31 = 100 % **MPO-ANCA:** LED = 24/29 = 83 %
 PR = 41/41 = 100 % PR = 40/40 = 100 %
 DS = 131/131 = 100 % DS = 127/127 = 100 %

Anti-GBM : LED = 31/31 = 100 %
 PR = 41/41 = 100 %
 DS = 128/128 = 100 %

Spécificité et sensibilité relatives de la trousse Wieslab® anti-GBM, ANCA screening comparée à une trousse ELISA semi-quantitative

Une étude rétrospective sur un total de 216 échantillons congelés a été réalisée avec la trousse anti-GBM, ANCA screening et avec une trousse semi-quantitative ELISA pour les anti-PR3 et anti-MPO. Dans cette étude, 169 échantillons congelés ont été également dosés avec la trousse anti-GBM, ANCA screening et avec une trousse semi-quantitative ELISA pour les anti-GBM. Le tableau suivant résume les résultats.

ELISA semi-quantitative		Wieslab® anti-GBM, ANCA screening								
		Négatif (< 3)			Douteux (3-4)			Positif (> 4)		
		GBM	PR3	MPO	GBM	PR3	MPO	GBM	PR3	MPO
MPO-ANCA PR3-ANCA Anti-GBM	Positif	0	0	1	0	0	0	0	0	23
	Positif	0	1	0	0	0	0	0	59	0
	Positif	0	0	0	0	0	0	37	0	0
	Négatif	128	152	182	3	2	4	0	0	0
	Douteux	0	1	4	0	0	1	1	1	1
	Total	128	154	187	3	2	5	38	60	24

Les sérums qui ont donné des résultats douteux ont été exclus des calculs.

Sensibilité relative PR3-ANCA=59/60= 98,3 %

Spécificité relative PR3-ANCA= 152/152 = 100 %

Sensibilité relative MPO-ANCA=23/24= 95,8 %

Spécificité relative MPO-ANCA= 182/182= 100 %

Sensibilité relative anti-GBM=37/37= 100 %

Spécificité relative anti-GBM = 128/128= 100 %

Précision intra-essai

La répétabilité ou la précision intra-essai a été déterminée sur deux échantillons pour chacun des trois anticorps, dosés en multiplets de 22 au cours de la même série de dosage. Les résultats sont donnés en ratio DO.

Echant PR3	Moy.	Ecart-type	CV %	Echant MPO	Moy.	Ecart-type	CV %	Echant GBM	Moy.	Ecart-type	CV %
CP	1,3	0,1	6	CP	1,8	0,1	3	CP	1,2	0,2	16
K5	1,3	0,1	5	K6	1,5	0,1	5	K4	0,6	0,03	5

Précision inter-essais

La reproductibilité ou la précision inter-essais a été déterminée sur deux échantillons pour chacun des trois anticorps, dosés en doublets au cours de 6 séries de dosage différentes. Les résultats sont donnés en ratio DO.

Echant PR3	Moy.	Ecart-type	CV %	Echant MPO	Moy.	Ecart-type	CV %	Echant. GBM	Moy.	Ecart-type	CV %
CP	27	2,9	11	CP	17	3,8	21	CP	17	1,1	6
K5	12	1,2	10	K6	17	0,8	5	K4	4	0,3	7

Précision inter-lots

La précision inter-lots a été déterminée sur trois échantillons pour chacun des trois anticorps, dosés en doublets. Les résultats ont été obtenus avec 4 lots différents de trousse.

Echant PR3	Moy.	Ecart-type	CV %	Echant. MPO	Moy.	Ecart-type	CV %	Echant. GBM	Moy.	Ecart-type	CV %
2	38	3,8	10	3	17	2,2	13	1	22	2,1	9
5	24	3,6	15	6	32	1,9	6	4	29	2,2	4
8	36	2,4	7	9	28	1,5	5	7	34	2,4	7

Cette trousse a fait l'objet d'un enregistrement à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (France) : le numéro d'enregistrement figure sur le conditionnement externe de la trousse.

CAUSES D'ERREUR

Problème	Cause possible :	Solution :
Valeurs des contrôles hors des intervalles	<ol style="list-style-type: none"> 1. Distribution des réactifs, temps et température de réaction erronés ; réactifs pas bien mélangés. 2. Contamination croisée des contrôles. 3. Mauvaise dilution. 4. Trajet optique sale 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vérifier temps et température d'incubation. Voir « Mauvaise précision » (ci-dessous). Refaire le dosage. 2. Pipeter avec soin. 3. Refaire le dosage. 4. Vérifier la présence de saleté ou des bulles d'air dans les puits. Nettoyer le fond de la plaque et relire.
Tous les résultats sont négatifs	<ol style="list-style-type: none"> 1. Un ou plusieurs réactifs n'ont pas été ajoutés ou ont été ajoutés dans le mauvais ordre. 2. Antigène des barrettes revêtues inactif. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vérifier la procédure. Vérifier s'il reste des réactifs. Refaire le dosage. 2. Vérifier la présence d'humidité dans les puits non utilisés. Nettoyer le fond de la plaque et relire.
Tous les puits sont jaunes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tampons ou réactifs contaminés. 2. Solution de lavage contaminée. 3. Mauvaise dilution du sérum. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vérifier toutes les solutions pour s'assurer qu'elles ne sont pas troubles. 2. Utiliser un récipient propre. Vérifier la qualité de l'eau utilisée pour préparer la solution. 3. Refaire le dosage.
Mauvaise précision	<ol style="list-style-type: none"> 1. CV% de l'appareil à pipeter supérieur à 5% ou échantillons ajoutés trop rapidement. 2. Sérum ou réactifs insuffisamment mélangés ou pas portés à température ambiante. 3. Ajout de réactifs trop lent ; intervalles de temps non reproductibles. 4. Trajet optique sale. 5. Lavage non reproductible ; présence de bulles d'air ou de liquide résiduel dans les puits à la fin du lavage. 6. Pipetage non reproductible. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vérifier le réglage de l'appareil à pipeter. Utiliser une technique reproductible. 2. Mélanger délicatement mais intimement tous les réactifs et les amener à température ambiante. 3. Développer une technique reproductible et utiliser des multipettes ou des distributeurs automatiques pour réduire les délais 4. Vérifier la présence de bulles d'air dans les puits. Nettoyer le fond de la plaque et relire. 5. Vérifier que tous les puits sont uniformément remplis et aspirés. Distribuer la solution de lavage de manière à dépasser le niveau de réactif dans les puits. Après le dernier lavage, vider les puits en tapotant les barrettes sur du papier absorbant. 6. Eviter les bulles d'air à l'extrémité des pipettes.

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

- 1. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Van Es L et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985;i:425-429.
- 2. Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers; 1993:A9,1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjolín C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990;127:139-145.
- 4. Wieslander J.** How are anti neutrophil cytoplasmic autoantibodies detected? *Am J Kidney Dis* 1991;18:154-158.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Ludemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990;346:520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988;318:1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 9. Jennette C, Falk R.** Small vessels vasculitis. *N Engl J Med* 1997, 337, 1512-1525.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Cohen Tervaert JW, Huitema MG, Hene RJ, Sluiter WJ, The T, van der Hem GK et al.** Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre. *Lancet* 1990; 336:709-711.
- 12. Savige J, Davis D, Falk DJ, Jennette JC, Wiik A.** ANCA and associated diseases; A review of clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin. Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Westman K, Bygren P, Eilert I, Wiik A, Wieslander J.** Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCAs; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndroms. *Nephrol Dial transplant* 1997, 12, 1863-1868.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Symbolforklaring. Förklaringar till symboler.

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

Ag	Antigen. Antigène. Antigeno, Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontrol. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

INSTRUCCIONES DE USO EN VERSIÓN BREVE AL ESPAÑOL

El kit de detección Wieslab® de anticuerpos anti-MBG y ANCA es un ensayo de inmunoenzimología (ELISA) para la detección cualitativa de anticuerpos frente a la membrana basal glomerular (MBG), la proteinasa 3 y la mieloperoxidasa en suero humano. El ensayo se utiliza para detectar anticuerpos en suero. Los resultados deben utilizarse como ayuda para el diagnóstico de síndromes renopulmonares y de glomerulonefritis de progresión rápida, especialmente el síndrome de Goodpasture (GP), la granulomatosis de Wegener (GW) y la poliangiitis microscópica (PM). El ensayo está indicado para su uso en pacientes con signos y síntomas que coinciden con los de GP, GW y PM. No está indicado para el cribado de una población sana.

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

Un resultado positivo debe confirmarse siempre mediante un análisis semicuantitativo.

Advertencias y precauciones

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Los componentes de suero humano utilizados en la preparación de los controles y los calibradores del kit dieron negativo en las pruebas para detectar la presencia de anticuerpos frente a los virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH 1 y 2) y de la hepatitis C (VHC), y frente al antígeno de superficie de la hepatitis B, realizados según los métodos aprobados por la FDA. Puesto que ningún método analítico puede garantizar totalmente la ausencia de VIH, VHC, VHB u otros agentes infecciosos, las muestras y los reactivos de origen humano deben manipularse como posibles agentes transmisores de infecciones.
- Los centros de control y prevención de enfermedades y los institutos nacionales de salud (de Estados Unidos) recomiendan que los agentes potencialmente infecciosos se manipulen según el nivel 2 de bioseguridad.
- Todas las soluciones contienen ProClin 300 como conservante. No debe pipetarse con la boca ni dejar que los reactivos o las muestras del paciente entren en contacto con la piel. Los reactivos que contienen ProClin pueden provocar irritación. Debe evitarse el contacto con la piel y los ojos. En caso de contacto, lavar la zona afectada con agua abundante.
- Las concentraciones de anticuerpos anti-MBG y ANCA en una muestra dada, determinadas mediante análisis de diferentes fabricantes, pueden variar debido a diferencias en los métodos analíticos y en la especificidad del reactivo.
- Pueden solicitarse a Euro Diagnostica las hojas de datos de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Atención

Contiene ProClin 300:

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

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

Obtención de muestras

El análisis de detección de anticuerpos anti-MBG y ANCA debe utilizarse con suero. Manipular como posible agente transmisor de infecciones.

Evitar el uso de sueros ictericos, lipidemicos y hemolizados.

Los sueros inactivados por calor pueden producir reactividades inespecificas y no deben utilizarse.

Almacenar el suero entre 2 °C y 8 °C si el análisis va a realizarse en el plazo de cinco días. Si las muestras deben conservarse durante períodos más prolongados, almacenar a una temperatura de -20 °C o inferior.

No utilizar congeladores antiescarcha, ya que las muestras pueden estar expuestas a ciclos de congelación y descongelación, lo que podría degradar los anticuerpos. Las muestras almacenadas de manera inadecuada o sujetas a varios ciclos de congelación y descongelación pueden dar lugar a resultados erróneos.

El NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) proporciona recomendaciones para el almacenamiento de muestras de sangre, (Procedimientos para la manipulación y el procesamiento de muestras de sangre – Normativa aprobada, H18A, 1990).

Componentes del kit y almacenamiento de reactivos

- Un soporte con tiras dobles (6× (2 × 8) pocillos) recubiertas con antígeno de Goodpasture (de origen bovino), proteinasa 3 purificada (de origen neutrofílico humano) y mieloperoxidasa (de origen neutrofílico humano), un tapa sellada en un envase de aluminio con una bolsa anihumedad.
- 0,75 mL de control negativo (CN) con suero humano en diluyente (color verde).
- 0,75 mL de control positivo (CP) con suero humano en diluyente (color rojo).
- 13 mL de conjugado de anticuerpos de cabra anti-IgG humana marcados con fosfatasa alcalina (color azul).
- 32 mL de diluyente (Dil) con PBS (color rojizo).
- 13 sustratos pNPP.
- 30 mL de solución de lavado concentrada 30x.

Todos los reactivos del kit están listos para su uso excepto la solución de lavado, y deben almacenarse a 2-8 °C.

Extraer únicamente el número de pocillos necesarios para el análisis y volver a sellar cuidadosamente el envase de aluminio.

Materiales o equipos necesarios no suministrados

Lector de microplacas con un filtro de 405 nm. NaCl, Tween 20 y agua destilada para preparar más solución de lavado.

Unidad de lavado para tiras, tejido absorbente, tubos y un temporizador. Pipetas de precisión con puntas desechables.

PROCEDIMIENTO

Todas las soluciones deben utilizarse a temperatura ambiente.

Extraer únicamente el número de pocillos necesarios para el análisis y volver a sellar cuidadosamente el envase de aluminio.

Si el análisis se realiza sin agitador, los tiempos de incubación deben ajustarse del modo siguiente: incubación del suero, 10 minutos, sin cambio; incubación del conjugado, 20-30 minutos; e incubación del sustrato, 20-30 minutos.

Preparación de la solución de lavado

Si observa cristales de sal en el frasco con solución de lavado concentrada, coloque el frasco en un baño de agua a 37 °C hasta que los cristales se hayan disuelto, antes de la dilución de la solución de lavado. Diluir 10 mL de la solución de lavado concentrada 30× en 290 mL de agua destilada. Si se almacena a 2-8 °C, la solución de lavado diluida es estable hasta la fecha de caducidad que figura en el kit.

Dilución del suero e incubación

1. Pipetear 75 µl de diluyente (Dil) en cada uno de los pocillos de una tira de microtitulación doble (salvo en G2 + H2).
2. Pipetear 25 µl de control negativo (CN) en cada uno de los pocillos de A2, C2 y E2.
3. Pipetear 25 µl de control positivo (CP) en cada uno de los pocillos de B2, D2 y F2.
4. Pipetear 25 µl de suero del paciente en cada uno de los pocillos de la columna 1 según el esquema siguiente. Colocar la tapa e incubar durante 10 minutos en un agitador.

	Columna 1	Columna 2	Recubrimiento de antígeno
A	75 µl Dil + 25 µl suero	75 µl Dil + 25 µl CN	Antígeno de GP
B	75 µl Dil + 25 µl suero	75 µl Dil + 25 µl CP	Antígeno de GP
C	75 µl Dil + 25 µl suero	75 µl Dil + 25 µl CN	Antígeno PR3
D	75 µl Dil + 25 µl suero	75 µl Dil + 25 µl CP	Antígeno PR3
E	75 µl Dil + 25 µl suero	75 µl Dil + 25 µl CN	Antígeno MPO
F	75 µl Dil + 25 µl suero	75 µl Dil + 25 µl CP	Antígeno MPO
G	75 µl Dil + 25 µl suero		HSA como blanco
H	75 µl Dil + 25 µl suero		Vacío como blanco

Tras la incubación del suero

Lavar 4 veces con solución de lavado; llenar y vaciar los pocillos cada vez. Después del último lavado, vaciar los pocillos golpeando suavemente la tira sobre un tejido absorbente.

Adición de conjugado

Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo. Colocar la tapa e incubar durante 10 minutos en un agitador (sin agitador, incubar durante 20-30 minutos).

Tras la incubación del conjugado

Lavar 4 veces con solución de lavado; llenar y vaciar los pocillos cada vez. Después del último lavado, vaciar los pocillos golpeando suavemente la tira sobre un tejido absorbente.

Adición del sustrato

Añadir 100 µl de sustrato pNPP a cada pocillo e incubar durante 10-20 minutos (sin agitador, incubar durante 20-30 minutos). Leer la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas a los 10-20 minutos después de la adición del sustrato y a los 20-30 minutos después de la adición del sustrato sin agitador.

Cálculos

El cociente de densidad óptica (DO) de cada muestra de paciente se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Cociente de DO} = \frac{\text{DO muestra del paciente}}{\text{DO del control negativo}}$$

La muestra del paciente es negativa si el cociente de DO es < 3,0. Es ambigua si el cociente es 3,0-4,0 y positiva si es > 4,0.

Control de calidad

La DO del CN de cada antígeno debe ser < 0,3.

La DO del CP de cada antígeno debe ser > 0,9.

Si los valores del CP o CN no se encuentran dentro de sus intervalos respectivos, la prueba debe considerarse no válida y debe repetirse.

El valor de la DO de la muestra del paciente en los pocillos recubiertos de HSA y en los no recubiertos debe ser $< 0,3$.

Si el valor de la DO de la muestra del paciente es $> 0,3$ en algunos de los pocillos recubiertos de HSA o no recubiertos, o es positivo en más de un antígeno, puede que la muestra contenga reactividades inespecíficas.

En ocasiones, las reactividades inespecíficas desaparecerán con una dilución superior.

Los controles negativo y positivo tienen como objetivo controlar un fallo importante del reactivo. El control positivo no garantiza la precisión en el valor de corte del análisis. Se recomienda analizar otro control en el valor de corte del análisis.

Pueden analizarse controles adicionales de acuerdo con las directrices o requisitos de las normativas locales, estatales y/o federales, o según las instituciones autorizadas. Consultar el documento C24-A del NCCLS para obtener información sobre prácticas de control de calidad adecuadas.

Interpretación de los resultados

Una muestra con un cociente de DO de:

$< 3,0$ = **negativa**

$> 4,0$ = **positiva**

$3,0-4,0$ = **ambigua**. Repetir el análisis y si vuelve a ser ambigua, analizar con un método alternativo.

Debido a la elevada sensibilidad del kit de detección, en un bajo porcentaje de casos, las muestras con un cociente de DO > 3 pueden dar negativo en un análisis cuantitativo.

Una prueba ambigua o positiva debe confirmarse siempre mediante un análisis cuantitativo.

Limitaciones

El cociente de DO de cada paciente no puede utilizarse como indicador de gravedad de una enfermedad, ya que los anticuerpos de pacientes diferentes pueden variar entre sí en cuanto a su afinidad. Por consiguiente, es difícil obtener una estandarización absoluta de los resultados. La prueba por sí sola no debe utilizarse como única base para la toma de decisiones relacionadas con el tratamiento clínico, sino que debe emplearse en combinación con los síntomas clínicos y los resultados de otras pruebas disponibles.

Los sueros de pacientes con otras enfermedades autoinmunitarias y de personas sanas pueden contener autoanticuerpos con posible reactividad cruzada. Algunas personas pueden dar positivo con indicios mínimos o inexistentes de enfermedad clínica. Por otra parte, algunos pacientes con enfermedad activa pueden presentar niveles indetectables de estos anticuerpos.

No deben iniciarse tratamientos inmunodepresores sobre la base de un resultado positivo para anticuerpos anti-MBG y ANCA.

El inicio del tratamiento, o los cambios en éste, no deben fundamentarse únicamente en las concentraciones de anticuerpos anti-MBG y ANCA, sino en una observación clínica minuciosa.

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

- 1. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Van Es L et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985;i:425-429.
- 2. Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers; 1993:A9,1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjolín C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990;127:139-145.
- 4. Wieslander J.** How are anti neutrophil cytoplasmic autoantibodies detected? *Am J Kidney Dis* 1991;18:154-158.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Ludemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990;346:520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988;318:1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 9. Jennette C, Falk R.** Small vessels vasculitis. *N Engl J Med* 1997, 337, 1512-1525.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Cohen Tervaert JW, Huitema MG, Hene RJ, Sluiter WJ, The T, van der Hem GK et al.** Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre. *Lancet* 1990; 336:709-711.
- 12. Savige J, Davis D, Falk DJ, Jennette JC, Wiik A.** ANCA and associated diseases; A review of clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin. Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Westman K, Bygren P, Eilert I, Wiik A, Wieslander J.** Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCAs; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndroms. *Nephrol Dial transplant* 1997, 12, 1863-1868.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Symbolforklaring. Förklaringar till symboler.

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

Ag	Antigen. Antigène. Antigeno, Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontrol. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

GEBRAUCHSANWEISUNG IN DEUTSCHER KURZFASSUNG

Benutzung des Produktes

Das Wieslab® GCP 100 Analyse Test Set ist ein *enzymgekoppelter Immunnachweis (ELISA)* für die Bestimmung und Quantifizierung von IgG Antikörper, welche gegen die glomerulären Basalmembranen und Proteine 3 (PR3) und Myeloperoxidase (MPO) in Humanserum gerichtet sind. Das Resultat kann als Hinweis bei Verdacht von Renopulmonell-Syndrom und systemischer Vaskulit, besonders Goodpastures Syndrom, Wegeners Granulomatosis und mikroskopischer Polyangiitis dienen. Die Analyse soll von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

NUTZUNG IN DER *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK:

Probenentnahme

Die GCP 100 – Analyse ist für Serumproben gedacht. Bitte bedenken Sie, dass verschiedene Reagenzien und vor allem die Serumproben potentiell infektiöse Bestandteile beinhalten könnten. Analysieren Sie nicht solche Proben, die ikterisch, lipemisch / lipämisch oder hämolysiert sind. Wärmeinaktiviertes Serum kann unspezifische Aktivität zeigen und sollte deswegen nicht analysiert werden. Proben können bei 2-8° C aufbewahrt werden, wenn die Analyse innerhalb der nächsten Tage gemacht wird. Eine langfristige Aufbewahrung sollte bei - 20° C oder kälter erfolgen. Gefrierschränke mit automatischer Abtaueinrichtung sind nicht für die Aufbewahrung geeignet, da das Risiko des Auftauens der Proben besteht. Proben, die nicht ordnungsgemäß gelagert worden sind, können falsche Ergebnisse hervorrufen.

NCCLS hat Richtlinien für die Lagerung von Blutproben herausgegeben (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Sicherheitsinformation

Nur für die *in-vitro*-Diagnostik zu benutzen

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



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Achtung

Enthält ProClin 300:

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

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

Zusätzlich erforderliche Ausrüstung, die nicht Bestandteile des Sets sind

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

Verpackungsinhalt und dessen Aufbewahrung

- Ein Rahmen mit abtrennbaren Probestreifen (12x8 well), die mit Proteinase 3, Myeloperoxidas und Goodpastures Antigen (GBM) beschichtet sind. Aufbewahrt in einem mit Trockenmittel gefülltem wiederverschließbaren Beutel aus luftdichter Folie.
- 0,75 mL Negativ Kontrolle (NC), vorverdünntes Humanserum „Diluent“ (grüne Farbe)
- 0,75 mL Positiv Kontrolle (PC), vorverdünntes Humanserum „Diluent“ (rote Farbe)
- 13 mL Konjugatlösung, mit alkalischen Phosphaten gekoppelt an Anti-IgG Antikörper (blaue Farbe).
- 32 mL Verdünnungspuffer „Diluent“ (Dil), enthält PBS (rote Farbe).
- 13 mL Substratlösung pNPP
- 30 mL Waschlösung (30 x Konzentriert)
- Ein Protokoll für Anti-GBM, ANCA Screening

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

TESTPROZEDUR

Alle Lösungen vor Gebrauch auf Zimmertemperatur erwärmen lassen. Alle Inkubationen bei Zimmertemperatur (20-25° C) durchführen. Um Verdunstung zu verhindern, muss ein Deckel benutzt werden. Wenn der Schüttler nicht benutzt wird gelten für die Inkubation folgende Zeiten: Erste Probeinkubation 10 Minuten, Inkubationen mit Konjugatlösung 20- 30 Minuten, Substratinkubation 20 - 30 Minuten.

Zubereitung der Waschlösung

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

Probeverdünnung und Inkubationszeiten

Verdünnen Sie die Patientenproben und die Kontrollen wie in nachfolgender Tabelle beschrieben:

	Kolumne 1	Kolumne 2	Antigen
A	75µl Dil + 25µl Pat 1	75µl Dil + 25µl NC	GBM
B	75µl Dil + 25µl Pat 1	75µl Dil + 25µl PC	GBM
C	75µl Dil + 25µl Pat 1	75µl Dil + 25µl NC	PR3
D	75µl Dil + 25µl Pat 1	75µl Dil + 25µl PC	PR3
E	75µl Dil + 25µl Pat 1	75µl Dil + 25µl NC	MPO
F	75µl Dil + 25µl Pat 1	75µl Dil + 25µl PC	MPO
G	75µl Dil + 25µl Pat 1		HSA
H	75µl Dil + 25µl Pat 1		Leer

Auf Schüttler bei Zimmertemperatur für 10 Minuten inkubieren.

Nach der Probeinkubation / Zusatz von Konjugatlösung

Waschen Sie 3 Mal mit 300µL Waschlösung /Ansatz. Bitte sehr sorgfältig die Probengefäße bei jedem Waschschritt befüllen und entleeren. Nach dem letzten Waschritte muss die verbleibenden Flüssigkeit durch Abklopfen der Probestreifen auf absorbierendem Papier entfernt werden.

Fügen Sie 100 µL Konjugatlösung zu jedem Reaktionsansatz hinzu. Inkubieren Sie auf dem Schüttler für 10 Minuten.

Nach der Konjugatinkubation

Waschen Sie wie oben angegeben.

Hinzufügen der Substratlösung

Fügen Sie 100µL Substratlösung pNPP zu jedem Reaktionsansatz hinzu. Inkubieren Sie auf dem Schüttler für 10 Minuten.

Messen Sie die Absorption mit einem Spektrophometer bei 405nm.

Auswertung

Die Absorptionsquote für jede einzelne Patientenprobe wird mit Hilfe von folgender Formel errechnet.

$$\text{Absorptionsquote (X)} = \frac{\text{Die Absorption der Patientenprobe für respektives Antigen}}{\text{Die Absorption der negativen Kontrolle (NC) für respektives Antigen}}$$

Qualitätskontrolle

Die Absorption der Negativkontrolle soll < 0,3 betragen.

Die Absorption der Positivkontrolle soll > 0,9 betragen.

Die Absorption der Patientenprobe soll < 0,3 in dem HSA Reaktionsansatz sowie in dem leeren Reaktionsansatz. Betragen.

Die Positiv- und die Negativkontrolle werden benutzt, um festzustellen, ob das Set technisch funktioniert hat.

Falls ein oder mehrere Werte nicht innerhalb der angegebenen Größenordnung liegen, sollte der Test als nicht gültig erklärt und die Analyse wiederholt werden. Sollte es erforderlich sein, können weitere Kontrollen analysiert werden. Empfehlungen betreffend Qualitätskontrolle können aus dem NCCLSs Dokument C24-A entnommen werden.

Auswertung der Resultate

Absorptionsquote < 3,0 = **negativ**

Absorptionsquote zwischen 3,0 und 4,0 = Bei nicht eindeutigen Resultaten Test wiederholen. Wenn Wiederholungstest ebenfalls nicht eindeutig, alternatives Nachweisverfahren verwenden.

Absorptionsquote > 4,0 = **positiv**

Bedenken Sie dass ein positives oder ein nicht eindeutiges resultat immer von einer quantitativen Methode bestätigt werden sollte.

Die Screeninganalyse hat eine etwas höhere Sensitivität als die quantitative Analyse, was dazu führt, dass einige der niedrigwertigen positiven Proben, in einen quantitativen Test negativ werden können.

Die Grenzen der Analyse

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

Die ausschließliche Verwendung der Ergebnisse der Analyse dieses Testes sind für eine klinische Beurteilung nicht ausreichend. Stattdessen müssen die Ergebnisse der Analyse zusammen mit anderen relevanten Parametern benutzt werden, wie z.B. klinische Parameter (Symptome etc.), um eine korrekte Beurteilung der spezifischen klinischen Situation erfassen zu können. Es ist bekannt, dass Sera von Patienten mit anderen autoimmunen Krankheiten und generell gesunde Individuen eine gewisse Kreuzreaktion in der Analyse aufweisen können. Mit anderen Worten, einige Individuen können also positiv für anti-GMB/ANCA - Antikörper reagieren, ohne dass sonstige klinische Belege für die Krankheit angezeigt werden.

Gleichzeitig ist es auch bekannt, dass Patienten mit aktiver Krankheit negativ mit anti-GMB/ANCA - Antikörper reagieren können. Mit der Behandlung darf nicht nur auf Grund eines positiven ASCA Resultates begonnen werden. Eine Behandlung darf auch nicht aufgrund von Veränderungen der anti-GBM/ANCA Titer initiiert oder geändert werden, sondern muss in jedem Fall auf dem klinischen Gesamtbild basieren. Die anti-GMB/ANCA Konzentrationen in einem spezifischen Serum können nach Analyse mit unterschiedlichen Testmethoden variieren. Das beruht primär auf den unterschiedlichen Eigenschaften

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

- 1. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Van Es L et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985;i:425-429.
- 2. Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers; 1993:A9,1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjolín C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990;127:139-145.
- 4. Wieslander J.** How are anti neutrophil cytoplasmic autoantibodies detected? *Am J Kidney Dis* 1991;18:154-158.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Ludemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990;346:520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988;318:1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 9. Jennette C, Falk R.** Small vessels vasculitis. *N Engl J Med* 1997, 337, 1512-1525.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Cohen Tervaert JW, Huitema MG, Hene RJ, Sluiter WJ, The T, van der Hem GK et al.** Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre. *Lancet* 1990; 336:709-711.
- 12. Savige J, Davis D, Falk DJ, Jennette JC, Wiik A.** ANCA and associated diseases; A review of clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin. Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Westman K, Bygren P, Eilert I, Wiik A, Wieslander J.** Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCAs; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndroms. *Nephrol Dial transplant* 1997, 12, 1863-1868.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Symbolforklaring. Förklaringar till symboler.

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

Ag	Antigen. Antigène. Antigeno, Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontrol. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

ISTRUZIONI D'USO ABBREVIATE

Uso previsto

Wieslab® GCP 100 è un kit immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione di anticorpi IgG , glomerulari della membrana basale (GBM), anti- Mieloperossidasi (MPO) e Proteinasi 3 (PR3) nel siero umano. Il test si usa per la rilevazione di anticorpi nei singoli campioni di siero umano. I risultati del test sono di ausilio nella diagnosi delle sindromi reno - polmonari, delle nefriti glomerulari progressive e in particolar modo della sindrome di Goodpasture (GP) , della granulomatosi di Wegener (WG) e della poliangite microscopica. Le analisi devono essere effettuate da laboratori professionali specializzati PER USO DIAGNOSTIC *IN VITRO*.

Raccolta dei campioni

Per il test GCP 100 si utilizzano campioni di siero. Manipolare come potenzialmente infetti. Evitare di usare sieri itterici, lipemici ed emolizzati. Si sconsiglia l'esecuzione del test su sieri inattivati tramite calore: possono dare reattività aspecifica. Se il test viene eseguito entro cinque giorni, conservare i sieri a 2-8° C. Per tempi più lunghi conservare i sieri a -20° C o a temperature più basse. I cicli di congelamento e scongelamento dei sieri possono comportare una perdita variabile dell'attività degli autoanticorpi.

L' NCCLS fornisce raccomandazioni per la conservazioni di campioni di sangue (Approved Standard- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Avvertenze e precauzioni

- Solo per uso diagnostico *in vitro*
- Ciascuna unità di siero utilizzata nella preparazione dei controlli e dei calibratori di questo prodotto è stata analizzata con metodi approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) per determinare la presenza di HBsAg e di anticorpi anti-HCV e anti-HIV-1/2 ed è risultata non reattiva . Poiché nessun metodo di analisi è in grado di garantire in maniera assoluta l'assenza del virus dell'epatite B (HBV), del virus dell'epatite C (HCV), del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) o di altri agenti infettivi, tutti i prodotti contenenti sostanze di origine umana vanno trattati come potenziali vettori di malattie infettive e vanno quindi maneggiati secondo le corrette pratiche di laboratorio e con le opportune precauzioni.
- Il Centro per il Controllo e per la Prevenzione delle Malattie e l'Istituto Nazionale per la Salute raccomandano che agenti potenzialmente infetti vengano manipolati a Livello 2 di biosicurezza.
- Tutte le soluzioni contengono ProClin 300 come conservante. Non pipettare mai con la bocca. Evitare il contatto dei reagenti o dei campioni di siero con la pelle. I reagenti contengono ProClin che può essere irritante. Evita il contatto con la pelle e con gli occhi. In caso di contatto, lavare con acqua abbondante.

In un dato campione, la concentrazione del GBM e degli ANCA determinata con metodi di altri produttori può variare a causa delle diversità tra metodi e la specificità dei reagenti.

Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Euro Diagnostica.



Attenzione

BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Contiene ProClin 300:

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

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

Materiale o accessori necessari ma non forniti

- Lettore di micropiastre con filtro 405 nm.
- Pipette di precisione con puntali monouso.
- sistema per lavare i pozzetti, carta assorbente, provette e cronometro.

Componenti del kit e conservazione dei reagenti

- Una piastra con doppia colonna di strips (6x(2x8) pozzetti) rivestiti con le GBM, le proteine mieloperossidasi (MPO) e proteinasi 3 (PR3), un coperchio. Tutto sigillato in un sacchetto di alluminio con essiccante.
- 0.75 mL di controllo negativo (CN) contenente siero umano e diluente (colore verde).
- 0.75 mL di controllo positivo (CP) contenente siero umano e diluente (colore rosso).
- 13 mL coniugate con fosfatasi alcalina dirette contro IgG umane (colore blu).
- 32 mL di diluente (Dil) contenente PBS (colore rosso).
- 13 mL di substrato pNPP.
- 30 mL di soluzione di lavaggio 30x.

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

Togliere il numero corretto di strip da utilizzare. Mettere le strip rimanenti nel sacchetto protettivo con l'essiccante, risigillare e riporre nel frigorifero

PROCEDURA

Tutte le soluzioni devono essere utilizzate a temperatura ambiente. Incubare sempre a temperatura ambiente (20-25° C) con il coperchio. Una doppia colonna di pozzetti può essere utilizzata per il siero di un singolo paziente. Utilizzare il test ANCA screening, usando il protocollo fornito con il kit. **Se il test è eseguito senza agitatore il tempo di incubazione deve essere modificato come segue: incubazione del siero 10 minuti; incubazione del coniugato 20-30 minuti; incubazione del substrato 20-30 minuti.**

Preparazione della soluzione di lavaggio

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

Diluizione dei campioni e incubazione

Distribuire i campioni e i controlli seguendo il seguente schema:

	Colonna 1	Colonna 2	Antigeni
A	75µL Dil + 25µL paz 1	75µL Dil + 25µL CN	GBM
B	75µL Dil + 25µL paz 1	75µL Dil + 25µL CP	GBM
C	75µL Dil + 25µL paz 1	75µL Dil + 25µL CN	PR3
D	75µL Dil + 25µL paz 1	75µL Dil + 25µL CP	PR3
E	75µL Dil + 25µL paz 1	75µL Dil + 25µL CN	MPO
F	75µL Dil + 25µL paz 1	75µL Dil + 25µL CP	MPO
G	75µL Dil + 25µL paz 1		HSA
H	75µL Dil + 25µL paz 1		Vuoto

Coprire con il coperchio e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente su un agitatore

Dopo l'incubazione dei campioni / Aggiunta del coniugato

Lavare ogni pozzetto 4 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio, riempire e svuotare i pozzetti ogni volta, dopo l'ultimo lavaggio eliminare completamente il liquido residuo capovolgendo la piastra e tamponandola con carta assorbente

Aggiungere 100 µL di coniugato in ciascun pozzetto. Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente su un agitatore.

Dopo l'incubazione del coniugato

Lavare come sopra

Aggiunta della soluzione di substrato

Distribuire 100 µL di soluzione substrato in ciascun pozzetto, incubare per 10-20 minuti a temperatura ambiente su un agitatore.

Leggere le assorbanze a 405 nm con un lettore di micropiastre.

Calcolo dei risultati

Per ciascun campione calcolare il rapporto di densità ottica come segue:

$$\text{Rapporto densità ottiche} = \frac{\text{assorbanza del campione per ciascun antigene}}{\text{assorbanza del CN per ciascun antigene}}$$

Controllo di qualità

La densità ottica del controllo negativo (CN) per ciascun antigene deve essere < 0.3.

La densità ottica del controllo positivo (CP) per ciascun antigene deve essere > 0.9

La densità ottica della HSA e dei pozzetti non rivestiti deve essere di < 0.3

I controlli negativo e positivo si utilizzano per monitorare l'eventuale malfunzionamento dei reagenti. Il controllo positivo non assicura la precisione per valori vicini al cut-off. In questo caso raccomandiamo di testare un controllo addizionale. Se uno dei valori non rientra nei range rispettivi, il test deve considerarsi non-valido e pertanto da ripetersi. Controlli addizionali possono essere testati secondo linee guida o richieste locali, nazionali, e/o regolamenti federali o organizzazioni di registrazione. Per una guida sui Controlli di Qualità vedi il NCCLS C24-A.

Interpretazione dei risultati

Rapporto di densità ottica < 3.0 = **Negativo**

Rapporto di densità ottica tra 3.0 – 4.0 = **Equivoco**; Ritesta, se risulta ancora equivoco ritesta con un metodo alternativo o testa un nuovo campione

Rapporto di densità ottica > 4 = **Positivo**

Un campione equivoco o positivo deve sempre essere confermato con un metodo quantitativo.

Grazie all'elevata sensibilità del metodo di screening, una piccola percentuale di campioni con una rapporto di densità ottica positiva ma bassa può risultare negativo con un metodo quantitativo.

Limitazioni

Il rapporto di densità ottica di ciascun paziente non può essere utilizzato per misurare la gravità della malattia, in quanto gli anticorpi di diversi pazienti possono differire l'uno dall'altro per affinità. Pertanto è difficile ottenere una standardizzazione assoluta dei risultati.

Il test non deve essere utilizzato come unico mezzo per decisioni su terapie cliniche, ma deve essere utilizzato in combinazione con i sintomi clinici e i risultati di altri test disponibili.

Sieri di pazienti con altre malattie autoimmuni e di individui sani possono contenere potenziali autoanticorpi cross-reattivi. Alcuni individui possono risultare positivi con leggeri o non evidenti sintomi di malattia. D'altra parte, alcuni pazienti con patologie attive possono avere livelli anticorpali non rilevabili.

Terapie immunosoppressive pertanto non dovrebbero iniziare sulla base di un risultato del anti – GBM e ANCA positivo. L'inizio o le modifiche di un trattamento non devono basarsi soltanto su variazioni dei rapporti di densità ottica del anti – GBM e ANCA, ma piuttosto sulla base di osservazioni cliniche accurate.

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

- 1. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Van Es L et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985;i:425-429.
- 2. Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers; 1993:A9,1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjolín C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990;127:139-145.
- 4. Wieslander J.** How are anti neutrophil cytoplasmic autoantibodies detected? *Am J Kidney Dis* 1991;18:154-158.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Ludemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990;346:520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988;318:1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 9. Jennette C, Falk R.** Small vessels vasculitis. *N Engl J Med* 1997, 337, 1512-1525.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Cohen Tervaert JW, Huitema MG, Hene RJ, Sluiter WJ, The T, van der Hem GK et al.** Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre. *Lancet* 1990; 336:709-711.
- 12. Savige J, Davis D, Falk DJ, Jennette JC, Wiik A.** ANCA and associated diseases; A review of clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin. Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Westman K, Bygren P, Eilert I, Wiik A, Wieslander J.** Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCAs; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndroms. *Nephrol Dial transplant* 1997, 12, 1863-1868.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Symbolforklaring. Förklaringar till symboler.

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

Ag	Antigen. Antigène. Antigeno, Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontrol. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

KORTFATTET DANSK INSTRUKTION.

Wieslab® GCP 100 test er et enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) til bestemmelse af antistoffer mod glomerulus basal membran (GBM), myeloperoxidase (MPO) og Proteinase 3 (PR3) i humant serum. Metoden anvendes til at bestemme antistoffer i et enkelt serum. Resultatet af metoden anvendes til hjælp til diagnosen ved akut reno-pulmonalt syndrom, hurtig progressiv glomerulonefritis, og vaskulit, specielt Goodpasture's syndrom (GP) Wegeners granulomatose (WG) og mikroskopisk polyangiitis. Analysen skal udføres af uddannede laboranter. Må kun anvendes til *in vitro* teknik.

Prøvetagning

Wieslab® GCP 100 analysen anvendes på serumprøver. Vær opmærksom på at flere reagenser og ikke mindst serumpøver kan indeholde infektiøst materiale. Undlad at analysere sera som er ikteriske, lipidholdige eller hæmolyserede. Varme inaktiverede sera kan give uspecifikke reaktioner og bør derfor ikke analyseres. Prøverne kan opbevares ved 2-8° C hvis analysen sker indenfor nogle få dage. Langtidsopbevaring af sera skal ske ved -20° C eller koldere. Anvend ikke fryserer med automatisk afrimning, da man risikere at sera bliver tørt og frosset og dermed nedbryder antistofferne. Prøver som opbevares forkert kan give forkerte resultater. NCCLS har givet anbefalinger om hvordan man opbevarer blodprøver. (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Sikkerhedsinformation

- Kun for *in vitro* diagnostik.
- Serum som anvendes ved præparation af kontroller og kalibratorer er testet negative for human immunodeficiency virus 1 og 2 (HIV 1 og 2), hepatit C (HCV) og hepatit B antigen. Bemærk at ingen metode helt kan garantere fravær af HIV, HCV, hepatitis B virus og andre infektiøse agens. Alle humane prøver må derfor betragtes som potentielt infektiøse og håndteres med forsigtighed.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC) og National Institutes of Health (NIH) i USA anbefaler at potentielt infektiøse materialer håndteres i overensstemmelse med Biosafety Level 2.
- Alle opløsninger indeholder ProClin 300 som konserveringsmiddel. Brug aldrig mundpipette. Undgå at få reagens eller serum direkte på huden. Reagenser med ProClin 300 er irriterende og derfor skal kontakt med hun og øjne undgås. Hvis det sker at reagens kommer i kontakt med hud eller øjne, skyl med store mængder vand.
- Materiale-sikkerhedsdatablade for alle farlige komponenter i dette kit fås ved henvendelse til Euro Diagnostica.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Advarsel

Indeholder ProClin 300:

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

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

Nødvendig udstyr og materiale som ikke indgår i kittet.

- Spektrofotometer med filter på 405 nm.
- Præcisionspipetter med engangsspidser.
- Vaskemaskine til mikrotiterplader, filtrepapir, prøverør, minutur.

KIT komponenter og opbevaring af reagenser.

- En ramme med strips (6 x (2 x 8) brønde) belagt med proteinase 3 (PR3), MPO, GBM og et låg. Alt er pakket i tætsluttende foliepose med tørringsmiddel.
- 0,75 mL negativ kontrol (NC), humant serum færdig fortyndet i "diluent"
- 0,75 mL positiv kontrol (PC) , humant serum færdigfortyndet i "diluent".
- 13 mL konjugatopløsning, alkalisk phofatase-mærket anti-IgG antistoffer (blå farve).
- 32 mL fortyndingsningsbuffer. "Diluent" (Dil) (rød farve)
- 13 mL substrat pNPP
- 30 mL vaskebuffer, 30 x koncentreret.

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

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

PROCEDURE

Alle opløsninger skal bruges ved stuetemperatur. Inkuber med låg ved stuetemperatur (20 – 25° C) i alle trin. En dobbelt strip kan bruges til et serum. Brug den indlagte protokol til ANCA screening når analysen udføres. Hvis analysen udføres uden omryster, skal inkubationstiden justeres som følgende: serum inkubation 10 minutter; konjugat inkubation 20-30 minutter; substrat inkubation 20 – 30 minutter.

Fremstilling af vaskeopløsning

Hvis der observers saltkrystal udfælding i flasken med koncentreret vaskeopløsning, skal flasken placeres i et 37°C vandbad indtil krystallerne er opløste. Derefter fortyndes vaskeopløsningen. Fortynd 10 mL af den 30 x koncentrerede vaskeopløsning i 290 mL destilleret vand. Når den bliver opbevaret ved 2-8° C er vaskeopløsningen holdbar indtil udløbsdatoen for kittet.

Fortynding og inkubation af sera.

Sæt låg på og inkuber 10 minutter under omrystning ved stuetemperatur.

	kolumn 1	kolumn 2	Antigen
A	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL NC	GBM
B	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL PC	GBM
C	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL NC	PR3
D	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL PC	PR3
E	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL NC	MPO
F	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL PC	MPO
G	75µL Dil + 25µL pat 1		HSA
H	75µL Dil + 25µL pat 1		Tom

Inkuber i 10 minutter under omrystning ved stuetemperatur.

Efter serum inkubation/tilsæt konjugat.

Vask 4 gange med 300 uL vaskeopløsning /brønd , fyld og tøm brøndene hver gang, efter sidste vask fjernes sidste rest af vaskeopløsning ved at slå stripsene mod absorberende papir.

Tilsæt 100 µL konjugat opløsning til hver brønd. Inkuber i 10 minutter under omrystning ved stuetemperatur.

Efter konjugat inkubation

Vask som tidligere.

Tilsætning af substratopløsning

Tilsæt 100 uL substrat pNPP per brønd, inkuber i 10-20 minutter under omrystning ved stuetemperatur.

Aflæs absorbansen ved 405 nm med ELISA reader.

Beregninger

En optisk densitet (OD) for hver patient serum beregnes som følgende:

$$\text{OD ratio (X)} = \frac{\text{OD for patient serum for hvert antigen}}{\text{OD for NC for hvert antigen}}$$

Kvalitetskontrol

OD værdien for den negative kontrol (NC) for hvert antigen skal være <0,3

OD værdien for den positive kontrol skal være >0,9

OD værdien for patient serum i HSA og ucoatede brønde skal være < 0,3

De negative og positive kontroller er beregnet til at vise eventuelle fejl i reagenser. Den positive kontrol vil ikke garantere præcisionen af analysens cut-off. Det anbefales af medtage en yderligere kontrol ved analysens cut-off. Hvis en af værdierne er udenfor dets respektive område, må testen betragtes som værende forkert, og analysen bør gentages. Yderligere kontroller kan testes som følge af anbefalinger fra de lokale myndigheder. Anbefalinger vedrørende kvalitetskontrol kan fås hos NCCLSs dokument C24-A.

Beregninger af resultater

OD ratio < 3,0 = **Negativ** OD ratio > 4,0 = **Positiv**

OD ratio mellem 3,0 och 4,0 = **Gråzone**, gentag testen, hvis der opnås samme resultat så anvend alternativ metode, eller test et nyt serum fra patienten.

Et gråzone eller et positivt resultat skal altid konfirmeres med en kvantitativ analyse.

På grund af den høje sensitivitet af screenings metoden, kan få procent, med OD ratio i det lave positive område i screenings metoden, blive negative med den kvantitative metode.

Tolkning af resultaterne

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

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

- 1. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Van Es L et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985;i:425-429.
- 2. Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers; 1993:A9,1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjolín C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990;127:139-145.
- 4. Wieslander J.** How are anti neutrophil cytoplasmic autoantibodies detected? *Am J Kidney Dis* 1991;18:154-158.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Ludemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990;346:520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988;318:1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 9. Jennette C, Falk R.** Small vessels vasculitis. *N Engl J Med* 1997, 337, 1512-1525.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Cohen Tervaert JW, Huitema MG, Hene RJ, Sluiter WJ, The T, van der Hem GK et al.** Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre. *Lancet* 1990; 336:709-711.
- 12. Savige J, Davis D, Falk DJ, Jennette JC, Wiik A.** ANCA and associated diseases; A review of clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin. Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Westman K, Bygren P, Eilert I, Wiik A, Wieslander J.** Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCAs; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndroms. *Nephrol Dial transplant* 1997, 12, 1863-1868.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Symbolforklaring. Förklaringar till symboler.

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

Ag	Antigen. Antigène. Antigeno, Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontrol. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

KORTFATTET NORSK INSTRUKSJON

Indikasjoner

Wieslab[®] anti-GBM, ANCA screeningtestsett er en ELISA-metode (enzyme-linked immunosorbent assay) for kvalitativ påvisning av antistoffer mot glomerulær basalmembran (GBM), proteinase-3 (PR3) og myeloperoksidase (MPO) i humant serum. Assayet brukes til å påvise antistoffer i en enkelt serumprøve. Resultatene fra assayet anvendes som støtte i diagnostiseringen av nyre-/lungesyndrom og raskt progredierende glomerulonefritt, særlig Goodpastures syndrom (GP), Wegeners granulomatose (WG) og mikroskopisk polyangitt (MP). Assayet er beregnet for bruk hos pasienter med tegn og symptomer som samsvarer med GP, WG og MP. Det er ikke beregnet på screening av en frisk populasjon.

Analysen bør utføres av opplært laboratoriepersonell.

FOR BRUK VED IN VITRO DIAGNOSTISKE FORMÅL.

Et positivt resultat bør alltid bekreftes med et semikvantitativt assay.

Advarsler og forsiktighetsregler

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



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Advarsel

Inneholder ProClin 300:

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

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

Innsamling av prøver

Anti-GBM, ANCA screeningsassay er beregnet for bruk med serum. Håndteres som om de kan overføre smittestoffer.

Unngå bruk av sera som er ikteriske, lipemiske og hemolyserte.

Varmedeaktiverte sera kan gi uspesifisert reaktivitet og bør ikke brukes.

Oppbevar serum mellom 2-8 °C hvis testing skal finne sted i løpet av fem dager. Hvis prøver skal oppbevares over lang tid, bør de oppbevares ved -20 °C eller kaldere.

Frostfri fryser må ikke brukes fordi den kan la prøvene gå gjennom frysetiningssykluser og forringe antistoffene. Prøver som er ukorrekt oppbevart eller utsettes for flere frysetiningssykluser kan gi falske resultater.

NCCLS gir anbefalinger for oppbevaring av blodprøver, (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Komponenter i settet og oppbevaring av reagenser

- En ramme med dobbeltremser (6x (2x8) brønner) dekket med Goodpasture-antigen (bovin kilde), rensed proteinase 3 (human neutrofilkilde) og myeloperoksidase (human neutrofilkilde), et lokk forseglet i foliepakning med tørkepakke.

- 0,75 mL negativ kontroll (NC) som inneholder humant serum i fortytning (grønn farge).

- 0,75 mL positiv kontroll (PC) som inneholder humant serum i fortytning (rød farge).

- 13 mL konjugat som inneholder alkaliske forfatasemerke (geit) antistoffer mot human IgG (blå farge).

- 32 mL fortytning (Dil) som inneholder PBS (røddaktig farge).

- 13 substrat pNPP.

- 30 mL vaskeløsning konsentrert 30x.

Alle reagenser i settet er klare til bruk, bortsett fra vaskeløsningen og bør oppbevares ved 2-8 °C.

Fjern bare det antall brønner som er nødvendig for testing. Forsegle aluminiumspakningen nøye igjen.

Nødvendige materialer/utstyr som ikke følger med

Mikroplateleser med filter, 405 nm. NaCl, Tween 20 og destillert vann for klargjøring av mer vaskeløsning.

Vasker for remser, absorberende stoff, rør og en tidsmåler. Presisjonspipetter med engangstupper.

PROSEDYRE

Alle løsninger bør brukes ved romtemperatur.

Fjern bare det antall brønner som er nødvendig for testing. Forsegle aluminiumspakningen nøye igjen.

Dersom assayet utføres uten en rister, bør inkubasjonstiden justeres på følgende måte: seruminkubasjon 10 minutter, ingen endring; konjugatinkubasjon 20-30 minutter; substratinkubasjon 20-30 minutter.

Klargjøring av vaskeløsning

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

Fortynning av serum og inkubasjon

1. Pipetter 75 µl fortytning (Dil) i hver brønn av en dobbelt mikrotiterremse (ikke G2+H2).
2. Pipetter 25 µl negativ kontroll (NC) i hver av brønnene A2, C2 og E2.
3. Pipetter 25 µl positiv kontroll (PC) i hver av brønnene B2, D2 og F2.
4. Pipetter 25 µl pasientserum i hver brønn av søyle 1 i henhold til skjemaet nedenfor. Sett på lokket og inkuber i 10 minutter på en rister.

	Søyle 1	Søyle 2	Antigenbelegg
A	75 µl Dil + 25 µl serum	75 µl Dil + 25 µl NC	GP antigen
B	75 µl Dil + 25 µl serum	75 µl Dil + 25 µl PC	GP antigen
C	75 µl Dil + 25 µl serum	75 µl Dil + 25 µl NC	PR3 antigen
D	75 µl Dil + 25 µl serum	75 µl Dil + 25 µl PC	PR3 antigen
E	75 µl Dil + 25 µl serum	75 µl Dil + 25 µl NC	MPO antigen
F	75 µl Dil + 25 µl serum	75 µl Dil + 25 µl PC	MPO antigen
G	75 µl Dil + 25 µl serum		HSA som blank
H	75 µl Dil + 25 µl serum		Tom som blank

Etter seruminkubasjon

Vask 4 ganger med vaskeløsning ved å fylle og tømme brønnene hver gang; etter siste vasking tømmes brønnene ved å banke remsene mot det absorberende stoffet.

Tilsette konjugat

Tilsett 100 µl konjugat i hver brønn. Sett på lokket og inkuber i 10 minutter på en rister (uten rister, inkuber i 20-30 minutter).

Etter konjugatinkubasjon

Vask 4 ganger med vaskeløsning ved å fylle og tømme brønnene hver gang; etter siste vasking tømmes brønnene ved å banke remsene mot det absorberende stoffet.

Tilsette substrat

Tilsett 100 µl substrat pNPP i hver brønn, inkuber i 10-20 minutter (uten en rister, inkuber i 20-30 minutter). Les av absorbansen ved 405 nm på en mikroplateleser 10-20 minutter etter tilsetting av substrat og 20-30 minutter etter tilsetting av substrat uten en rister.

Beregninger

Et optisk tetthetsforhold (OD) for hver pasientprøve beregnes slik:

$$\text{OD-forhold} = \frac{\text{OD pasientprøve}}{\text{OD for negative kontroll}}$$

Pasientprøven er negativ hvis OD-forholdet er < 3,0. Tvetydig hvis OD-forholdet er 3,0-4,0 og positivt hvis OD-forholdet er > 4,0.

Kvalitetskontroll

OD for NC for hvert antigen skal være < 0,3.

OD for PC for hvert antigen skal være < 0,9.

Hvis PC- eller NC-verdiene ikke ligger innenfor sine respektive områder, bør testen betraktes som ugyldig og testen gjennomføres på nytt.

OD-verdien for pasientprøven i HSA og i de utildekkede brønnene skal være < 0,3.

Hvis OD-verdien for pasientprøven er >0,3 i noen av HSA eller utildekkede brønnene eller positive for flere enn ett antigen, kan prøven inneholde uspesifisert reaktivitet.

Iblant vil uspesifisert reaktivitet forsvinne med en høyere fortykning.

De negative og positive kontrollene er beregnet på å overvåke betydelig reagensfeil. Den positive kontrollen vil ikke sikre presisjon ved cut-off for assayet. Det anbefales å analysere en ekstra kontroll ved cut-off for assayet.

Flere kontroller kan testes i henhold til retningslinjene eller krav fra lokale eller statlige forskrifter eller godkjenningseksperter. Se NCCLS C24-A for veiledning om korrekte kvalitetskontrollrutiner.

Tolking av resultatene

En prøve med et OD-forhold på:

< 3,0 = **Negativ**

3.0 – 4.0 = **Tvetydig**; test på nytt, hvis fremdeles tvetydig, test på ny med en annen metode

> 4,0 = **Positiv**

På grunn av den høye sensitiviteten til screeningsettet, kan en liten andel av prøvene med et OD-forhold > 3 vise seg å være negative i et kvantitativt assay.

Et tvetydig eller positivt testresultat bør alltid bekreftes med et kvantitativt assay.

Begrensninger

Den enkelte pasients OD-forhold kan ikke brukes som et mål på alvorlighetsgraden for en sykdom siden antistoffer fra forskjellige pasienter kan avvike fra hverandre med hensyn til affinitet. Derfor er det vanskelig å oppnå en absolutt standardisering av resultater. Testen bør ikke brukes som det eneste grunnlaget for beslutninger om klinisk behandling, men bør brukes i kombinasjon med kliniske symptomer og resultater fra andre tilgjengelige tester.

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

Immunsuppressiv behandling må ikke startes på grunnlag av et positivt anti-GBM, ANCA-resultat.

Oppstart eller endringer av behandling bør ikke baseres på endringer i anti-GBM, ANCA-konsentrasjon alene, men på grundig klinisk observasjon.

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

- 1. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Van Es L et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985;i:425-429.
- 2. Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers; 1993:A9,1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjolín C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990;127:139-145.
- 4. Wieslander J.** How are anti neutrophil cytoplasmic autoantibodies detected? *Am J Kidney Dis* 1991;18:154-158.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Ludemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990;346:520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988;318:1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 9. Jennette C, Falk R.** Small vessels vasculitis. *N Engl J Med* 1997, 337, 1512-1525.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Cohen Tervaert JW, Huitema MG, Hene RJ, Sluiter WJ, The T, van der Hem GK et al.** Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre. *Lancet* 1990; 336:709-711.
- 12. Savige J, Davis D, Falk DJ, Jennette JC, Wiik A.** ANCA and associated diseases; A review of clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin. Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Westman K, Bygren P, Eilert I, Wiik A, Wieslander J.** Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCAs; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndroms. *Nephrol Dial transplant* 1997, 12, 1863-1868.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Symbolforklaring. Förklaringar till symboler.

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

Ag	Antigen. Antigène. Antigeno, Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontrol. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

KORTFATTAD SVENSK INSTRUKTION

Produktens användning

Wieslab® GCP 100 test kit är en *enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* för bestämning av IgG antikroppar riktade mot glomerulärt basalmembran (GBM), proteinas 3 (PR3) och myeloperoxidas (MPO) i humant serum. Resultatet kan ge vägledning vid utredning av misstänkt renopulmonella syndrom och systemisk vaskulit, särskilt Goodpastures syndrom, Wegeners granulomatos och mikroskopisk polyangiit. Analysen skall utföras av behörig personal.

FÖR *IN VITRO* DIAGNOSTIK ANVÄNDNING.

Provtagning

GCP 100 analysen är avsedd för serumprover. Tänk på att flera reagens och inte minst serumprovet potentiellt kan innehålla infektiösa agens. Analysera inte sera som är ikteriska, lipemiska eller hemolyserade. Värmeinaktiverat sera kan ge ospecifik reaktivitet och bör därför ej analyseras. Prover kan förvaras vid 2-8° C om analys sker inom några dagar. Långtidsförvaring skall ske vid -20° C eller kallare. Använd inte frysar med automatisk avfrostning då risk finns att prover töar under avfrostningarna. Prover som förvarats oriktigt kan ge felaktiga resultat.

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

Säkerhetsinformation

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



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Varning

Innehåller ProClin 300:

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

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

Nödvändig utrustning och material som ej ingår i kitet

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

Ingående reagens och förvaring

- En ram med dubbelstrips (6x (2x8) brunnar) belagda med proteinas 3, myeloperoxidas och Goodpastures antigen (GBM), ett lock. Allt förpackat i en återförslutningsbar foliepåse med torkmedel.
- 0,75 mL negativ kontroll (NC), humant serum i "diluent" (grön färg).
- 0,75 mL positiv kontroll (PC), humant serum i "diluent" (röd färg).
- 13 mL konjugatlösning, alkaliskt fosfatasmärkta anti-IgG antikroppar (blå färg).
- 32 mL spädningslösning "Diluent"(Dil), PBS (röd färg).
- 30 mL tvättlösning, 30x koncentrerad.
- 13 mL pNPP substratlösning.

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

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

TESTPROCEDUR

Alla lösningar skall vara rumstempererade innan man använder dem. Alla inkubationer skall ske vid rumstemperatur (20-25° C). Ett dubbelstrip används för varje patientprov. Använd lock för att undvika avdunstning. **Följande inkubationstider gäller om inte skak används: provinkubationen 10 minuter, inkubation med konjugat 20-30 minuter, substratinkubation 20-30 minuter.**

Beredning av tvättlösning

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

Provspädning och inkubationstider

Späd patientprover och kontroller enligt tabellen nedan.

	kolumn 1	kolumn 2	Antigen
A	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL NC	GBM
B	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL PC	GBM
C	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL NC	PR3
D	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL PC	PR3
E	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL NC	MPO
F	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL PC	MPO
G	75µL Dil + 25µL pat 1		HSA
H	75µL Dil + 25µL pat 1		Tom

Inkubera i rumstemperatur på skak i 10 minuter.

Efter provinkubering / Tillsättning av Konjugat

Tvätta 4 gånger med 300 µL tvättlösning / brunn, var noga med att helt tömma och fylla brunnarna i varje tvättcykel. Efter sista tvätten skall alla rester av vätska avlägsnas genom att slå mikrotiterstripsen mot ett absorberande papper.

Tillsätt 100 µL konjugatlösning till varje brunn. Inkubera i rumstemperatur på skak i 10 minuter.

Efter konjugatinkubering

Tvätta som tidigare.

Tillsättande av substratlösning

Tillsätt 100 µL substrat pNPP i varje brunn. Inkubera i rumstemperatur på skak i 10-20 minuter.

Avläs absorbansen i en spektrofotometer vid 405 nm.

Beräkningar

Kvoten av absorbansen för varje enskilt patientprov beräknas enligt följande formel.

$$\text{Absorbanskvot (X)} = \frac{\text{Patientprovets absorbans för respektive antigen}}{\text{Negativa kontrollens (NC) absorbans för respektive antigen}}$$

Kvalitetskontroll

Den negativa kontrollens absorbans skall vara $< 0,3$.

Den positiva kontrollens absorbans skall vara $> 0,9$.

Patientprovets absorbans skall vara $< 0,3$ i HSA brunnen respektive den tomma brunnen. De negativa och positiva kontrollerna används för att kontrollera att kittet fungerar tekniskt. Om något/några värden inte faller inom angivet område bör testen ej godkännas och man skall köra om analysen. Ytterligare kontroller kan analyseras, om så krävs av lokala myndigheter. Rekommendationer angående kvalitetskontroll kan fås ur NCCLSs dokument C24-A.

Tolkning av resultaten

Absorbanskvot $< 3,0$ = **Negativt**

Absorbanskvot mellan 3,0 och 4,0 = **Gråzon/tvetydigt**; Testa om. Om samma resultat uppnås, använd en alternativ metod.

Absorbanskvot $> 4,0$ = **Positivt**

Observera att ett positivt eller tvetydigt provsvar alltid bör konfirmeras med en kvantitativ metod.

Screeninganalysen har en något högre sensitivitet än den kvantitativa analysen vilket gör att några procent av lågt positiva prov kan bli negativt en kvantitativ test.

Analysens begränsningar

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

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

- 1. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Van Es L et al.** Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985;i:425-429.
- 2. Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J.** Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes, in Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers; 1993:A9,1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjolín C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990;127:139-145.
- 4. Wieslander J.** How are anti neutrophil cytoplasmic autoantibodies detected? *Am J Kidney Dis* 1991;18:154-158.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Ludemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990;346:520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988;318:1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 9. Jennette C, Falk R.** Small vessels vasculitis. *N Engl J Med* 1997, 337, 1512-1525.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Cohen Tervaert JW, Huitema MG, Hene RJ, Sluiter WJ, The T, van der Hem GK et al.** Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre. *Lancet* 1990; 336:709-711.
- 12. Savige J, Davis D, Falk DJ, Jennette JC, Wiik A.** ANCA and associated diseases; A review of clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin. Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Westman K, Bygren P, Eilert I, Wiik A, Wieslander J.** Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCAs; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndroms. *Nephrol Dial transplant* 1997, 12, 1863-1868.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Symbolforklaring. Förklaringar till symboler.

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

Ag	Antigen. Antigène. Antigeno, Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Diluent. Fortynning. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontrol. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

EURO DIAGNOSTICA AB

Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden

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

E-mail: info@eurodiagnostica.comwww.eurodiagnostica.com