

Instruction

## WIESLAB<sup>®</sup> ANCA screen kit

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

Break apart microtitration strips (12x8) 96 wells  
Store the kit at +2-8° C  
For in vitro diagnostic use only



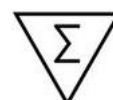
Document No. E-23-0159-05  
May, 2015

### WIESLAB<sup>®</sup> ANCA screen kit

English: page .....	2
Français: page .....	12
Español: página .....	19
Deutsch: Seite .....	25
Italiano: pagina .....	32
Dansk: side.....	39
Svenska: sida.....	45

**REF** CP 111

**IVD**



## **INTENDED USE**

The Wieslab<sup>®</sup> ANCA screening test kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for qualitative detection of IgG antibodies to proteinase 3 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 systemic vasculitis, especially Wegener's granulomatosis (WG) and microscopic polyangiitis (MP). The analysis should be performed by trained laboratory professionals. FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

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

## **Summary and explanation**

ANCAs (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) are a family of autoantibodies related to vasculitis and inflammatory disorders. Since 1985, when c-ANCA was shown to be related to Wegener's granulomatosis (1), interest in ANCAs has steadily increased, and today these antibodies are considered to be major diagnostic tools for the diagnosis and follow up of systemic vasculitis (13, 14).

The first method to detect ANCA was indirect immuno-fluorescence (IIF) performed on ethanol fixed granulocytes (2). This method yields two patterns, a cytoplasmic staining of the granulocyte denoting the presence of c-ANCAs, and a perinuclear staining denoting the presence of p-ANCAs. IIF was followed by ELISAs using the purified proteins (3,4).

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

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

## **Principle of the Wieslab<sup>®</sup> ANCA screen kit**

The wells of the microtiterstrip are coated with purified proteinase 3 and myeloperoxidase. 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**

- 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.

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

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

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

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

The 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 breakapart strips (12x8) wells), coated with purified proteinase 3 (6 strips red coloured) and myeloperoxidase (6 strips green coloured), 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.
- Precision pipettes with disposable tips.
- Washer for strips, absorbent tissue, tubes and a timer.

**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.
2. Pipet 25 µL negative control (NC) into wells A1 and A2.
3. Pipet 25 µL positive control (PC) into wells B1 and B2.
4. Pipet 25 µL of patient serum no.1 into wells C1 and C2, serum no.2 into wells D1 and D2, serum no. 3 into wells E1 and E2 etc. according to the scheme below. Put on the lid and incubate for 10 minutes on a shaker.

	1	2
	<b>Column 1 (PR3-ag) Red</b>	<b>Column 2 (MPO-ag) Green</b>
<b>A</b>	75 µL Dil + 25 µL NC	75 µL Dil + 25 µL NC
<b>B</b>	75 µL Dil + 25 µL PC	75 µL Dil + 25 µL PC
<b>C</b>	75 µL Dil + 25 µL pat 1	75 µL Dil + 25 µL pat 1
<b>D</b>	75 µL Dil + 25 µL pat 2	75 µL Dil + 25 µL pat 2
<b>E</b>	75 µL Dil + 25 µL pat 3	75 µL Dil + 25 µL pat 3
<b>F</b>	75 µL Dil + 25 µL pat 4	75 µL Dil + 25 µL pat 4
<b>G</b>	75 µL Dil + 25 µL pat 5	75 µL Dil + 25 µL pat 5
<b>H</b>	75 µL Dil + 25 µL pat 6	75 µL Dil + 25 µL pat 6

**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 negative control should be  $< 0.3$

The OD for the positive control should be  $> 0.9$

If any of the values are not within their respective ranges, the test should be considered invalid and the test should be repeated.

The patient sample may contain unspecific reactivities if it is positive on both antigens and must be reassayed in a quantitative assay. 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 that an additional control be assayed that is close to the 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 ANCA result. Initiation or changes in treatment should not be based on changes in ANCA concentration alone, but rather on careful clinical observation.

### Expected results

MPO and PR3-ANCA are rarely found in normal healthy individuals. The ANCA screening kit was tested with 131 normal sera. 131 were found to be negative. One new patient with PR3-ANCA is expected per 100000 individuals per year. Around 10% of patients with WG are negative in both IIF and ELISA. MPO-ANCA are found in approximately one half of the sera of MP (microscopic polyangiitis) patients. 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. (Table 1)

The PR3-ANCA was tested with 42 WG sera, 39 were found to be positive.

PR3-ANCA are found in approximately one half of the sera of MP (microscopic polyangiitis) patients.

The PR3-ANCA was tested with 43 MP sera, 21 were found to be positive. (Table 1)

## Performance characteristics

**Table 1. Clinical sensitivity and specificity.** A total of 288 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	
		PR3	MPO	PR3	MPO	PR3	MPO
Blood donors: (NS)	131	131	127	0	4	0	0
WG:	42	3	37	0	1	39	4
MP:	43	20	23	2	0	21	20
SLE:	31	31	24	0	2	0	*5
RA:	41	41	40	0	1	0	0

WG = Wegener's granulomatosis, MP = microscopic polyangiitis RA = rheumatoid arthritis  
SLE = systemic lupus erythematosus GBM = glomerular basement membrane

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

### Clinical sensitivity (Equivocal samples not included in the calculations)

#### PR3-ANCA

WG = 39/42 = 92.9 % 95% CI = 80.5-98.5% MP=21/41=51.2 % 95% CI = 35.1-67.1%

#### MPO-ANCA

WG = 4/41 = 9.7 % 95% CI = 2.7-23.1% MP=20/43=46.5 % 95% CI = 31.2-62.3%

### Clinical specificity (Equivocal samples not included in the calculations)

#### PR3-ANCA

SLE = 31/31 = 100 % 95% CI = 88.8-100%  
RA=41/41=100 % 95% CI = 91.4-100% NS = 131/131 = 100 % 95% CI = 97.2-100%

#### MPO-ANCA

SLE =24/29 =82.8 % 95% CI = 64.2-94.2%  
RA=40/40=100 % 95% CI = 91.2-100% NS = 127/127 = 100 % 95% CI = 97.1-100%

**Table 2. Relative sensitivity and specificity** of the Wieslab® PR3-ANCA screen kit compared to a semi-quantitative ELISA. A total of 216 frozen retrospective sera were assayed. The table summarises the results.

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

### Sera falling in the equivocal range are not included in the calculations:

Relative sensitivity PR3-ANCA = 59/60 = 98.3 % 95% CI = 91.1-100%  
Relative sensitivity MPO-ANCA = 23/24 = 95.8 % 95% CI = 78.9-99.9%

Relative specificity PR3-ANCA = 152/152 = 100 % 95% CI = 97.6-100%  
Relative specificity MPO-ANCA = 182/182 = 100 % 95% CI = 98-100%

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

**Table 3. Batch to batch variation** was determined by testing three different samples in 4 different batches.

Sample		OD ratio		SD		CV %	
PR3	MPO	PR3	MPO	PR3	MPO	PR3	MPO
2	3	34.5	16.3	1.0	3.9	3	24
5	6	19.8	27.8	2.2	2.1	11	7
8	9	33.8	23.0	1.5	2.9	4	13

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

Sample		OD ratio		SD		CV %	
PR3	MPO	PR3	MPO	PR3	MPO	PR3	MPO
PK	PK	27.3	17.3	2.9	3.8	11	21
5	6	12.1	16.5	1.2	0.8	10	5

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

Sample		Mean OD		SD		CV %	
PR3	MPO	PR3	MPO	PR3	MPO	PR3	MPO
PK	PK	1.3	1.9	0.07	0.06	6	3
5	6	1.3	1.5	0.06	0.07	5	5

**TROUBLESHOOTING**

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



**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*. Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
- 4. Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA ? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 9. Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. *I. Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
- 12. Savige J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wiik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.

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

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. 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. Atensi3n. Achtung. Attenzione. Atenç3o. 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.

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

## INSTRUCTION ABREGEE SUR LE MANIEMENT ET L'EXECUTION

CETTE TROUSSE EST UTILISEE POUR LE DIAGNOSTIC *IN VITRO*

La trousse Wieslab® CP 111 utilise une méthode immuno-enzymatique (*ELISA*) pour la détection et la détermination qualitative des anticorps IgG, contre des Protein 3 (PR3) et Myeloperoxidas (MPO) dans le sérum humain. Le résultat peut servir d'indice en cas de soupçon de Vaskulitis systémique, particulièrement Granulomatosis de Wegener et Polyangiitis microscopique. L'analyse doit être effectuée par du personnel qualifié.

### Prelevement d'échantillons

L'analyse- CP 111 est à utiliser avec des échantillons sériques. Veuillez penser à manipuler les contenus

d'éprouvettes et surtout les échantillons sériques comme étant susceptibles de transmettre des agents infectieux.

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

Les échantillons peuvent être conservés à 2-8°C si l'analyse est réalisée dans les jours suivants. Pour des périodes plus longues, conserver le sérum à -20°C ou à température inférieure. Ne pas utiliser de congélateurs à décongélation automatique, qui pourraient 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 de faux résultats. Le NCCLS a publié des directives pour la conservation des échantillons sanguins (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

### Precautions d'emploi

N'utiliser que pour le diagnostic in vitro.

Le sérum humain pour la préparation de contrôles et de calibration a été testé négatif à la présence d'anticorps au virus humain immunodéficient 1 & 2 (VIH 1&2), hépatite C (VHC), aussi bien qu'à l'hépatite B antigènes de surface. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, VIH 1/2, VHC et Hepatite B ou autres composants infectieux, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux.

C'est pourquoi il faudra manipuler avec précaution tout échantillon d'origine humaine.

Le Centers for Disease Control and Prevention (CDC) et le National Institutes of Health (NIH) aux USA recommandent d'analyser en laboratoire les matériaux potentiellement infectieux en niveau de sécurité 2.

Toutes les solutions contiennent du ProClin 300 comme conservateur. Ne jamais pipeter avec la bouche. Evitez tout contact direct avec la peau lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons de patients. Les réactifs contenant du ProClin 300 peuvent être irritants. C'est pourquoi il faut absolument éviter le contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, laver immédiatement les parties touchées avec une grande quantité d'eau.

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

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

### Materiel necessaire mais non fourni

Lecteur de plaque avec filtre à 405 nm.

Micropipettes de précision avec embouts jetables.

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

### Contenu du paquet et sa conservation

- Un cadre avec 6 languettes rouges d'échantillons séparables enduites d'une préparation de Protein 3 (PR3).
- Un cadre avec 6 languettes vertes d'échantillons séparables enduites d'une préparation de Myeloperoxidas (MPO), y compris les couvercles correspondant. Le tout conditionné dans un sachet étanche contenant un déshydratant.
- Un flacon de 0,75 mL, contrôle négatif (NC), sérum humain dans le diluant (couleur verte).
- Un flacon de 0,75 mL, contrôle positif (PC), sérum humain dans le diluant (couleur rouge).
- Un flacon de 13 mL, solution conjuguée, avec de la phosphatase alcaline conjuguée à des anti-IgG humaines purifiées (couleur bleue).
- Un flacon de 32 mL, tampon diluant (couleur rouge) contenant une solution PBS.
- Un flacon de 13 mL, solution de substrat pNPP.
- Un flacon de 30 mL, solution de lavage (30 x concentrée)

Tous les composants cités précédemment, sauf les solutions de lavage dans la trousse, sont immédiatement prêts à l'emploi. Conserver la trousse entre +2 – 8° C et prière de n'extraire que le nombre de barrettes nécessaire. Les barrettes restantes doivent être conservées dans le sachet fermé.

### Préparation des réactifs

Avant de démarrer la procédure de dosage, tous les composants de la trousse doivent être amenés à température ambiante de (20-25° C). Pour éviter l'évaporation, il est nécessaire d'utiliser un couvercle. Pour l'incubation (à température ambiante), si un agitateur n'est pas utilisé, les temps suivants sont à respecter: première incubation d'échantillon 10 minutes, incubations avec la solution conjuguée 20-30 minutes, incubation de substrat 20-30 minutes.

### Procédure de dosage

En cas d'observation de cristaux de sel dans le flacon contenant la solution de lavage concentrée, placer le flacon dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à dissolution complète des cristaux avant de procéder à la dilution de la solution de lavage. Diluer 10 mL de solution de lavage concentrée 30 fois (X30) dans 290 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.

### Dilution d'échantillons et temps d'incubation

Diluer les échantillons de patient et les contrôles comme indiqué ci-dessous sur le schéma.

	<b>Colonne 1 PR3 couleur rouge</b>	<b>Colonne 2 MPO couleur verte</b>
<b>A</b>	75µL Dil + 25µL NC	75µL Dil + 25µL NC
<b>B</b>	75µL Dil + 25µL PC	75µL Dil + 25µL PC
<b>C</b>	75µL Dil + 25µL Pat 1	75µL Dil + 25µL Pat 1
<b>D</b>	75µL Dil + 25µL Pat 2	75µL Dil + 25µL Pat 2
<b>E</b>	75µL Dil + 25µL Pat 3	75µL Dil + 25µL Pat 3
<b>F</b>	75µL Dil + 25µL Pat 4	75µL Dil + 25µL Pat 4
<b>G</b>	Etc.	Etc.
<b>H</b>		

**Incuber 10 minutes à température ambiante dans l'agitateur.**

**Après l'incubation des échantillons / Supplément de solution conjuguée**

Laver 3 fois avec 300µL 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.

Ajouter 100 µL de conjugué dans chaque puits. Incuber de nouveau pendant 10 min dans l'agitateur à température ambiante.

**Après incubation du conjugué**

Laver comme indiqué plus haut.

**Addition de solution de substrat**

Ajouter 100 µL de solution de substrat pNPP dans chaque puits et incuber de nouveau pendant 10 min dans l'agitateur à température ambiante.

Lire l'absorbance sur un lecteur de microplaque à 405 nm.

**Calculs des résultats**

La valeur d'absorbance pour chaque échantillon est calculée à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Cote d'absorbance (X)} = \frac{\text{Absorbance de l'échantillon de patient pour l'antigène respectif}}{\text{Absorbance des contrôles négatifs (NC) pour l'antigène respectif}}$$

**Contrôle de qualité**

La valeur d'absorbance du contrôle négatif doit être < 0,3.

La valeur d'absorbance du contrôle positif doit être > 0,9.

La cote d'absorbance doit être > 6.

Les contrôles négatif et positif sont prévus pour contrôler tout défaut substantiel des réactifs

Si l'une des valeurs ne donne pas les résultats attendus, le test doit être considéré

comme non valide et il doit être refait. Des contrôles supplémentaires peuvent être dosés suivant les exigences de

la réglementation. Voir les recommandations du contrôle de qualité du NCCLS, document C24-A.

**Interprétation des résultats**

La cote d'absorbance doit être < 3,0 = **négatif**

La cote d'absorbance entre 3,0 et 4,0 = **douteux** ; A renouveler en cas de résultats douteux. si le résultat du deuxième dosage est douteux, doser de nouveau avec une autre méthode ou alors doser un nouvel échantillon.

La cote d'absorbance doit être > 4,0 = **positif**

\* Il est à remarquer qu'un résultat positif ou douteux doit toujours être confirmé par une analyse quantitative.

L'analyse au screening est à plus haute sensibilité que l'analyse quantitative, ce qui conduit à ce que certains des échantillons à valeur positive peu élevée se montrent négatifs à l'analyse quantitative.

### **Limites du dosage**

Le titre d'anticorps d'un patient ne doit pas être utilisé pour mesurer la gravité de la maladie, puisque les anticorps de différents patients peuvent différer les uns des autres par leur affinité (des antigènes utilisés ici). 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 à d'autres paramètres, comme 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 ANCA 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.

Les concentrations ANCA dans un sérum spécifique peuvent varier selon les différentes méthodes d'analyse. Ceci est basé sur les différentes qualités et sensibilités des réactifs qui proviennent d'autres trousse de différents fabricants.

**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*. Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
- 4. Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA ? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 9. Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. I. *Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
- 12. Savige J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wiik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.



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

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. 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. Atensi3n. Achtung. Attenzione. Atenç3o. 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. Inneholder 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.

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

## INSTRUCCIONES DE USO EN VERSIÓN BREVE AL ESPAÑOL

### Utilización de los productos

El Wieslab® CP 111 Set de prueba es una prueba inmunológica de acoplamiento de enzimas (ELISA) para la identificación de anticuerpos IgG, los cuales están dirigidos en contra de las proteínas 3 (PR3) y Mieloperoxidas (MPO) en suero humano. El resultado puede ser un sospechoso indicio sistemático vasculítico, en especial Wegener's Granulomatosis y Polyangiitis microscópica. El análisis debe ser efectuado por personal calificado.

PARA USO DEL DIAGNOSTICO EN VITRO

### Toma de muestras

El análisis CP111 está concebido para las pruebas de suero. Considere que diferentes reactivos sobre todo las pruebas de suero pueden tener componentes potencialmente infecciosos. No analice pruebas que sean ictericas, lípidas o hemolíticas. El suero no activado por calor puede mostrar actividad inespecífica y por tanto no debe ser analizado. Las pruebas pueden ser conservadas entre 2-8° C cuando los análisis sean realizados en los próximos días. La conservación a largo plazo debe realizarse a - 20°C o más. Los congeladores con sistema de autodescongelación no son apropiados para estos casos, debido al riesgo de descongelación de las pruebas. Las pruebas que no han sido debidamente almacenadas pueden arrojar resultados erróneos.

La NCCLS tiene las normativas para el almacenamiento de muestras de sangre (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

### Información de seguridad

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



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

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.

### Equipo adicional requerido que no es parte integrante del set

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

### Contenido y conservación

- Un cuadro con 6 tiras de muestra color rojo que están recubiertas con Proteínas (PR3). Un cuadro con 6 tiras de prueba color verde que están recubiertas con Myeloperoxidas (MPO). Todo con una sustancia secante en una bolsa a prueba de aire que puede volverse a cerrar.
- 0,75 mL Control negativo (NC), Suero humano prediluido „Diluent“ (color verde).
- 0,75 mL Control positivo (PC), Suero humano prediluido „Diluent“ (color rojo).
- 13 mL Solución conjugat con Fosfatasa alcalina acoplada a anticuerpos Anti-IgG (color azul).
- 32 mL Diluyente "Diluent" (Dil), contiene (color rojo).
- 13 mL solución Substrato pNPP.
- 30 mL Solución de lavado (30 x concentrada).

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

### PROCEDIMIENTO

Antes de usarse las soluciones dejarlas que tomen la latemperatura ambiente. Todas las incubaciones deben realizarse a temperatura ambiente (20-25° C). Para evitar la evaporación deben taparse. Para la incubación rigen los siguientes tiempos: Primera prueba de incubación de prueba 10 minutos, incubaciones con solución conjugat 20-30 minutos, incubación de substrato 20-30 minutos.

### Solución de lavado

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

### Dilución de Prueba y tiempo de incubación

Diluya la prueba del paciente y los controles como se muestra en el diagrama.

	<b>Columna 1 PR3 Color rojo</b>	<b>Columna 2 MPO Color verde</b>
<b>A</b>	75µL Dil + 25µL NC	75µL Dil + 25µL NC
<b>B</b>	75µL Dil + 25µL PC	75µL Dil + 25µL PC
<b>C</b>	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL pat 1
<b>D</b>	75µL Dil + 25µL pat 2	75µL Dil + 25µL pat 2
<b>E</b>	75µL Dil + 25µL pat 3	75µL Dil + 25µL pat 3
<b>F</b>	75µL Dil + 25µL pat 4	75µL Dil + 25µL pat 4
<b>G</b>	Etc.	Etc.
<b>H</b>		

**Incúbese en el batidor durante 10 minutos a temperatura ambiente .**

**Añadir solución conjugat**

Lávese 3 veces 300µL con solución de lavado. Con cada ciclo de lavado sea muy cuidadoso al vaciar y rellenar las probetas. Después del último lavado debe extraerse el líquido restante mediante papel absorbente. Añadir 100µL de solución conjugat a cada set de reactivo. Incúbese durante 10 minutos en el batidor.

**Después de la incubación**

Lávese como se indica anteriormente.

**Añadir solución de sustrato**

Añadir 100µL de solución de sustrato pNPP a cada set de reactivo. Incúbese durante 10 minutos en el batidor.

Mida la absorción con un espectrómetro de 405nm.

**Calculación**

La cuota de absorción para cada prueba de Paciente se calcula mediante la siguiente fórmula

$$\text{Cantidad de Absorción (X)} = \frac{\text{Absorción de la prueba del paciente para el respectivo antígeno}}{\text{La absorción del control negativo (NC) para el respectivo antígeno}}$$

**Control de calidad**

La absorción del control negativo debe ser  $< 0,3$

La absorción del control positivo debe ser  $> 0,9$  y la cuota de absorción tiene que ser  $> 6$ .

Los controles positivo y negativo se utilizan para determinar si el Set ha funcionado técnicamente.

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

**Significado de los resultados**

**Cuota de absorción  $< 3,0$  = negativo**

**Cuota de absorción entre  $3,0$  y  $4,0$  = dudoso**

Con resultados dudosos repetir la prueba. Cuando la repetición no sea clara utilice alternativamente otros métodos de comprobación.

**Cuota de absorción  $> 4,0$  = positivo**

**Considere que un resultado positivo o dudoso debe ser siempre ratificado mediante el método cuantitativo.**

El análisis de Screening tiene una mayor sensibilidad que el análisis cuantitativo lo que conlleva a que algunas pruebas positivas con índices bajos se muestren de forma negativa en un test cuantitativo.

**Límites del análisis**

-El concentrado de anticuerpos de un solo paciente no puede ser utilizado para dictaminar la gravedad de la enfermedad, debido a que los anticuerpos de diferentes pacientes presentan diferentes afinidades (del antígeno aquí utilizado) y es por eso que el análisis es difícil de tipificar.

La utilización de los resultados de este análisis no son suficientes para un dictamen clínico. En lugar de éstos deben considerarse los análisis del Test conjuntamente con otros parámetros relevantes como por ejemplo parámetro clínico (síntomas, etc) para la valoración correcta y específica de la situación clínica. Es conocido que sueros de pacientes con otras enfermedades autoinmunes y generalmente individuos sanos muestran reacción cruzada en los resultados de los análisis sin que se tengan pruebas de indicio de enfermedad. En otras palabras un individuo puede reaccionar positivamente para Anticuerpos-ANCA sin que haya pruebas clínicas para señalar una enfermedad.

Al mismo tiempo se sabe que pacientes que padecen la enfermedad pueden reaccionar en forma negativa con Anticuerpos- ANCA. Un tratamiento tampoco debe iniciarse o modificarse por cambios de la concentración ANCA, pero sí debe basarse en el cuadro clínico general. La concentración ANCA de un suero específico puede variar después del análisis con diferentes métodos de prueba. Esto se debe a las diferentes características y sensibilidad de los reactivos que provienen de diferentes Sets y diferentes fabricantes.

**REFERENCES. 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*. Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
- 4. Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA ? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 9. Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. *I. Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
- 12. Savige J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wiik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.

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

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. 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. Atensi3n. Achtung. Attenzione. Atenç3o. 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.

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



## GEBRAUCHSANWEISUNG IN DEUTSCHER KURZFASSUNG

### Benutzung des Produktes

Das Wieslab® CP 111 Test Set ist ein *enzymgekoppelter Immunnachweis (ELISA)* für die Bestimmung IgG Antikörper, welche gegen Protein 3 (PR3) und Myeloperoxidas (MPO) in Humanserum gerichtet sind. Das Resultat kann als Hinweis bei Verdacht von Systemisch Vaskulitis, besonders Wegener's Granulomatosis und mikroskopische Polyangiitis dienen. Die Analyse soll von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

NUZUNG VON DER *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK.

### Probenentnahme

Die CP 111 – Analyse ist für Serumproben gedacht. Bitte bedenken Sie, dass verschiedene Reagenzien und vor allem die Serumproben potentiell infektiöse Bestandteile beinhalten könnten. Analysieren Sie keine solche Proben, die ikterisch, lipämisch oder hämolysiert sind. Wärmeinaktiviertes Serum kann unspezifische Aktivität zeigen und sollte deswegen nicht analysiert werden. Proben können bei 2-8° C aufbewahrt werden, wenn die Analyse innerhalb der nächsten Tage gemacht wird. Eine langfristige Aufbewahrung sollte bei - 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 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 mit einem negativen 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 beim Umgang mit Reagenz- oder Patientenproben mit der Haut. Reagenzien mit ProClin 300 wirken reizend. Deswegen sind der Kontakt mit Haut und Augen unbedingt zu vermeiden. Für den Fall dass Reagenzien mit Haut oder Augen in Berührung gekommen sind, spülen Sie sofort die betroffenen Stellen mit viel Mengen Wasser sorgfältig ab.
- Sicherheitsdatenblätter sind für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile auf Anfrage von Euro Diagnostica erhältlich.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

### Achtung

Enthält ProClin 300:

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

- H317: 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 6 roten abtrennbaren Probestreifen, die mit Protein 3 (PR3) beschichtet sind. Ein Rahmen mit 6 grünen abtrennbaren Probestreifen, die mit Myeloperoxidas (MPO) beschichtet sind. Verpackt in einem mit Trockenmittel gefülltem widerverschließbaren 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 Substrat pNPP Lösung
- 30 mL Waschlösung (30 x Konzentriert).

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 Raumtemperatur erwärmen lassen. Alle Inkubationen bei Raumtemperatur (20-25° C) durchführen. Um Verdunstung zu verhindern, muss ein Deckel benutzt werden. Bitte nehmen Sie nur so viele Ansätze, wie Sie benötigen. Für die Inkubation, wenn ein „Schüttler“ nicht verwendet wird, gelten folgende Zeiten: Erste Probeinkubation 10 Minuten, Inkubationen mit Konjugatlösung 20-30 Minuten, Substartinkubation 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 von 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 Patientenprobe und die Kontrolle wie in unten angegebene Schemata.

	<b>Kolumne 1 PR3 rote Farbe</b>	<b>Kolumne 2 MPO grüne Farbe</b>
<b>A</b>	75µL Dil + 25µL NC	75µL Dil + 25µL NC
<b>B</b>	75µL Dil + 25µL PC	75µL Dil + 25µL PC
<b>C</b>	75µL Dil + 25µL Pat 1	75µL Dil + 25µL Pat 1
<b>D</b>	75µL Dil + 25µL Pat 2	75µL Dil + 25µL Pat 2
<b>E</b>	75µL Dil + 25µL Pat 3	75µL Dil + 25µL Pat 3
<b>F</b>	75µL Dil + 25µL Pat 4	75µL Dil + 25µL Pat 4
<b>G</b>	Etc.	Etc.
<b>H</b>		

**Bei Raumtemperatur am Schüttler für 10 Minuten inkubieren.**

### **Nach der Probeinkubation / Zusatz von Konjugatlösung**

Waschen Sie 3 Mal mit 300µL Waschlösung /Ansatz. Bitte sehr sorgfältig das Entleeren und Befüllen der Probengefäße bei jedem Waschzyklus vornehmen. Nach dem letzten Waschschrift muss die verbleibenden Flüssigkeiten durch Abschlagen der Probestreifen auf absorbierendem Papier entfernt werden.

**Fügen Sie 100 µL Konjugatlösung zu jedem Reaktionsansatz hinzu. Inkubieren Sie mit 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 mit Schüttler für 10-20 Minuten.

Messen Sie die Absorption mit einem Spektrophometer bei 405nm.

### **Berechnungen**

Die Quote der Absorption für jede einzelne Patientenprobe wird mit Hilfe folgende Formel berechnet.

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

### **Qualitätskontrolle**

Die Absorption der negativen Kontrolle soll < 0,3 betragen.

Die Absorption der positiven Kontrolle soll > 0,9 betragen und der Absorptionsquote soll > 6 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 ungültig erklärt und die Analyse wiederholt werden. Sollten es erforderlich sein, können weitere Kontrollen analysiert werden. Empfehlungen betreffend Qualitätskontrolle können aus dem NCCLSs Dokument C24-A entnommen werden.

### **Deutung der Resultatae**

Absorptionsquote < 3,0 = **negativ**

Absorptionsquote zwischen 3,0 und 4,0 = **Nicht eindeutig**; Test wiederholen, wenn der Wiederholungstest ebenfalls nicht eindeutig, entweder alternatives Nachweisverfahren verwenden, oder eine neue Probe anfordern.

Absorptionsquote > 4,0 = **positiv**

**Beachten Sie, dass ein positives oder nicht eindeutiges Testergebnis immer durch eine quantitative Methode bestätigt werden sollte.**

Die Screeninganalyse hat eine etwas höhere Sensitivität als die quantitative Analyse, was dazu führt, dass positiven Ergebnisse negativ in einem quantitativem Test 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 Tests ist 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 Seren von Patienten mit anderen autoimmunen Krankheiten und generell gesunde Individuen eine gewisse Kreuzreaktion in der Analyse aufweisen können. Mit anderen Worten, einige Individuen können positiv für ANCA - Antikörper reagieren, ohne dass sonstige klinische Belege für die Krankheit angezeigt werden. Gleichzeitig ist es auch bekannt, dass Patienten mit aktiver Krankheit negativ reagieren können. Eine Behandlung darf nicht nur auf Grund eines positiven Resultates begonnen werden. Eine Behandlung darf auch nicht aufgrund von Veränderungen der Titer initiiert oder geändert werden, sondern muss in jedem Fall auf dem klinischen Gesamtbild basieren.

Die ANCA Konzentrationen in einem spezifischen Serum können nach Analyse mit unterschiedlichen Testmethoden variieren. Das beruht primär auf den unterschiedlichen Eigenschaften und Empfindlichkeiten der Reagenzien, die aus unterschiedlichen Sets verschiedener Hersteller stammen.

**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*. Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
- 4. Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA ? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 9. Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. *I. Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
- 12. Savige J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wiik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.

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

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. 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. Inholder tilstrækkelig for 96 test. Inholder 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.

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

## ISTRUZIONI D'USO ABBREVIATE

### Uso previsto

Wieslab® CP 111 è un kit immunoenzimatico in fase solida (ELISA) per la determinazione di anticorpi qualitativi Mieloperossidasi (MPO) e Proteinasi 3 (PR3) nel siero umano. Il test si usa per la rilevazione di anticorpi in siero umano. I risultati del test sono di ausilio nella diagnosi delle vasculiti sistemiche, specialmente della granulomatosi di Wegener e della poliangite microscopica. 'Questo test non è stato pensato per essere usato su individui sani ma su paziente che mostrano consistenti segni delle malattie di WG e MP. Le analisi devono essere effettuate da laboratori professionali specializzati.

**Un risultato positivo, deve essere sempre confermata da un'analisi semi – quantitativa.**

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

### Raccolta dei campioni

Per il test ANCA 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 conservazione 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.

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



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

### Attenzione

Contiene ProClin 300:

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



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

### 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 pozzetti , 48 colorati di rosso e rivestiti con gli antigeni proteinasi 3 (PR3), e 48 pozzetti colorati di verde e rivestiti con antigeni mieloperossidasi (MPO), 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 IgG 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.

Utilizzare solo il numero necessario di pozzetti da utilizzare per il test. Mettere i pozzetti 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). **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

- 1 Pipettate 75 µL di diluente (Dil) in ogni pozzetto.
- 2 Pipettate 25 µL controllo negativo (CN) nel pozzetto A 1.
- 3 Pipettate 25 µL controllo positivo (CP) nel pozzetto B 1.
- 4 Pipettate 25 µL del siero del paziente nr. 1 nel pozzetto C 1; il siero nr. 2 nel pozzetto D 1; il siero nr. 3 nel pozzetto E 1 ecc. come descritto nel seguente schema. Incubate per 10 minuti con coperchio su un agitatore.

	Pozzetti Rossi (PR3)	Pozzetti Verdi (MPO)
A	75µL Dil + 25µL CN	75µL Dil + 25µL CN
B	75µL Dil + 25µL CP	75µL Dil + 25µL CP
C	75µL Dil + 25µL paz 1	75µL Dil + 25µL paz 1
D	75µL Dil + 25µL paz 2	75µL Dil + 25µL paz 2
E	75µL Dil + 25µL paz 3	75µL Dil + 25µL paz 3
F	75µL Dil + 25µL paz 4	75µL Dil + 25µL paz 4
G	75µL Dil + 25µL paz 5	75µL Dil + 25µL paz 5
H	75µL Dil + 25µL paz 6	75µL Dil + 25µL paz 6

**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

Distribuire 100 µL di coniugato in ciascun pozzetto. Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente su un agitatore. (senza agitatore incubare 20 –30 minuti)

**Dopo l'incubazione del coniugato**

Lavare come sopra

**Distribuire la soluzione substrato**

Distribuire 100 µL di substrato pNPP in ciascun pozzetto, incubare per 10-20 minuti a temperatura ambiente su un agitatore (senza agitatore incubate per 20 –30 minuti)

Leggere le assorbanze a 405 nm con un lettore di micropiastre 10 – 20 minuti dopo l'aggiunta del substrato se si usa un agitatore oppure dopo 20 – 30 minuti senza l'agitatore.

**Calcolo dei risultati**

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

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

Il campione del paziente è negativo se la densità ottica è < 3.0; è equivoco se è 3.0 – 4.0 e positivo se è > 4.0

**Controllo di qualità**

La densità ottica del controllo negativo (CN) deve essere di < 0.3.

La densità ottica del controllo positivo (CP) deve essere di > 0.9

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 ANCA positivo. L'inizio o le modifiche di un trattamento non devono basarsi soltanto su variazioni dei rapporti di densità ottica degli ANCA, ma piuttosto sulla base di osservazioni cliniche accurate.

### **Risultati attesi**

Raramente in individui sani viene riscontrato il PR3 e l'MPO-ANCA. Il Kit CP111 è stato testato su 131 sieri normali e 131 sono risultati negativi PR3 – ANCA mentre al MPO – ANCA 127 sono risultati negativi e 4 sono risultati equivoci. Circa il 10% dei pazienti con WG è risultato negativo sia al IIF sia all'ELISA. Il PR3 – ANCA è stato testato su 42 sieri contenenti WG e 39 sono risultati positivi. PR3 – ANCA è stato testato anche con sieri MP e in 21 è risultato positivo. MPO – ANCA è stato anche testato su 42 sieri aventi WG e 4 sono risultati positivi. MPO – ANCA è stato testato anche su 43 sieri aventi MP e 20 sono risultati positivi. (vedi tabella 1)

**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*. Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
- 4. Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA ? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 9. Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. I. *Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
- 12. Savige J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wiik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.

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

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. 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. Atensi3n. Achtung. Attenzione. Atenç3o. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
 96	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Indeholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

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

**KORTFATTET DANSK INSTRUKTION.****Produktets anvendelse**

Wieslab<sup>®</sup> CP 111 test er et enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) til bestemmelse af antistoffer mod 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 og hurtig progressiv glomerulonefritis, Wegeners granulomatose (WG) og mikroskopisk polyangiitis. Analysen skal udføres af uddannede laboranter.

**MÅ KUN ANVENDES TIL IN VITRO TEKNIK.**

**Prøvetagning**

Wieslab<sup>®</sup> CP 111 analysen anvendes på serumprøver. Vær opmærksom på at flere reagenser og ikke mindst serumpøver kan indeholde infektiøst materiale. Undlad at analysere sera som er ikteriske, lipidholdige eller hæmolyserede. Varme inaktiverede sera kan give uspecifikke reaktioner og bør derfor ikke analyseres. Prøverne kan opbevares ved 2-8 °C hvis analysen sker indenfor nogle få dage. Langtidsopbevaring af sera skal ske ved -20 °C eller koldere. Anvend ikke fryserer med automatisk afrimning, da man risikere at sera bliver tøet og frosset og dermed nedbryder antistofferne. Prøver som opbevares forkert kan give forkerte resultater. 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), hepatitis C (HCV) og hepatitis B antigen. Bemærk at ingen metode helt kan garantere fravær af HIV, HCV, hepatitis B virus og andre infektiøse agens. Alle humane prøver må derfor betragtes som potentielt infektiøse og håndteres med forsigtighed.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC) og National Institutes of Health (NIH) i USA anbefaler at potentielt infektiøse materialer håndteres i overensstemmelse med Biosafety Level 2.
- Alle opløsninger indeholder ProClin 300 som konserveringsmiddel. Brug aldrig mundpipette. Undgå at få reagens eller serum direkte på huden. Reagenser med ProClin 300 er irriterende og derfor skal kontakt med hun og øjne undgås. Hvis det sker at reagens kommer i kontakt med hud eller øjne, skyl med store mængder vand.
- Materiale-sikkerhedsdatablade for alle farlige komponenter i dette kit fås ved henvendelse til Euro Diagnostica.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

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 udslæt: Søg lægehjælp.

**Nødvendig udstyr og materiale som ikke indgår i kittet**

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

**KIT komponenter og opbevaring af reagenser**

- En ramme med 48 røde brønde belagt med proteinase 3 ( PR3 ), 48 grønne brønde belagt med MPO 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 opløst. 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.

	<b>Røde brønde (PR3)</b>	<b>Grønne brønde (MPO)</b>
<b>A</b>	75µL Dil + 25µL NC	75µL Dil + 25µL NC
<b>B</b>	75µL Dil + 25µL PC	75µL Dil + 25µL PC
<b>C</b>	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL pat 1
<b>D</b>	75µL Dil + 25µL pat 2	75µL Dil + 25µL pat 2
<b>E</b>	75µL Dil + 25µL pat 3	75µL Dil + 25µL pat 3
<b>F</b>	75µL Dil + 25µL pat 4	75µL Dil + 25µL pat 4
<b>G</b>	75µL Dil + 25µL pat 5	75µL Dil + 25µL pat 5
<b>H</b>	75µL Dil + 25µL pat 6	75µL Dil + 25µL pat 6

**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  $> 0,9$

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 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.

OD ratio  $> 4,0$  = **Positiv**

**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 uden at have klinisk tegn på sygdom. Samtidig ved man, at der også forekommer patienter med aktiv sygdom, som er negativ for ANCA. Immunsuppressiv behandling må ikke begyndes kun baseret på positivt ANCA resultat. Heller ikke må behandling påbegyndes eller ændres kun på grund af ændringer i ANCA titeren, men skal baseres på det totale kliniske billede.

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

**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*. Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
- 4. Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA ? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 9. Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. *I. Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
- 12. Savige J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wiik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.

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

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

## KORTFATTAD SVENSK INSTRUKTION

### Produktens användning

Wieslab® CP 111 test kit är en *enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* för bestämning av IgG antikroppar riktade mot proteinas 3 (PR3) och myeloperoxidase (MPO) i humant serum. Resultatet kan ge vägledning vid utredning av misstänkt systemisk vaskulit särskilt, Wegeners granulomatos och mikroskopisk polyangiit. Analysen skall utföras av behörig personal.

FÖR *IN VITRO* DIAGNOSTIK ANVÄNDNING.

### Provtagning

CP 111 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 tinar 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 yantigen. 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 kittet

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

### Ingående reagens och förvaring

- En ram med 6 röda strips avbrytbara brunnar belagda med proteinas 3 (PR3) och 6 gröna strips avbrytbara brunnar belagda med myeloperoxidase (MPO), 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 fosfat-märkta anti-IgG antikroppar (blå färg).
- 32 mL spädningslösning "Diluent" (Dil), PBS (röd färg).
- 13 mL substrat pNPP
- 30 mL tvättlösning, 30x koncentrerad.

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

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

### TESTPROCEDUR

Alla lösningar skall vara rumstempererade innan man använder dem. Alla inkubationer skall ske vid rumstemperatur (20-25° C). Bryt av det antal brunnar som behövs. Använd lock för att undvika avdunstning. **Följande inkubationstider gäller om inte skak används: första 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 nedanstående tabell

	<b>Column 1 PR3 röd färg</b>	<b>Column 2 MPO grön färg</b>
<b>A</b>	75µL Dil + 25µL NC	75µL Dil + 25µL NC
<b>B</b>	75µL Dil + 25µL PC	75µL Dil + 25µL PC
<b>C</b>	75µL Dil + 25µL pat 1	75µL Dil + 25µL pat 1
<b>D</b>	75µL Dil + 25µL pat 2	75µL Dil + 25µL pat 2
<b>E</b>	75µL Dil + 25µL pat 3	75µL Dil + 25µL pat 3
<b>F</b>	75µL Dil + 25µL pat 4	75µL Dil + 25µL pat 4
<b>G</b>	Etc.	Etc.
<b>H</b>		

**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 substrat pNPP**

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

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  $> 0,9$ .

De negativa och positiva kontrollerna används för att kontrollera att kitet fungerar tekniskt. Om något/några värden inte faller inom angivet område bör testen ej godkännas och man skall göra om analysen. 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 skall 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 negativa i 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 ANCA utan övriga kliniska belägg för sjukdom. Samtidigt vet man att det också förekommer patienter med aktiv sjukdom som är negativa för ANCA. Immunosuppressiv behandling får inte påbörjas enbart baserat på ett positivt ANCA resultat. Inte heller får behandling initieras eller ändras enbart på grund av ändringar i ANCA titern utan skall istället baseras på den totala kliniska bilden.

- 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*. Kluwer Academic Publishers 1993, A9, 1-14.
- 3. Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990, 127, 139-145.
- 4. Segelmark M, et al.** How and why should we detect ANCA ? *Clin Exp Rheumatol* 2000, 18, 629-635.
- 5. Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL.** Wegeners autoantigen decoded. *Nature* 1990, 346, 520.
- 6. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 7. Falk RJ, Jennette JC.** Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988, 318, 1651-1657.
- 8. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers 1994, 1-9.
- 9. Kamech L, Harper L, Savage C.** ANCA - Positive Vasculitis. *I. Am Soc Nephrol* 2002 43 1953 - 1960.
- 10. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1995, 48, 844-850.
- 11. Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of ANCA levels: a prospective study. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 2025 - 2033.
- 12. Savige J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, and Wiik A.** ANCA and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000, 57, 846-862.
- 13. Savige J, Gills D, Benson E et al.** International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA. *Am J Clin Pathol* 1999, 111, 507-513.
- 14. Won H, et al.** Serial ANCA titers. Useful tool for the prevention of relapses in ANCA associated vasculitis. *Kidney Int*, 2003, 63, 1079-1085.



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

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

**EURO DIAGNOSTICA AB**

Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden  
 Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88  
 E-mail: [info@eurodiagnostica.com](mailto:info@eurodiagnostica.com)  
[www.eurodiagnostica.com](http://www.eurodiagnostica.com)