

Instruction

WIESLAB[®] ANCA panel kit

Qualitative specificity assay

Enzyme immunoassay for detection of autoantibodies
against six ANCA antigens
(Azurocidin, BPI, Cathepsin G, Elastase, Lactoferrin and Lysozyme)

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



Document No. E-23-0168-07
May, 2015

WIESLAB[®] ANCA panel kit Qualitative specificity assay

English:	page	2
Français:	page	11
Español:	página	18
Deutsch:	Seite	24
Italiano:	pagina	31
Dansk:	side.....	38
Norsk:	side.....	44
Svenska:	sida.....	50

REF

PAN 106

IVD



INTENDED USE

The Wieslab[®] ANCA panel test kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for qualitative detection of IgG antibodies to azurocidin, BPI, cathepsin G, elastase, lactoferrin, and lysozyme in human sera. The assay is used to detect antibodies in a single serum specimen.

The test is useful as an aid in screening for specificity of ANCA IIF positive samples which are negative for PR3-ANCA and MPO-ANCA, or for detection of ANCA in inflammatory bowel diseases, liver diseases etc. One patient's sample can be tested for all six antigens on twelve occasions.

The analysis should be performed by trained laboratory professionals.

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

Summary and explanation

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

The first method to detect ANCA was indirect immunofluorescence (IIF) performed on ethanol fixed granulocytes (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).

In systemic vasculitis the two most important antigens are proteinase 3 and myeloperoxidase. In inflammatory conditions like rheumatoid arthritis, autoimmune hepatitis or inflammatory bowel disease however, many other antigens have been proposed to be involved. The most important being azurocidin, BPI, (BPI=Bactericidal permeability increasing protein), cathepsin G, elastase, lactoferrin and lysozyme.

Principle of the Wieslab[®] ANCA screening assay

The wells of a microtitre strips are coated with purified ANCA antigens. During the first incubation, specific antibodies in diluted serum, will bind to the antigen coating.

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

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

After a further washing step, detection of specific antibodies is obtained by incubation with substrate solution. The amount of bound antibodies correlates to the colour intensity and is measured in terms of absorbance (optical density (OD)).

Warnings and precautions

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

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



Warning

BUF	WASH	30X
DIL		

CONJ	
SUBS	pNPP

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 panel assay is for use with serum. Handle as if capable of transmitting 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 strips (12x8) coated with ANCA antigens and one lid sealed in a foil pack .
- 13 mL conjugate containing alkaline phosphatase-labelled antibodies to human IgG (blue colour).
- 32 mL Diluent (Dil) containing PBS (red colour).
- 13 mL 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 strips needed for testing, resealing the aluminium package carefully.

Materials or equipment required but not provided

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

PROCEDURE

All solutions should be used at room temperature. One strip should be used for one patient sample. Use the enclosed protocol for ANCA panel when performing the assay.

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 30 mL of the 30x concentrated wash solution in 870 mL distilled water. When stored at 2-8° C, the diluted wash solution is stable until the date of expiration of the kit.

Dilution of serum and incubation

Dilute the patient's serum 1/80 with diluent (790 µl diluent + 10 µl serum).

Pipet 100 µl of diluted serum in well H and 100 µl diluent in well H according to the schema below.

Column 1	Antigen coat
100 µl diluted serum	← HSA as blank
100 µl diluted serum	← Azurocidin
100 µl diluted serum	← BPI
100 µl diluted serum	← Cathepsin G
100 µl diluted serum	← Elastase
100 µl diluted serum	← Lactoferrin
100 µl diluted serum	← Lysozyme
100 µl diluent	← Human IgG (Assay Control)

Put on the lid and incubate for 30 minutes at room temperature (+20-25° C).

After serum incubation

Wash 3 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 30 minutes in room temperature (+20-25° C).

After conjugate incubation

Wash 3 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 solution

Add 100 µl substrate pNPP solution to each well. Put on the lid and incubate for 60 minutes in room temperature (+20-25° C).

Read the absorbance at 405 nm on a microplate reader.

Calculations

The patient sample is negative for azurocidin, elastase, laktoferrin and lysozyme if the OD value is < 0,4.

The patient sample is negative for BPI and cathepsin G if the OD value is <0,6

If the patient OD value is > 0,4 on azurocidin or elastase or laktoferrin or lysozyme or > 0,6 on BPI or cathepsin G an optical density (OD) ratio for the antigen is calculated as follows:

$$\text{OD ratio} = \frac{\text{OD of patient sample for the antigen}}{\text{OD of patient sample blank (well A)}}$$

The patient sample is **negative** if the OD ratio is < 3,0 and **positive** if the OD ratio is > 4,0.

3.0 – 4,0 is **equivocal**. Retest, if still equivocal retest by an alternative method or test a new sample.

Quality Control

The OD for the patient sample in the blank well (A) should be $< 0,35$

The OD for the assay control (well H) should be $> 1,0$

If the OD value for the patient sample is > 0.35 in the blank well (A), the sample contains unspecific reactivities, which has to be checked for.

If the assay control value is 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 more than one antigen.

Interpretation of results

A sample with a OD ratio of : $< 3,0 = \text{Negative}$ $> 4,0 = \text{Positive}$

$3.0 - 4,0 = \text{Equivocal}$; Retest, if still equivocal retest by an alternative method or test a new sample.

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 standardisation 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

$< 5\%$ ANCA are found in normal healthy individuals. Normally around 1% of samples sent to a laboratory contain unspecific reactivities, which have to be checked for.

Performance characteristics

Table 1. Clinical sensitivity and specificity. A total of 258 frozen retrospective sera with clinical characterisation were assayed. The following table summarises the results. (Equivocal samples are not included in the calculations).

Control and Disease groups	Total number	AZ pos	BPI pos	CH pos	EL pos	LF pos	LY pos
Blood donors:	90	0	4	4	0	0	0
Syst. Vasculitis:	48	2	2	1	0	0	0
Cystic fibrosis:	31	0	17	1	0	0	0
Ulcerative colitis:	46	2	1	1	0	0	1
Coeliac disease:	46	0	0	2	0	0	1
SCDA:	42	0	1	10	0	0	0
Crohns syndrome:	45	0	1	1	0	0	2

IBD = Inflammatory bowel diseases, **SCDA** = serum containing different autoantibodies (ANA, DNA, SSA etc.)

Table 2. Batch to batch-variation was determined by testing one sample in three -five different batches.

	AZ	BPI	CH	EL	LF	LY
Batch #	5	4	4	4	3	5
Mean OD	2,1	1,2	1,6	2,3	1,6	1,8
SD	0,3	0,15	0,35	0,25	0,03	0,49
CV %	14	12	22	11	2	13

Table 3. Inter-assay precision was determined by testing two samples in six different runs.

	AZ		BPI		CH		EL		LF		LY	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Sample	1,5	2,6	1,2	1,3	1,6	1,3	1,8	2,1	1,6	1,1	1,7	0,7
OD	1,5	2,6	1,2	1,3	1,6	1,3	1,8	2,1	1,6	1,1	1,7	0,7
SD	0,12	0,05	0,13	0,1	0,05	0,09	0,14	0,11	0,13	0,08	0,06	0,09
CV %	8	2	12	7	3	6	8	5	8	7	4	14

Table 4. Intra-assay precision was determined by testing one sample in 12 wells.

	AZ	BPI	CH	EL	LF	LY
Sample	1	1	1	1	1	1
Mean OD	1,8	1,1	1,9	2,0	1,8	1,4
SD	0,08	0,03	0,05	0,14	0,08	0,04
CV%	5	3	2	7	5	3

Troubleshooting

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

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

Bygren, P., Rasmussen, N., Isaksson, B., and Wieslander, J. (1992). Anti-neutrophil cytoplasm antibodies, anti-GBM antibodies and anti-dsDNA antibodies in glomerulonephritis. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 783-792.

Cohen Tervaert, J.W., Mulder, L., Stegeman, C., Elema, J., Huitema, M., The, H., and Kallenberg, C. (1993). Occurrence of autoantibodies to human leucocyte elastase in Wegener's granulomatosis and other inflammatory disorders. *Ann. Rheum. Dis.* 52, 115-120.

Coremans, I.E., Hagen, E.C., van der Voort, E.A., van der Woude, F.J., Daha, M.R., and Breedveld, F.C. (1993). Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic enzymes in Felty's syndrome. *Clin. Exp Rheumatol.* 11, 255-262.

Halbwachs Mecaelli, L., Nusbaum, P., Noel, L.H., Reumaux, D., Erlinger, S., Grunfeld, J.P., and Lesavre, P. (1992). Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 79-84.

Lesavre, P., Nusbaum, P., and Halbwachs Mecaelli, L. (1993). Methods of detection of anti-cathepsin G autoantibodies in human. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 257-261.

Peen, E., et al. Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. *Gut.* 34, 56-62.

Skogh, T. and Peen, E. (1993). Lactoferrin, anti-lactoferrin antibodies and inflammatory disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 533-538.

Zhao MH, Lockwood CM. Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996, 103, 397-402.

Zhao MH, Jones S.J., Lockwood C.M. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:49-56.

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

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. 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. 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.

<table border="1"> <tr> <td data-bbox="395 197 491 257">Ag</td> </tr> </table>	Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.		
Ag				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="395 300 491 360">DIL</td> </tr> </table>	DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Fortynning. Spädningsbuffert.		
DIL				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="355 403 491 463">CONJ</td> </tr> </table>	CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.		
CONJ				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="124 528 256 589">BUF</td> <td data-bbox="256 528 405 589">WASH</td> <td data-bbox="405 528 507 589">30X</td> </tr> </table>	BUF	WASH	30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.
BUF	WASH	30X		
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="220 640 352 701">SUBS</td> <td data-bbox="352 640 491 701">pNPP</td> </tr> </table>	SUBS	pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.	
SUBS	pNPP			

INSTRUCTION ABREGEE SUR LE MANIEMENT ET L'EXECUTION

CETTE TROUSSE EST UTILISEE POUR LE DIAGNOSTIC *IN VITRO*

La trousse Wieslab® PAN 106 utilise une méthode immuno-enzymatique (*ELISA*) pour la détection et la détermination semi-quantitative des anticorps IgG, contre des antigènes ANCA définis dans le sérum humain, ainsi que Azurocidin, BPI, Cathepsin G, Elastase, Laktoferrin et Lysozym. Le résultat peut servir d'indice en cas de soupçon de maladie du foie et de maladies inflammatoires intestinales. L'analyse doit être effectuée par du personnel qualifié.

Prelevement d'échantillons

L'analyse-PAN 106 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 Hépatite 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.



Attention

BUF	WASH	30X
DIL		

CONJ	
SUBS	pNPP

Contient ProClin 300:
Masse de réaction de: 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

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

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 des languettes d'échantillons (12x8 well) enduites d'une préparation d'antigènes ANCA, y compris le couvercle correspondant. Le tout conditionné dans un sachet étanche contenant un déshydratant.
- 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), les temps suivants sont à respecter: première incubation d'échantillon 30 minutes, incubations avec la solution conjuguée 30 minutes, incubation de substrat 60 minutes (\pm 10 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 le sérum de patient au 1/80 avec le tampon diluant (790 μ l de diluant +10 μ l de sérum) et pipeter selon le tableau de distribution ci-après :

	Colonne 1	Antigènes
A	100 μ L sérum humain dilué	← HSA comme valeur blanc
B	100 μ L sérum humain dilué	← Azurocidin
C	100 μ L sérum humain dilué	← BPI
D	100 μ L sérum humain dilué	← Cathepsin G
E	100 μ L sérum humain dilué	← Elastase
F	100 μ L sérum humain dilué	← Laktoferrin
G	100 μ L sérum humain dilué	← Lysozym
H	100 μ L Diluant	← Humant IgG, contrôle d'analyse

Mettre le couvercle et incuber 30 minutes à température ambiante.

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 30 min à température ambiante.

Après incubation du conjugué

Laver comme indiqué plus haut.

Addition de solution de substrat

- Ajouter 100 µl de solution de substrat dans chaque puits et incuber la microplaque, pendant 60 min (± 10 min) à température ambiante (20-25° C).

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

Calculs des résultats

L'échantillon est interprété négatif pour Azurocidin, Elastase, Laktoferrin et Lysozym, si l'absorbance est < 0,4. L'échantillon est négatif pour BPI et Cathepsin G, si l'absorbance est < 0,6.

Pour le cas où l'échantillon montre une absorbance > 0,4 pour un des Antigènes Azurocidin, Elastase, Laktoferrin, Lysozym ou >0,6 pour des Antigènes BPI, Cathepsin G, la cote d'absorbance est calculée à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Cote d'absorbance (X)} = \frac{\text{L'absorbance de l'échantillon de patient pour l'antigène respectif}}{\text{L'absorbance de la valeur blanc (Contenant d'échantillon A)}}$$

L'échantillon est interprété **négatif**, si la cote d'absorbance est < 3,0 et **positif**, si la cote d'absorbance est > 4,0. Une valeur entre 3,0 – 4,0 est considérée comme douteuse et le test devrait dans ce cas être renouvelé soit avec une autre méthode ou alors doser un nouvel échantillon.

Contrôle de qualité

L'absorbance de la valeur blanc (contenant d'échantillon A) doit être < 0,35.

L'absorbance du contrôle d'analyse (contenant d'échantillon H) doit être > 1,0.

Dans le cas où l'absorbance de l'échantillon dans le contenant d'échantillon A est > 0,35, celui-ci contient une réactivité immunitaire non spécifique qui doit être examinée séparément.

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

Cote d'absorbance < 3,0 = **négatif**

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.

Cote d'absorbance > 4,0 = **positif**

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

- Bygren, P., Rasmussen, N., Isaksson, B., and Wieslander, J. (1992).** Anti-neutrophil cytoplasm antibodies, anti-GBM antibodies and anti-dsDNA antibodies in glomerulonephritis. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 783-792.
- Cohen Tervaert, J.W., Mulder, L., Stegeman, C., Elema, J., Huitema, M., The, H., and Kallenberg, C. (1993).** Occurrence of autoantibodies to human leucocyte elastase in Wegener's granulomatosis and other inflammatory disorders. *Ann. Rheum. Dis.* 52, 115-120.
- Coremans, I.E., Hagen, E.C., van der Voort, E.A., van der Woude, F.J., Daha, M.R., and Breedveld, F.C. (1993).** Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic enzymes in Felty's syndrome. *Clin. Exp Rheumatol.* 11, 255-262.
- Halbwachs Mecaelli, L., Nusbaum, P., Noel, L.H., Reumaux, D., Erlinger, S., Grunfeld, J.P., and Lesavre, P. (1992).** Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 79-84.
- Lesavre, P., Nusbaum, P., and Halbwachs Mecaelli, L. (1993).** Methods of detection of anti-cathepsin G autoantibodies in human. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 257-261.
- Peen, E., et al.** Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. *Gut.* 34, 56-62.
- Skogh, T. and Peen, E. (1993).** Lactoferrin, anti-lactoferrin antibodies and inflammatory disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 533-538.
- Zhao MH, Lockwood CM.** Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996, 103, 397-402.
- Zhao MH, Jones S.J., Lockwood C.M.** Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:49-56.

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

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. 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. 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.

<table border="1"> <tr> <td data-bbox="395 197 491 255">Ag</td> </tr> </table>	Ag	<p>Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.</p>		
Ag				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="395 295 491 353">DIL</td> </tr> </table>	DIL	<p>Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Fortynning. Spädningsbuffert.</p>		
DIL				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="355 394 491 452">CONJ</td> </tr> </table>	CONJ	<p>Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.</p>		
CONJ				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="124 521 256 580">BUF</td> <td data-bbox="256 521 405 580">WASH</td> <td data-bbox="405 521 512 580">30X</td> </tr> </table>	BUF	WASH	30X	<p>Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.</p>
BUF	WASH	30X		
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="220 636 352 694">SUBS</td> <td data-bbox="352 636 491 694">pNPP</td> </tr> </table>	SUBS	pNPP	<p>Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.</p>	
SUBS	pNPP			

INSTRUCCIONES DE USO EN VERSIÓN BREVE AL ESPAÑOL

El Análisis Wieslab® PAN 106 es un prueba inmunológica de acoplamiento de enzimas (ELISA) para la identificación y análisis cuantitativo de Anticuerpos IgG los cuales están dirigidos en contra de antígenos ANCA así como Azurocidin, BPI, Cathepsin G, Elastas, Laktoferrin y Lysozym El resultado puede ser un sospechoso indicio de enfermedades de hígado y enfermedades infecciosas en la zona intestinal. El análisis debe ser realizado por personal calificado.

PARA USO DEL DIAGNOSTICO EN VITRO :

Toma de muestras

El análisis PAN 106 está concebido para las pruebas de suero. Considere que diferentes reactivos sobre todo las pruebas de suero pueden tener componenetes potencialmente infecciosos. No analice pruebas que sean ictericas, lípidas o hemolíticas. El suero no activado por calor puede mostrar actividad inespecifica 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) en Estados Unidos recomiendan que materiales potencialmente infecciosos deben ser investigados en laboratorios de nivel de seguridad 2.
- Todas las soluciones contienen ProClin 300 como conservante. No manipule nunca la pipeta con la boca. Evite el contacto directo de la piel con los reactivos o las muestras de los pacientes. Reactivos con ProClin 300 actúan de forma irritante, por eso es indispensable evitar el contacto con la piel y los ojos. En caso de que un reactivo entre en contacto con la piel o los ojos, enjuague inmediatamente y con cuidado la zona afectada con gran cantidad de agua.
- Pueden solicitarse a Euro Diagnostica las hojas de datos de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.



Atención

BUF	WASH	30X
DIL		

CONJ	
SUBS	pNPP

Contiene ProClin 300:
 Masa de reacción de: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7]
 and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

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

Equipo adicional requerido que no es parte integrante del set:

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

Conservación

- Un cuadro con tiras de muestra (12x8 well), que están recubiertas con Antígenos ANCA con sus respectivas tapas. Todo dentro de una bolsa a prueba de aire, rellena de sustancia secante.
- 13 mL solución conjugat con fosfato alcalino unido al anticuerpo Anti-IgG (color azul).
- 32 mL solución diluyente "Diluent" (Dil) , contiene PBS (color rojo).
- 13 mL solución sustrato pNPP.
- 30 mL solución de lavado (30 x concentrada)

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

PROCEDIMIENTO

Antes de usarse las soluciones dejarlas que tomen la temperatura ambiente. 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 30 minutos, incubaciones con solución conjugat 30 minutos, incubación de sustrato 60 Minutos (\pm 10 minutos).

Solución de lavado

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

Dilución de prueba y tiempo de incubación

Diluya la Prueba del Paciente con 1/80 de Diluyente de prueba (790 μ L Diluent + 10 μ L Suero) y extraiga los valores fde acuerdo al diagrama siguiente:

	Columna 1	Antígeno
A	100 μ L Prueba de suero diluída	← HSA sin valor
B	100 μ L Prueba de suero diluída	← Azurocidin
C	100 μ L Prueba de suero diluída	← BPI
D	100 μ L Prueba de suero diluída	← Cathepsin G
E	100 μ L Prueba de suero diluída	← Elastas
F	100 μ L Prueba de suero diluída	← Laktoferrin
G	100 μ L Prueba de suero diluída	← Lysozym
H	100 μ L Diluyente	← Humant IgG, control de análisis

Tápese e incúbese durante 30 Minutos a temperatura ambiente .

Después de la prueba de incubación / Adición de solución conjugat

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

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

Después de la incubación

Lave como se indica arriba.

Anada solución de substrato

Anada 100µl de solución de substrato a cada set de reactivo. Incúbese durante 60 Minutos (+/- 10 minutos).

Mida la absorción con un espectrómetro de 405nm.

Calculación

La Prueba es negativa para Azurocidin, Elastase, Laktoferrin y Lysozym cuando la absorción es < 0,4 .

La Prueba es negativa para BPI y Cathepsin G cuando la absorción es < 0,6 .

En caso de que la prueba de absorción sea > 0,4 para uno de los Antígenos Azurocidin, Elastase, Laktoferrin, Lysozym o >0,6 para Antígenos BPI, Cathepsin G, se calcula la cuota de absorción con la ayuda de la siguiente fórmula:

$$\text{Parámetro de absorción (X)} = \frac{\text{Absorción de la Pruba del paciente para Antígeno respectivo}}{\text{Absorción sin valor (Recipiente de Prueba A)}}$$

La Prueba es negativa , **cuando el parámetro de absorción es < 3,0** y positiva cuando el parámetro de absorción es > 4,0 . Un valor entre 3,0 – 4, 0 se considerará dudoso y en este caso debe repetirse el análisis. Si el resultado sigue siendo dudoso debe realizarse un análisis alternativo o tomar una nueva Prueba .

Control de calidad

La absorción sin valor (Recipiente de prueba A) debe ser < 0,35.

La absorción del control de análisis (Recipiente de Prueba H) debe ser > 1,0.

En caso de que la absorción del recipiente de prueba A sea > 0,35 esto indica una inmuno reacción no específica que deberá ser analizada separadamente.

El control negativo y positivo se utilizan para determinar si el test ha funcionado bien técnicamente En el caso de que uno o varios valores se encuentren fuera de los valores indicados el test se considera nulo y debe repetirse el análisis. Si las autoridades locales así lo exigen pueden ser realizados controles adicionales. Recomendaciones del control de calidad se encuentran en NCCLSs Dokument C24-A

Significado de los resultados

Parámetro de absorción < 3,0 = **negativo**

Parámetro de absorción entre 3,0 und 4,0 = **dudoso**. Con resultados dudosos repetir la prueba. Cuando la repetición de la prueba no sea clara utilice alternativamente otros métodos de comprobación, o analice una nueva prueba.

Parámetro de absorción > 4,0 = **positivo**

Límites del análisis

-El concentrado de anticuerpos de un solo paciente no puede ser utilizado para dictaminar la gravedad de la enfermedad, debido a que los anticuerpos de diferentes pacientes presentan diferentes afinidades (del anígeno 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

Bygren, P., Rasmussen, N., Isaksson, B., and Wieslander, J. (1992). Anti-neutrophil cytoplasm antibodies, anti-GBM antibodies and anti-dsDNA antibodies in glomerulonephritis. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 783-792.

Cohen Tervaert, J.W., Mulder, L., Stegeman, C., Elema, J., Huitema, M., The, H., and Kallenberg, C. (1993). Occurrence of autoantibodies to human leucocyte elastase in Wegener's granulomatosis and other inflammatory disorders. *Ann. Rheum. Dis.* 52, 115-120.

Coremans, I.E., Hagen, E.C., van der Voort, E.A., van der Woude, F.J., Daha, M.R., and Breedveld, F.C. (1993). Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic enzymes in Felty's syndrome. *Clin. Exp Rheumatol.* 11, 255-262.

Halbwachs Mecaelli, L., Nusbaum, P., Noel, L.H., Reumaux, D., Erlinger, S., Grunfeld, J.P., and Lesavre, P. (1992). Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 79-84.

Lesavre, P., Nusbaum, P., and Halbwachs Mecaelli, L. (1993). Methods of detection of anti-cathepsin G autoantibodies in human. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 257-261.

Peen, E., et al. Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. *Gut.* 34, 56-62.

Skogh, T. and Peen, E. (1993). Lactoferrin, anti-lactoferrin antibodies and inflammatory disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 533-538.

Zhao MH, Lockwood CM. Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996, 103, 397-402.

Zhao MH, Jones S.J., Lockwood C.M. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:49-56.

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

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. 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. 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.

<table border="1"> <tr> <td data-bbox="395 197 491 255">Ag</td> </tr> </table>	Ag	<p>Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.</p>		
Ag				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="395 295 491 353">DIL</td> </tr> </table>	DIL	<p>Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Fortynning. Spädningsbuffert.</p>		
DIL				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="355 394 491 452">CONJ</td> </tr> </table>	CONJ	<p>Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.</p>		
CONJ				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="124 521 256 580">BUF</td> <td data-bbox="256 521 405 580">WASH</td> <td data-bbox="405 521 507 580">30X</td> </tr> </table>	BUF	WASH	30X	<p>Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.</p>
BUF	WASH	30X		
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="220 636 352 694">SUBS</td> <td data-bbox="352 636 491 694">pNPP</td> </tr> </table>	SUBS	pNPP	<p>Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.</p>	
SUBS	pNPP			

GEBRAUCHSANWEISUNG IN DEUTSCHER KURZFASSUNG

Benutzung des Produktes

Das Wieslab® PAN 106 Test ist ein *enzymgekoppelter Immunnachweis (ELISA)* für die qualitative Bestimmung von IgG Antikörper, welche gegen definierte ANCA Antigene sowie Azurocidin, BPI, Cathepsin G, Elastas, Laktoferrin und Lysozym gerichtet sind. Das Resultat kann als Hinweis bei Verdacht von Leberkrankungen und entzündlichen Krankheiten im Darmbereich dienen. Die Analyse soll von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

NUZUNG IN DER *IN-VITRO*- DIAGNOSTIK:

Probenentnahme

Die PAN 106-Analyse ist für Serumproben gedacht. Bitte bedenken Sie, dass verschiedene Reagenzien und vor allem die Serumproben potentiell infektiöse Bestandteile beinhalten könnten. Analysieren Sie nicht solche Proben, die ikterisch, lipämisch oder hämolysiert sind. Wärmeinaktiviertes Serum kann unspezifische Aktivität zeigen und sollte deswegen nicht analysiert werden. Proben können bei 2-8° C aufbewahrt werden, wenn die Analyse innerhalb der nächsten Tage gemacht wird. Eine langfristige Aufbewahrung sollte bei - 20° C oder kälter erfolgen. Gefrierschränke mit automatischer Abtaueinrichtung sind nicht für die Aufbewahrung geeignet, da das Risiko des Auftauens der Proben besteht. Proben, die nicht ordnungsgemäß gelagert worden sind, können falsche Ergebnisse hervorrufen. NCCLS hat Richtlinien für die Lagerung von Blutproben herausgegeben (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Sicherheitsinformation

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



Achtung

BUF	WASH	30X
DIL		

CONJ	
SUBS	pNPP

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 Probestreifen (12x8 well), die mit ANCA Antigen beschichtet sind, nebst zugehörigem Deckel. Aufbewahrt in einem mit Trockenmittel gefülltem widerverschließbarem Beutel aus luftdichter Folie.
- 13 mL Konjugatlösung, mit alkalischer Phosphatase 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 Waschlösung im Set, sind gebrauchsfertig. Bewahren Sie das Set im Kühlschrank bei +2-8° C auf Bitte entnehmen Sie nur so viele Probestreifen wie nötig. Die restlichen Probestreifen müssen in dem geschlossenen Beutel aufbewahrt werden.

TESTPROZEDUR

Alle Lösungen vor Gebrauch auf Zimmertemperatur erwärmen lassen. Alle Inkubationen bei Zimmertemperatur (20-25° C) durchführen. Um Verdunstung zu verhindern, muss ein Deckel benutzt werden. Für jede Probe wird ein Doppelstreifen verwendet. Für die Inkubation gelten folgende Zeiten: Erste Probeinkubation 30 Minuten, Inkubationen mit Konjugatlösung 30 Minuten, Substartinkubation 60 Minuten (± 10 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 mit 1/80 mit dem Probenverdünnungspuffer (790 µl Diluent + 10 µl Serum) und pipettieren Sie wie in der nachfolgend aufgeführten Tabelle:

	Kolumne 1	Antigen
A	100 µl verdünnte Serumprobe	← HSA als Leerwert
B	100 µl verdünnte Serumprobe	← Azurocidin
C	100 µl verdünnte Serumprobe	← BPI
D	100 µl verdünnte Serumprobe	← Cathepsin G
E	100 µl verdünnte Serumprobe	← Elastas
F	100 µl verdünnte Serumprobe	← Laktoferrin
G	100 µl verdünnte Serumprobe	← Lysozym
H	100 µl Diluent	← Humant IgG, Analysekontrolle

Deckel aufsetzen und bei Zimmertemperatur 30 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 für 30 Minuten.

Nach der Konjugatinkubation

Waschen Sie wie oben angegeben.

Hinzufügen der Substratlösung pNPP

Fügen Sie 100µl Substratlösung zu jedem Reaktionsansatz hinzu. Für 60 Minuten (+/- 10 Minuten) inkubieren.

Messen Sie die Absorption mit einem Spektrophometer bei 405nm.

Auswertung

Die Probe ist negativ für Azurocidin, Elastase, Laktoferrin und Lysozym wenn die Absorption < 0,4 beträgt. Die Probe ist negativ für BPI und Cathepsin G wenn die Absorption < 0,6 beträgt.

Sollte die Probe eine Absorption mit > 0,4 für einen von die Antigene Azurocidin , Elastase, Laktoferrin, Lysozym oder >0,6 für Antigen BPI, Cathepsin G zeigen, wird die Absorptionsquote mit Hilfe folgende Formel berechnet:

$$\text{Absorptionsquote (X)} = \frac{\text{Die Absorption der Patientenprobe für respektive Antigen}}{\text{Die Absorption des Leerwerts (Probegefäß A)}}$$

Die Probe ist **negativ**, wenn die Absorptionsquote < 3,0 ist und **positiv**, wenn die Absorptionsquote > 4,0 ist. Ein Wert bei 3,0 – 4, 0 wird als nicht eindeutig bewertet und der Test sollte in diesem Fall wiederholt werden.

Wenn das Resultat immer noch als nicht eindeutig ist, sollte entweder ein alternatives Nachweisverfahren verwendet werden, oder eine neue Probe verwendet werden.

Qualitätskontrolle

Die Absorption des Leerwerts (Probegefäß A) soll < 0,35 betragen.

Die Absorption der Analysekontrolle (Probegefäß H) soll > 1,0 betragen.

Falls die Absorption der Probe in Probegefäß A > 0,35 beträgt, beinhaltet die Probe unspezifische Immunreaktivität welche separat ermittelt werden.

Die Negativ – und die Positivkontrolle werden benutzt um festzustellen ob das Set technisch funktioniert hat. Falls eine oder mehrere Werte nicht innerhalb der angegebenen Größenordnung liegen, sollte der Test als nicht gültig erklärt und die Analyse wiederholt werden. Sollten lokale Behörden es fordern, können weitere Kontrollen analysiert werden. Empfehlungen betreffend Qualitätskontrolle können aus dem NCCLSs Dokument C24-A entnommen werden.

Auswertung der Resultate

Absorptionsquote < 3,0 = **negativ** Absorptionsquote > 4,0 = **positiv**

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

Die Grenzen der Analyse

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

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

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

- Bygren, P., Rasmussen, N., Isaksson, B., and Wieslander, J. (1992).** Anti-neutrophil cytoplasm antibodies, anti-GBM antibodies and anti-dsDNA antibodies in glomerulonephritis. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 783-792.
- Cohen Tervaert, J.W., Mulder, L., Stegeman, C., Elema, J., Huitema, M., The, H., and Kallenberg, C. (1993).** Occurrence of autoantibodies to human leucocyte elastase in Wegener's granulomatosis and other inflammatory disorders. *Ann. Rheum. Dis.* 52, 115-120.
- Coremans, I.E., Hagen, E.C., van der Voort, E.A., van der Woude, F.J., Daha, M.R., and Breedveld, F.C. (1993).** Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic enzymes in Felty's syndrome. *Clin. Exp Rheumatol.* 11, 255-262.
- Halbwachs Mecaelli, L., Nusbaum, P., Noel, L.H., Reumaux, D., Erlinger, S., Grunfeld, J.P., and Lesavre, P. (1992).** Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 79-84.
- Lesavre, P., Nusbaum, P., and Halbwachs Mecaelli, L. (1993).** Methods of detection of anti-cathepsin G autoantibodies in human. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 257-261.
- Peen, E., et al.** Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. *Gut.* 34, 56-62.
- Skogh, T. and Peen, E. (1993).** Lactoferrin, anti-lactoferrin antibodies and inflammatory disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 533-538.
- Zhao MH, Lockwood CM.** Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996, 103, 397-402.
- Zhao MH, Jones S.J., Lockwood C.M.** Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:49-56.

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

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. 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. 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.

<table border="1"> <tr> <td data-bbox="395 197 491 255">Ag</td> </tr> </table>	Ag	<p>Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.</p>		
Ag				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="395 295 491 353">DIL</td> </tr> </table>	DIL	<p>Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Fortynning. Spädningsbuffert.</p>		
DIL				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="355 394 491 452">CONJ</td> </tr> </table>	CONJ	<p>Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.</p>		
CONJ				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="124 521 256 580">BUF</td> <td data-bbox="256 521 405 580">WASH</td> <td data-bbox="405 521 507 580">30X</td> </tr> </table>	BUF	WASH	30X	<p>Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.</p>
BUF	WASH	30X		
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="220 636 352 694">SUBS</td> <td data-bbox="352 636 491 694">pNPP</td> </tr> </table>	SUBS	pNPP	<p>Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.</p>	
SUBS	pNPP			

ISTRUZIONI D'USO ABBREVIATE

Uso previsto

Wieslab® ANCA panel test è un kit immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione qualitativa di anticorpi IgG e Azurocidin, BPI, Cathepsin G, Elastase, Lactoferrin e Lysozyme nel siero umano. Il test si usa per la rilevazione di anticorpi in un singolo campione di siero umano. I risultati del test sono di aiuto nello screening della specificità di campioni positivi all'ANCA IIF, che risultano negativi al PR3 – ANCA e al MPO – ANCA o per la determinazione di ANCA nelle malattie infiammatorie dell'intestino, malattie del fegato ecc. Il campione di ogni paziente può essere testato per tutti e sei gli antigeni su dodici occasioni. Le analisi devono essere eseguite da laboratori professionali specializzati.

PER USO DIAGNOSTIC *IN VITRO*.

Raccolta dei campioni

Per il test ANCA panel 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.
- In un dato campione, la concentrazione degli ANCA determinata con metodi di altri produttori può variare a causa delle diversità tra metodi e la specificità dei reagenti.
- Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Euro Diagnostica.



Attenzione

BUF	WASH	30X
DIL		

CONJ	
SUBS	pNPP

Contiene ProClin 300:

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

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

Materiale o accessori necessari ma non forniti

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

Componenti del kit e conservazione dei reagenti

- Una cornice con strips (12 x 8) rivestiti con antigeni Anca , un coperchio. Tutto sigillato in un sacchetto di alluminio con essiccante.
- 13 mL coniugate con fosfatasi alcalina dirette contro IgG umane, (colore blue).
- 32 mL di diluente (Dil) contenente PBS (colore rosso).
- 13mL 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 delle strips necessarie per le analisi. Mettere le strips rimanenti nel sacchetto protettivo con l'essiccante, risigillare e riporre nel frigorifero

PROCEDURA

Tutte le soluzioni devono essere utilizzate a temperatura ambiente. Per ogni campione di paziente usare una strips.

Utilizzare il test ANCA panel usando il protocollo fornito con il Kit

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. Se necessario, ulteriore soluzione di lavaggio può essere così preparata: dissolvere 9.0 g NaCl in 1 L di acqua distillata, aggiungere 0.5 ml tween 20 e miscelare

Diluizione dei sieri e incubazione

Diluite il siero del paziente 1/80, con diluente (790 µl diluente + 10 µl siero).

Pipettate 100 µl di siero del paziente diluito nel pozzetto A-G, e 100 µl nel pozzetto H, come dal seguente schema.

	Colonna 1	Antigen
A	100 µl siero diluite	← HSA
B	100 µl siero diluite	← Azurocidin
C	100 µl siero diluite	← BPI
D	100 µl siero diluite	← Cathepsin G
E	100 µl siero diluite	← Elastase
F	100 µl siero diluite	← Lactoferrin
G	100 µl siero diluite	← Lysozyme
H	100 µl diluente	← Human IgG

Coprire con il coperchio e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente

Dopo l'incubazione dei campioni

Lavare ogni pozzetto 3 volte con la 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

Aggiunta del coniugato

Distribuire 100 µL di coniugato in ciascun pozzetto. Coprire con il coperchio e Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (+20–25° C)

Dopo l'incubazione del coniugato

Lavare come sopra

Aggiunta del substrato pNPP

Aggiungere 100 µL di soluzione substrato in ciascun pozzetto, chiudere con il coperchio e incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (+ 20 – 25° C)

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

Calcolo dei risultati

Il campione del paziente e' negativo alla azurocidin , elastase, laktoferrin e lysozymese se il valore della densita' ottica e' <0. 4

il campione del paziente e' negativo alla BPI e cathespin G se il valore della densita' ottica e' < 0.6

$$\text{Rapporto densita' ottiche} = \frac{\text{densita' ottica del campione per ciascun antigene}}{\text{Densita' ottica del campione del paziente (pozzetto A)}}$$

Il campione del paziente e' **negativo**, se il rapporto della densita' ottica e' < 3,0 e **positivo** se il rapporto della densita' ottica e' di >4,0. se e' di 3,0 – 4,0 e' **equivoco**, ritesta, se risulta ancora equivoco, ritesta con un metodo alternativo o testa un altro campione.

Controllo di qualità

La densita' ottica del campione del paziente nel pozzetto A deve essere di < 0,35

La densita' ottica del controllo delle analisi pozzetto H deve essere di > 1,0

Se la densita' ottica del campione del paziente nel pozzetto (A) , il campione del paziente puo' avere reattivita' non specifiche e deve quindi essere ricontrrollato. Se uno dei valori non rientra nella sua rispettiva scala il test deve considerarsi come non valido e pertanto da ripetersi. Il campione se risultante positivo a piu' di un antigene, puo avere reattivita' non specifiche.

Interpretazione dei risultati

Rapporto di densita' ottica < 3.0 = **Negativo**

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

Rapporto di densita' ottica > 4 = **Positivo**

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

In individui di sana costituzione è stato trovato il < 5% Anca . Normalmente solo 1% spediti in laboratorio hanno presentato reattività non specifiche i quali sono nuovamente controllati.

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

- Bygren, P., Rasmussen, N., Isaksson, B., and Wieslander, J. (1992).** Anti-neutrophil cytoplasm antibodies, anti-GBM antibodies and anti-dsDNA antibodies in glomerulonephritis. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 783-792.
- Cohen Tervaert, J.W., Mulder, L., Stegeman, C., Elema, J., Huitema, M., The, H., and Kallenberg, C. (1993).** Occurrence of autoantibodies to human leucocyte elastase in Wegener's granulomatosis and other inflammatory disorders. *Ann. Rheum. Dis.* 52, 115-120.
- Coremans, I.E., Hagen, E.C., van der Voort, E.A., van der Woude, F.J., Daha, M.R., and Breedveld, F.C. (1993).** Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic enzymes in Felty's syndrome. *Clin. Exp Rheumatol.* 11, 255-262.
- Halbwachs Mecaelli, L., Nusbaum, P., Noel, L.H., Reumaux, D., Erlinger, S., Grunfeld, J.P., and Lesavre, P. (1992).** Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 79-84.
- Lesavre, P., Nusbaum, P., and Halbwachs Mecaelli, L. (1993).** Methods of detection of anti-cathepsin G autoantibodies in human. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 257-261.
- Peen, E., et al.** Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. *Gut.* 34, 56-62.
- Skogh, T. and Peen, E. (1993).** Lactoferrin, anti-lactoferrin antibodies and inflammatory disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 533-538.
- Zhao MH, Lockwood CM.** Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996, 103, 397-402.
- Zhao MH, Jones S.J., Lockwood C.M.** Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:49-56.

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

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

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

KORTFATTET DANSK INSTRUKTION.**Produktets anvendelse**

Wieslab® PAN 106 test er et enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) til bestemmelse af antistoffer mod azurocidin, BPI, cathepsin G, elastas, laktoferrin og lysozym i humant serum. Metoden anvendes til at bestemme antistoffer i et enkelt serum. Analysen skal udføres af uddannede laboranter.

MÅ KUN ANVENDES TIL *IN VITRO* TEKNIK.

Prøvetagning.

Wieslab® PAN 106 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 fryserne 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.

**Advarsel**

BUF	WASH	30X
DIL		

CONJ	
SUBS	pNPP

Indeholder ProClin 300:

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

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

Nødvendig udstyr og materiale som ikke indgår i kittet.

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

KIT komponenter og opbevaring af reagenser.

- En ramme med strips (12 x 8 brønde) belagt med ANCA antigener og et låg. Alt er pakket i tætsluttende foliepose med tørringsmiddel.
- 13 mL konjugatopløsning, alkalisk phofatase-mærket anti-IgG antistoffer (blå farve)
- 32 mL fortyndingsbuffer. "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 30 minutter; konjugat inkubation 30 minutter; substrat inkubation 60 minutter (\pm 10 minutter).

Fremstilling af vaskeopløsning

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

Fortynding og inkubation af sera.

Fortynd patientprøve 1/80 med fortyndingsbuffer (790µl diluent+ 10 µl serum) tilsæt 100 µl/brønd (A til G) og 100 µl diluent i H efter nedenstående skema. Sæt låg på og inkuber 30 minutter ved stuetemperatur.

	Kolumn 1	Antigen
A	100 µL fortyndet serum	HSA blank
B	100 µL fortyndet serum	Azurocidin
C	100 µL fortyndet serum	BPI
D	100 µL fortyndet serum	Cathepsin G
E	100 µL fortyndet serum	Elastas
F	100 µL fortyndet serum	Laktoferrin
G	100 µL fortyndet serum	Lysozym
H	100 µL fortyndet serum	Humant IgG (Test kontrol)

Efter serum inkubation/tilsæt konjugat.

Vask 3 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 30 minutter ved stuetemperatur.

Efter konjugat inkubation

Vask som tidligere.

Tilsætning af substratopløsning.

Tilsæt 100 uL substrat pNPP per brønd, inkuber i 60 minutter ved stuetemperatur. Aflæs absorbansen ved 405 nm med ELISA reader.

Beregninger

Patientprøven er negativ for azurocidin, elastas, laktoferrin og lysozym hvis OD < 0,4. Patientprøven er negativ for BPI og cathepsin G hvis OD < 0,6.

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

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

Kvalitetskontrol

OD værdien for patientprøven i brønde A skal være <0,35

OD værdien for brønde H skal være > 1,0

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

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.

Positivt værdi for mer en et enkelt antistof kan tyde på specifik reaktivitet i prøven.

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**

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 fabrikanter.

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

- Bygren, P., Rasmussen, N., Isaksson, B., and Wieslander, J. (1992).** Anti-neutrophil cytoplasm antibodies, anti-GBM antibodies and anti-dsDNA antibodies in glomerulonephritis. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 783-792.
- Cohen Tervaert, J.W., Mulder, L., Stegeman, C., Elema, J., Huitema, M., The, H., and Kallenberg, C. (1993).** Occurrence of autoantibodies to human leucocyte elastase in Wegener's granulomatosis and other inflammatory disorders. *Ann. Rheum. Dis.* 52, 115-120.
- Coremans, I.E., Hagen, E.C., van der Voort, E.A., van der Woude, F.J., Daha, M.R., and Breedveld, F.C. (1993).** Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic enzymes in Felty's syndrome. *Clin. Exp Rheumatol.* 11, 255-262.
- Halbwachs Mecaelli, L., Nusbaum, P., Noel, L.H., Reumaux, D., Erlinger, S., Grunfeld, J.P., and Lesavre, P. (1992).** Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 79-84.
- Lesavre, P., Nusbaum, P., and Halbwachs Mecaelli, L. (1993).** Methods of detection of anti-cathepsin G autoantibodies in human. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 257-261.
- Peen, E., et al.** Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. *Gut.* 34, 56-62.
- Skogh, T. and Peen, E. (1993).** Lactoferrin, anti-lactoferrin antibodies and inflammatory disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 533-538.
- Zhao MH, Lockwood CM.** Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996, 103, 397-402.
- Zhao MH, Jones S.J., Lockwood C.M.** Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:49-56.

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

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. 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. 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.

<table border="1"> <tr> <td data-bbox="395 197 491 255">Ag</td> </tr> </table>	Ag	<p>Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.</p>		
Ag				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="395 295 491 353">DIL</td> </tr> </table>	DIL	<p>Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Fortynning. Spädningsbuffert.</p>		
DIL				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="355 394 491 452">CONJ</td> </tr> </table>	CONJ	<p>Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.</p>		
CONJ				
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="124 521 256 580">BUF</td> <td data-bbox="256 521 405 580">WASH</td> <td data-bbox="405 521 507 580">30X</td> </tr> </table>	BUF	WASH	30X	<p>Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert 30x konc. Vaskeløsning 30x kons. Tvättbuffert 30x konc.</p>
BUF	WASH	30X		
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="220 636 352 694">SUBS</td> <td data-bbox="352 636 491 694">pNPP</td> </tr> </table>	SUBS	pNPP	<p>Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.</p>	
SUBS	pNPP			

KORTFATTET NORSK INSTRUKSJON

INDIKASJONER

Wieslab™ ANCA paneltestsett er en ELISA-metode (enzyme-linked immunosorbent assay) for kvalitativ påvisning av IgG-antistoffer mot azurocidin, BPI, katepsin G, elastase, laktoferrin og lysozym i humant serum. Assayet brukes til å påvise antistoffer i en enkelt serumprøve.

Testen er nyttig som hjelp ved screening for spesifisitet av ANCA IIF-positive prøver som er negative for PR3-ANCA og MPO-ANCA, eller for påvisning av ANCA ved inflammatoriske tarmsykdommer, leversykdommer osv. En pasientprøve kan testes for alle seks antigener ved tolv tilfeller.

Analysen bør utføres av opplært laboratoriepersonell.

FOR BRUK VED IN VITRO DIAGNOSTISKE FORMÅL.

Advarsler og forsiktighetsregler

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



Advarsel

BUF	WASH	30X
DIL		

CONJ	
SUBS	pNPP

Inneholder ProClin 300:

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

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

Innsamling av prøver

ANCA panelassay er beregnet for bruk med serum. Håndteres som om de kan overføre stoffer.

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

Varmedeaktiverede sera kan gi uspesifisert reaktivitet og bør ikke brukes.

Oppbevar serum mellom 2-8 °C hvis testing skal finne sted i løpet av fem dager. Hvis prøver skal oppbevares over lang tid, bør de oppbevares ved -20 °C eller kaldere. Frostfri fryser må ikke brukes fordi den kan la prøvene gå gjennom frysetiningssykluser og forringe antistoffene. Prøver som er ukorrekt oppbevart eller utsettes for flere frysetiningssykluser kan gi falske resultater.

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

Komponenter i settet og oppbevaring av reagenser

- En ramme med remser (12x8) dekket med ANCA-antigener og ett lokk forseglet i foliepakning.
- 13 mL konjugat som inneholder alkaliske forsfatasemerke antistoffer mot human IgG (blå farge).
- 32 mL fortynning (Dil) som inneholder PBS (rød farge).
- 13 mL substrat pNPP.
- 30 mL vaskeløsning konsentrert 30x.

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

Nødvendige materialer/utstyr som ikke følger med

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

PROSEDYRE

Alle løsninger bør brukes ved romtemperatur. Det anvendes én remse for én pasientprøve. Bruk vedlagte protokoll for ANCA panel ved utføring av assayet.

Klargjøring av vaskeløsning

Dersom det observeres saltkrystaller i flasken med konsentrert vaskeløsning, plasseres flasken i et vannbad på 37°C til krystallene har løst seg opp før vaskeløsningen fortynnes. Fortynn 30 mL av den 30x konsentrerte vaskeløsningen i 870 mL destillert vann. Ved oppbevaring ved 2-8 °C er den fortynnete vaskeløsningen stabil til utløpsdatoen for settet.

Fortynning av serum og inkubasjon

Fortynn pasientserumet 1/80 med fortynning (790 µl fortynning + 10 µl serum).

Pipetter 100 µl fortynnet pasientserum i brønn A-G, og 100 µl fortynning i brønn H i henhold til skjemaet nedenfor.

Søyle 1	Antigenbelegg
100 µl fortynnet serum	← HSA som blank
100 µl fortynnet serum	← Azurocidin
100 µl fortynnet serum	← BPI
100 µl fortynnet serum	← Katepsin G
100 µl fortynnet serum	← Elastase
100 µl fortynnet serum	← Laktoferrin
100 µl fortynnet serum	← Lysozym
100 µl fortynning	← Human IgG (assaykontroll)

Sett på lokket og inkuber i 30 minutter ved romtemperatur (+20-25 °C).

Etter seruminkubasjon

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

Tilsette konjugat

Tilsett 100 µl konjugat i hver brønn. Sett på lokket og inkuber i 30 minutter ved romtemperatur (+20-25 °C).

Etter konjugatinkubasjon

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

Tilsette substratløsning

Tilsett 100 µl substrat pNPP-løsning i hver brønn. Sett på lokket og inkuber i 60 minutter ved romtemperatur (+20-25 °C).

Les av absorbansen ved 405 nm på en mikroplateleser.

Beregninger

Pasientprøven er negativ for azurocidin, elastase, laktoferrin og lysozym hvis OD-verdien er < 0,4.

Pasientprøven er negativ for BPI og katepsin G hvis OD-verdien er <0,6

Hvis pasientens OD-verdi er > 0,4 for azurocidin eller elastase eller laktoferrin eller lysozym eller > 0,6 for BPI eller katepsin G, beregnes et OD-forhold (optisk tetthet) for antigenet på følgende måte:

$$\text{OD-forhold} = \frac{\text{OD for pasientprøven for antigenet}}{\text{OD for pasientprøve blank (brønn A)}}$$

Pasientprøven er **negativ** hvis OD-forholdet er < 3,0 og **positiv** hvis OD-forholdet er > 4,0.

3.0 – 4,0 er **tvetydig**. Test på nytt, hvis fremdeles tvetydig, test på nytt med en annen metode eller test en ny prøve.

Kvalitetskontroll

OD for pasientprøven i den blanke brønnen (A) skal være < 0,35

OD for assaykontrollen (brønn H) skal være > 1,0

Hvis OD-verdien for pasientprøven er > 0,35 i den blanke brønnen (A), inneholder prøven uspesifisert reaktivitet, som må undersøkes.

Hvis assaykontrollverdien ikke ligger innenfor sine respektive områder, bør testen betraktes som ugyldig og testen gjennomføres på nytt.

Pasientprøven kan inneholde uspesifisert reaktivitet hvis den er positiv for mer enn ett antigen.

Tolking av resultatene

En prøve med et OD-forhold på: < 3,0 = **Negativ** > 4,0 = **Positiv**

3.0 – 4,0 = **Tvetydig**; test på nytt, hvis fremdeles tvetydig, test på nytt med en annen metode eller test en ny prøve.

Begrensninger

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

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

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

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

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

- Bygren, P., Rasmussen, N., Isaksson, B., and Wieslander, J. (1992).** Anti-neutrophil cytoplasm antibodies, anti-GBM antibodies and anti-dsDNA antibodies in glomerulonephritis. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 783-792.
- Cohen Tervaert, J.W., Mulder, L., Stegeman, C., Elema, J., Huitema, M., The, H., and Kallenberg, C. (1993).** Occurrence of autoantibodies to human leucocyte elastase in Wegener's granulomatosis and other inflammatory disorders. *Ann. Rheum. Dis.* 52, 115-120.
- Coremans, I.E., Hagen, E.C., van der Voort, E.A., van der Woude, F.J., Daha, M.R., and Breedveld, F.C. (1993).** Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic enzymes in Felty's syndrome. *Clin. Exp Rheumatol.* 11, 255-262.
- Halbwachs Mecaelli, L., Nusbaum, P., Noel, L.H., Reumaux, D., Erlinger, S., Grunfeld, J.P., and Lesavre, P. (1992).** Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 79-84.
- Lesavre, P., Nusbaum, P., and Halbwachs Mecaelli, L. (1993).** Methods of detection of anti-cathepsin G autoantibodies in human. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 257-261.
- Peen, E., et al.** Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. *Gut.* 34, 56-62.
- Skogh, T. and Peen, E. (1993).** Lactoferrin, anti-lactoferrin antibodies and inflammatory disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 533-538.
- Zhao MH, Lockwood CM.** Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996, 103, 397-402.
- Zhao MH, Jones S.J., Lockwood C.M.** Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:49-56.

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

	<p>Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.</p>
	<p>Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.</p>
	<p>Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.</p>
	<p>Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.</p>
	<p>Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.</p>
	<p>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.</p>
	<p>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.</p>
	<p>Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.</p>
	<p>Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.</p>
	<p>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.</p>
	<p>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.</p>

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

KORTFATTAD SVENSK INSTRUKTION

Produktens användning

Wieslab® PAN 106 test kit är en *enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* för kvalitativ bestämning av IgG antikroppar i humant serum riktade mot definierade ANCA antigen som azurocidin, BPI, cathepsin G, elastas, laktoferrin och lysozym. Resultatet kan ge vägledning vid utredning av leversjukdomar och inflammatoriska tarmsjukdomar. Analysen skall utföras av behörig personal.
FÖR *IN VITRO* DIAGNOSTIK ANVÄNDNING.

Provtagning

PAN 106 analysen är avsedd för serumprover. Tänk på att flera reagens och inte minst serumprovet potentiellt kan innehålla infektiösa agens. Analysera inte sera som är ikteriska, lipemiska eller hemolyserade. Värmeinaktiverat sera kan ge ospecifik reaktivitet och bör därför ej analyseras. Prover kan förvaras vid 2-8° C om analys sker inom några dagar. Långtidsförvaring skall ske vid -20° C eller kallare. Använd inte frysar med automatisk avfrostning då risk finns att prover töar under avfrostningarna. Prover som förvarats oriktigt kan ge felaktiga resultat. NCCLS har gett ut rekommendationer på hur man förvarar blodprover (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Säkerhetsinformation

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



Varning

BUF	WASH	30X
DIL		

CONJ	
SUBS	pNPP

Innehåller ProClin 300:

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

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

Nödvändig utrustning och material som ej ingår i kitet

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

Ingående reagens och förvaring

- En ram med strips (12 x 8 brunnar) belagda med ANCA antigen, ett lock. Allt förpackat i en återförslutningsbar foliepåse med torkmedel.
- 13 mL konjugatlösning, alkaliskt fosfatasmärkta anti-IgG antikroppar (blå färg).
- 32 mL spädningslösning "Diluent"(Dil), PBS (röd färg).
- 13 mL SubstratpNPP.
- 30 mL tvättlösning, 30x koncentrerad.

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

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

TESTPROCEDUR

Alla lösningar skall vara rumstempererade innan man använder dem. Alla inkubationer skall ske vid rumstemperatur (20-25° C). Ett dubbelstrip används för varje patientprov. Använd lock för att undvika avdunstning. **Följande inkubationstider gäller om inte skak används: provinkubationen 30 minuter, inkubation med konjugat 30 minuter, substratinkubation 60 minuter (± 10 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 1/80 med diluent (790 µL diluent + 10 µL serum) och pipettera enligt tabellen nedan.

	kolumn 1	Antigen
A	100 µL spätt serumprov	← HSA som blank
B	100 µL spätt serumprov	← Azurocidin
C	100 µL spätt serumprov	← BPI
D	100 µL spätt serumprov	← Cathepsin G
E	100 µL spätt serumprov	← Elastas
F	100 µL spätt serumprov	← Laktoferrin
G	100 µL spätt serumprov	← Lysozym
H	100 µL diluent	← Humant IgG, analyskontroll

Sätt på locket och inkubera i rumstemperatur i 30 minuter.

Efter provinkubering / Tillsättning av Konjugat

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

Tillsätt 100 µL konjugatlösning till varje brunn. Sätt på locket och inkubera i rumstemperatur i 30 minuter.

Efter konjugat inkubering

Tvätta som tidigare.

Tillsättande av substrat pNPP

Tillsätt 100 µL substrat pNPP i varje brunn. Sätt på locket och inkubera i rumstemperatur i 60 minuter. Avläs absorbansen i en spektrofotometer vid 405 nm.

Beräkningar

1. Provet är negativt för azurocidin, elastas, laktoferrin och lysozym om absorbansen är $< 0,4$. Provet är negativt för BPI och Cathepsin G om absorbansen är $< 0,6$
2. Om provet visar en absorbans på $> 0,4$ för någon av antigenen azurocidin, elastas, laktoferrin, lysozym eller $>0,6$ för antigenen BPI, cathepsin G, beräknas absorbanskvoten enligt följande formel.

$$\text{Absorbanskvot (X)} = \frac{\text{Patientprovets absorbans för respektive antigen}}{\text{Blankens (brunn A) absorbans}}$$

3. Provet är **negativt** om absorbanskvoten är $< 3,0$ och **positiv** vid absorbanskvot $> 4,0$. Ett värde på $3,0 - 4,0$ bedöms som **gråzon/tvetydigt** och bör köras om. Om tvetydigheten kvarstår efter omkörning bör provet analyseras med annan metod eller nytt prov tas.

Kvalitetskontroll

Blankens (brunn A) absorbans skall vara $< 0,35$. Analyskontrollens (brunn H) absorbans skall vara $> 1,0$. Om provets absorbans i brunn A är $> 0,35$ innehåller provet ospecifik immunreaktivitet som måste utredas/bedömas separat.

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

Tolkning av resultaten

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

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

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

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 allmäkliniska (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. 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/specifitet 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.

Wieslab® kit

Protocol for PAN 106 ANCA panel kit

Date:

Kit lot no:

Signature:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
													Patient sample
A													HSA-blank
B													Azurocidin
C													BPI
D													Cathepsin G
E													Elastase
F													Lactoferrin
G													Lysozyme
H													H IgG (PC)

Controls approved (Y/N)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<0,35													HSA-blank
>1,0													H IgG (PC)

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

Bygren, P., Rasmussen, N., Isaksson, B., and Wieslander, J. (1992). Anti-neutrophil cytoplasm antibodies, anti-GBM antibodies and anti-dsDNA antibodies in glomerulonephritis. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 783-792.

Cohen Tervaert, J.W., Mulder, L., Stegeman, C., Elema, J., Huitema, M., The, H., and Kallenberg, C. (1993). Occurrence of autoantibodies to human leucocyte elastase in Wegener's granulomatosis and other inflammatory disorders. *Ann. Rheum. Dis.* 52, 115-120.

Coremans, I.E., Hagen, E.C., van der Voort, E.A., van der Woude, F.J., Daha, M.R., and Breedveld, F.C. (1993). Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic enzymes in Felty's syndrome. *Clin. Exp Rheumatol.* 11, 255-262.

Halbwachs Mecaelli, L., Nusbaum, P., Noel, L.H., Reumaux, D., Erlinger, S., Grunfeld, J.P., and Lesavre, P. (1992). Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 79-84.

Lesavre, P., Nusbaum, P., and Halbwachs Mecaelli, L. (1993). Methods of detection of anti-cathepsin G autoantibodies in human. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 257-261.

Peen, E., et al. Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. *Gut.* 34, 56-62.

Skogh, T. and Peen, E. (1993). Lactoferrin, anti-lactoferrin antibodies and inflammatory disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 533-538.

Zhao MH, Lockwood CM. Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996, 103, 397-402.

Zhao MH, Jones S.J., Lockwood C.M. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:49-56.

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

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

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

EURO DIAGNOSTICA AB
 Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden
 Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88
 E-mail: info@eurodiagnostica.com
 www.eurodiagnostica.com