



Instructions for Use

PR3 sensitive ELISA

IVD



REF EIA- 5429

Σ 96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
 Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
 Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
 Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.
 Por favor, use apenas a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.**

1	INTENDED PURPOSE EN	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST.....	2
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	2
4	CONTENTS OF THE KIT.....	3
5	MATERIALS REQUIRED.....	3
6	SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING.....	4
7	STORAGE AND STABILITY.....	4
8	PROCEDURAL NOTES.....	4
9	PREPARATION OF REAGENTS.....	4
10	PREPARATION OF SAMPLES.....	4
11	TEST PROCEDURE.....	5
12	VALIDATION.....	5
13	CALCULATION OF RESULTS.....	5
14	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	6
15	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	7
1	DESTINAZIONE D'USO IT	8
2	METODOLOGIA.....	8
3	INDICAZIONI E MISURE PRECAUZIONALI.....	8
4	CONTENUTO DEL KIT.....	9
5	MATERIALE NECESSARIO.....	9
6	RACCOLTA, CONSERVAZIONE, MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI.....	10
7	CONSERVAZIONE E STABILITÀ.....	10
8	AVVERTENZE OPERATIVE.....	10
9	PREPARAZIONE DEI REAGENTI.....	10
10	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	10
11	ESECUZIONE DEL TEST.....	11
12	CONVALIDA.....	11
13	CALCOLO DEI RISULTATI.....	11
14	CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO.....	12
15	LIMITI DEL PROCEDIMENTO.....	13
16	REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI / BIBLIOGRAFÍA / RÉFÉRENCES / REFERÊNCIAS LITERÁRIAS.....	14
	SYMBOLS USED.....	15

1 INTENDED PURPOSE

PR3 sensitive ELISA is a test system for the quantitative measurement of IgG class autoantibodies against proteinase 3 (PR3) in human serum or plasma.

This product is intended for professional in vitro diagnostic use only.

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) are diagnostic markers for ANCA-associated vasculitides. Anti-PR3 characterises granulomatosis with polyangiitis (GPA, formerly: Wegener's granulomatosis). The test supports the differential diagnosis of vasculitis when used in combination with other laboratory and clinical findings.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

Highly purified proteinase 3 (PR3) is bound to microwells.

The determination is based on an indirect enzyme linked immune reaction with the following steps:

Specific antibodies in the patient sample bind to the antigen coated on the surface of the reaction wells. After incubation, a washing step removes unbound and unspecifically bound serum or plasma components.

Subsequently added enzyme conjugate binds to the immobilized antibody-antigen-complexes. After incubation, a second washing step removes unbound enzyme conjugate. After addition of substrate solution the bound enzyme conjugate hydrolyses the substrate forming a blue coloured product. Addition of an acid stops the reaction generating a yellow end-product.

The intensity of the yellow colour correlates with the concentration of the antibody-antigen-complex and can be measured photometrically at 450 nm.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- All reagents of this kit are intended for professional in vitro diagnostic use only.
- Components containing human serum were tested and found negative for HBsAg, HCV, HIV1 and HIV2 by FDA approved methods. No test can guarantee the absence of HBsAg, HCV, HIV1 or HIV2, and so all human serum based reagents in this kit must be handled as though capable of transmitting infection.
- Bovine serum albumin (BSA) used in components has been tested for BSE and found negative.
- Avoid contact with the substrate TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine).
- Stop solution contains acid, classification is non-hazardous. Avoid contact with skin.
- Control, sample buffer and wash buffer contain sodium azide 0.09% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.
- Enzyme conjugate contains ProClin 300 0.05% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.

During handling of all reagents, controls and serum samples observe the existing regulations for laboratory safety regulations and good laboratory practice:

- First aid measures:
In case of skin contact, immediately wash thoroughly with water and soap. Remove contaminated clothing and shoes and wash before reuse. If system fluid comes into contact with skin, wash thoroughly with water. After contact with the eyes carefully rinse the opened eye with running water for at least 10 minutes. Get medical attention if necessary.
- Personal precautions, protective equipment and emergency procedures:
Observe laboratory safety regulations. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow. Do not pipette by mouth. Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled. When spilled, absorb with an inert material and put the spilled material in an appropriate waste disposal.
- Exposure controls / personal protection:
Wear protective gloves of nitril rubber or natural latex. Wear protective glasses. Used according to intended use no dangerous reactions known.
- Conditions to avoid:
Since substrate solution is light-sensitive. Store in the dark.
- For disposal of laboratory waste the national or regional legislation has to be observed.

Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying control sera.

4 CONTENTS OF THE KIT

Symbols		Sufficient for 96 determinations
MICROPLATE	1	One divisible microplate consisting of 12 modules of 8 wells each. Ready to use.
CALIBRATOR A	1x 1.5 mL	Calibrator A, 0 U/mL , containing serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR B	1x 1.5 mL	Calibrator B, 10 U/mL , containing PR3 antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR C	1x 1.5 mL	Calibrator C, 20 U/mL , containing PR3 antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR D	1x 1.5 mL	Calibrator D, 40 U/mL , containing PR3 antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR E	1x 1.5 mL	Calibrator E, 80 U/mL , containing PR3 antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use.
CALIBRATOR F	1x 1.5 mL	Calibrator F, 200 U/mL , containing PR3 antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use.
CONTROL +	1x 1.5 mL	Control positive , containing PR3 antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.
CONTROL -	1x 1.5 mL	Control negative , containing PR3 antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN ₃ 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.
DILUENT	20 mL	Sample Buffer P , containing PBS, BSA, detergent, preservative NaN ₃ 0.09%, yellow, concentrate (5 x).
CONJUGATE	15 mL	Enzyme Conjugate ; containing anti-human IgG antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative Proclin 0.05%, light red. Ready to use.
TMB	15 mL	TMB Substrate ; containing 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin, colourless. Ready to use.
STOP	15 mL	Stop Solution ; contains acid. Ready to use.
WASH	20 mL	Wash Buffer , containing Tris, detergent, preservative NaN ₃ 0.09%; 50X conc.
	1	Instruction for Use
	1	Certificate of Analysis

5 MATERIALS REQUIRED

- Microplate reader capable of endpoint measurements at 450 nm; optional: reference filter at 620 nm
- Data reduction software
- Multi-channel dispenser or repeatable pipette for 100 µL
- Vortex mixer
- Pipettes for 10 µL, 100 µL and 1000 µL
- Laboratory timing device
- Distilled or deionised water
- Measuring cylinder for 1000 mL and 100 mL
- Plastic container for storage of the wash solution

This ELISA is suitable for use on open automated ELISA processors. Each assay has to be validated on the respective automated system. Detailed information is provided upon request.

6 SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING

- Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
- Allow blood to clot and separate the serum or plasma by centrifugation.
- Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia should be avoided, but does not interfere with this assay.
- Specimens may be refrigerated at 2 °C - 8 °C for up to five days or stored at -20 °C up to six months.
- Avoid repetitive freezing and thawing of serum or plasma samples. This may result in variable loss of antibody activity.
- Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

7 STORAGE AND STABILITY

- Store test kit at 2 °C - 8 °C in the dark.
- Do not expose reagents to heat, sun, or strong light during storage and usage.
- Store microplate sealed and desiccated in the clip bag provided.
- Shelf life of the unopened test kit is 18 months from day of production. Unopened reagents are stable until expiration of the kit. See labels for individual batch.
- Diluted Wash Buffer and Sample Buffer are stable for at least 30 days when stored at 2 °C - 8 °C. We recommend consumption on the same day.

8 PROCEDURAL NOTES

- Do not use kit components beyond their expiration dates.
- Do not interchange kit components from different lots and products.
- All materials must be at room temperature (20 °C - 28 °C) prior to use.
- Prepare all reagents and samples. Once started, perform the test without interruption.
- Double determinations may be done. By this means pipetting errors may become obvious.
- Perform the assay steps only in the order indicated.
- Always use fresh sample dilutions.
- Pipette all reagents and samples into the bottom of the wells.
- To avoid carryover or contamination, change the pipette tip between samples and different kit controls.
- Wash microwells thoroughly and remove the last droplets of wash buffer.
- All incubation steps must be accurately timed.
- Do not re-use microplate wells.

9 PREPARATION OF REAGENTS

Wash Buffer (WASH)

Dilute the contents of one vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled or deionised water to a final volume of 1000 mL prior to use.

Sample Buffer P (DILUENT)

Prior to use dilute the contents (20 mL) of one vial of sample buffer 5x concentrate with distilled or deionised water to a final volume of 100 mL.

10 PREPARATION OF SAMPLES

Dilute all patient samples **1:200** with sample buffer prior to use in the assay:
combine 5 µL of sample with 995 µL of sample buffer in a polystyrene tube. Mix well.

Note: Calibrators / Controls are ready to use and need not be diluted.

11 TEST PROCEDURE

Prepare enough microplate modules for all calibrators / controls and patient samples.

1. Pipette **100 µL** of calibrators, controls and prediluted patient samples into the wells.
2. Incubate for **30 minutes** at room temperature (20 °C - 28 °C).
3. Discard the contents of the microwells and **wash 3 times with 300 µL** of wash solution.
4. Dispense **100 µL** of enzyme conjugate into each well.
5. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and **wash 3 times with 300 µL** of wash solution.
7. Dispense **100 µL** of TMB substrate solution into each well.
8. Incubate for **15 minutes** at room temperature
9. Add **100 µL** of stop solution to each well of the modules
10. Incubate for **5 minutes** at room temperature.
11. **Read** the optical density at 450 nm (reference 600-690 nm) and calculate the results. The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read during this time.

Example for a pipetting scheme:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... patient sample, A-F Calibrators, C+, C- controls

12 VALIDATION

Test results are valid if the optical densities at 450 nm for calibrators / controls and the results for controls comply with the reference ranges indicated on the Certificate of Analysis enclosed in each test kit.

If these quality control criteria are not met the assay run is invalid and should be repeated.

13 CALCULATION OF RESULTS

For quantitative results plot the optical density of each calibrator versus the calibrator concentration to create a calibration curve. The concentration of patient samples may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

Using data reduction software a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice.

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 Calibration

This assay system is calibrated in relative arbitrary units, since no international reference preparation is available for this assay.

14.2 Measuring range

The calculation range of this ELISA assay is 0 - 200 U/mL

14.3 Expected values

In a normal range study with samples from healthy blood donors the following ranges have been established with this ELISA assay:

Cut-off: 10 U/mL

14.4 Interpretation of results

Negative: < 10 U/mL

Positive: ≥ 10 U/mL

14.5 Linearity

Patient samples containing high levels of specific antibody were serially diluted in sample buffer to demonstrate the dynamic range of the assay and the upper / lower end of linearity. Activity for each dilution was calculated from the calibration curve using a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates.

Sample	Dilution	Observed [U/mL]	Expected [U/mL]	O/E [%]
1	1:100	168.2	168.2	100
	1:200	84.6	84.1	101
	1:400	41.3	42.1	98
	1:800	20.1	21.0	96
	1:1600	9.7	10.5	92
2	1:100	122.1	122.1	100
	1:200	60.7	61.1	99
	1:400	29.8	30.5	98
	1:800	14.6	15.3	95
	1:1600	6.7	7.6	88

14.6 Limit of detection

Functional sensitivity was determined to be: 0.5 U/mL

14.7 Reproducibility

Intra-assay precision:

Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run. Results for precision-within-assay are shown in the table below.

Inter-assay precision:

Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 6 determinations in 5 different runs. Results for run-to-run precision are shown in the table below.

Intra-Assay		
Sample	Mean [U/mL]	CV [%]
1	11.9	3.5
2	44.7	2.0
3	132.8	2.5

Inter-Assay		
Sample	Mean [U/mL]	CV [%]
1	12.6	3.8
2	46.8	4.1
3	122.7	4.2

14.8 Interfering substances

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dL) or lipemic (up to 3 g/dL triglycerides) sera or plasma, or bilirubin (up to 40 mg/dL) containing sera or plasma.

Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants (Citrate, EDTA, Heparin).

However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

14.9 Study results

Study population	n	n Pos	[%]
Morbus Wegener (cANCA pos)	51	49	96.1
Inflam./Non-inflammatory disorders	450	8	1.8
Healthy controls	80	0	0.0

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
EIA-5429	Pos	49	8	581
	Neg	2	522	
		51	530	

Sensitivity: 96.1 %

Specificity: 98.5 %

Overall agreement: 98.3 %

15 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

This assay is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

The above pathological and normal reference ranges for antibodies in patient samples should be regarded as recommendations only. Each laboratory should establish its own ranges according to ISO 15189 or other applicable laboratory guidelines.



1 DESTINAZIONE D'USO

PR3 sensitive ELISA è un test immunometrico per la misurazione quantitativa degli anticorpi di classe IgG, IgM contro proteinase 3 (PR3) in campioni di siero umano o plasma.

Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso professionale nella diagnostica in vitro.

Gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) sono marcatori diagnostici delle vasculiti ANCA-associate. Gli anti-PR3 caratterizzano la granulomatosi con poliangioite (GPA, in precedenza: granulomatosi di Wegener). Questo test contribuisce alla diagnosi differenziale della vasculite se eseguito in combinazione con altri esami clinici e di laboratorio.

2 METODOLOGIA

Micropiastra: rivestiti con antigene purificato PR3.

La determinazione è basata su una reazione immune indiretta legata a un enzima con le seguenti fasi:

gli anticorpi presenti nei campioni positivi legano gli antigeni presenti sulla superficie dei due pozzetti di reazione formando un complesso antigene-anticorpo. Dopo un periodo di incubazione, una prima fase di lavaggio rimuove le molecole non legate e le molecole non specifiche legate.

Successivamente l'enzima coniugato aggiunto lega il complesso antigene-anticorpo fissato. Dopo un periodo d'incubazione, una seconda fase di lavaggio rimuove l'enzima coniugato non legato. L'aggiunta della soluzione di enzima-substrato provoca idrolisi e la comparsa del colore durante l'incubazione. L'aggiunta di un acido interrompe la reazione formando un giallo prodotto finale.

L'intensità del colore giallo è correlata alla concentrazione del complesso antigene-anticorpo e può essere misurata fotometricamente a 450 nm.

3 INDICAZIONI E MISURE PRECAUZIONALI

- Tutti i reagenti di questa confezione di prova sono destinati esclusivamente all'uso da parte di personale specializzato nella diagnostica in vitro.
- I componenti, che contengono siero umano, sono stati testati con metodi riconosciuti dalla FDA per rilevare la presenza di HBsAg, HCV, HIV1 e HIV2 e sono risultati negativi. Poiché nessun test può garantire l'assenza di HBsAg, HCV, HIV1 e HIV2, consigliamo di trattare tutti i componenti della confezione di prova contenenti siero come materiale potenzialmente infettivo.
- L'albumina di siero bovino (BSA), contenuta nei componenti, è stata testata per rilevare la presenza di ESB ed è risultata negativa.
- Evitare il contatto con il substrato enzimatico TMB (3,3',5,5'-tetrametil benzidina).
- Soluzione Stoppante contiene acido. Questa concentrazione è classificata come non pericolosa. Evitare il contatto con gli occhi.
- Il mezzo di controllo, il tampone e il tampone di lavaggio contengono 0.09% di azoturo di sodio come conservante. Questa concentrazione non è classificata come pericolosa.
- Il coniugato enzimatico contiene 0.05% di ProClin 300 come conservante. Questa concentrazione è classificata come non pericolosa.

Durante la manipolazione di reagenti, mezzi di controllo e campioni dei pazienti si devono osservare le normali norme di sicurezza e la buona prassi di laboratorio:

- Misure di pronto soccorso: in caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e accuratamente con acqua e sapone. Togliersi abiti e scarpe contaminati e lavarli prima di usarli nuovamente. Se il liquido del sistema dovesse entrare in contatto con la cute, lavare accuratamente con acqua. Dopo il contatto con gli occhi, sciacquare con acqua corrente per almeno 10 minuti con le palpebre ben aperte. In caso di necessità consultare un medico.
- Misure in caso di rilascio involontario: osservare le norme di sicurezza della buona prassi di laboratorio. Evitare il contatto con occhi e cute. Non ingerire. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere, fumare o truccarsi nei luoghi in cui vengono manipolati i campioni oppure i componenti del prodotto. Raccogliere eventuali versamenti con materiale inerte ed eseguire uno smaltimento adeguato dei rifiuti.
- Dispositivi di protezione individuale: indossare guanti protettivi in lattice o nitrile. Indossare occhiali di protezione. In caso di uso conforme non sono note reazioni pericolose.
- Condizioni da evitare: poiché il substrato TMB è fotosensibile, immagazzinare al buio.
- I rifiuti devono essere smaltiti in conformità alle disposizioni ambientali nazionali e locali.

Osservare le direttive per il controllo di qualità nei laboratori medici riguardanti il trasporto di sieri di riferimento e/o pool di sieri.

4 CONTENUTO DEL KIT

Simboli		Sufficiente per 96 determinazioni
MICROPLATE	1	Micropiastra a pozzetti separabili costituita da 12 strisce da 8 pozzetti. Pronto per l'uso.
CALIBRATOR A	1x 1,5 mL	Calibratore A, 0 U/mL , contenente siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR B	1x 1,5 mL	Calibratore B, 10 U/mL , contenente anticorpi anti-PR3 in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR C	1x 1,5 mL	Calibratore C, 20 U/mL , contenente anticorpi anti-PR3 in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR D	1x 1,5 mL	Calibratore D, 40 U/mL , contenente anticorpi anti-PR3 in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR E	1x 1,5 mL	Calibratore E, 80 U/mL , contenente anticorpi anti-PR3 in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%). Pronto per l'uso.
CALIBRATOR F	1x 1,5 mL	Calibratore F, 200 U/mL , contenente anticorpi anti-PR3 in un siero matrice / tampone (PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09%). Pronto per l'uso.
CONTROL +	1x 1,5 mL	Controllo positivo contiene anticorpi anti-PR3, PBS, BSA, detergente; NaN ₃ 0.09% come conservante. Pronto per l'uso. La concentrazione è specificata nel certificato di analisi.
CONTROL -	1x 1,5 mL	Controllo negativo contiene anticorpi anti-PR3, PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09% come conservante. Pronto per l'uso. La concentrazione è specificata nel certificato di analisi.
DILUENT	20 mL	Tampone del campione P ; giallo; PBS, BSA, detergente, NaN ₃ 0.09% come conservante, concentrato 5x.
CONJUGATE	15 mL	Coniugato enzimatico ; rosso chiaro; contiene anticorpi IgG anti-umani marcati con perossidasi, PBS, BSA, detergente; 0,05% Proclin come conservante. Pronto per l'uso.
TMB	15 mL	TMB Substrato . Reagente pronto all'uso.
STOP	15 mL	Soluzione Stoppante (contiene acido). Pronto per l'uso.
WASH	20 mL	Tampone di lavaggio ; contiene elettroforesi triacetato, detergente, NaN ₃ 0,09% come conservante; concentrato 50x.
	1	Istruzioni per l'uso
	1	Certificato di analisi

5 MATERIALE NECESSARIO

- Lettore di micropiastre con possibilità di misurazione end point, a 450 nm; riferimento 620 nm opzionale
- Software per l'elaborazione dei dati
- Dispensatore multicanale o pipetta sequenziale da 100 µL
- Agitatore di tipo vortex
- Micropipette con puntali monouso 10 µL, 100 µL, 1000 µL
- Orologio da laboratorio
- Acqua distillata oppure deionizzata
- Cilindro di misura per 1000 mL, 100 mL
- Bottiglie di plastica per la conservazione della soluzione di lavaggio

Automazione

Questo saggio ELISA può essere utilizzato su processori automatici aperti ELISA. L'applicazione deve essere convalidata sul rispettivo sistema automatizzato. Le informazioni sono fornite su richiesta.

6 RACCOLTA, CONSERVAZIONE, MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

- I campioni di sangue si devono ottenere in conformità alle direttive vigenti.
- Lasciare che il sangue si coaguli e ricavare il siero per centrifugazione.
- L'uso di sieri emolitici, lipemici ed itterici va evitato.
- I campioni di siero e di plasma si possono conservare raffreddati a 2 °C - 8 °C fino a 5 giorni.
Se si prevede una conservazione più lunga, i campioni dovrebbero essere aliquotati e surgelati a -20 °C.
- Evitare lo scongelamento ed il congelamento ripetuti! Questo può portare alla perdita variabile dell'attività autoimmune o degli anticorpi.
- L'uso di sieri termoattivati è sconsigliato.

7 CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Immagazzinamento della confezione di prova a 2 °C - 8 °C al buio.
- Durante l'immagazzinamento e l'utilizzo non esporre i reagenti a calore, sole o eccessiva luce.
- Immagazzinare micropiastra nel sacchetto con clip in dotazione, sigillate e con il dissecante.
- La confezione di prova non aperta può essere conservata per 18 mesi dalla data di produzione.
I reagenti non aperti sono stabili fino alla scadenza della confezione di prova. Vedere l'etichetta del singolo lotto.
- Il tampone di lavaggio diluito e il tampone del campione diluito sono stabili per almeno 30 giorni a una temperatura di 2 °C - 8 °C. Consigliamo di consumare in giornata le soluzioni pronte.

8 AVVERTENZE OPERATIVE

- Non usare kit scaduti.
- Non intercambiare componenti di kit con diversi numeri di lotto e prodotti.
- Tutti i materiali devono essere conservati a temperatura ambiente.
- Preparare tutti i reagenti ed i campioni. Una volta avviato il ciclo analitico, eseguito la prova senza interruzioni.
- Determinazioni doppie possono essere fatto. In questo modo errori di pipettamento può diventare evidente.
- Utilizzare la procedura analitica indicata.
- Usare sempre campioni freschi.
- Pipettare reagenti e campioni sul fondo del pozzetto.
- Per evitare di riporto o contaminazione, cambiare la punta della pipetta tra i campioni ed i controlli kit differenti.
- Lavare accuratamente i pozzetti e rimuovere tutte le goccioline di tampone di lavaggio al fine.
- Rispettare accuratamente i tempi di incubazione.
- Non riutilizzare piastre già usate.

9 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Tampone di lavaggio (WASH)

Il contenuto di ogni flacone del concentrato del tampone di lavaggio (20 mL) va diluito prima dell'uso fino ad un volume finale di 1000 mL (1 litro), aggiungendo dell'acqua distillata.

Tampone del campione P (DILUENT)

Prima dell'uso, diluire il contenuto (20 mL) di ciascun flacone di diluente campioni concentrato 5x con acqua distillata o deionizzata fino a un volume finale di 100 mL.

10 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Prima di utilizzare nel test diluire tutti i campioni dei pazienti **1:200** con il tampone del campione:

Mettete **995 µL** di tampone campione diluito in un tubo di polistirolo e aggiungere **5 µL** di campione. Mescolare bene.

Nota: I calibratori / controlli sono pronti per l'uso e non necessitano di diluizioni.

11 ESECUZIONE DEL TEST

Prelevare il numero di strip necessario per l'analisi in funzione del numero di campioni, controlli e calibratori.

1. Dispensare nei rispettivi pozzetti **100 µL** dei calibratori, controlli e campioni prediluiti.
2. Incubare per **30 min** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C).
3. Svuotare i pozzetti e lavare **3 volte con 300 µL** di soluzione di lavaggio.
4. Dispensare **100 µL** di coniugato in ciascun pozzetto.
5. Incubare per **15 min** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C).
6. Svuotare i pozzetti e lavare **3 volte con 300 µL** di soluzione di lavaggio.
7. Dispensare **100 µL** di TMB in ciascun pozzetto.
8. Incubare per **15 min** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C).
9. Dispensare **100 µL** di Soluzione Stoppante a ciascun pozzetto.
10. Incubare per **5 min** a temperatura ambiente (20 °C - 28 °C).
11. **Leggere** la Densità Ottica a 450 nm (riferimento 600-690 nm) e calcolare il risultato.
Il colore è stabile per almeno 30 min. Leggere in questo periodo di tempo.

Esempio di un sistema di dispensazione:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D	P4										
E	E	P5										
F	F	P6										
G	C+	P7										
H	C-	P8										

P1, ... Campioni, A-F Calibratore, C+, C- Controllo

12 CONVALIDA

Il test è valido è valido solo se le densità ottiche a 450 nm dei calibratori / controlli ed i risultati di lettura per i controlli cadono nei limiti indicati sul certificato di analisi allegato a ciascun kit.

Se tutti questi criteri non sono riscontrati, i risultati devono essere considerati non validi e il test deve essere ripetuto.

13 CALCOLO DEI RISULTATI

Per ottenere risultati quantitativi riportare la densità ottica di ciascun calibratore rispetto alla concentrazione del calibratore per costruire una curva di calibrazione. La concentrazione dei campioni da analizzare è determinata tramite la curva di calibrazione così estrapolata.

Software per l'elaborazione dei dati con i 4 parametri curva e lin-log per densità ottica e la concentrazione è il metodo migliore.

14 CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

14.1 Calibrazione

Il sistema di misurazione è calibrato in unità relative arbitrarie, poiché non esiste uno standard internazionale.

14.2 Campo di misura

Il campo di misura è pari a 0 - 200 U/mL

14.3 Valori normali

Nell'ambito di uno studio sul campo di riferimento con campioni di donatori di sangue sani sono stati rilevati i seguenti valori:

valore limite: 10 U/mL

14.4 Interpretazione dei risultati

Negativo: < 10 U/mL

Positivo: ≥ 10 U/mL

14.5 Linearità

Campioni di pazienti con un'elevata concentrazione di anticorpi specifici sono stati sottoposti a diluizione lineare nel tampone per stabilire il campo dinamico dell'analisi nonché l'estremità inferiore e superiore della linearità. L'attività degli anticorpi di ogni stadio di diluizione è stata calcolata dalla curva di calibrazione con un 4 parametri con assi lin-log coordinate.

Campione	Diluizione	Osservato [U/mL]	Previsto [U/mL]	O/P [%]
1	1:100	168,2	168,2	100
	1:200	84,6	84,1	101
	1:400	41,3	42,1	98
	1:800	20,1	21,0	96
	1:1600	9,7	10,5	92
2	1:100	122,1	122,1	100
	1:200	60,7	61,1	99
	1:400	29,8	30,5	98
	1:800	14,6	15,3	95
	1:1600	6,7	7,6	88

14.6 Limite di determinazione

Sensibilità funzionale: 0,5 U/mL

14.7 Riproducibilità

Precisione intra-assay:

il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato per tre campioni ognuno con 24 definizioni in un ciclo. I risultati della precisione nella serie sono riassunti nella tabella.

Precisione intra-assay:

il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato per tre campioni rispettivamente da 6 definizioni in 5 cicli. I risultati della precisione da ciclo a ciclo sono riassunti nella tabella.

Intra-test		
Campione	Mezzo [U/mL]	CV [%]
1	11,9	3,5
2	44,7	2,0
3	132,8	2,5

Inter-test		
Campione	Mezzo [U/mL]	CV [%]
1	12,6	3,8
2	46,8	4,1
3	122,7	4,2

14.8 Interferisce

Non si ha osservato nessuna interferenza con emolitico (fino a 1000 mg/dL), lipoideo (fino a 3 g/dL di trigliceridi) o bilirubina (fino a 40 mg/dL) contenenti siero.

Nessuna osservato effetto di interferenza con anticoagulanti (EDTA, eparina, citrato).

14.9 Risultati dello studio

Popolazione di studio	n	n Pos	[%]
Morbus Wegener (cANCA pos)	51	49	96,1
Inflam./Non-inflammatory disorders	450	8	1,8
Healthy controls	80	0	0.0

		Diagnosi clinica		
		Pos	Neg	
EIA-5429	Pos	49	8	
	Neg	2	522	
		51	530	581

Sensività: 96.1 %

Specificità: 98.5 %

Efficienza diagnostica: 98.3 %

15 LIMITI DEL PROCEDIMENTO

Questo test è un ausilio diagnostico. La diagnosi clinica definitiva non dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo test, ma dovrebbe essere fatta dal medico, dopo tutto i risultati clinici e di laboratorio sono state valutate concernente l'intero quadro clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione per la terapia dovrebbe essere presa individualmente.

Gli intervalli di riferimento sopra patologiche e normale per gli anticorpi nei campioni dei pazienti devono essere considerati come raccomandazioni solo. Ogni laboratorio deve stabilire i propri range secondo la ISO 15189 o ad altre linee guida del laboratorio applicabili.

16 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI / BIBLIOGRAFÍA / RÉFÉRENCES / REFERÊNCIAS LITERÁRIAS

1. Cohen Tervaert J.W., Goldschmeding, R., Elema, J.D., Limburg, P.C. et al Association of autoantibodies to myeloperoxidase with different forms of vasculitis. *Arthritis Rheum.* 33 (8):1264-1272, 1990
2. Cotch, M.F., Hoffman, G.S., Yerg, D.E., et.al. The epidemiology of Wegener's granulomatosis. Estimates of the five-year period prevalence, annual mortality, and geographic disease distribution from population-based data sources. *Arthritis Rheum.*, Vol 39, 87-92, 1996
3. de Grot, K., Schnabel, A., Gross, W. L. ANCA-assozierte Vaskulitiden (Wegener Granulomatose, Churg-Straus Syndrom, Mikroskopische Polyangiitis) - 1. Diagnostisches Procedere. *Z. Rheumatol.*, Vol 54, 291 - 302, 1995
4. Gross, W.L. Systemic necrotizing vasculitis. *Baillieres.Clin.Rheumatol.*, Vol. 11, 259-284, 1997
5. Gross, W.L., Csernok, E., Helmchen, U. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies, autoantigens, and systemic vasculitis. *APMIS* , Vol. 103, 81-97, 1995
6. Jenette, J. C. Falk, R. J. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases. A review. *Am. J. Kidney Dis.*, Vol 15, 517 - 529, 1990
7. Jennette, C.J., Falk, R.J., Andrassy, K., Bacon, P.A. et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum.* Vol. 37, 187-192, 1994
8. Kallenberg, C.G Vasculitis 1995: new concepts in pathophysiology. *Isr.J Med Sci.*, Vol. 32, 7-12, 1996
9. Kallenberg, C.G. Laboratory findings in the vasculitides. *Baillieres Clin Rheumatol.*, Vol 11, 395-421, 1997
10. Schmitt, W. H., Gross, W. L. Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA). *Internist*, Vol. 36, 282 - 290, 1995
11. Wiik, A., Stumman, L., Kjeldsen, L., Borregaard, N., et al. The diversity of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) antigens. *Clin. Exp. Immunol.*, Vol. 101, Suppl. I, 15-17, 1995

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français	Português
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes	Conformidade Europeia
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation	Consultar as instruções de utilização
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence	Número de catálogo
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot	Código do lote
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> determinações
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation	Limites de temperatura
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation	Prazo de validade
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant	Fabricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur	Distribuidor
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement	Conteúdo
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité	Volume / Quantidade