

Instruction

WIESLAB® Vasculitis screen

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

Microtitration 96 wells
Store the kit at +2-8° C
For in vitro diagnostic use only



Document No. LABEL-DOC-0049 2.0

WIESLAB® Vasculitis screen

English:	page	2
Français:	page	14
Español:	página	21
Deutsch:	Seite	28
Italiano:	pagina	35
Português:	página	42
Dansk:	side.....	50
Norsk:	side.....	57
Svenska:	sida.....	64

INTENDED USE

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

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

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

Summary and explanation

Goodpasture syndrome is characterised by lung haemorrhage, renal failure and the presence of anti-GBM antibodies. The diagnosis is based on clinical signs of lung haemorrhage and rapidly progressive glomerulonephritis, but there are several other autoimmune diseases which may present with similar symptoms and less than one third of patients with reno-pulmonary syndromes have antibodies against the Goodpasture antigen, the majority having either proteinase 3 (PR3)-ANCA or myeloperoxidase (MPO)-ANCA (1, 2).

Thus patients with reno-pulmonary syndromes can be identified by three autoantibodies: i.e. anti-GBM, PR3-ANCA or MPO-ANCA (2).

The molecular nature of the Goodpasture antigen is described in (3) and is the NC1 domain of the alpha 3 chain of type IV collagen. The antigen is characterised by a restricted tissue distribution, occurring mainly in kidney and lungs.

ANCAs (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) are a family of autoantibodies related to vasculitis and inflammatory disorders. The first method to detect ANCA was indirect immunofluorescence (IIF) performed on ethanol fixed granulocytes (4). 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 (5). The most important antigens are proteinase 3 (PR3) and myeloperoxidase (MPO). PR3 is a serine protease with a molecular weight of 29kD, and MPO is a dimer with a molecular weight of 140kD. Thus antibodies to proteinase 3 are termed PR3-ANCA, and antibodies to myeloperoxidase are termed MPO-ANCA.

Antibodies to PR3 and MPO can be detected either by a direct ELISA method or capture technique where monoclonal antibodies capture the antigens. The capture technique is therefore an alternative method to detect ANCA. It has been described that the capture technique for PR3-ANCA has a higher sensitivity and correlates to severity of disease (6, 7). It is uncommon with relapse of disease if the capture ELISA is negative (8, 9, 10, 11).

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

Principle of the Wieslab® Vasculitis screen

The wells of a microtiterplate are coated with purified GBM antigen (Bovine) (row A and B), anti-PR3 monoclonal antibody and purified proteinase 3 (Human Neutrophil) (row C and D), anti-MPO monoclonal antibody and purified myeloperoxidase (Human Neutrophil) (row E and F), monoclonal mouse antibody (row G) and HSA (Human Serum Albumin) (row H). G and H are control wells.

During the first incubation, specific antibodies in diluted serum will bind to the antigen coating. The wells are then washed to remove unbound antibodies and other components. A conjugate of alkaline phosphatase labelled (goat) antibodies to human IgG binds to the antibodies in the wells in the second incubation. After a further washing step, detection of specific antibodies is obtained by incubation with substrate solution. Addition of stop solution terminates the reaction, resulting in a coloured endproduct. The amount of bound antibodies correlates to the colour intensity and is measured as absorbance (optical density (OD)).

Warnings and precautions

- For in vitro diagnostic use.
- Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol.
- Do not use components past the expiration date and do not mix components from different lots.
- The human serum components used in the preparation of the controls 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 stop solution contains 10 mM EDTA.
- The concentrations of anti GBM and ANCA in a given specimen determined with assays from different manufactures 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 Svar Life Science.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SOLN	STOP
SUBS	pNPP

Warning

Contains ProClin 300:

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

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

Specimen collection

The Wieslab® Vasculitis screen assay is for use with serum. Handle as if capable of transmitting infections agents.

Avoid using sera which are icteric, lipemic and hemolyzed.

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

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

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

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

Kit components and storage of reagents

- One frame with 96 wells coated with purified GBM antigen (Bovine), monoclonal anti-

proteinase 3/proteinase 3 (Human Neutrophil) and monoclonal anti-myeloperoxidase/myeloperoxidase (Human Neutrophil) and control wells with monoclonal mouse antibody or human serum albumin: one lid sealed in a foil pack with a dry pack.

- 3 mL negative control (NC) containing human serum in diluent (green colour).
- 3 mL positive control (PC) containing human serum in diluent (red colour).
- 13 mL conjugate containing alkaline phosphatase-labelled (Goat) antibodies to human IgG (blue colour).
- 32 mL Diluent (Dil) containing PBS (red colour).
- 13 mL Substrate pNPP.
- 13 mL Stop Solution.
- 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.

Materials or equipment required but not provided

Microplate reader with filter 405 nm. Distilled water for preparing more washing solution. Washer for strips, absorbent tissue, plastic tubes to dilute the patient sample and a timer. Precision pipettes with disposable tips.

Do not use reference wavelength (620 nm or similar) when reading the plate. Do not use reference wavelength subtracted OD values for the calculations.

PROCEDURE

All solutions should be used at room temperature. Do not open the foil packaged plate until it has been room tempered as damp from condensation may have a negative affect on the antigen. Incubate all steps at room temperature (20-28°C) with lid. Remove only the number of wells needed for testing, resealing the aluminium package carefully. In the event that the wells become separated they can be reassembled in the correct order. Each well in a column is individually marked with different numbers of notches, one notch in well A, two notches in well B and so on.

Preparation of washing solution

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

Dilution of serum and incubation

Dilute the patient's serum 1/20 with diluent (950 µL diluent + 50 µL serum).

Pipet 100 µL/well of negative control (NC), positive control (PC) according to the diagram below. Diluted patient serum (P) is added to each well in the Sample Column. Incubate for 10 minutes.

	Reference Column	Sample Column	Antigen coat per row
A	NC	P	GBM
B	PC	P	GBM
C	NC	P	PR3
D	PC	P	PR3
E	NC	P	MPO
F	PC	P	MPO
G	NC	P	Mouse monoclonal
H		P	HSA

After serum incubation

Wash 4 times with 300 µL washing solution/well, filling and emptying the wells each time; after the last wash, empty the wells by tapping the wells on an absorbent tissue.

Adding conjugate

Add 100 µL conjugate to each well. Incubate for 10 minutes.

After conjugate incubation

Wash as before.

Adding substrate

Add 100 µL substrate pNPP to each well, incubate for 20 minutes.

Adding stop solution

Add 100 µL stop solution to each well and read the absorbance at 405 nm on a microplate reader within 2 hours.

Do not use reference wavelength (620 nm or similar) when reading the plate.

Calculations

Do not use reference wavelength subtracted OD values for the calculations.

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

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

The patient sample is negative if the OD ratio is < 3.0 and positive if the OD ratio is ≥ 3.0.

Quality Control

All calculations should only be made on the 405 nm data without reference wavelength OD subtraction.

The OD for the NC for each antigen should be < 0.4.

See Certificate for acceptable expected range (Ratio) for the PC.

The range is different for each antigen.

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

Control wells: The control well with mouse monoclonal antibody (row G) should have a negative OD ratio i.e. < 3.0. The OD value for the patient sample in the HSA well (row H) should be < 0.4. If the OD value for the patient sample is ≥0.4 in the HSA or positive on more than one antigen the sample may contain unspecific reactivity. In some samples unspecific reactivity will disappear with a higher dilution as used in a quantitative test.

Dual PR3/MPO positives: Occasionally patient samples are positive for both PR3 and MPO. This is extremely rare. Careful evaluation of such results are then necessary. A simultaneous rise in OD compared to NC or even positive ratio result in the mab-control well (row G) strongly indicates a false positive reaction due to the presence of antibodies to the mouse monoclonals used to capture the antigens. A further indication of that false reaction is that the sample is negative in the GP-coated wells. In these situations the test results can not be used. It is recommended to retest the sample by the use of Wieslab Capture PR3/MPO-ANCA quantitative methods where a higher sample dilution is used.

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

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

Interpretation of results

A sample with an OD ratio of:

< 3.0 = Negative

≥ 3.0 = Positive

Owing to the high sensitivity of the screening kit, in a few percent of cases samples with an OD ratio ≥ 3.0 may be found to be negative in a quantitative assay.

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

Limitations

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

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

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

Expected results

ANCA and anti-GBM are rarely found in normal healthy individuals. The anti-GBM, ANCA screening kit was tested with 120 normal sera. 120 were found to be negative. The annual incidence of Goodpasture syndrome is one per million and one new patient with PR3-ANCA is expected per 100,000 inhabitants per year. Around 10% of patients with WG are negative in both IIF and ELISA.

Anti-GBM was tested with 40 GP sera, 40 were found to be positive.

The MPO-ANCA was tested with 40 WG sera, 3 were found to be positive. The MPO-ANCA was tested with 40 MP sera, 28 were found to be positive.

The PR3-ANCA was tested with 40 WG sera, 38 were found to be positive. The PR3-ANCA was tested with 40 MP sera, 9 were found to be positive. (Table 1)

Performance characteristics

Table 1. Clinical sensitivity and specificity. A total of 288 frozen retrospective sera with clinical characterisation were assayed. The following table summarises the results

Control and Disease groups	Total number	Negative <3			Positive ≥ 3.0		
		Anti-GBM	Capture-PR3	Capture-MPO	Anti-GBM	Capture-PR3	Capture-MPO
GP	40	0	36	29	40	4	11
WG	40	40	2	37	0	38	3
MPA	40	40	31	12	0	9	28
Blood Donors	120	120	120	120	0	0	0
RA	20	20	20	20	0	0	0
SLE	8	8	8	8	0	0	0
UICo	20	20	20	20	0	0	0
Totalt	288	248	237	246	40	51	42

GP = Goodpasture syndrome

WG = Wegener's granulomatosis

MPA = microscopic polyangiitis

RA (anti-CCP positive samples) = rheumatoid arthritis

SLE (anti-Sm positive samples) = systemic lupus erythematosus

UICo = ulcerative colitis

GBM = anti-glomerular basement membrane

Clinical sensitivity

Anti-GBM

GP 40/40 = 100 % 95% CI = 91.2 – 100%

Capture-PR3 ANCA

WG 38/40 = 95.0 % 95% CI = 83.1 – 99.4%

MP 9/40 = 22.5 % 95% CI = 10.8 – 38.4%

Capture-MPO ANCA

WG 3/40 = 7.5 % 95% CI = 1.8 – 20.4%

MP 28/40 = 70.0 % 95% CI = 53.5 – 83.4 %

Clinical specificity

Anti-GBM

SLE 8/8 = 100 % 95% CI = 63.1 – 100%

RA 20/20 = 100 % 95% CI = 83.2 – 100%

UICo 20/20 = 100 % 95% CI = 83.2 – 100%

Blood Donors 120/120 = 100 % 95% CI = 97.0 – 100%

Capture-PR3 ANCA

SLE 8/8 = 100 % 95% CI = 63.1 – 100%

RA 20/20 = 100 % 95% CI = 83.2 – 100%

UICo 20/20 = 100 % 95% CI = 83.2 – 100%

Blood Donors 120/120 = 100 % 95% CI = 97.0 – 100%

Capture-MPO ANCA

SLE 8/8 = 100 % 95% CI = 63.1 – 100%

RA 20/20 = 100 % 95% CI = 83.2 – 100%

UICo 20/20 = 100 % 95% CI = 83.2 – 100%

Blood Donors 120/120 = 100 % 95% CI = 97.0 – 100%

Table 2. Relative sensitivity and specificity of the Wieslab® Vasculitis screen kit compared to an alternative qualitative ELISA. A total of 288 frozen retrospective sera were assayed on the Wieslab® Vasculitis screen kit and Wieslab® anti-GBM, ANCA screen.

Anti-GBM		Wieslab® anti-GBM, ANCA screen	
		Negative	Positive
Wieslab® Vasculitis screen kit	Negative	248	0
	Positive	0	40

Total 288 serum samples.

Capture-PR3		Wieslab® anti-GBM, ANCA screen	
		Negative	Positive
Wieslab® Vasculitis screen kit	Negative	232	4
	Positive	3	46

Total 285 serum samples; 3 borderline samples in reference kit were excluded from calculations.

Capture-MPO		Wieslab® anti-GBM, ANCA screen	
Wieslab® Vasculitis screen kit		Negative	Positive
	Negative	238	5
	Positive	0	42

Total 285 serum samples; 3 borderline samples in reference kit were excluded from calculations.

Positive Percent Agreement

Anti-GBM	= 40/40 = 100 %	95% CI = 91.2 – 100%
Capture-PR3 ANCA	= 46/50 = 92.0%	95% CI = 80.8 – 97.8%
Capture-MPO ANCA	= 42/47 = 89.4%	95% CI = 76.9 – 96.5%

Negative Percent Agreement

Anti-GBM	= 248/248 = 100 %	95% CI = 98.5 – 100%
Capture-PR3 ANCA	= 232/235 = 98.7 %	95% CI = 96.3 – 99.7%
Capture-MPO ANCA	= 238/238 = 100 %	95% CI = 98.5 – 100%

Overall Percent Agreement

Anti-GBM	= 288/288 = 100%	95% CI = 98.7 – 100%
Capture-PR3 ANCA	= 278/285 = 97.5%	95% CI = 95 – 99%
Capture-MPO ANCA	= 280/285 = 98.2%	95% CI = 96 – 99.4%

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

Table 3. Batch to batch variation was determined by testing six different samples in eight replicates on three different batches.

	1	2	3	4	5	6
Anti-GBM						
Mean OD ratio	3.9	5.9	4.4	6.5	8.3	6.5
SD	0.50	0.44	0.51	0.89	0.58	0.75
% CV	13	7	12	14	7	12
Capture-PR3						
Mean OD ratio	2.9	3.0	3.3	4.4	6.8	6.5
SD	0.71	0.51	0.43	0.50	0.98	1.48
% CV	24	17	13	11	14	23
Capture-MPO						
Mean OD ratio	3.1	3.2	3.1	6.8	5.6	6.5
SD	0.33	0.25	0.19	0.77	0.38	0.48
% CV	11	8	6	11	7	7

Table 4. Inter-assay precision was determined by testing six different samples in eight replicates at three separate occasions.

	1	2	3	4	5	6
Anti-GBM						
Mean OD ratio	3.4	5.8	4.3	6.3	8.9	6.3
SD	0.31	0.20	0.15	0.21	0.22	0.25
% CV	9	3	4	3	2	4
Capture- PR3						
Mean OD ratio	4.0	3.3	3.4	4.4	6.9	6.9
SD	0.76	0.25	0.21	0.52	0.30	0.54
% CV	19	8	6	12	4	8
Capture-MPO						
Mean OD ratio	3.5	3.6	3.1	7.3	5.6	6.9
SD	0.19	0.41	0.20	0.36	0.55	0.39
% CV	5	11	6	5	10	6

Table 5. Intra-assay precision was determined by testing six different samples in eight replicates at one occasion.

	1	2	3	4	5	6
Anti-GBM						
Mean OD ratio	4.5	6.9	4.8	7.7	4.8	7.7
SD	0.21	0.15	0.28	0.37	0.28	0.38
% CV	5	2	6	5	6	5
Capture-PR3						
Mean OD ratio	5.1	4.0	4.7	7.5	4.7	7.5
SD	0.27	0.11	0.13	0.34	0.13	0.33
% CV	5	3	3	5	3	4
Capture-MPO						
Mean OD ratio	4.2	4.2	4.5	9.3	4.5	9.3
SD	0.10	0.18	0.15	0.21	0.15	0.21
% CV	2	4	3	2	3	2


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. 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. 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

1. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J. Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med.* 1995 Aug;238(2):143-52.
2. Westman KW, Bygren PG, Eilert I, Wiik A, Wieslander J. Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCA; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndromes. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Sep;12(9):1863-8.
3. Gunnarsson A, Hellmark T, Wieslander J. Molecular properties of the Goodpasture epitope. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30844-8.
4. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet.* 1985 Feb 23;1(8426):425-9.
5. Segelmark M, Westman K, Wieslander J. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol.* 2000 Sep-Oct;18(5):629-35.
6. Westman KW, Selga D, Bygren P, Segelmark M, Baslund B, Wiik A, Wieslander J. Clinical evaluation of a capture ELISA for detection of proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody. *Kidney Int.* 1998 May;53(5):1230-6.
7. Csernok E, Holle J, Hellmich B, Willem J, Tervaert C, Kallenberg CG, Limburg PC, Niles J, Pan G, Specks U, Westman K, Wieslander J, De Groot K, Gross WL. Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study. *Rheumatology (Oxford).* 2004 Feb;43(2):174-80. Epub 2003 Oct 29.
8. Westman KW, Bygren PG, Olsson H, Ranstam J, Wieslander J. Relapse rate, renal survival, and cancer morbidity in patients with Wegener's granulomatosis or microscopic polyangiitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 1998 May;9(5):842-52.
9. Gisslén K, Wieslander J, Westberg G, Herlitz H. Relationship between anti-neutrophil cytoplasmic antibody determined with conventional binding and the capture assay, and long-term clinical course in vasculitis. *J Intern Med.* 2002 Feb;251(2):129-35.
10. Segelmark M, Phillips BD, Hogan SL, Falk RJ, Jennette JC. Monitoring proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies for detection of relapses in small vessel vasculitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Sep;10(5):769-74.
11. Westman KW, Selga D, Isberg PE, Bladström A, Olsson H. High proteinase 3-anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) level measured by the capture enzyme-linked immunosorbent assay method is associated with decreased patient survival in ANCA-associated vasculitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Nov;14(11):2926-33.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. 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. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medisinsk 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. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. 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. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
SOLN STOP	Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

INSTRUCTION EN ABREGE

Indications

Le kit de test de dépistage de la vasculite Wieslab® est un dosage avec immunoabsorbant lié à une enzyme (ELISA) pour la détection qualitative d'anticorps anti-membrane basale glomérulaire (GBM), anti-protéinase-3 (PR3) et anti-myéloperoxydase (MPO) dans le sérum humain. Le dosage est utilisé pour détecter les anticorps dans un spécimen sérique unique. Les résultats du dosage sont destinés à être utilisés pour aider au diagnostic du syndrome réno-pulmonaire et de la glomérulonéphrite rapidement progressive, en particulier le syndrome de Goodpasture (GP), la granulomatose de Wegener (GW) et la polyangéite microscopique (PAM). Le dosage est indiqué chez les patients présentant des signes et symptômes correspondant au GP, à la GW et à la PAM. Il n'est pas indiqué pour le dépistage des populations saines. À UTILISER EN DIAGNOSTIC IN VITRO.

Tout résultat positif doit être systématiquement confirmé par dosage quantitatif.

Mises en garde et précautions d'emploi

- À utiliser en diagnostic in vitro.
- Les résultats optimums sont obtenus en observant rigoureusement ce protocole.
- Ne pas utiliser d'éléments du kit au-delà de la date de péremption et de pas utiliser ensemble des éléments provenant de lots différents.
- Les éléments issus de sérum humain utilisés dans la préparation des témoins du kit ont été testés pour contrôler la présence éventuelle d'anticorps aux virus 1 et 2 de l'immunodéficience humaine (VIH1 et 2), de l'hépatite C (VHC) ainsi que l'antigène de surface de l'hépatite B, conformément aux méthodes homologuées par la FDA, et se sont révélés négatifs. Etant donné qu'aucune autre méthode de test ne peut garantir entièrement l'absence des virus VIH, VHC ou de l'hépatite B, ou d'autres agents infectieux, il est indispensable de manipuler les spécimens et réactifs de source humaine en les considérant potentiellement capables de transmettre des agents infectieux.
- Les centres de contrôle et prévention des pathologies et les instituts nationaux concernés par les affaires de santé conseillent de manipuler les agents potentiellement infectieux selon le niveau 2 de biosécurité.
- Toutes les solutions contiennent l'agent de conservation ProClin 300. Ne jamais pipeter à la bouche ou laisser des réactifs ou échantillons de patients entrer en contact avec la peau. Les réactifs contenant de la ProClin 300 sont potentiellement irritants. Eviter tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, rincer abondamment à l'eau.
- La solution d'arrêt contient de l'EDTA à 10 mM.
- Les concentrations d'anti-MBG et d'ANCA d'un spécimen donné déterminées par dosages en provenance de fabricants différents peuvent varier en raison des différences entre les méthodes de dosage et la spécificité des réactifs.
- On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le coffret sur demande auprès de Svar Life Science.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SOLN	STOP
SUBS	pNPP

Attention

Contient ProClin 300:

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

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

P333+313: En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.

Collecte de spécimens

Le dosage de dépistage de la vasculite Wieslab® s'utilise avec du sérum.

Le manipuler comme potentiellement susceptible de transmettre des agents infectieux.

Éviter d'utiliser des sérums ictériques, lipémiques ou hémolysés.

Les sérums ayant été inactivés à la chaleur peuvent produire des réactivités non spécifiques et ne doivent pas être utilisés.

Entreposer le sérum à une température comprise entre 2-8°C si l'analyse doit avoir lieu dans les 5 jours. Si les spécimens doivent être gardés plus longtemps, les entreposer à des températures de -20°C ou inférieures.

Ne pas utiliser de congélateur sans givre étant donné que ce genre de congélateur est susceptible d'exposer les spécimens à des cycles de congélation et décongélation consécutives et de dégrader l'anticorps. Les échantillons incorrectement entreposés ou ayant été exposés à plusieurs cycles de congélation et décongélation consécutives sont susceptibles de produire des résultats erronés.

Le NCCLS fait état de recommandations relatives à l'entreposage de spécimens sanguins, (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Éléments du kit et entreposage des réactifs

- Un cadre contenant 96 puits enduits d'antigène MBG (bovin), d'anticorps monoclonal anti-protéinase 3/protéinase 3 (neutrophile humain) et d'anticorps monoclonal anti-myéloperoxydase/myéloperoxydase (neutrophile humain) et des puits témoins avec de l'anticorps monoclonal de souris ou de l'albumine sérique humaine : un couvercle isolé sous emballage métallisé avec sachet anti-humidité.
- 3 ml de témoin négatif (TN) contenant du sérum humain dans du diluant (de couleur verte).
- 3 ml de témoin positif (TP) contenant du sérum humain dans du diluant (de couleur rouge).
- 13 ml de conjugué contenant des anticorps marqués à la phosphatase alcaline (de chèvre) anti-IgG humaine (de couleur bleue).
- 32 ml de diluant (Dil) contenant du PBS (de couleur rouge).
- 13 ml de substrat pNPP.
- 13 ml de solution d'arrêt.
- 30 ml de solution de lavage concentrée 30 fois.

Tous les réactifs du kit sont prêts à l'emploi à l'exception de la solution de lavage et doivent être entreposés à une température comprise entre + 2 et 8° C.

Matériels ou équipements nécessaires non fournis

Lecteur de microplaque avec filtre de 405 nm. Eau distillée pour préparer de la solution de lavage supplémentaire. Laveur de bandelettes, papier absorbant, tubes en plastique pour diluer l'échantillon patient et minuteur. Pipettes de précision à embouts jetables.

Ne pas utiliser de longueur d'onde de référence (620 nm ou similaire) lors de la lecture de la plaque.

Pour les calculs, ne pas utiliser de valeurs de DO après soustraction d'une longueur d'onde de référence.

TECHNIQUE

Toutes les solutions doivent être utilisées à température ambiante. Ne pas ouvrir la plaque emballée dans le sachet métallisé jusqu'à ce qu'elle ne se soit stabilisée à température ambiante, l'humidité éventuelle de condensation pouvant avoir un effet négatif sur l'antigène. Incuber toutes les étapes à températures ambiante (20-28°C) avec le couvercle. Enlever uniquement le nombre de puits nécessaires à l'analyse en prenant soin de refermer soigneusement l'emballage en aluminium. Dans l'éventualité d'une séparation des puits, il est possible de les rassembler dans l'ordre. Chaque puits d'une colonne est individuellement marqué de plusieurs encoches, une encoche dans le puits A, deux encoches dans le puits B, etc.

Préparation de la solution de lavage.

En cas d'observation de cristaux de sel dans le flacon contenant la solution de lavage concentrée, placer le flacon dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à dissolution complète des cristaux avant de

procéder à la dilution de la solution de lavage. Diluer 10 ml de la solution de lavage concentrée 30 fois dans 290 ml d'eau distillée. Lorsqu'elle est entreposée à une température comprise entre 2 et 8°C, la solution de lavage diluée reste stable jusqu'à la date de péremption du kit.

Dilution du sérum et incubation.

Diluer le sérum du patient à raison de 1/20 avec le diluant (950 µL de diluant + 50 µL de sérum).

Pipeter 100 µl/puits de témoin négatif (TN), témoin positif (TP) conformément au diagramme ci-dessous. Le sérum patient dilué est ajouté à chaque puits dans la colonne à échantillon. Incuber pendant 10 minutes.

	Colonne de référence	Colonne à échantillon	Revêtement d'antigène par rangée
A	TN	P	MBG
B	TP	P	MBG
C	TN	P	PR3
D	TP	P	PR3
E	TN	P	MPO
F	TP	P	MPO
G	TN	P	Monoclonal souris
H		P	HSA

Après incubation du sérum

Laver 4 fois avec 300 µL de solution de lavage/puits, en remplissant et vidant les puits à chaque fois; après le dernier lavage, vider les puits en les tapotant sur du papier absorbant.

Ajout du conjugué

Ajouter 100 µL de conjugué à chaque puits. Incuber pendant 10 minutes.

Après incubation du conjugué

Laver selon les instructions ci-dessus.

Ajout du substrat

Ajouter 100 µL de substrat pNPP à chaque puits et incuber pendant 20 minutes.

Ajout de la solution d'arrêt

Ajouter 100 µL de solution d'arrêt à chaque puits et lire l'absorbance à 405 nm sur un lecteur de microplaque dans les 2 heures.

Ne pas utiliser de longueur d'onde de référence (620 nm ou similaire) lors de la lecture de la plaque.

Calculs

Pour les calculs, ne pas utiliser de valeurs de DO après soustraction d'une longueur d'onde de référence.

Un coefficient de densité optique (DO) est calculé comme suit pour chaque échantillon patient :

$$\text{Coefficient DO} = \frac{\text{DO échantillon patient}}{\text{DO du témoin négatif}}$$

L'échantillon patient est négatif lorsque le coefficient de DO est < 3,0 et positif lorsque le coefficient de DO est ≥ 3,0.

Contrôle qualité

Tous les calculs doivent être exclusivement réalisés avec les données à 405 nm, sans soustraction de DO d'une longueur d'onde de référence.

Le DO pour le TN de chaque antigène doit être < 0,4.

Voir le Certificat pour les plages cibles acceptables (coefficient) pour le TP.

La plage diffère pour chaque antigène.

Si les valeurs du TP ou du TN ne sont pas situées dans leurs plages respectives, le test devra être considéré comme invalide et devra être répété.

Puits témoins: Le puits témoin contenant de l'anticorps monoclonal de souris (rangée G) doit révéler un coefficient de DO négatif, c.à.d. < 3.0 . La valeur de DO pour l'échantillon patient du puits HAS (rangée H) doit être $< 0,4$. Si la valeur de DO de l'échantillon patient est $\geq 0,4$ dans le HSA ou positive sur plusieurs antigènes, il est possible que l'échantillon présente une réactivité non-spécifique. Dans certains échantillons, la réactivité non-spécifique disparaît avec une dilution supérieure comme dans les utilisations de tests quantitatifs.

Double positivité PR3/MPO : Parfois, les échantillons patient peuvent présenter une positivité à la fois à la PR3 et à la MPO. Cela est extrêmement rare. Il sera donc nécessaire d'évaluer soigneusement de tels résultats. Une hausse simultanée de la DO par rapport au TN ou même un résultat de coefficient positif dans le puits témoin AM (rangée G) indique clairement la présence d'une réaction faussement positive due à la présence d'anticorps aux monoclonaux de souris utilisés pour capturer les antigènes. La négativité de l'échantillon dans les puits enduits de GP est une indication supplémentaire de cette fausse réaction. Dans ces cas, les résultats du test ne pourront pas être utilisés. Il est recommandé de retester l'échantillon en utilisant les méthodes quantitatives Wieslab Capture PR3/MPO-ANCA dans lesquelles une dilution d'échantillon supérieure est utilisée.

Les témoins négatifs et positifs sont destinés à surveiller les risques de défaillance importante des réactifs. Le témoin positif ne garantit pas la précision au seuil de détection du dosage.

Des témoins supplémentaires pourront être testés conformément aux directives ou exigences réglementaires locales, fédérales ou nationales, ou émanant d'organismes d'accréditation. Consulter la norme NCCLS C24-A pour y consulter les directives relatives aux pratiques de contrôle qualité.

Interprétation des résultats

Un échantillon présentant un coefficient de DO de :

$< 3,0$ = Négatif

$\geq 3,0$ = Positif

En raison de la haute sensibilité du kit de dépistage, dans un pourcentage limité de cas, les échantillons présentant un coefficient de DO $\geq 3,0$ pourront s'avérer négatifs dans un dosage quantitatif.

Tout résultat positif devra être systématiquement confirmé par dosage quantitatif.

Limitations

Le coefficient de DO du patient individuel n'est pas représentatif de la gravité de la maladie, étant donné que les anticorps de différents patients peuvent varier en affinité. Il est par conséquent difficile d'obtenir une standardisation absolue des résultats. Il n'est pas prudent de se fier uniquement à ce test pour prendre des décisions thérapeutiques cliniques. Il devra plutôt être utilisé en parallèle avec les symptômes cliniques et les résultats d'autres analyses disponibles.

Le sérum de patients atteints d'autres maladies auto-immunes et d'individus normaux est susceptible de contenir des anticorps pouvant potentiellement présenter des réactions croisées. Certains individus peuvent être positifs et présenter peu ou pas de signes de pathologie clinique. D'un autre côté, il se peut que certains patients atteints d'une maladie active présentent des niveaux d'anticorps en question indétectables.

Il ne conviendra pas d'entreprendre de thérapie immunosuppressive suite à un résultat anti-MBG, ANCA positif. Les débuts ou changements de traitement ne devront pas être uniquement basés sur les variations de concentration d'anti-GBM, ANCA, mais plutôt sur une observation clinique rigoureuse.

References

1. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J. Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med.* 1995 Aug;238(2):143-52.
2. Westman KW, Bygren PG, Eilert I, Wiik A, Wieslander J. Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCA; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndromes. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Sep;12(9):1863-8.
3. Gunnarsson A, Hellmark T, Wieslander J. Molecular properties of the Goodpasture epitope. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30844-8.
4. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet.* 1985 Feb 23;1(8426):425-9.
5. Segelmark M, Westman K, Wieslander J. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol.* 2000 Sep-Oct;18(5):629-35.
6. Westman KW, Selga D, Bygren P, Segelmark M, Baslund B, Wiik A, Wieslander J. Clinical evaluation of a capture ELISA for detection of proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody. *Kidney Int.* 1998 May;53(5):1230-6.
7. Csernok E, Holle J, Hellmich B, Willem J, Tervaert C, Kallenberg CG, Limburg PC, Niles J, Pan G, Specks U, Westman K, Wieslander J, De Groot K, Gross WL. Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study. *Rheumatology (Oxford).* 2004 Feb;43(2):174-80. Epub 2003 Oct 29.
8. Westman KW, Bygren PG, Olsson H, Ranstam J, Wieslander J. Relapse rate, renal survival, and cancer morbidity in patients with Wegener's granulomatosis or microscopic polyangiitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 1998 May;9(5):842-52.
9. Gisslén K, Wieslander J, Westberg G, Herlitz H. Relationship between anti-neutrophil cytoplasmic antibody determined with conventional binding and the capture assay, and long-term clinical course in vasculitis. *J Intern Med.* 2002 Feb;251(2):129-35.
10. Segelmark M, Phillips BD, Hogan SL, Falk RJ, Jennette JC. Monitoring proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies for detection of relapses in small vessel vasculitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Sep;10(5):769-74.
11. Westman KW, Selga D, Isberg PE, Bladström A, Olsson H. High proteinase 3-anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) level measured by the capture enzyme-linked immunosorbent assay method is associated with decreased patient survival in ANCA-associated vasculitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Nov;14(11):2926-33.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklrning der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicao dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes p etiketter. Förklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Nmero de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Nmero de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Nmero 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. Förvaringstemperatur.
	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. Inneholder tilstrkkelig 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. verensstmmer med direktiv 98/79/EG fr medicintekniske produkter.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. 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. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
SOLN STOP	Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

INSTRUCCIONES DE USO EN VERSIÓN BREVE AL ESPAÑOL

Uso previsto

El kit de prueba de cribado de la vasculitis Wieslab® es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección cualitativa de anticuerpos frente a la membrana basal glomerular (MBG), la proteinasa-3 (PR3) y la mieloperoxidasa (MPO) en sueros humanos. El ensayo se utiliza para detectar anticuerpos en una única muestra de suero. Los resultados del ensayo se deben usar como ayuda en el diagnóstico de los síndromes renopulmonares y la glomerulonefritis rápidamente progresiva, especialmente el síndrome de Goodpasture (GP), la granulomatosis de Wegener (GW) y la poliangiitis microscópica (PM). El ensayo está pensado para su uso en pacientes con signos y síntomas compatibles con GP, GW y PM. No está pensado para realizar cribado en una población sana. PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Un resultado positivo debe confirmarse siempre mediante un ensayo cuantitativo.

Advertencias y precauciones

- Para uso diagnóstico in vitro.
- Los resultados óptimos se obtienen con un seguimiento estricto de este protocolo.
- No use componentes pasada su fecha de caducidad y no mezcle componentes de diferentes lotes.
- Los componentes de suero humano empleados en la preparación de los controles del kit se han estudiado en cuanto a la presencia de anticuerpos frente a los virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH 1 y 2), hepatitis C (VHC), así como el antígeno de superficie de la hepatitis B mediante métodos aprobados por la FDA y los resultados han sido negativos. Como ningún método puede ofrecer la garantía absoluta de que están ausentes el VIH, el VHB, el virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos, las muestras y los reactivos de origen humano deben manipularse como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos.
- Los Centers for Disease Control and Prevention y los National Institutes of Health recomiendan que los agentes potencialmente infecciosos se manipulen en un nivel 2 de Bioseguridad.
- Todas las soluciones contienen ProClin 300 como conservante. Nunca pipetee con la boca ni permita que los reactivos o la muestra del paciente entren en contacto con la piel. Los reactivos que contienen ProClin pueden ser irritantes. Evite el contacto con la piel y los ojos. En caso de contacto, enjuague con una cantidad abundante de agua.
- La solución de parada contiene EDTA 10 mM.
- Las concentraciones de anti-MBG y ANCA en una muestra dada determinados con ensayos de diferente fabricación pueden variar debido a las diferencias en los métodos de ensayo y la especificidad de los reactivos.
- Pueden solicitarse a Svar Life Science las hojas de datos de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SOLN	STOP
SUBS	pNPP

Atención

Contiene ProClin 300:

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

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

Recogida de muestras

El ensayo de cribado de vasculitis de Wieslab® debe usarse con suero. Manipule como si fuera capaz de transmitir agentes infecciosos.

Evite el uso de sueros que sean ictericos, lipémicos o estén hemolizados.

Los sueros inactivados por calor pueden dar reactividades inespecíficos y no deben utilizarse.

Conserve el suero a entre 2 y 8°C si las pruebas se van a realizar en el plazo de cinco días. Si las muestras se van a conservar durante períodos más largos, consérvelas a -20°C o menos.

No utilice un congelador sin escarcha, porque puede permitir a las muestras pasar por ciclos de congelación-descongelación y degradar el anticuerpo. Las muestras que se conserven inadecuadamente o se sometan a múltiples ciclos de congelación-descongelación pueden dar resultados falsos.

El NCCLS proporciona recomendaciones para conservar las muestras de sangre, (Procedimientos Estándar Aprobados para la Manipulación y el Procesamiento de Muestras de Sangre, *Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens*, H18A, 1990).

Componentes del kit y conservación de los reactivos

- Un marco con 96 pocillos revestidos con antígeno de MBG purificada (bovina), anticuerpo monoclonal anti-proteinasa 3/proteinasa 3 (neutrófilos humanos) y anticuerpos monoclonales anti-mieloperoxidasa/mieloperoxidasa (neutrófilo humano) y pocillos control con anticuerpo monoclonal de ratón o albúmina sérica humana: una tapa sellada en un paquete de lámina de aluminio con un paquete seco.

- 3 ml de control negativo (CN) con suero humano en diluyente. (color verde).

- 3 ml de control positivo (CP) con suero humano en diluyente (color rojo).

- 13 ml de conjugado con anticuerpos (de carnero) frente a la IgG humana marcados con fosfatasa alcalina (color azul).

- 32 ml de diluyente (Dil) con PBS (color rojo).

- 13 ml de sustrato pNPP.

- 13 ml de solución de parada

- 30 ml de solución de lavado concentrada 30x.

Todos los reactivos del kit están listos para usar, excepto la solución de lavado y deben conservarse a + 2-8° C.

Materiales o equipo necesarios pero no suministrados

Lector de microplacas con filtro de 405 nm. Agua destilada para preparar más solución de lavado.

Lavador para tiras, tejido absorbente, tubos de plástico para diluir la muestra del paciente y un temporizador. Pipetas de precisión con puntas desechables.

No utilice longitud de onda de referencia (620 nm o similar) al leer la placa.

No utilice valores de DO restados a la longitud de onda de referencia para los cálculos.

PROCEDIMIENTO

Todas las soluciones deben usarse a temperatura ambiente. No abra la placa embalada en aluminio hasta que no alcance la temperatura ambiental ya que la humedad producida por la condensación podría afectar negativamente al antígeno. Incube todos los pasos a temperatura ambiente (20-28°C) con tapa. Extraiga sólo el número de pocillos necesarios para las pruebas, volviendo a cerrar el paquete de aluminio cuidadosamente. En caso de que los pocillos se separen, se pueden volver a montar en el orden correcto. Cada pocillo en una columna está marcado individualmente con diferentes números de muescas, una muesca en el pocillo A, dos muescas en el pocillo B y así sucesivamente.

Preparación de la solución de lavado

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

Dilución del suero e incubación

Diluya el suero del paciente 1/20 con diluyente (950 µl de diluyente + 50 µl de suero).

Pipetee 100 µl/pocillo de control negativo (CN), control positivo (CP) de acuerdo con el diagrama siguiente. Se añade suero de paciente (P) diluido a cada pocillo en la columna de muestras. Incube durante 10 minutos.

	Columna de referencia	Columna de muestra	Revestimiento de antígeno por fila
A	CN	P	MBG
B	CP	P	MBG
C	CN	P	PR3
D	CP	P	PR3
E	CN	P	MPO
F	CP	P	MPO
G	CN	P	Monoclonal de ratón
H		P	HSA

Después de la incubación del suero

Lave 4 veces con 300 µl de solución de lavado/pocillo, llenando y vaciando los pocillos cada vez; después del último lavado, vacíe los pocillos mediante suaves toques en un tejido absorbente.

Adición de conjugado

Añada 100 µl de conjugado a cada pocillo. Incube durante 10 minutos.

Después de la incubación del conjugado

Lave como antes

Adición de sustrato

Añada 100 µl de sustrato pNPP a cada pocillo, incube durante 20 minutos.

Adición de la solución de parada

Añada 100 µl de solución de parada a cada pocillo y lea la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas en el plazo de 2 horas.

No utilice longitud de onda de referencia (620 nm o similar) al leer la placa.

Cálculos

No utilice valores de DO restados a la longitud de onda de referencia para los cálculos.

Se calcula un cociente de densidad óptica (DO) para cada muestra de paciente, como sigue:

DO de la muestra del paciente

Cociente de DO = -----

DO del control negativo

La muestra del paciente es negativa si el cociente de DO es < 3,0 y positiva si el cociente de DO es ≥ 3,0.

Control de calidad

Todos los cálculos deben realizarse exclusivamente con los datos de 405 nm, sin resta de DO a la longitud de onda de referencia.

La DO para el CN de cada antígeno debe ser < 0,4.

Véase el Certificado para el rango (cociente) esperado aceptable para el CP.

El rango es diferente para cada antígeno.

Si los valores del CP o el CN no están dentro de sus rangos respectivos, la prueba debe considerarse no válida y debería repetirse.

Pocillos control: El pocillo control con anticuerpo monoclonal de ratón (fila G) debe tener un cociente de DO negativo, esto es, < 3,0. El valor de DO para la muestra del paciente en el pocillo de HSA (fila H) debe ser < 0,4. Si el valor de DO para la muestra del paciente es ≥ 0,4 en el HSA o positivo en más de un antígeno, la muestra puede contener reactividad inespecífica. En algunas muestras, la reactividad

inespecífica desaparecerá con una dilución más grande, como la que se usa en una prueba cuantitativa.

Positivos dobles PR3/MPO: Ocasionalmente, muestras de pacientes son positivas tanto para PR3 como para MPO. Esto es muy raro. Por tanto, es necesaria la evaluación cuidadosa de esos resultados. Una elevación simultánea de la DO en comparación con el CN o incluso un resultado de cociente positivo en el pozo de control de AcM (fila G) indican fuertemente una reacción falsa positiva debido a la presencia de anticuerpos a los monoclonales de ratón empleados para capturar los antígenos. Otra indicación de esa reacción falsa es que la muestra es negativa en los pocillos revestidos por GP. En estas situaciones, los resultados de la prueba no se pueden usar. Se recomienda volver a estudiar la muestra mediante el uso de métodos cuantitativos de PR3/MPO-ANCA Wieslab-Capture cuando se use una dilución mayor de la muestra.

Los controles negativos y positivos están pensados para vigilar un fracaso sustancial de un reactivo. El control positivo no asegurará la precisión del corte del ensayo.

Podrían estudiarse controles adicionales de acuerdo con las directrices o requisitos de las normas locales, estatales y/o federales o las organizaciones de acreditación. Consulte el documento NCCLS C24-A para orientación sobre prácticas adecuadas de CC.

Interpretación de los resultados

Una muestra con un cociente de DO de:

< 3,0 = Negativo

≥ 3,0 = Positivo

Debido a la elevada sensibilidad del kit de cribado, en un pequeño porcentaje de casos, pueden encontrarse muestras con un cociente de DO $\geq 3,0$ que son negativas en un ensayo cuantitativo.

Un resultado positivo de la prueba debe confirmarse siempre mediante un ensayo cuantitativo.

Limitaciones

El cociente de DO de cada paciente individual no se puede usar como medida de la intensidad de la enfermedad, porque los anticuerpos de diferentes pacientes pueden diferir entre sí en afinidad. Por tanto, es difícil obtener una estandarización absoluta de los resultados. No debe utilizarse la prueba como única base para la toma de decisiones en terapia clínica, sino que debe usarse en combinación con los síntomas clínicos y los resultados de otras pruebas disponibles.

Los sueros de pacientes con otras enfermedades autoinmunitarias y de personas normales pueden contener autoanticuerpos que pueden tener reacción cruzada. Algunas personas pueden dar resultado positivo, con pocas o ninguna prueba de enfermedad clínica. Por otro lado, algunos pacientes con enfermedad activa pueden tener niveles indetectables de estos anticuerpos.

No debe iniciarse tratamiento inmunosupresor sobre la base de un resultado positivo anti-MBG, ANCA. El inicio o los cambios en el tratamiento no deben basarse en cambios en la concentración de anti-MBG, ANCA por sí solos, sino más bien en una observación clínica cuidadosa.

References

1. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J. Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med.* 1995 Aug;238(2):143-52.
2. Westman KW, Bygren PG, Eilert I, Wiik A, Wieslander J. Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCA; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndromes. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Sep;12(9):1863-8.
3. Gunnarsson A, Hellmark T, Wieslander J. Molecular properties of the Goodpasture epitope. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30844-8.
4. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet.* 1985 Feb 23;1(8426):425-9.
5. Segelmark M, Westman K, Wieslander J. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol.* 2000 Sep-Oct;18(5):629-35.
6. Westman KW, Selga D, Bygren P, Segelmark M, Baslund B, Wiik A, Wieslander J. Clinical evaluation of a capture ELISA for detection of proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody. *Kidney Int.* 1998 May;53(5):1230-6.
7. Csernok E, Holle J, Hellmich B, Willem J, Tervaert C, Kallenberg CG, Limburg PC, Niles J, Pan G, Specks U, Westman K, Wieslander J, De Groot K, Gross WL. Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study. *Rheumatology (Oxford).* 2004 Feb;43(2):174-80. Epub 2003 Oct 29.
8. Westman KW, Bygren PG, Olsson H, Ranstam J, Wieslander J. Relapse rate, renal survival, and cancer morbidity in patients with Wegener's granulomatosis or microscopic polyangiitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 1998 May;9(5):842-52.
9. Gisslén K, Wieslander J, Westberg G, Herlitz H. Relationship between anti-neutrophil cytoplasmic antibody determined with conventional binding and the capture assay, and long-term clinical course in vasculitis. *J Intern Med.* 2002 Feb;251(2):129-35.
10. Segelmark M, Phillips BD, Hogan SL, Falk RJ, Jennette JC. Monitoring proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies for detection of relapses in small vessel vasculitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Sep;10(5):769-74.
11. Westman KW, Selga D, Isberg PE, Bladström A, Olsson H. High proteinase 3-anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) level measured by the capture enzyme-linked immunosorbent assay method is associated with decreased patient survival in ANCA-associated vasculitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Nov;14(11):2926-33.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. 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. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medisinsk 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. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. 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. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
SOLN STOP	Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

GEBRAUCHSANWEISUNG IN DEUTSCHER KURZFORM

Verwendungszweck

Das Testkit Wieslab® Vaskulitis-Screening ist ein enzymgebundener Immunosorbent-Test (ELISA) für den qualitativen Nachweis von Antikörpern gegen die glomeruläre Basalmembran (GBM), Proteinase-3 (PR3) und Myeloperoxidase (MPO) in humanem Serum. Der Test wird zum Nachweis von Antikörpern in einer einzelnen Serumprobe verwendet. Die Testergebnisse sind als Hilfsmittel für die Diagnose von renopulmonalen Syndromen und rasch progressiver Glomerulonephritis, besonders Goodpasture-Syndrom (GP), Wegener-Granulomatose (WG) und mikroskopische Polyangiitis (MP) zu verwenden. Der Test ist zum Einsatz bei Patienten mit Anzeichen und Symptomen gedacht, die mit GP, WG, und MP einhergehen. Er ist nicht zum Screening einer gesunden Population gedacht.

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

Ein positives Ergebnis sollte immer durch einen quantitativen Test bestätigt werden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- In-vitro-Diagnostikum.
- Optimale Ergebnisse werden durch die strikte Einhaltung dieser Anweisung (Ablaufschema) erzielt.
- Komponenten nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden. Komponenten verschiedener Chargen nicht untereinander mischen.
- Die Komponenten humanen Serums, die für die Herstellung der Kontrollen des Kits verwendet werden, wurden auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen das humane Immundefizienz-Virus 1 und 2 (HIV 1&2), Hepatitis C (HCV) sowie das Hepatitis-B-Oberflächenantigen mit von der FDA zugelassenen Methoden getestet und als negativ befundet. Da keine Testmethode vollständig garantieren kann, dass das HIV-, HCV-, Hepatitis B-Virus bzw. andere infektiöse Erreger nicht vorliegen, müssen Proben und Reagenzien menschlichen Ursprungs wie infektiöses Material gehandhabt werden.
- Die amerikanischen Gesundheitsbehörden (Centers for Disease Control and Prevention und National Institutes of Health) empfehlen, dass potenziell infektiöses Material nach Biosicherheitsstufe 2 (BSL 2) gehandhabt wird.
- Alle Lösungen enthalten ProClin 300 als Konservierungsmittel. Niemals mit dem Mund pipettieren bzw. Reagenzien oder Patientenprobe mit der Haut in Kontakt kommen lassen. Reagenzien, die ProClin enthalten, können reizend sein. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Bei Berührung gründlich mit Wasser abspülen.
- Die Stopplösung enthält 10 mM EDTA.
- Die in einer bestimmten Probe mit Tests verschiedener Hersteller bestimmten Konzentrationen von Anti-GBM und ANCA können aufgrund unterschiedlicher Testmethoden und Spezifität der Reagenzien voneinander abweichen.
- Sicherheitsdatenblätter sind für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile auf Anfrage von Svar Life Science erhältlich.



Achtung

BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SOLN	STOP
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:	Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
P264:	Gründlich die Hände waschen nach Gebrauch.
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.

Probenentnahme

Der Wieslab® Vaskulitis-Screeningtest wird mit Serum durchgeführt. Wie potenziell infektiöses Material behandeln.

Möglichst kein ikterisches, lipämisches oder hämolytisches Serum verwenden.

Hitzeinaktivierte Seren können unspezifisch reagieren und sollten daher nicht verwendet werden.

Serum bei 2-8 °C lagern, wenn es innerhalb von 5 Tagen getestet wird. Bei -20 °C oder darunter lagern, wenn die Proben für einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden sollen.

Keinen Gefrierschrank mit Abtauautomatik verwenden, da dadurch die Proben einem Gefrier-Auftau-Zyklus ausgesetzt sind, der die Antikörper zerstören kann. Unsachgemäß gelagerte Proben oder Proben, die mehrfach eingefroren und aufgetaut wurden, können falsche Ergebnisse liefern.

Das NCCLS hat Empfehlungen zur Lagerung von Blutproben herausgebracht ("Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens", H18A, 1990).

Kitkomponenten und Reagenzienlagerung

- Ein Rahmen mit 96 Wells, beschichtet mit gereinigtem GBM-Antigen (Rind), monoklonaler Anti-Proteinase 3/Proteinase 3 (humane Neutrophile) und monoklonale Anti-Myeloperoxidase/Myeloperoxidase (humane Neutrophile) sowie Kontroll-Wells mit monoklonalen Maus-Antikörpern oder humanem Serumalbumin: ein Abdeckung in einer Folienverpackung mit Trockenmittel verschweißt.

- 3 ml Negativkontrolle (NK), enthält Humanserum in Verdünnungsmittel (Grün).

- 3 ml Positivkontrolle (PK), enthält Humanserum in Verdünnungsmittel (Rot).

- 13 ml Konjugat, enthält mit alkalische Phosphatase markierte Antikörper (Ziege) gegen Human-IgG (Blau).

- 32 ml Verdünnungsmittel (Dil), enthält PBS (Rot).

- 13 ml Substrat pNPP

- 13 ml Stopplösung

- 30 ml Waschlösung, 30-fach konzentriert.

Außer der Waschlösung sind alle Kitreagenzien gebrauchsfertig und bei 2-8 °C aufzubewahren.

Nicht mitgelieferte, aber erforderliche Materialien oder Geräte

Lesegerät für Mikrotiterplatten mit 405 nm Filter. Destilliertes Wasser zur Vorbereitung der Waschlösung. Waschgerät für die Streifen, saugfähige Papiertücher, Röhrchen aus Kunststoff zum Verdünnen der Patientenprobe und ein Kurzzeitwecker. Präzisionspipetten mit Einmalspitzen.

Beim Lesen der Platte keine Referenzwellenlänge (620 nm oder ähnlich) verwenden!

Für die Berechnung keine OD-Werte verwenden, bei denen eine Referenzwellenlänge abgezogen wurde!

TESTVERFAHREN

Alle Lösungen bei Raumtemperatur verwenden. Die Folieverpackung mit der Testplatte erst dann öffnen, wenn sie Raumtemperatur erreicht hat. Die Feuchtigkeit der Kondensation könnte das Antigen sonst negativ beeinträchtigen. Alle Schritte bei Raumtemperatur (20-28 °C) mit Abdeckung inkubieren. Nur die Anzahl Wells herausnehmen, die zum Testen benötigt werden. Die Aluminiumverpackung wieder sorgfältig verschließen. Voneinander getrennte Wells können wieder in der richtigen Reihenfolge zusammengesetzt werden. Jedes Well einer Spalte trägt eine individuelle Markierung mit unterschiedlicher Anzahl von Kerben: eine Kerbe in Well A, zwei Kerben in Well B usw.

Vorbereiten 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. 10 ml der 30-fach konzentrierten Waschlösung in 290 ml destilliertem Wasser verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Lagerung bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar.

Verdünnen des Serums und Inkubation

Das Patientenserum mit Verdünnungsmittel 1:20 verdünnen (950 µl Verdünnungsmittel + 50 µl Serum).

Gemäß der Tabelle unten 100 µl/Well Negativkontrolle (NK) bzw. Positivkontrolle (PK) pipettieren. In jedes Well der Probenspalte verdünntes Patientenserum (P) hinzufügen. 10 Minuten inkubieren.

	Referenzspalte	Probenspalte	Antigenbeschichtung/Reihe
A	NK	P	GBM
B	PK	P	GBM
C	NK	P	PR3
D	PK	P	PR3
E	NK	P	MPO
F	PK	P	MPO
G	NK	P	Maus, monoklonal
H		P	HSA

Nach Seruminkubation

4-mal mit 300 µl Waschlösung/Well waschen, dabei die Wells jedes Mal erneut füllen und abkippen. Nach dem letzten Waschen die Wells durch Klopfen auf saugfähiges Papier gut leeren.

Hinzufügen von Konjugat

100 µl Konjugat in jedes Well pipettieren. 10 Minuten inkubieren.

Nach Konjugatinkubation

Wie oben beschrieben waschen.

Hinzufügen von Substrat

100 µl Substrat pNPP in alle Wells pipettieren und 20 Minuten inkubieren.

Hinzufügen der Stopplösung

100 µl Stopplösung in alle Wells pipettieren und innerhalb von 2 Stunden auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 405 nm ablesen.

Beim Lesen der Platte keine Referenzwellenlänge (620 nm oder ähnlich) verwenden!

Berechnungen

Für die Berechnung keine OD-Werte verwenden, bei denen eine Referenzwellenlänge abgezogen wurde!

Für jeden Patienten wird der Index der optischen Dichte (OD) wie folgt berechnet:

$$\text{Bindungsindex} = \frac{\text{OD Patientenprobe}}{\text{OD der Negativkontrolle}}$$

Die Patientenprobe ist negativ, wenn der Bindungsindex < 3,0 und positiv, wenn er ≥ 3,0 beträgt.

Qualitätskontrolle

Alle Berechnungen ausschließlich auf Basis der 405 nm Werte vornehmen, ohne Abzug der OD-Werte mittels einer Referenzwellenlänge.

Die OD der NK muss für alle Antigene < 0,4 betragen.

Für die PK siehe Zertifikat des zulässigen erwarteten Bereichs (Index).

Der Bereich ist für jedes Antigen unterschiedlich.

Wenn sich die Werte von PK und NK außerhalb ihres entsprechenden Bereichs befinden, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

Kontroll-Wells: Das Kontroll-Well mit dem monoklonalen Maus-Antikörper (Reihe G) muss einen negativen Bindungsindex, d. h. $< 3,0$ aufweisen. Der OD-Wert der Patientenprobe in dem HSA-Well (Reihe H) sollte $< 0,4$ betragen. Falls der OD-Wert der Patientenprobe mit HSA $\geq 0,4$ beträgt oder für mehr als ein Antigen positiv ist, reagiert die Probe möglicherweise unspezifisch. Bei einigen Proben kann die unspezifische Reaktion ggf. mit einer höheren Verdünnung, wie bei einem quantitativen Test, aufgehoben werden.

PR3/MPO-positiv: Gelegentlich sind Patientenproben positiv für PR3 und MPO, auch wenn das extrem selten vorkommt. Diese Ergebnisse müssen einer sorgfältigen Bewertung unterzogen werden. Ein gleichzeitiger Anstieg der OD im Vergleich zur NK oder sogar positive Index-Ergebnisse im MAB-Kontroll-Well (Reihe G) deuten stark auf eine falsch positive Reaktion durch Anwesenheit von Antikörpern gegen die Maus-Monoklonale, die zur Erfassung der Antigene eingesetzt werden, hin. Eine weiterer Hinweis für solch eine falsche Reaktion ist, dass die Probe in den GP-beschichteten Wells negativ sind. In diesem Fall kann das Testergebnis nicht verwendet werden. Es wird empfohlen, die Probe mit den quantitativen Methoden des Wieslab Capture PR3/MPO-ANCA erneut zu testen, bei denen eine höhere Probenverdünnung verwendet wird.

Die Negativ- und Positivkontrollen dienen der Überwachung auf entscheidendes Reagenzienversagen. Die Positivkontrolle gewährleistet keine Präzision am Test-Cut-off.

Zusätzliche Kontrollen können nach den Richtlinien oder Vorschriften regionaler und/oder staatlicher Bestimmungen bzw. von Zulassungsorganisationen analysiert werden. Siehe NCCLS C24-A für Informationen über entsprechende Verfahren zur Qualitätskontrolle.

Auswertung der Ergebnisse

Eine Probe mit einem Bindungsindex von:

$< 3,0$ = Negativ

$\geq 3,0$ = Positiv

Wegen der hohen Empfindlichkeit des Screening-Kits werden zu einem geringen Prozentsatz Proben mit einem Bindungsindex von $\geq 3,0$ in einem quantitativen Test negativ ausfallen.

Ein positives Testergebnis sollte immer durch einen quantitativen Test bestätigt werden.

Grenzen des Verfahrens

Die einzelnen Bindungsindizes der Patienten können nicht als Maß der Erkrankungsschwere angesehen werden, da Antikörper verschiedener Patienten in Affinität voneinander abweichen können. Daher ist es nicht einfach, eine uneingeschränkte Standardisierung der Ergebnisse zu erhalten. Den Test nicht als einzige Entscheidungsfindung, sondern zusammen mit klinischen Symptomen und den Ergebnissen anderer verfügbarer Tests für die klinische Therapie heranziehen.


Seren von Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen und von normalen Personen können mögliche kreuzreaktive Autoantikörper enthalten. Einige Personen können bei nur geringen oder keinen Anzeichen auf eine klinische Erkrankung positiv sein. Andererseits können einige Patienten mit aktiver Erkrankung nicht nachweisbare Spiegel dieser Antikörper haben.

Auf Basis eines positiven Anti-GBM/ANCA-Ergebnisses keine immunsuppressive Therapie einleiten. Keine Behandlung sollte auf der Basis von Änderungen in der Anti-GBM/ANCA-Konzentration alleine, sondern eher aufgrund genauer klinischer Beobachtung eingeleitet oder geändert werden.

References

1. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J. Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med.* 1995 Aug;238(2):143-52.
2. Westman KW, Bygren PG, Eilert I, Wiik A, Wieslander J. Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCA; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndromes. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Sep;12(9):1863-8.
3. Gunnarsson A, Hellmark T, Wieslander J. Molecular properties of the Goodpasture epitope. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30844-8.
4. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet.* 1985 Feb 23;1(8426):425-9.
5. Segelmark M, Westman K, Wieslander J. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol.* 2000 Sep-Oct;18(5):629-35.
6. Westman KW, Selga D, Bygren P, Segelmark M, Baslund B, Wiik A, Wieslander J. Clinical evaluation of a capture ELISA for detection of proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody. *Kidney Int.* 1998 May;53(5):1230-6.
7. Csernok E, Holle J, Hellmich B, Willem J, Tervaert C, Kallenberg CG, Limburg PC, Niles J, Pan G, Specks U, Westman K, Wieslander J, De Groot K, Gross WL. Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study. *Rheumatology (Oxford).* 2004 Feb;43(2):174-80. Epub 2003 Oct 29.
8. Westman KW, Bygren PG, Olsson H, Ranstam J, Wieslander J. Relapse rate, renal survival, and cancer morbidity in patients with Wegener's granulomatosis or microscopic polyangiitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 1998 May;9(5):842-52.
9. Gisslén K, Wieslander J, Westberg G, Herlitz H. Relationship between anti-neutrophil cytoplasmic antibody determined with conventional binding and the capture assay, and long-term clinical course in vasculitis. *J Intern Med.* 2002 Feb;251(2):129-35.
10. Segelmark M, Phillips BD, Hogan SL, Falk RJ, Jennette JC. Monitoring proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies for detection of relapses in small vessel vasculitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Sep;10(5):769-74.
11. Westman KW, Selga D, Isberg PE, Bladström A, Olsson H. High proteinase 3-anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) level measured by the capture enzyme-linked immunosorbent assay method is associated with decreased patient survival in ANCA-associated vasculitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Nov;14(11):2926-33.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medisinsk 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. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. 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. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
SOLN STOP	Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

QUESTA È UNA ISTRUZIONE ABBREVIATA DEL TRATTAMENTO E ESECUZIONE**Uso previsto**

Il kit del test di screening per la vasculite Wieslab® è un dosaggio immunoassorbente legato ad enzima (ELISA) per la rilevazione qualitativa di anticorpi anti-GMB (membrana basale glomerulare), anti-proteinasi-3 (PR3) e anti-mieloperossidasi (MPO) nel siero umano. Il dosaggio viene utilizzato per rilevare la presenza di anticorpi in un unico campione di siero. I risultati del dosaggio devono essere utilizzati come ausilio alla diagnosi di sindromi nefro-polmonari e di glomerulonefriti rapidamente progressive, specialmente la sindrome di Goodpasture (GP), la granulomatosi di Wegener (WG) e la poliangeite microscopica (MP). Il dosaggio viene utilizzato su pazienti che mostrano segni e sintomi coerenti con GP, WG e MP. Non viene invece utilizzato come test di screening sulla popolazione sana. SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Un risultato positivo deve sempre essere confermato da un dosaggio quantitativo.

Avvertenze e precauzioni

- Solo per uso diagnostico in vitro.
- I risultati migliori si ottengono rispettando rigorosamente questo protocollo.
- Non utilizzare i componenti oltre la data di scadenza né mischiare componenti di lotti diversi.
- I componenti del siero umano utilizzati nella preparazione dei controlli presenti nel kit sono stati testati per la presenza di anticorpi del virus di immunodeficienza umana 1 e 2 (HIV 1&2), dell'epatite C (HCV) nonché dell'antigene di superficie dell'epatite B utilizzando metodi approvati dall'FDA e risultati negativi. Dal momento che nessun metodo di verifica può fornire una garanzia totale in merito all'assenza dei virus HIV, HCV, epatite B o di altri agenti infettivi, occorre maneggiare i campioni e i reagenti di origine umana come potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi.
- I Centers for Disease Control and Prevention e il National Institutes of Health raccomandano di gestire agenti potenzialmente infettivi secondo il livello di biosicurezza 2.
- Tutte le soluzioni contengono il conservante ProClin 300. Mai pipettare a bocca né lasciare che i reagenti o i campioni paziente vengano a contatto con la pelle. I reagenti contenenti ProClin possono causare irritazione. Evitare il contatto con pelle e occhi. In caso di contatto, sciacquare con abbondanti quantità di acqua.
- La soluzione di arresto contiene 10 mM EDTA.
- Le concentrazioni di anti-GBM e anti-ANCA in un determinato campione stabilite con dosaggi di produttori diversi possono variare a causa di differenze nei metodi di dosaggio e nella specificità dei reagenti.
- Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Svar Life Science.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SOLN	STOP
SUBS	pNPP

Attenzione

Contiene ProClin 300:

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

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

Raccolta dei campioni

Il dosaggio di screening per la vascolite Wieslab[®] deve essere utilizzato con il siero. Maneggiare come potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi.

Non utilizzare sieri itterici, lipemici o emolizzati.

I sieri inattivati dal calore potrebbero mostrare reattività aspecifiche per cui se ne sconsiglia l'uso.

Conservare il siero ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C qualora il test venga eseguito entro cinque giorni. Nel caso in cui i campioni debbano essere conservati più a lungo, conservarli ad una temperatura pari a -20°C o meno.

Non utilizzare un congelatore frost-free poiché potrebbe indurre cicli di congelamento-scongelo dei campioni degradando così l'anticorpo. I campioni conservati in modo improprio o sottoposti a cicli di congelamento – scongelamento ripetuti potrebbero determinare risultati spuri.

L'NCCLS fornisce raccomandazioni relative alla conservazione dei campioni ematici, (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Componenti del kit e conservazione dei reagenti

- Un telaio con 96 pozzetti rivestiti di un antigene GBM purificato (bovino), un anticorpo monoclonale anti-proteinasi 3/proteinasi 3 (neutrofilo umano) e un anticorpo monoclonale anti-mieloperossidasi/mieloperossidasi (neutrofilo umano) e pozzetti di controllo contenenti anticorpo monoclonale di topo o albumina sierica umana: un coperchio sigillato in una busta dry pack in alluminio.
- 3 ml di controllo negativo (NC) contenente siero umano in diluente (colore verde).
- 3 ml di controllo positivo (PC) contenente siero umano in diluente (colore rosso).
- 13 ml di coniugato contenente anticorpi anti-IgG umane (capra) marcati con fosfatasi alcalina (colore blu).
- 32 ml di diluente (Dil) contenente PBS (colore rosso).
- 13 ml di substrato pNPP.
- 13 ml di soluzione di arresto.
- 30 ml di soluzione di lavaggio concentrata 30x.

Tutti i reagenti del kit sono pronti per l'uso ad eccezione della soluzione di lavaggio e da conservare ad una temperatura compresa tra + 2 e 8°C.

Materiali o attrezzature necessari ma non in dotazione

Lettore di micropiastre con filtro da 405 nm. Acqua distillata per la preparazione di altra soluzione di lavaggio. Lavatore per strip, tessuto assorbente, provette di plastica per la diluizione del campione paziente e un timer. Pipette di precisione con puntali monouso.

Non usare una lunghezza d'onda di riferimento (620 nm o simile) durante la lettura della piastra. Non usare per i calcoli valori OD sottratti dalla lunghezza d'onda di riferimento.

PROCEDURA

Tutte le soluzioni devono essere utilizzate a temperatura ambiente. Non aprire la piastra protetta dall'alluminio prima che abbia raggiunto la temperatura ambiente in quanto l'umidità causata dalla condensazione potrebbe avere un effetto negativo sull'antigene. Incubare in tutte le fasi a temperatura ambiente (20 - 28°C) con il coperchio. Rimuovere esclusivamente il numero di pozzetto necessario al test risigillando con cautela la confezione in alluminio. nel caso in cui i pozzetti si separino, è possibile riassemblarli nel giusto ordine. Ciascun pozzetto di una colonna è contrassegnato singolarmente da numeri diversi di tacche: una tacca nel pozzetto A, due tacche nel pozzetto B e così via.

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 di soluzione di lavaggio concentrata 30x in 290 ml di acqua distillata. Quando conservata a 2 - 8°C, la soluzione di lavaggio diluita è stabile fino alla data di scadenza del kit.

Diluizione del siero e incubazione

Diluire il siero del paziente con diluente in rapporto 1/20 (950 µl di diluente + 50 µl di siero).

Pipettare 100 µl per pozzetto di controllo negativo (NC), controllo positivo (PC) secondo lo schema riportato qui di seguito. Il siero paziente diluito (P) viene aggiunto in ciascun pozzetto della Colonna campione. Incubare per 10 minuti.

	Colonna di riferimento	Colonna campione	Rivestimento di antigene per fila
A	NC	P	GBM
B	PC	P	GBM
C	NC	P	PR3
D	PC	P	PR3
E	NC	P	MPO
F	PC	P	MPO
G	NC	P	Monoclonale di topo
H		P	HSA

Dopo l'incubazione del siero

Lavare 4 volte con 300 µl di soluzione di lavaggio per pozzetto, riempiendo e svuotando ogni volta i pozzetti; dopo l'ultimo lavaggio, svuotare i pozzetti capovolgendoli su tessuto assorbente.

Aggiunta del coniugato

Aggiungere 100 µl di coniugato in ciascun pozzetto. Incubare per 10 minuti.

Dopo l'incubazione del coniugato

Lavare come descritto prima.

Aggiunta del substrato

Aggiungere 100 µl di substrato pNPP in ciascun pozzetto, incubare per 20 minuti.

Aggiunta della soluzione di arresto

Aggiungere 100 µl di soluzione di arresto in ciascun pozzetto e leggere l'assorbanza a 405 nm con un lettore di micropiastre entro 2 ore.

Non usare una lunghezza d'onda di riferimento (620 nm o simile) durante la lettura della piastra.

Calcoli

Non usare per i calcoli valori OD sottratti dalla lunghezza d'onda di riferimento.

Per ciascun campione paziente si calcola un rapporto di densità ottica (OD) utilizzando la seguente formula:

$$\text{Rapporto DO} = \frac{\text{DO del campione paziente}}{\text{DO del controllo negativo}}$$

Il campione paziente è negativo se il rapporto OD è < 3.0 e positivo se il rapporto OD è ≥ 3.0 .

Controllo qualità

Tutti i calcoli devono essere eseguiti solo con i dati di 405 nm, senza sottrazione OD dalla lunghezza d'onda di riferimento.

Il valore OD dell'NC per ciascun antigene deve essere < 0.4 .

Per conoscere il range accettabile previsto (Rapporto) per il PC consultare il certificato.

Il range è diverso per ciascun antigene.

Se i valori PC o NC non rientrano nei rispettivi range si consiglia di considerare non valido il test e di ripeterlo.

Pozzetti di controllo: Il pozzetto di controllo contenente l'anticorpo monoclonale di topo (fila G) deve avere un rapporto OD negativo ovvero < 3.0 . Il valore OD del campione paziente nel pozzetto HSA (fila H) deve essere < 0.4 . Se il valore OD del campione paziente è ≥ 0.4 nell'HSA o positivo su più di un antigene significa che il campione potrebbe contenere una reattività aspecifica. In alcuni campioni la

reattività aspecifica scompare ad una maggiore diluizione come quando il campione viene utilizzato in un test quantitativo.

Doppi positivi PR3/MPO: A volte i campioni paziente sono positivi sia per PR3 che per MPO. Si tratta tuttavia di un caso estremamente raro. È pertanto necessaria un'attenta valutazione di tali risultati. Un aumento simultaneo nel valore OD rispetto al NC o addirittura un rapporto positivo come risultato nel pozzetto di controllo mab (fila G) è altamente indicativo di una reazione falsa positiva dovuta alla presenza di anticorpi monoclonali di topo utilizzati per catturare gli antigeni. Un'ulteriore indicazione di questa falsa reazione è che il campione è negativo nei pozzetti rivestiti di GP. In questi casi non è possibile utilizzare i risultati del test. Si raccomanda di ritestare il campione utilizzando metodi quantitativi Wieslab Capture PR3/MPO-ANCA che prevedono l'impiego di una maggiore diluizione del campione.

I controlli negativo e positivo servono per il monitoraggio di fallimenti sostanziali del reagente. Il controllo positivo non garantisce la precisione del dosaggio al punto di cut-off.

È possibile testare ulteriori controllo conformemente alla linee guida o ai requisiti delle normative locali, regionali e/o federali o di organizzazioni riconosciute. Per le linee guida sulle corrette pratiche di CQ, fare riferimento a NCCLS C24-A.

Interpretazione dei risultati

Un campione con un rapporto OD di:

< 3.0 = Negativo

≥ 3.0 = Positivo

A causa dell'elevata sensibilità del kit di screening, in una piccola percentuale di casi i campioni con un rapporto OD ≥ 3.0 potrebbero risultare negativi in un dosaggio quantitativo.

Un test positivo deve sempre essere confermato da un dosaggio quantitativo.

Limiti

Il rapporto OD di un singolo paziente non può essere utilizzato come stima della gravità di una malattia in quanto gli anticorpi di pazienti diversi potrebbero differire l'uno dall'altro per affinità. È quindi difficile ottenere una standardizzazione assoluta dei risultati. Il test non può fondarsi sulla sola base di decisioni prese in merito alla terapia clinica, ma deve essere utilizzato in combinazione con la valutazione dei sintomi clinici e dei risultati di altri test disponibili.

I sieri di pazienti affetti da malattie autoimmuni e quelli di individui sani possono contenere autoanticorpi potenzialmente cross-reattivi. Alcuni individui potrebbero essere positivi, con scarsa se non addirittura inesistente manifestazione di malattia clinica. Alcuni pazienti con malattia attiva potrebbero, invece, presentare livelli irrilevabili di questi anticorpi.

Si sconsiglia la somministrazione di una terapia immunosoppressiva e sulla base di un risultato anti-GBM, ANCA positivo. L'avvio o la modifica di un trattamento non devono basarsi su variazioni nella sola concentrazione anti-GBM, ANCA ma piuttosto su un'attenta osservazione clinica.

References

1. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J. Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med.* 1995 Aug;238(2):143-52.
2. Westman KW, Bygren PG, Eilert I, Wiik A, Wieslander J. Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCA; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndromes. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Sep;12(9):1863-8.
3. Gunnarsson A, Hellmark T, Wieslander J. Molecular properties of the Goodpasture epitope. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30844-8.
4. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet.* 1985 Feb 23;1(8426):425-9.
5. Segelmark M, Westman K, Wieslander J. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol.* 2000 Sep-Oct;18(5):629-35.
6. Westman KW, Selga D, Bygren P, Segelmark M, Baslund B, Wiik A, Wieslander J. Clinical evaluation of a capture ELISA for detection of proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody. *Kidney Int.* 1998 May;53(5):1230-6.
7. Csernok E, Holle J, Hellmich B, Willem J, Tervaert C, Kallenberg CG, Limburg PC, Niles J, Pan G, Specks U, Westman K, Wieslander J, De Groot K, Gross WL. Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study. *Rheumatology (Oxford).* 2004 Feb;43(2):174-80. Epub 2003 Oct 29.
8. Westman KW, Bygren PG, Olsson H, Ranstam J, Wieslander J. Relapse rate, renal survival, and cancer morbidity in patients with Wegener's granulomatosis or microscopic polyangiitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 1998 May;9(5):842-52.
9. Gisslén K, Wieslander J, Westberg G, Herlitz H. Relationship between anti-neutrophil cytoplasmic antibody determined with conventional binding and the capture assay, and long-term clinical course in vasculitis. *J Intern Med.* 2002 Feb;251(2):129-35.
10. Segelmark M, Phillips BD, Hogan SL, Falk RJ, Jennette JC. Monitoring proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies for detection of relapses in small vessel vasculitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Sep;10(5):769-74.
11. Westman KW, Selga D, Isberg PE, Bladström A, Olsson H. High proteinase 3-anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) level measured by the capture enzyme-linked immunosorbent assay method is associated with decreased patient survival in ANCA-associated vasculitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Nov;14(11):2926-33.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklrning der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes p etiketter. 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. Anvnd fre.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gef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 instruções 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. Inneholder tilstrkkelig 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 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 diagnstico 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. verensstmmer med direktiv 98/79/EG fr medicintekniske produkter.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. 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. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
SOLN STOP	Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

EM RESUMO INSTRUÇÃO DE PORTUGUISE

Utilização prevista

O kit do teste Wieslab® Vasculitis Screening (Rastreo de Vasculite) é um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção qualitativa de anticorpos anti-membrana basal glomerular (MBG - *glomerular basement membrane* - GBM), anti-proteinase-3 (PR3) e anti-mieloperoxidase (MPO) em soros humanos. O ensaio é utilizado para detectar anticorpos somente numa amostra de soro. Os resultados do ensaio destinam-se a ser utilizados como meio auxiliar no diagnóstico das síndromes renopulmonares e da glomerulonefrite rapidamente progressiva, especialmente da síndrome de Goodpasture (GP), granulomatose de Wegener (WG) e poliangeite microscópica (PAM). O ensaio é indicado para utilização em doentes com sinais e sintomas consistentes com GP, WG e PAM. Não é indicado como teste de rastreio numa população saudável.

PARA USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Um resultado positivo deve ser sempre confirmado por um ensaio quantitativo.

Advertências e precauções

- Para uso em diagnóstico *in vitro*.
- Obtêm-se resultados óptimos aderindo rigorosamente a este protocolo.
- Não utilize componentes cujo prazo de validade expirou e não misture componentes de lotes diferentes.
- Os componentes de soro humano utilizados na preparação dos controlos incluídos no kit foram testados quanto à presença de anticorpos contra os vírus 1 e 2 da imunodeficiência humana (VIH 1 e 2), vírus da hepatite C (VHC), assim como contra o antigénio de superfície da hepatite B por métodos aprovados pela FDA, com resultados negativos. Como não existe nenhum método de teste que ofereça uma garantia total da ausência dos vírus VIH, VHC, da hepatite B ou de outros agentes infecciosos, as amostras e reagentes derivados de produtos humanos devem ser manuseados como materiais capazes de transmitir agentes infecciosos.
- Os Centros para Controlo e Prevenção de Doenças e os Institutos Nacionais de Saúde recomendaram que agentes potencialmente infecciosos sejam manuseados no Nível 2 de Biosegurança.
- Todas as soluções contêm ProClin 300 como conservante. Nunca pipetar com a boca nem permitir que reagentes ou amostras de doentes entrem em contacto com a pele. Os reagentes que contêm ProClin podem ser irritantes. Evitar o contacto com a pele e olhos. Em caso de contacto, lavar abundantemente com água.
- A solução de paragem contém 10 mM de EDTA.
- As concentrações de anti-MBG e ANCA numa dada amostra, determinadas com ensaios de diferentes fabricantes, podem variar devido a diferenças nos métodos dos ensaios e especificidade dos reagentes.
- As fichas dos dados de segurança do material relativas a todos os componentes perigosos incluídos neste kit estão disponíveis sob pedido junto da Svar Life Science.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SOLN	STOP
SUBS	pNPP

Atenção

Contém ProClin 300:

A reacção de massa: 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:	Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.
P264:	Lavar as mãos cuidadosamente após manuseamento.
P280:	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P302+352:	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes.
P333+313:	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.

Colheita de amostras

Utilizar o ensaio de rastreio de Vasculite Wieslab® somente com soro. Manusear como capaz de transmitir agentes infecciosos.

Evitar a utilização de soros ictericos, lipémicos e hemolisados.

Soros inactivados pelo calor podem produzir reactividades inespecíficas e não devem ser utilizados.

Conservar o soro entre 2°C - 8°C se o ensaio for realizado num período de cinco dias. Se as amostras tiverem de ser conservadas durante períodos mais longos, conservar a uma temperatura de -20°C ou inferior.

Não utilizar congeladores sem formação de gelo porque podem sujeitar as amostras a ciclos de congelação-descongelação e causar a degradação dos anticorpos. Amostras incorrectamente conservadas ou que foram sujeitas a ciclos de congelação-descongelação podem produzir resultados falsos.

A NCCLS (*National Committee on Clinical Laboratory Standards*) oferece recomendações para a conservação de amostras de sangue (Padrões-Procedimentos aprovados para o Manuseamento e Processamento de Amostras de Sangue, H18A, 1990).

Componentes do kit e conservação de reagentes

- Uma placa com 96 poços revestidos com antigénio de MBG purificado (bovino), anti-proteinase 3 monoclonal/proteinase 3 (neutrófilos humanos) e anti-mieloperoxidase monoclonal/mieloperoxidase (neutrófilos humanos) e com poços de controlo com anticorpo monoclonal de ratinho ou com albumina sérica humana; uma tampa, acondicionadas numa embalagem selada de folha de alumínio com exsicante.

- 3 ml de controlo negativo (NC) contendo soro humano em diluente (cor verde).

- 3 ml de controlo positivo (PC) contendo soro humano em diluente (cor vermelha).

- 13 ml de conjugado contendo anticorpos anti-IgG humana (cabra) marcados com fosfatase alcalina (cor azul).

- 32 ml de diluente (Dil) contendo PBS (cor vermelha).

- 13 ml de substrato pNPP.

- 13 ml de solução de paragem.

- 30 ml de solução de lavagem concentrada 30x.

Todos os reagentes do kit estão prontos a utilizar com excepção da solução de lavagem e devem ser conservados a 2°C - 8°C.

Materiais ou equipamento necessários mas não fornecidos

Leitor de microplacas com filtro de 405 nm. Água destilada para preparação de mais solução de lavagem. Máquina de lavar as tiras, papel absorvente, tubos de plástico para diluir a amostra do doente e um temporizador. Pipetas de precisão com pontas descartáveis..

Não utilizar o comprimento de onda de referência (620 nm ou semelhante) ao efetuar a leitura da chapa.

Não utilizar valores DO subtraídos de comprimento de onda de referência para os cálculos.

PROCEDIMENTO

Todas as soluções devem ser utilizadas à temperatura ambiente. Não abrir a placa acondicionada na embalagem de folha de alumínio até ter atingido a temperatura ambiente dado que a humidade resultante da condensação pode ter um efeito negativo no antigénio. Efectuar a incubação em todas as etapas à temperatura ambiente (20°C - 28°C) com a tampa. Remover apenas o número de poços

necessários para o ensaio, tornando a selar cuidadosamente a embalagem de alumínio. No caso de os poços se separarem, estes podem ser novamente reunidos na ordem correcta. Cada poço numa coluna é marcado individualmente com um número diferentes de entalhes em V, um entalhe no poço A, dois entalhes no poço B e assim por diante.

Preparação da solução de lavagem

Caso sejam observados cristais de sal no frasco com solução de lavagem concentrada, coloque o frasco num banho de água a 37°C, até os cristais se dissolverem, antes de diluir a solução de lavagem. Diluir 10 ml da solução de lavagem concentrada 30x em 290 ml de água destilada. Quando conservada a 2°C-8°C, a solução de lavagem diluída é estável até ao prazo de validade indicado no kit.

Diluição do soro e incubação

Diluir o soro do doente a 1/20 com diluente (950 µl de diluente + 50 µl de soro).

Pipetar 100 µl/poço de controlo negativo (NC) e de controlo positivo (PC) de acordo com o diagrama seguinte. O soro do doente (P) diluído é adicionado em cada poço na Coluna de Amostras. Incubar durante 10 minutos.

	Coluna de referência	Coluna de amostras	Antigénio de revestimento por fila
A	NC	P	MBG
B	PC	P	MBG
C	NC	P	PR3
D	PC	P	PR3
E	NC	P	MPO
F	PC	P	MPO
G	NC	P	Monoclonal de ratinho
H		P	HSA

Após incubação do soro

Lavar 4 vezes com 300 µl de solução de lavagem/poço, enchendo e esvaziando os poços de cada vez; depois da última lavagem, esvaziar os poços batendo levemente com os poços em papel absorvente.

Adição do conjugado

Adicionar 100 µl de conjugado em cada poço. Incubar durante 10 minutos.

Após incubação do conjugado

Lavar como acima indicado.

Adição do substrato

Adicionar 100 µl do substrato pNPP em cada poço, incubar durante 20 minutos.

Adição da solução de paragem

Adicionar 100 µl de solução de paragem em cada poço e ler a absorbância a 405 nm num leitor de microplacas em menos de 2 horas.

Não utilizar o comprimento de onda de referência (620 nm ou semelhante) ao efetuar a leitura da chapa.

Cálculos

Não utilizar valores DO subtraídos de comprimento de onda de referência para os cálculos.

A razão da densidade óptica (DO) de cada amostra de um doente é calculada como segue:

$$\text{Razão da DO} = \frac{\text{DO da amostra do doente}}{\text{DO do controlo negativo}}$$

A amostra do doente é negativa se a razão da DO for inferior a 3,0 e positiva se a razão da DO for igual ou superior a 3,0.

Controlo de qualidade

Todos os cálculos deverão ser efetuados apenas nos dados 405 nm, sem subtração de DO de comprimento de onda de referência.

A DO do controlo negativo de cada antigénio deve ser inferior a 0,4.

Ver o Certificado do intervalo previsto aprovado (Razão) do PC.

O intervalo é diferente para cada antigénio.

Se os valores de PC ou NC não estiverem nos intervalos respectivos, o ensaio deve ser considerado como não válido e deve ser repetido.

Poços de controlo: O poço de controlo com anticorpo monoclonal (mab) de ratinho (fila G) tem uma razão DO negativa, isto é inferior a 3,0. O valor da DO da amostra do doente no poço da albumina sérica humana (HSA) (fila H) deve ser inferior a 0,4. Se o valor da DO da amostra do doente for igual ou superior a 0,4 na HSA ou positiva em mais do que um antigénio, a amostra pode conter uma reactividade inespecífica. Em algumas amostras, a reactividade inespecífica desaparece com uma diluição mais elevada como a que é utilizada num ensaio quantitativo.

Duplos positivos PR3/MPO: Ocasionalmente, as amostras de doentes são positivas para PR3 e MPO, o que é extremamente raro. Portanto, a avaliação cuidadosa destes resultados é necessária. Um aumento simultâneo da DO em comparação com o NC ou mesmo com um resultado de razão positivo no poço de controlo do mab (fila G) indica fortemente uma reacção falsa negativa devido à presença de anticorpos contra os anticorpos monoclonais de ratinho utilizados para captação de antigénios. Outra indicação desta reacção falsa é que a amostra é negativa nos poços revestidos para GP. Nestas situações, os resultados do ensaio não podem ser utilizados. Recomenda-se repetir a análise da amostra utilizando os métodos quantitativos Wieslab Capture PR3/MPO-ANCA nos quais se utiliza uma diluição mais elevada da amostra.

Os controlos negativo e positivo destinam-se à monitorização de uma falha importante dos reagentes. O controlo positivo não assegura a precisão no valor limiar (*cut-off*) do ensaio.

Podem analisar-se controlos adicionais, de acordo com as directrizes ou exigências dos regulamentos locais e/ou nacionais ou das organizações autorizadas. Consultar o C24-A do NCCLS para orientação sobre as práticas apropriadas de Controlo de Qualidade.

Interpretação dos resultados

Uma amostra com uma razão de DO:

< 3,0 = Negativo

≥ 3,0 = Positivo

Devido à alta sensibilidade do kit de rastreio pode verificar-se que, numa pequena percentagem de casos, amostras com uma razão da DO igual ou superior a 3,0 são negativas num ensaio quantitativo.

Um resultado positivo deve ser sempre confirmado por um ensaio quantitativo.

Limitações

A razão da DO de um doente em particular não pode ser utilizada como medida da gravidade da doença, dado que os anticorpos de doentes diferentes podem diferir uns dos outros no que respeita à afinidade. Por este motivo, é difícil obter uma normalização absoluta de resultados. Não se pode depender apenas de ensaios deste tipo como base exclusiva para uma tomada de decisões em

terapêutica clínica, no entanto, devem ser utilizados juntamente com os sintomas clínicos e os resultados de outros ensaios disponíveis.

Os soros de doentes com outras doenças auto-imunes e de indivíduos normais podem conter potencialmente auto-anticorpos com reactividade cruzada. Alguns indivíduos podem ser positivos, tendo pouca ou nenhuma evidência de doença clínica. Por outro lado, alguns doentes com doença activa podem ter níveis não detectáveis destes anticorpos.

Não se deve iniciar uma terapêutica imunossupressora com base num resultado positivo de ANCA anti-MBG. O início ou as alterações do tratamento não se devem basear apenas em alterações da concentração de ANCA anti-MBG, mas também numa observação clínica cuidadosa.

References

1. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J. Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med.* 1995 Aug;238(2):143-52.
2. Westman KW, Bygren PG, Eilert I, Wiik A, Wieslander J. Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCA; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndromes. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Sep;12(9):1863-8.
3. Gunnarsson A, Hellmark T, Wieslander J. Molecular properties of the Goodpasture epitope. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30844-8.
4. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet.* 1985 Feb 23;1(8426):425-9.
5. Segelmark M, Westman K, Wieslander J. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol.* 2000 Sep-Oct;18(5):629-35.
6. Westman KW, Selga D, Bygren P, Segelmark M, Baslund B, Wiik A, Wieslander J. Clinical evaluation of a capture ELISA for detection of proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody. *Kidney Int.* 1998 May;53(5):1230-6.
7. Csernok E, Holle J, Hellmich B, Willem J, Tervaert C, Kallenberg CG, Limburg PC, Niles J, Pan G, Specks U, Westman K, Wieslander J, De Groot K, Gross WL. Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study. *Rheumatology (Oxford).* 2004 Feb;43(2):174-80. Epub 2003 Oct 29.
8. Westman KW, Bygren PG, Olsson H, Ranstam J, Wieslander J. Relapse rate, renal survival, and cancer morbidity in patients with Wegener's granulomatosis or microscopic polyangiitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 1998 May;9(5):842-52.
9. Gisslén K, Wieslander J, Westberg G, Herlitz H. Relationship between anti-neutrophil cytoplasmic antibody determined with conventional binding and the capture assay, and long-term clinical course in vasculitis. *J Intern Med.* 2002 Feb;251(2):129-35.
10. Segelmark M, Phillips BD, Hogan SL, Falk RJ, Jennette JC. Monitoring proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies for detection of relapses in small vessel vasculitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Sep;10(5):769-74.
11. Westman KW, Selga D, Isberg PE, Bladström A, Olsson H. High proteinase 3-anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) level measured by the capture enzyme-linked immunosorbent assay method is associated with decreased patient survival in ANCA-associated vasculitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Nov;14(11):2926-33.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medisinsk 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. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. 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. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
SOLN STOP	Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

KORTFATTET DANSK INSTRUKTION

Tilslaget brug

Wieslab® vasculitis screeningstestkit er en enzymkoblet immunosorbentanalyse (ELISA) til kvalitativ påvisning af antistoffer mod glomerulus basalmembran (GBM), proteinase -3 (PR3) og myeloperoxidase (MPO) i human sera. Analysen anvendes til at påvise antistoffer i en enkelt serumprøve. Analysens resultater bruges som en hjælp til diagnosticering af reno-pulmonale syndromer og hurtigt fremadskridende glomerulonephritis, især Goodpasture syndrom (GP), Wegener's granulomatose (WG) og mikroskopisk polyangiitis (MP). Analysen er beregnet til brug for patienter med tegn og symptomer, der er forenelige med GP, WG og MP. Den er ikke beregnet til screening af en rask population.

TIL IN VITRO DIAGNOSTISK BRUG.

Et positivt resultat skal altid bekræftes med en kvantitativ analyse.

Advarsler og forholdsregler

- Til in vitro diagnostisk brug.
- For optimale resultater skal denne protokol overholdes strengt.
- Brug ikke komponenter efter disses udløbsdato, og bland ikke komponenter fra forskellige partier.
- De human serum-komponenter, som er blevet anvendt ved fremstilling af kontrollerne i kittet, er blevet undersøgt for tilstedeværelse af antistoffer over for human immunodeficiency virus 1 & 2 (HIV 1&2), hepatitis C (HCV), såvel som hepatitis B overfladeantigen med FDA godkendte metoder og fundet negative. Da der ikke er nogen testmetoder, der kan give fuldstændig forsikring for, at der ikke er HIV, HCV, hepatitis B virus eller andre infektiøse agenser til stede, skal prøver og human-baserede reagenser håndteres, som var de i stand til at overføre infektiøse agenser.
- Det amerikanske Center for Sygdomskontrol og Forebyggelse og det Nationale Sundhedsinstitut har anbefalet, at potentielt infektiøse agenser håndteres ved biosikkerhedsniveau 2.
- Alle opløsninger indeholder ProClin 300 som konserveringsmiddel. Man må aldrig pipettere med munden eller lade reagenser eller patientprøver komme i kontakt med huden. Reagenser, der indeholder ProClin, kan have irriterende virkning. Undgå kontakt med hud og øjne. I tilfælde af kontakt skal der skylles med masser af vand.
- Stop-opløsningen indeholder 10 mM EDTA.
- Koncentrationer af anti-GBM og ANCA i en given prøve, der bestemmes med analyser fra forskellige producenter, kan variere på grund af forskelle i analysemetoder og reagensspecificitet.
- Materiale-sikkerhedsdatablade for alle farlige komponenter i dette kit fås ved henvendelse til Svar Life Science.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SOLN	STOP
SUBS	pNPP

Advarsel

Indeholder ProClin 300:

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

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

Prøvetagning

Wieslab[®] Vasculitis screen assay er beregnet til brug med serum. Skal håndteres, som var den i stand til at overføre infektiøse agenser.

Undgå at bruge sera, der er ikterisk, lipæmisk eller hæmolyseret.

Varmeinaktiveret sera kan give uspecifikke reaktiviteter og bør ikke anvendes.

Opbevar serum mellem 2-8°C, hvis testning vil finde sted indenfor fem dage. Hvis prøver skal opbevares i længere tid, skal de opbevares ved -20°C eller koldere.

Brug ikke en frostfri fryser, da den kan lade prøverne gennemgå nedfrysnings-/optøningscyklusser, hvorved antistofferne nedbrydes. Prøver, der ikke opbevares korrekt eller gennemgår flere nedfrysnings-/optøningscyklusser, kan give falske resultater.

NCCLS har opstillet anbefalinger for opbevaring af blodprøver, (Godkendte standardprocedurer for håndtering og bearbejdning af blodprøver (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990)).

Kitkomponenter og opbevaring af reagenser

- Et stativ med 96 brønde coated med rensed GBM-antigen (bovint), monoklonalt anti-proteinase 3/proteinase 3 (human neutrophil) og monoklonal anti-myeloperoxidase/myeloperoxidase (human neutrofil) og kontrolbrønde med musemonoklonalt antistof eller human serum albumin: et låg forseglet i en foliepakke med en tørpakke.

- 3 ml negativ kontrol (NC), der indeholder human serum i diluent (grøn farve).

- 3 ml positiv kontrol (PC), der indeholder human serum i diluent (rød farve).

- 13 ml konjugat, der indeholder alkalisk fosfatase-mærkede (gede) antistoffer mod humant IgG (blå farve).

- 32 ml diluent (Dil), der indeholder PBS (rød farve).

13 ml pNPP-substrat

- 13 ml stopopløsning.

- 30 ml vaskeopløsning 30x koncentreret.

Alle reagenser i kittet, undtagen vaskeopløsningen, er parat-til-brug og skal opbevares ved 2-8° C.

Nødvendige materialer eller udstyr, der ikke medfølger

Mikropladelæser med 405 nm filter. Destilleret vand til fremstilling af yderligere vaskeopløsning. Vasker til strimler, absorberende servietter, plastrør til fortynding af patientprøve og en timer.

Præcisionspipetter med engangsspidser.

Ikke bruk referansebølgelengde (620 nm eller lignende) ved avlesing av skiltet.

Ikke bruk referansebølgelengde med substraherte OD-verdier til kalkulasjonene.

PROCEDURE

Alle opløsninger skal bruges ved stuetemperatur. Den folieindpakkede plade må ikke åbnes, før den er nået op på den omgivende rumtemperatur, da kondensfugtighed kan have en negativ effekt på antigenet. På alle trin skal der inkuberes ved stuetemperatur (20-28°C) med låg. Tag kun det antal brønde, der skal anvendes til testning, ud og genforsegl aluminiumspakken omhyggeligt. Hvis brøndene skulle komme fra hinanden, kan de samles igen i den rigtige rækkefølge. Hver brønd i en kolonne er individuelt afmærket med forskellige antal hakker, et hak i brønd A, to hakker i brønd B osv.

Klargøring 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 30x koncentrerede vaskeopløsning i 290 ml destilleret vand. Ved opbevaring ved 2-8°C vil den fortyndede vaskeopløsning være stabil til kittets udløbsdato.

Fortynding af serum og inkubation

Fortynd patientens serum 1/20 med diluent (950 µl diluent + 50 µl serum).

Afpipettér 100 µl/brønd af negativ kontrol (NC) og positiv kontrol (PC) i henhold til nedenstående diagram. Fortyndet patientserum (P) tilsættes til hver enkelt brønd i Prøvekolonnen. Inkubér i 10 minutter.

	Referenkekolonne	Prøvekolonne	Antigenbelæg. pr. række
A	NC	P	GBM
B	PC	P	GBM
C	NC	P	PR3
D	PC	P	PR3
E	NC	P	MPO
F	PC	P	MPO
G	NC	P	Musemonoklonal
H		P	HSA

Efter serum-inkubation

Vask 4 gange med 300 µl vaskeopløsning/brønd, idet brøndene fyldes og tømmes hver gang; efter den sidste vask skal brøndene tømmes ved at tappe dem på en absorberende serviet.

Tilsætning af konjugat

Tilsæt 100 µl konjugat til hver brønd. Inkubér i 10 minutter.

Efter konjugat-inkubation

Vask som før.

Tilsætning af substrat

Tilsæt 100 µl pNPP-substrat til hver brønd og inkubér i 20 minutter.

Tilsætning af stopopløsning

Tilsæt 100 µl stopopløsning til hver brønd og aflæs absorbansen ved 405 nm på en mikropladelæser indenfor 2 timer.

Ikke bruk referansebølgelengde (620 nm eller lignende) ved avlesing av skiltet.

Beregninger

Ikke bruk referansebølgelengde med substraherte OD-verdier til kalkulasjonene.

Et optisk densitet- (OD) forhold for hver enkelt patientprøve beregnes som følger:

$$\text{OD forhold} = \frac{\text{OD patientprøve}}{\text{OD for negativ kontrol}}$$

Patientprøven er negativ, hvis OD forholdet er < 3,0 og positiv, hvis OD forholdet er ≥3,0.

Kvalitetskontrol

Alle kalkulasjoner skal kun gjøres på 405 nm-dataene, uten OD-subtraksjon fra referansebølgelengde.

OD for NC for hvert antigen skal være < 0,4.

Se Certifikat for acceptabelt forventet område (forhold) for den PC.

Området er forskjelligt for hvert antigen.

Hvis PC- eller NC-værdierne ikke er indenfor deres respektive områder, skal testen anses for ugyldig og skal gentages.

Kontrolbrønde: Kontrolbrønden med musemonoklonalt antistof (række G) skal have et negativt OD forhold, dvs. < 3,0. OD værdien for patientprøven i HSA brønden (række H) skal være < 0,4. Hvis OD værdien for patientprøven er ≥0,4 i HSA eller positiv på mere end et antigen, vil prøven måske indeholde uspecifik reaktivitet. I nogle prøver vil uspecifik reaktivitet forsvinde med en højere fortynding, som brukt i en kvantitativ test.

Dobbelt PR3/MPO positive: Nu og da vil patientprøver være positive for både PR3 og MPO. Det forekommer ekstremt sjældent. En grundig evaluering af sådanne resultater vil være nødvendig. En simultan stigning i OD i sammenligning med NC, eller endog et positivt forholdsresultat i mab-kontrol

brønden (række G), er en stærk indikation af en falsk-positiv reaktion, der skyldes tilstedeværelsen af de musemonoklonale antistoffer, der bruges til at binde antigenerne. En yderligere indikation af en sådan falsk reaktion er, at prøven er negativ i de GP-coatede brønde. I disse situationer kan testresultaterne ikke bruges. Det anbefales, at teste prøven igen med Wieslab Capture PR3/MPO-ANCA kvantitative metoder, hvor en højere prøvefortynding anvendes.

De negative og positive kontroller er beregnet til at monitorere væsentlig reagenssvigt. Den positive kontrol vil ikke forsikre nøjagtigheden af analysens cutoff.

Yderligere kontroller kan testes i overensstemmelse med lokale, nationale og/eller statslige forordninger eller akkrediterende organisationer. Der henvises til NCCLS C24-A for vejledning om behørig kvalitetskontroller.

Fortolkning af resultater

En prøve med et OD forhold på:

< 3,0 = Negativ

≥ 3,0 = Positiv

På grund af screeningkittets høje sensitivitet, kan nogle få procent af prøver med et OD forhold $\geq 3,0$ blive fundet negative i en kvantitativ analyse.

Et positivt testresultat skal altid bekræftes med en kvantitativ analyse.

Begrænsninger

Den individuelle patients OD-forhold kan ikke bruges som et udtryk for sygdomsalvorlighed, da antistoffer fra forskellige patienter kan afvige fra hinanden i affinitet. Det er derfor vanskeligt at opnå en absolut standardisering af resultater. Testen må derfor ikke udgøre det eneste grundlag for beslutning om klinisk behandling, men skal bruges i kombination med kliniske symptomer og resultaterne af andre tilgængelige tests.

Sera fra patienter med andre autoimmunsygdomme og fra normale personer kan indeholde potentielt krydsreaktive autoantistoffer. Nogle personer kan være positive med kun svag eller ingen evidens på klinisk sygdom. På den anden side kan nogle patienter med aktiv sygdom have upåviselige niveauer af disse antistoffer.


Immunosuppressiv behandling må ikke startes på basis af et positivt anti-GBM, ANCA resultat.

Initiering eller ændring af behandling må ikke baseres på ændringer i anti-GBM, ANCA-koncentration alene, men snarere på omhyggelig klinisk observation.

References

1. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J. Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med.* 1995 Aug;238(2):143-52.
2. Westman KW, Bygren PG, Eilert I, Wiik A, Wieslander J. Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCA; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndromes. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Sep;12(9):1863-8.
3. Gunnarsson A, Hellmark T, Wieslander J. Molecular properties of the Goodpasture epitope. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30844-8.
4. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet.* 1985 Feb 23;1(8426):425-9.
5. Segelmark M, Westman K, Wieslander J. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol.* 2000 Sep-Oct;18(5):629-35.
6. Westman KW, Selga D, Bygren P, Segelmark M, Baslund B, Wiik A, Wieslander J. Clinical evaluation of a capture ELISA for detection of proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody. *Kidney Int.* 1998 May;53(5):1230-6.
7. Csernok E, Holle J, Hellmich B, Willem J, Tervaert C, Kallenberg CG, Limburg PC, Niles J, Pan G, Specks U, Westman K, Wieslander J, De Groot K, Gross WL. Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study. *Rheumatology (Oxford).* 2004 Feb;43(2):174-80. Epub 2003 Oct 29.
8. Westman KW, Bygren PG, Olsson H, Ranstam J, Wieslander J. Relapse rate, renal survival, and cancer morbidity in patients with Wegener's granulomatosis or microscopic polyangiitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 1998 May;9(5):842-52.
9. Gisslén K, Wieslander J, Westberg G, Herlitz H. Relationship between anti-neutrophil cytoplasmic antibody determined with conventional binding and the capture assay, and long-term clinical course in vasculitis. *J Intern Med.* 2002 Feb;251(2):129-35.
10. Segelmark M, Phillips BD, Hogan SL, Falk RJ, Jennette JC. Monitoring proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies for detection of relapses in small vessel vasculitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Sep;10(5):769-74.
11. Westman KW, Selga D, Isberg PE, Bladström A, Olsson H. High proteinase 3-anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) level measured by the capture enzyme-linked immunosorbent assay method is associated with decreased patient survival in ANCA-associated vasculitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Nov;14(11):2926-33.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklrning der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes p etiketter. 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. Anvnd fre.
	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. 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. Inneholder tilstrkkelig 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 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 diagnstico 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 udstyr 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. verensstmmer med direktiv 98/79/EG fr medicintekniske produkter.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. 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. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
SOLN STOP	Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

KORTFATTET NORSK INSTRUKSJON

Indikasjoner

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

FOR BRUK VED IN VITRO DIAGNOSTISKE FORMÅL.

Et positivt resultat bør alltid bekreftes med et kvantitativt assay.

Advarsler og forsiktighetsregler

- For bruk ved in vitro diagnostiske formål.
- Nøye overholdelse av denne protokollen vil gi optimale resultater.
- Ikke bruk komponenter etter utløpsdatoen, og ikke bland komponenter fra ulike lot-numre.
- Komponentene i det humane serumet som brukes i klargjøringen av kontrolløsningene 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.
- Stoppløsningen inneholder 10 mM EDTA.
- - Konsentrasjonene av anti-GBM og ANCA i en gitt prøve som er fremkommet med assayer fra forskjellige produsenter, kan variere på grunn av ulikheter i analysemetoder og reagensspesifisitet.
- På forespørsel Svar Life Science gi HMS-datablad på alle farlige komponenter som inngår i settet.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SOLN	STOP
SUBS	pNPP

Advarsel

Inneholder ProClin 300:

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

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

Innsamling av prøver

Wieslab® vaskulitt-screening-assayet er beregnet for bruk med serum. Håndteres som om det kan overføre smittestoffer.

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

Varmedeaktivererte 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 96 brønner dekket med rensset GBM-antigen (bovin), monoklonalt anti-proteinase 3/proteinase 3 (human neutrofil) og monoklonal anti-myeloperoksidase/myeloperoksidase (human neutrofil) og kontrollbrønner med monoklonalt antistoff fra mus eller humant serumalbumin: ett lokk forsegle i foliepakning med tørkepakke.

- 3 ml negativ kontroll (NC) som inneholder humant serum i fortytning (grønn farge).

- 3 ml positiv kontroll (PC) som inneholder humant serum i fortytning (rød farge).

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

- 32 ml fortytning (Dil) som inneholder PBS (rød farge).

- 13 ml substrat pNPP.

- 13 ml stoppløsning.

- 30 ml vaskeløsning konsentrert 30x.

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

Nødvendige materialer/utstyr som ikke følger med

Mikroplateleser med filter, 405 nm. Destillert vann for klargjøring av mer vaskeløsning. Vasker for remser, absorberende stoff, plastrør for å fortynne pasientprøven samt en tidsmåler. Presisjonspipetter med engangstupper.

Benyt ikke reference bølgelengde (620 nm eller ligende) ved læsning af plade.

Ved beregninger, benyt ikke OD verdier fratrukket reference bølgelengde.

PROSEDYRE

Alle løsninger bør brukes ved romtemperatur. Du må ikke åpne den foliepakkede platen før den har oppnådd romtemperatur fordi damp fra kondens kan ha negativ effekt på antigenet. Inkuber alltid ved romtemperatur (20-28 °C) med lokk. Fjern bare det antall brønner som er nødvendig for testing.

Forsegle aluminiumspakningen nøye igjen. Dersom brønnene blir separert, kan de samles igjen i riktig rekkefølge. Hver brønn i en søyle er individuelt merket med forskjellig antall spor, ett spor i brønn A, to spor i brønn B og så videre.

Klargjøring av vaskeløsning

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

Fortynning av serum og inkubasjon

Fortynn pasientserumet 1/20 med fortytning (950 µl fortytning + 50 µl serum).

Pipetter 100 µl/brønn av negativ kontroll (NC), positiv kontroll (PC) i henhold til skjemaet nedenfor. Fortynnet pasientserum (P) tilsettes hver brønn i prøvesøylen. Inkuber i 10 minutter.

	Referansesøyle	Prøvesøyle	Antigenbelegg per rad
A	NC	P	GBM
B	PC	P	GBM
C	NC	P	PR3
D	PC	P	PR3
E	NC	P	MPO
F	PC	P	MPO
G	NC	P	Musemonoklonal
H		P	HSA

Etter seruminkubasjon

Vask 4 ganger med 300 µl vaskeløsning/brønn, ved å fylle og tømme brønnene hver gang; etter siste vasking tømmes brønnene ved å banke dem mot det absorberende stoffet.

Tilsette konjugat

Tilsett 100 µl konjugat i hver brønn. Inkuber i 10 minutter.

Etter konjugatinkubasjon

Vask som tidligere.

Tilsette substrat

Tilsett 100 µl substrat pNPP i hver brønn, inkuber i 20 minutter.

Tilsette stoppløsning

Tilsett 100 µl stoppløsning i hver brønn og les av absorbansen ved 405 nm på en mikroplateleser i løpet av 2 timer.

Benyt ikke reference bølgelengde (620 nm eller ligende) ved læsning af plade.

Beregninger

Ved beregninger, benyt ikke OD verdier fratrukket reference bølgelengde.

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

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

Pasientprøven er negativ hvis OD-forholdet er < 3,0 og positiv hvis OD-forholdet er ≥ 3,0.

Kvalitetskontroll

Alle udregninger skal laves ved brug af 405 nm date uden OD fratrukket reference bølgelengde.

OD for NC for hvert antigen skal være < 0,4.

Se på etiketten for akseptabelt forventet område (forhold) for PC.

Området er forskjellig for hvert antigen.

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

Kontrollbrønner: Kontrollbrønningen med monoklonalt antistoff fra mus (rad G) skal ha et negativt OD-forhold dvs. < 3,0. OD-verdien for pasientprøven i HSA-brønningen (rad H) skal være < 0,4. Hvis OD-verdien for pasientprøven er ≥ 0,4 i HSA-brønningen eller er positiv for flere enn ett antigen, kan prøven inneholde uspesifikk reaktivitet. I noen prøver vil uspesifikk reaktivitet forsvinne med en høyere fortykning, slik som anvendes i en kvantitativ test.

Doble PR3/MPO-positive: Iblant er pasientprøver positive for både PR3 og MPO. Dette er svært sjelden. I slike tilfeller må resultatene vurderes nøye. En samtidig økning i OD sammenlignet med NC eller likt positivt forholdsresultat i mab-kontrollbrønnen (rad G) er en sterk indikasjon på en falsk positiv reaksjon på grunn av antistoffer mot musemonoklonalene som brukes til å fange antigenene. En ytterligere indikasjon på falsk reaksjon er at prøven er negativ i de GP-belagte brønnene. I slike situasjoner kan ikke testresultatene brukes. Det anbefales å teste prøven på nytt ved hjelp av Wieslab Capture PR3/MPO-ANCA-kvanitative metoder når en høyere prøvefortynning anvendes.

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

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

Tolking av resultatene

En prøve med et OD-forhold på:

< 3,0 = Negativ

≥ 3,0 = Positiv

På grunn av den høye sensitiviteten til screeningsettet, kan en liten andel av prøvene med et OD-forhold $\geq 3,0$ vise seg å være negative i et kvantitativt assay.

Et positivt testresultat bør alltid bekreftes med et kvantitativt assay.

Begrensninger

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

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

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

References

1. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J. Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med.* 1995 Aug;238(2):143-52.
2. Westman KW, Bygren PG, Eilert I, Wiik A, Wieslander J. Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCA; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndromes. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Sep;12(9):1863-8.
3. Gunnarsson A, Hellmark T, Wieslander J. Molecular properties of the Goodpasture epitope. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30844-8.
4. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet.* 1985 Feb 23;1(8426):425-9.
5. Segelmark M, Westman K, Wieslander J. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol.* 2000 Sep-Oct;18(5):629-35.
6. Westman KW, Selga D, Bygren P, Segelmark M, Baslund B, Wiik A, Wieslander J. Clinical evaluation of a capture ELISA for detection of proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody. *Kidney Int.* 1998 May;53(5):1230-6.
7. Csernok E, Holle J, Hellmich B, Willem J, Tervaert C, Kallenberg CG, Limburg PC, Niles J, Pan G, Specks U, Westman K, Wieslander J, De Groot K, Gross WL. Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study. *Rheumatology (Oxford).* 2004 Feb;43(2):174-80. Epub 2003 Oct 29.
8. Westman KW, Bygren PG, Olsson H, Ranstam J, Wieslander J. Relapse rate, renal survival, and cancer morbidity in patients with Wegener's granulomatosis or microscopic polyangiitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 1998 May;9(5):842-52.
9. Gisslén K, Wieslander J, Westberg G, Herlitz H. Relationship between anti-neutrophil cytoplasmic antibody determined with conventional binding and the capture assay, and long-term clinical course in vasculitis. *J Intern Med.* 2002 Feb;251(2):129-35.
10. Segelmark M, Phillips BD, Hogan SL, Falk RJ, Jennette JC. Monitoring proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies for detection of relapses in small vessel vasculitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Sep;10(5):769-74.
11. Westman KW, Selga D, Isberg PE, Bladström A, Olsson H. High proteinase 3-anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) level measured by the capture enzyme-linked immunosorbent assay method is associated with decreased patient survival in ANCA-associated vasculitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Nov;14(11):2926-33.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuil de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medisinsk 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. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. 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. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
SOLN STOP	Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

KORTFATTAD SVENSK INSTRUKTION

Produktens användning

Wieslab® Vasculitis Screen test kit är en *enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* för kvalitativ bestämning av antikroppar riktade mot glomerulärt basalmembran (GBM), Proteinase 3 (PR3) och Myeloperoxidas (MPO) i humant serum. Analysen används för antikroppsbestämning i enskilda patientprover. Resultaten kan ge vägledning vid utredning av misstänkt renopulmonella syndrom och snabbt utvecklande glomerulonefrit, särskilt Goodpastures syndrom (GP), Wegeners granulomatos (WG) och mikroskopisk polyangit (MP). Analysen är avsedd att användas på patienter med symptom associerade med GP, WG och MP.

Analysen är inte avsedd för screening av en frisk population.

FÖR *IN VITRO* DIAGNOSTIK ANVÄNDNING.

Ett positivt resultat bör alltid verifieras med kvantitativ analys.

Säkerhetsinformation

- Endast för *in vitro* diagnostik.
- Optimala resultat uppnås om man strikt följer protokollet.
- Använd inte kitkomponenter efter utgångsdatum och blanda inte komponenter från olika kitlotter.
- Serum som har använts vid preparation av kitkontroller har testats negativt för antikroppar mot humant immunodeficiency virus 1 & 2 (HIV 1&2), hepatit C (HCV) och hepatit B ytantigen med FDA godkända testmetoder. 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 och undvik hudkontakt med reagens eller patientprov. 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.
- Stopplösning innehåller 10mM EDTA
- Anti-GBM och ANCA koncentrationer i ett specifikt serumprov kan variera i kit från olika tillverkare. Detta beror på skillnader i analysmetoder och reagensers specificitet.
- På begäran kan Svar Life Science tillhandahålla säkerhetsdatablad om alla farliga komponenter som ingår i kitet.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		

CONTROL	+
CONTROL	-
SOLN	STOP
SUBS	pNPP

Varning

Innehåller ProClin 300:
Reaktionsmassa bestående av: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

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

Provtagning

Wieslab® Vasculitis Screen analysen är avsedd för serumprov. Hantera serumprov som potentiellt infektiösa.

Undvik att analysera 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 fem dagar. Långtidsförvaring skall ske vid -20° C eller kallare. Använd inte frysar med automatisk avfrostning då risk finns att prover töar under avfrostningarna vilket kan orsaka antikroppsdegradering. 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).

Nödvändig utrustning och material som ej ingår i kitet

Spektrofotometer med filter för 405 nm. Destillerat vatten för beredning av tvättlösning.

Tvättmaskin för mikrotiterplattor, torkpapper, provrör för spädning av patient prover, timer.

Precisionspipetter med engångsspetsar.

Använd inte referensvåglängd (620 nm eller liknande) vid avläsning av plattan.

Använd inte referensvåglängds subtraherade OD-värden för beräkningarna.

Ingående reagens och förvaring

- En ram med 96 brunnar belagda med renat GBM antigen (Bovine), monoklonal anti-proteinas 3/proteinas 3 (Human Neutrofil), monoklonal anti-myeloperoxidas/myeloperoxidas (Human Neutrofil), kontrollbrunnar med monoklonala musantikroppar och human serum albumin och ett lock. Allt förpackat i en återförslutningsbar foliepåse med torkmedel.

- 3 mL negativ kontroll (NC), humant serum spätt i "diluent" (grön färg).

- 3 mL positiv kontroll (PC), humant serum spätt i "diluent" (röd färg).

- 13 mL konjugatlösning, alkaliskt fosfatas-märkta (Get) antikroppar mot humant IgG (blå färg).

- 32 mL "Diluent" (Dil), PBS (röd färg).

- 13 mL substrat pNPP.

- 13 mL Stopplösning.

- 30 mL Tvättlösning, 30x koncentrerad.

Alla reagens i kitet är färdiga att användas utom tvättlösningen, reagenser skall förvaras vid 2-8° C.

TESTPROCEDUR

Alla lösningar skall vara rumstempererade innan man använder dem. Öppna inte foliepåsen med plattan förrän den har uppnått rumstemperatur för att undvika kondens som kan påverka antigenet negativt.

Samtliga inkubationer skall ske vid rumstemperatur (18-28° C), använd lock .

Tag endast ut det antal strips som behövs, resten skall förvaras i noggrant tillsluten aluminiumpåse.

Skulle brunnar separeras kan de åter sättas ihop i rätt ordning, varje brunn i raden har en individuell markering med olika antal skårer: en skåra vid brunn A, två skårer vid brunn B osv.

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 patientprovet 1/20 med Diluent (950 µL diluent +50 µL serum).

Pipettera 100 µL/brunn av negativ kontroll (NC), positiv kontroll (PC) och spätt patientserum (P) i referens och prov kolumnen enligt schemat nedan.

Inkubera i 10 minuter.

	Referens kolumn	Prov kolumn	Antigen coat
A	NC	P	GBM
B	PC	P	GBM
C	NC	P	PR3
D	PC	P	PR3
E	NC	P	MPO
F	PC	P	MPO
G	NC	P	Monoklonal musantikropp
H		P	HSA

Efter provinkubering

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

Tillsättande av konjugat

Tillsätt 100 µL konjugatlösning i varje brunn. Inkubera 10 minuter.

Efter konjugatinkubering

Tvätta som tidigare.

Tillsättande av substratlösning

Tillsätt 100 µL pNPP substratlösning i varje brunn. Inkubera 20 minuter.

Tillsättande av stopplösning

Tillsätt 100 µL stopplösning i varje brunn. Avläs absorbansen i en spektrofotometer vid 405 nm inom 2 timmar.

Använd inte referensvåglängd (620 nm eller liknande) vid avläsning av plattan.

Beräkningar

Använd inte referensvåglängds subtraherade OD-värden för beräkningarna.

Absorbanskvoten (OD kvoten) för varje enskilt patientprov beräknas enligt följande formel:

$$\text{Absorbanskvot (OD kvoten)} = \frac{\text{Patientprovets absorbansvärde (OD)}}{\text{Negativa kontrollens absorbansvärde (OD)}}$$

Patientprov bedöms negativ när OD kvoten är <3.0 och positiv när OD kvoten är ≥3.0

Kvalitetskontroll

Alla beräkningar bör endast göras på 405 nm data utan subtraktion av OD-värden för referens våglängd.

Den negativa kontrollens (NC) absorbansvärde (OD) i brunnar för varje enskilt antigen skall vara <0.4.

För positiva kontrollens (PC) godkända kvotgränser se certifikat. Kvotgränserna är olika för varje enskilt antigen.

Om något av PC eller NC värdena inte faller inom angivet område bör testen betraktas som icke giltig och göras om.

Kontrollbrunnar: OD kvoten i kontrollbrunnar coatade med monoklonala musantikroppar (Rad G) skall vara <3.0 . Absorbansvärden (OD) för patientprov i HSA coatade brunnar (rad H) skall vara <0.4 . Om absorbansvärdet (OD) av patientprov är ≥ 0.4 i HSA brunnen (rad H) eller är positivt för fler än ett antigen i antigencoatade brunnar kan provet innehålla en ospecifik reaktivitet. Hos en del prover kan den ospecifika reaktiviteten försvinna vid högre provspädning som används i kvantitativa tester.

Dubbel PR3/MPO positiva: I vissa fall kan patientprov bli positiva i både PR3 och MPO, något som inträffar ytterst sällan. Noggrann utvärdering av sådana resultat är därför nödvändig. En samtidig ökning av OD jämfört med NC eller till och med positiva kvot i MAB-kontrollbrunnen (rad-G) indikerar starkt en falsk positiv reaktion på grund av förekomsten av antikroppar mot monoklonala musantikroppar som används för antigen capture. Ytterligare en indikation på att detta är en falsk reaktion är att provet blir negativt i de GP-coatade brunnarna. I dessa situationer kan provresultaten inte användas. Det rekommenderas att testa provet på nytt med Wieslab® Capture PR3/MPO-ANCA kvantitativa metoder där en högre provspädning används.

Negativa och positiva kontroller är avsedda för övervakning av eventuella försämringar av viktiga reagensers funktion. Den positiva kontrollen garanterar inte analysens precision vid cut-off.

Ytterligare kontroller kan analyseras i enlighet med lokala, statliga och/eller federala regulatoriska krav/riktlinjer eller ackrediterade organisationens bestämmelser. Rekommendationer angående kvalitetskontroll kan fås ur NCCLSs dokument C24-A.

Tolkning av resultat

Prov med OD kvoten:

$<3,0$ = Negativt

≥ 3.0 = Positivt

Screeninganalysen har högre sensitivitet än den kvantitativa analysen vilket gör att några procent av prover med OD kvoten ≥ 3.0 kan bli negativa i en kvantitativ test.

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

Analysens begränsningar

En enskild patients absorbanskvot 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.

Kliniska bedömningar ska inte baseras enbart med ledning av analysresultat från detta test. Istället skall analysresultatet användas tillsammans med andra relevanta parametrar, inte minst allmänkliniska (symptom etc), för att korrekt bedöma den specifika kliniska situationen.


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 utan övriga kliniska belägg för sjukdom. Samtidigt kan vissa patienter med aktiv sjukdom ha opåvisbara nivåer av dessa antikroppar.

Immunosuppressiv behandling får inte påbörjas enbart baserat på ett positivt anti-GBM, ANCA resultat. Inte heller får behandling initieras eller ändras enbart på grund av ändringar i anti-GBM, ANCA titern utan skall istället baseras på den totala kliniska bilden.

References

1. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J. Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med.* 1995 Aug;238(2):143-52.
2. Westman KW, Bygren PG, Eilert I, Wiik A, Wieslander J. Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCA; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndromes. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Sep;12(9):1863-8.
3. Gunnarsson A, Hellmark T, Wieslander J. Molecular properties of the Goodpasture epitope. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30844-8.
4. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet.* 1985 Feb 23;1(8426):425-9.
5. Segelmark M, Westman K, Wieslander J. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol.* 2000 Sep-Oct;18(5):629-35.
6. Westman KW, Selga D, Bygren P, Segelmark M, Baslund B, Wiik A, Wieslander J. Clinical evaluation of a capture ELISA for detection of proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody. *Kidney Int.* 1998 May;53(5):1230-6.
7. Csernok E, Holle J, Hellmich B, Willem J, Tervaert C, Kallenberg CG, Limburg PC, Niles J, Pan G, Specks U, Westman K, Wieslander J, De Groot K, Gross WL. Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study. *Rheumatology (Oxford).* 2004 Feb;43(2):174-80. Epub 2003 Oct 29.
8. Westman KW, Bygren PG, Olsson H, Ranstam J, Wieslander J. Relapse rate, renal survival, and cancer morbidity in patients with Wegener's granulomatosis or microscopic polyangiitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 1998 May;9(5):842-52.
9. Gisslén K, Wieslander J, Westberg G, Herlitz H. Relationship between anti-neutrophil cytoplasmic antibody determined with conventional binding and the capture assay, and long-term clinical course in vasculitis. *J Intern Med.* 2002 Feb;251(2):129-35.
10. Segelmark M, Phillips BD, Hogan SL, Falk RJ, Jennette JC. Monitoring proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies for detection of relapses in small vessel vasculitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Sep;10(5):769-74.
11. Westman KW, Selga D, Isberg PE, Bladström A, Olsson H. High proteinase 3-anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) level measured by the capture enzyme-linked immunosorbent assay method is associated with decreased patient survival in ANCA-associated vasculitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Nov;14(11):2926-33.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. 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. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medisinsk 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. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. 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. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
SOLN STOP	Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Stoppløsning. Stoppløsning. Stoppløsning
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

SVAR LIFE SCIENCE AB
Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden
Phone: +46 40 53 76 00
E-mail: info@svarlifescience.com
www.svarlifescience.com