



## **RELISA® PR3-ANCA-TESTSYSTEM FÖR ANTIKROPPAR MOT PROTEINAS 3**

*För diagnostisk användning in vitro*

*För professionell användning*

*Katalognr: 7096-16*

*AVSEDD ANVÄNDNING: Detta är ett testsystem för enzymimmunoanalys för detektering av antikroppar mot proteinas 3 (PR3) i humanserum. Detta testsystem ska användas som hjälp vid detektering av antikroppar som är förknippade med Wegeners granulomatos och annan vaskulit.*

### **SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET**

Antineutrofil cytoplasmiska autoantikroppar (ANCA) är en grupp antikroppar som reagerar med cytoplasmiska antigener i humana neutrofiler. Trots att dessa antikroppar ursprungligen rapporterades 1964 (1), kom den första rapporten som kopplade dessa antikroppar till sjukdom år 1982, när Davies m.fl. rapporterade förekomsten av antikropparna hos åtta patienter med segmentell nekrotiserande glomerulonefrit (2). År 1984 rapporterades fyra patienter till med vaskulit och glomerulonefrit. År 1985 visade van der Woude m.fl. att ANCA hade ett starkt samband med Wegeners granulomatos och att antikroppstiter korrelerade med sjukdomsaktivitet (3). År 1988 rapporterade Falk och Jenette att ANCA hade mer än en antigenspecificitet (4). En efterföljande rapport visade att specificiteten för ANCA korrelerade med de patologiska egenskaperna hos vaskulit (5).

Screening för ANCA genomförs vanligen med hjälp av en indirekt immunofluoresensanalys. I detta test kan flera mönster av cellulär färgning iakttas. Två huvudmönster av färgning har beskrivits och karakteriserats väl när etanolfixerade neutrofiler används i det immunofluoresenta ANCA-testet. Autoantikroppar som visar ett fint granulärt cytoplasmamönster, som kallas C-ANCA, riktas vanligen mot en serinproteas, proteinas 3 (PR-3). Dessa autoantikroppar har visat sig ha ett starkt samband med Wegeners granulomatos. Det andra huvudmönstret av färgning, det pernukleära, eller P-ANCA-mönstret, som vanligen kommer av antikroppar som riktats mot myeloperoxidas (MPO) har förknippats med systemisk vaskulit och idopatisk nekrotiserande och tilltagande glomerulonefrit (4). Alla prover som uppvisar ett positivt indirekt immunofluoresenstest bör bekräftas som MPO-ANCA eller PR3-ANCA med en enzymimmunoanalys (EIA). Vissa författare anser att alla prover från kliniskt misstänkta patienter bör testas med EIA, eftersom 5% av proverna är positiva enbart med EIA (6). Trots att PR3-ANCA oftast påträffas hos patienter med Wegeners granulomatos (upp till 85% av patienterna) är de inte specifika för denna sjukdom, eftersom de även påträffas hos en mindre procentandel patienter med idiopatisk nekrotiserande och tilltagande glomerulonefrit. På samma sätt förknippas MPO-ANCA med idiopatisk nekrotiserande tilltagande glomerulonefrit hos upp till 65% av patienterna, men påträffas också hos en mindre procentandel patienter med Wegeners granulomatos. Antigenen MPO-ANCA eller PR3-ANCA kan påträffas vid mikroskopisk polyangit, vardera hos cirka 45% av patienterna (7, 8, 9).

### **TESTPRINCIP**

Detta test är ett indirekt EIA. Stabiliserade humana PR3-antigener har belagts på mikrobrunnarnas yta och fungerar som ett antigensubstrat i detta system. Spädningar av patientproverna placeras i mikrobrunnarna och inkuberas, vilket gör att specifika antikroppar i provet reagerar med antigenet i den solida fasen. Efter tvätt, som tar bort obundna antikroppar och andra serumproteiner, inkuberas brunnarna med antihumana antikroppar från get, vilka märkts med

pepparrotsperoxid. Det pepparrotsperoxidaskonjugerade antikroppspreparat som ingår i systemet är specifikt för humana IgG-gammakedjor.

Efter inkubation med pepparrotsperoxidaskonjugatet, bildas ett stabilt treparts-komplex om resultaten är positiva. Detta komplex består av pepparrotsperoxidaskonjugerad antihumana antikroppar som är bundna till humana antikroppar mot PR3, vilka är bundna till det antigen som stabiliserats på plastytan.

Efter ännu ett tvättsteg detekteras detta komplex genom tillsats av en lösning med tetrametylbensidin (TMB) och H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> som ett kromogent substrat. Graden av färgutveckling i varje brunn är proportionell mot koncentrationen av antikroppar mot PR3 i varje serumprov. Varje mikrobrunn läses av i en spektrofotometer vid 450 nm.

## SYSTEMETS KOMPONENTER – MATERIAL SOM MEDFÖLJER

**Lagring:** Alla komponenter ska lagras i kyl vid 2–10°C. Får ej frysas.

**Stabilitet:** Alla komponenter förblir stabila i minst 12 månader från tillverkningsdatum. Använd inte någon komponent efter utgångsdatum.

### REAKTIVA REAGENSER

**RELISA® PR3-belagda mikrobrunnsremсор:** Katalognr. 7008-16. En mikrobrunnsram som rymmer tolv åttabrunnsstrips belagda med humant PR3. Dessa strips har grön färgkodning. Om färre än åtta brunnar behövs för testningen kan brunnarna separeras genom att de bryts loss. De oanvända stripsen kan läggas tillbaka i foliepåsen med torkmedelsförpackningen, förslutas med blixtlåset och kylas ned igen i upp till 45 dagar.

**RELISA® provspädning:** Katalognr. 7100 (100 ml). Patentskyddad buffrad provspädning som används till att späda patientprover.

**RELISA® enzymantikroppsreagens – humant IgG-gammakedjespecifikt:** Katalognr. 7009-15 (14 ml). Antihumant IgG från get (gammakedjespecifikt) konjugerat till pepparrotsperoxid (HRP). Reagenset är klart att använda.

**RELISA® substratlösning:** Katalognr. 7035 (14 ml). HRP-specifik enzymsubstratlösning som innehåller stabiliserad 3,3',5,5'-tetrametylbensidin (TMB) och väteperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Reagenset är klart att använda.

**RELISA® stoppreagens:** Katalognummer 7033 (14 ml). Patentskyddad stoppreagens för Immuno Concepts EIA-testsystem. Reagensen är bruksfärdig. **WARNING:** Frätande. Denna reagens innehåller hydrokloriska och svavelhaltiga syror (mindre än 3 % vardera per volym) och skall hanteras med varsamhet. Förvaras utom räckhåll för barn. Om du råkar röra vid ögonen i samband med hantering skall du omedelbart spola noggrant med vatten och kontakta läkare. Tillsätt aldrig vatten till denna reagens.

**RELISA® PR3 kalibratorsera:** Katalognr. 7261-16, 7262-16, 7263-16, 7264-16, 7265-16 (2 ml vardera). Humansera som innehåller antikroppar mot PR3. Analysvärdet för vart och ett av dessa sera anges på flaskans etikett. Dessa sera levereras i bruksspädning och är klara att använda.

**RELISA® PR3 positiv kontroll:** Katalognr. 7021-16 (2 ml). Humant positivt kontrollserum som innehåller antikroppar mot PR3. Detta serum levereras i bruksspädning och är klart att använda.

**RELISA® Negativ kontroll:** Katalognr. 7031 (2 ml). Humant negativt kontrollserum som inte innehåller antikroppar mot PR3. Detta serum levereras i bruksspädning och är klart att använda.

**RELISA® valfri outspädd analyserad positiv kontroll med PR3:** Katalognr. 7022-16 (0,25 ml). Humant positivt kontrollserum som innehåller antikroppar mot PR3. Behandla denna positiva kontroll som outspädd serum. Analysvärdet för detta serum anges på flaskans etikett.

### ICKE REAKTIVA KOMPONENTER

#### Hållare för mikrobrunnar

#### Tvättbuffertlösning:

**PBS-buffert:** Katalognr. 1011. Fosfatbuffrad koksaltspuder (0,01M, pH 7,4 ± 0,2). Varje påse innehåller tillräckligt med buffertpuder för en liter. (Två påsar buffertpuder medföljer för varje 96-mikrobrunnspatta i kompletta testsatser).

**Tvättbuffertkoncentrat:** Katalognr. 1031 (10 ml). 5% Tween 20-lösning som ska användas i tvättbufferten. (Två flaskor buffertkoncentrat medföljer för varje 96-mikrobrunnspatta i kompletta testsatser).

**Preparering:** Lös upp en påse buffertpulver i en liter avjoniserat eller destillerat vatten. Tillsätt hela innehållet i en flaska tvättbuffertkoncentrat till det upplösta PBS. Blanda väl och lagra i kyl, 2–10 °C i upp till 4 veckor eller tills tecken på kontamination eller andra synbara förändringar inträffar. Tvättbuffertlösning måste ha rumstemperatur (18–24°C) före användning.

## YTTERLIGARE MATERIAL SOM KRÄVS – MEDFÖLJER EJ

Volymetriska precisionspipetter för att leverera volymer på 25–1000 µl

Klämflaska för att leverera tvättbuffertlösning till mikrobrunnarna eller ett automatiskt eller halvautomatiskt tvättsystem för mikrobrunnar

Enlitersbehållare för PBS-tvättbuffertlösning

Avjoniserat eller destillerat vatten

Spektrofotometer för plattavläsning med möjlighet till att läsa av absorbans vid 450 nm

Provrör för preparering av serumspädningar

Läskpapper eller pappersdukar

Multikanalpipett med kapacitet för att leverera till 8 brunnar

Engångshandskar

Lab-timer

## FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- Allt material av mänskligt ursprung som används i denna produkt har testats och funnits vara negativt (ej upprepat reaktivt) för antikroppar mot humant immunodefektvirus-1 (HIV-1), humant immunodefektvirus-2 (HIV-2) hepatit C-virus (HCV) och för hepatit B-antigen (HBsAg) enligt FDA-godkända metoder. Men ingen testmetod kan erbjuda fullständiga garantier för att HIV-1, HIV-2, hepatit C, hepatit B eller andra smittoämnen inte förekommer. Därför bör allt material i satsen hanteras på samma sätt som potentiellt smittsamma material.
- Alla patientprover ska hanteras på biosäkerhetsnivå 2 enligt rekommendationerna för eventuellt smittsamma humanserum- eller blodprover enligt Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
- Spädning av komponenterna eller ersättning med andra komponenter än de som medföljer detta system kan ge inkonsekventa resultat.
- Natriumazid (0,09%) används som konserveringsmedel. Natriumazid kan reagera med bly eller kopparledningar och bilda explosiva metallazidsalter. Spola med rikliga volymer kranvatten vid kassering av reagenser för att förhindra potentiella rester i ledningarna. Natriumazid är ett gift och kan vara toxiskt vid förtäring.
- Denna sats är endast till för diagnostisk användning *in vitro*.
- Pipettera aldrig med munnen och undvik kontakt mellan reagenser och prover och hud eller slemhinnor. Skölj med bakteriedödande tvål och rikliga mängder vatten om kontakt inträffar.
- Rök, ät eller drick inte inom områden där prover eller reagenssatser hanteras.
- Undvik alltid stänk eller bildning av aerosoler.
- Andra inkuberingstider och -temperaturer än de som anges kan ge felaktiga resultat.
- Korskontaminering av reagenser eller prover kan ge falska resultat. Proverna måste hållas kvar i mikrobrunnarna under testning.
- Återanvändbara glasartiklar måste tvättas och sköljas rena från rengöringsmedel före användning. Alla glasartiklar måste vara rena och torra före användning.
- Låt alla reagenser, mikrobrunnar och prover nå rumstemperatur (18–24°C) före användning.
- Använd engångshandskar vid hantering av prover och reagenser och tvätta händerna grundligt efteråt.
- Mikrobiell korskontaminering av reagenser eller prover kan ge falska resultat.
- Stoppreagensen är frätande och kan orsaka brännskador. Denna reagens innehåller hydrokloriska och svavelhaltiga syror (mindre än 3 % vardera per volym) och skall hanteras med varsamhet. Förvaras utom räckhåll för barn. Om du råkar röra ögonen vid hantering skall du omedelbart spola med vatten och kontakta läkare. Tillsätt aldrig vatten i denna reagens.

## PROVTAGNING

**Provtagning:** Serumprov rekommenderas. Cirka 5 ml helblod ska tappas aseptiskt genom venpunktion med steriltt vakuumprovör eller annat lämpligt provtagningssystem. Låt blodet koagulera i rumstemperatur (18–24°C). Serumet

bör separeras från koaguleringen genom centrifugering så snart som möjligt för att minimera hemolys.

**Interfererande substanser:** Sera som uppvisar en hög grad av hemolys, ikterus eller mikrobiell tillväxt ska inte användas eftersom dessa tillstånd kan leda till avvikande resultat. Prover som innehåller synbara partiklar ska klargöras genom centrifugering före testning.

**Lagring:** Sera kan lagras vid 2–10°C i upp till en vecka. Om testningen försenas ytterligare ska sera lagras frysta vid –20°C eller lägre. Serum ska inte lagras i en självavfrostande kyl eller frys.

**FÖRSIKTIGT:** Upprepad infrysning/tining av patientprover kan ge falskt positiva eller falskt negativa resultat.

## ALLMÄNNA ANMÄRKNINGAR OM PROCEDUREN

1. Det är extremt viktigt att alla satsartiklarna och serumproverna har rumstemperatur (18–24°C) före användning. En hel liter tvättbuffert kan behöva flera timmar för att uppnå 20 °C efter den tagits ur kylan. Inkubationstemperaturer över eller under det angivna intervallet kan leda till felaktiga resultat. Ställ tillbaka ej använda prover och reagenser i kylskåpet efter användning.
2. Blanda reagenserna väl före användning genom att försiktigt vända dem upp och ned. Blanda inte med vortexblandare och skaka inte reagenserna. Undvik skumbildning.
3. Vid preparering av provspädningar ska pipettspetsarna torkas av före dispensering av serum till provspädningsmedlet. För mycket prov som fäster på utsidan av pipettspetsen påverkar resultaten.
4. Användning av multikanalspipett rekommenderas eftersom det ger mer enhetliga reagensdispenserings, inkubationstider och reaktionstider.
5. **Korrekt tvättning av brunnarna är extremt viktigt.** Felaktigt tvättade brunnar ger höga bakgrundsvärden och kan ge falskt positiva värden. Vid manuell tvättning aspireras innehållet från brunnarna. Fyll därefter varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik korskontaminering av brunnarna, speciellt i den första tvätten efter aspirationen. Töm ut all tvättbuffert från brunnarna genom att vända dem upp och ned. Skaka därefter bort resterna av tvättbufferten från brunnarna med en snabb snärtande rörelse med handleden. Upprepa fyllningen och tömningen i totalt 3 till 5 tvättar. Brunnarna bör därefter svepas in i rikligt med pappersdukar eller annat absorberande material som tar bort alla rester av tvättbuffert. Användning av ett automatiskt mikrobrunnstvättsystem säkerställer konsekvent tvätt av brunnarna och rekommenderas.  
**OBS!** På grund av olika typer av tvätteknik och automatiska system kan antalet tvättar behöva justeras för att erhålla optimala resultat. Varje laboratorium ska fastställa det mest effektiva antalet tvättar för deras tvättsystem.
6. Otillräcklig borttagning av rester av tvättbuffert kan leda till inkonsekvent färgutveckling. Mikrobrunnstrips ska torkas av med absorberande papper eller pappersdukar för att minimera resterna av tvättbuffert.
7. Timing i alla stegen är mycket viktig. Alla serumprover ska spädas innan proceduren påbörjas. Proverna måste dispensereras till mikrobrunnarna under så kort tid som möjligt (inte mer än fem minuter). Batchstorleken ska anpassas så att provhanteringen med marginal kan genomföras inom denna tidsperiod. Användning av multikanalspipett underlättar hanteringen av prover och reagenser och rekommenderas.
8. Med undantag för den sista inkubationen (substratlösning) börjar starten av varje inkubationsperiod med att prov- eller reagensdispenseringen avslutas. Inkubationen av substratlösningen måste vara exakt 15 minuter för varje brunn. Alla prover och reagenser ska dispensereras i samma följd och med en konstant hastighet.

## TOLKNING AV RESULTAT

### BERÄKNINGAR

1. Subtrahera absorbansvärdet för reagensblankbrunnen från absorbansvärdena som erhållits i brunnarna för kalibrator, kontroll och patientprov. Beräkna medelabsorbansvärdena för duplikatbrunnar.
2. Plotta ut medelabsorbansvärdet för varje kalibrator på RELISA® PR3 arbetsblad. Rita en idealkurva mellan kalibratorpunkterna.
3. Ta fram enhetsvärdet för varje patientprov genom interpolering från kalibratorkurvan.

### VALFRI ENPUNKTSMETOD FÖR KALIBRERING

1. Subtrahera absorbansvärdet för reagensblankbrunnen från absorbansvärdena som erhållits i brunnarna för kalibrator, kontroll och patientprov. Beräkna medelabsorbansvärdena för duplikatbrunnar.
2. Dividera den specifika antikropps-koncentrationen för Kalibratorserum nr 3 (anges på etiketten) med medelabsorbansvärdet för kalibratorbrunnarna för att få konverteringsfaktorn.
3. Multiplicera absorbansvärdena för vart och ett av proverna med konverteringsfaktorn för att få den specifika antikropps-koncentrationen i enheterna.

4. Den förenklade formen för dessa beräkningar kan uttryckas som:

$$\frac{\text{Värden för Kalibrator nr 3 (enheter)} \times \text{absorbansen av provet}^*}{\text{Absorbans för Kalibrator nr 3}} = \text{Enhetsvärde för provet}$$

\*Om kalibratorerna och proverna körs i duplikat använder du den genomsnittliga absorbansen för duplikatbrunnarna.

#### **KVALITETSKONTROLL**

1. Medelabsorbansvärdet för Kalibrator nr 3 måste vara minst 0,400. Absorbansvärden mindre än 0,400 anger otillräcklig färgutveckling och en ogiltig körning. Otillräcklig färgutveckling beror vanligen på användning av kalla reagenser eller felaktig timing av ett eller flera steg i analysen. Låt reagenserna värmas upp till rumstemperatur (18–24°C), upprepa körningen och var extra noga med tiderna i varje steg.
2. Blankkontrollbrunnen ska ha ett absorbansvärde på mindre än 0,150. Blankabsorbansvärden som är större än 0,150 anger otillräcklig tvätt eller kontamination av reagenserna och en ogiltig körning.
3. Prover med specifika antikroppsvärden som är större än den övre gränsen för Kalibrator nr 5 ska rapporteras som större än enhetens värde för Kalibrator nr 5.
4. Kalibratorlinjen måste plottas för varje körning (alternativt kan konverteringsfaktorn beräknas om du använder den valfria enpunktskalibreringen). Om du använder en kalibratorlinje eller konverteringsfaktor från en annan körning blir resultaten ogiltiga.
5. Varje laboratorium ska fastställa och upprätthålla sitt eget intervall (normal) för referensvärden med utgångspunkt i patientpopulationen och andra lokala faktorer.
6. Det positiva kontrollserumet är ett humanserum som innehåller antikroppar mot PR3. Detta är en kvalitetskontroll som bör ge ett värde som är större än 35 enheter.
7. Det negativa kontrollserumet är en pool av humanserum som inte innehåller antikroppar mot PR3. Denna kontroll bör ge värden på mindre än 35 enheter.
8. Det ospädda analyserade positiva kontrollserumet är ett humanserum som innehåller antikroppar mot PR3. Analysvärdet för denna kontroll anges på etiketten i PR3-enheter. Detta intervall fastställdes för att omfatta 99 % av referensvärdena på grund av statistiskt normal variation. Enstaka små avvikelser utanför dessa intervall är normalt. Varje laboratorium bör fastsätta sina egna kriterier för godkännande/icke godkännande baserat på erfarenhet av denna analys.

#### **TOLKNING AV PATIENTRESULTAT**

Nivåerna av antikroppar mot PR3 har visat sig stiga och sjunka med sjukdomens förlopp, men den kliniska signifikansen för en enstaka antikroppsnivå studeras fortfarande (9). Enhetsvärdena som erhålls i denna analys är utformade enbart för att dela in patienter i följande breda grupper. Patientprovbrunnar som har beräknade värden som är högre än eller lika med 35 enheter betraktas som positiva. Patientprovbrunnar som har beräknade värden på mindre än 35 enheter betraktas som negativa. Varje laboratorium måste fastställa sitt eget referensintervall och brytpunktsvärden baserat på patientpopulationen som testas. Enhetsvärdena påverkas av patientfaktorer, mekaniska beaktanden (t.ex. pipetteringsprecision och exakthet samt analysvillkor (t.ex. temperatur och tidsmätning för stegen). Seriebestämningar av antikroppsnivåer för en patient kan ange höjning eller sänkning av antikroppsnivåer.

#### **RAPPORTERING AV RESULTAT**

Resultaten bör rapporteras som positiva eller negativa för antikroppar mot PR3, med enhetsvärdet. Antikroppsnivåerna som påträffas i ett enstaka prov har begränsad klinisk signifikans. Seriebestämningar av antikroppsnivåer för en patient kan ange höjning eller sänkning av antikroppsnivåer, vilket har visat sig följa sjukdomsförloppet.

## **BEGRÄNSNINGAR FÖR TESTET**

1. Diagnos kan inte ställas enbart med utgångspunkt i detektering av antikroppar mot PR3-ANCA. Läkaren måste tolka dessa resultat i kombination med patientens anamnes och symptom, fysiska fynd och andra diagnostiska procedurer.
2. Behandling ska inte påbörjas enbart med utgångspunkt i ett positivt test för antikroppar mot PR3. Kliniska indikationer, andra laboriefynd och läkarens kliniska intryck måste beaktas innan någon behandling sätts in.
3. Resultaten av detta test bör användas i kombination med information från den kliniska utvärderingen och andra diagnostiska procedurer för att fastställa patientens kliniska status.

## **REFERENSVÄRDEN**

I en normalpopulation är referensvärdet mindre än 35 enheter (negativt). PR3-ANCA påträffas hos upp till 85 % av patienterna med Wegeners granulomat, 45 % av patienterna med mikroskopisk polyangit och en mindre procentandel av patienterna med idiopatisk nekrotiserande och tilltagande glomerulonefrit (9).

## REFERENSINTERVALL

Referensintervallet fastställdes genom testning av sera från 500 friska blodgivare, 239 kvinnor och 261 män, av vilka ingen hade någon känd historik av reumatiska sjukdomar. Med utgångspunkt i en ROC-kurva som genererats från dessa data fastställdes normala brytpunktsvärden som mindre än 35 PR3-enheter.

På grund av den inbyggda variabiliteten för ELISA-analyser, bör enhetsvärden inom fem enheter över eller under det positiva/negativa brytpunktsvärdet (dvs. mellan 30 och 40 enheter) tolkas med försiktighet. De kliniska fynden, tecknen, symptomen, läkarens intryck och andra laboratorieresultat ska bedömas vid tolkningen av resultaten från denna analys.

## PRESTANDEEGENSKAPER

Immuno Concepts RELISA® PR3-testsystem jämfördes med ett annat kommersiellt tillgängligt ELISA PR3-testsystem. Den population som studerades bestod av 173 prover som skickades till kliniska laboratorier för testning av ANCA, MPO och PR3, men utan specifika diagnoser. 10 prover var från patienter med diagnosen mikroskopisk polyangit, 15 prover var från patienter med diagnosen nekrotiserande tilltagande glomerulonefrit, 12 prover var från patienter med diagnosen polyarteritis nodosa, 7 prover var från patienter med diagnosen Churg-Strauss syndrom, 12 patienter med diagnosen vaskulit, 25 patienter med diagnosen Wegeners granulomatos, 261 prover från manliga blodgivare och 239 från kvinnliga blodgivare. Alla proverna testades parallellt på den predikativa utrustningen och den testade utrustningen. Baserat på dessa jämförelser erhöles följande data med hjälp av en fempunkts kalibreringskurva:

Immuno Concepts RELISA® PR3 Antikroppstest	Predikativt anti-PR3-test	
	Positiva	Negativa
Positiva	179	8
Negativa	4	563

Dessa data ger följande statistik: relativ sensitivitet: 97,8 %; relativ specificitet: 98,6 % och övergripande överensstämmelse: 98,4 %.

Bland de 8 "falskt positiva" proverna, hade 2 ett P-ANCA-mönster med immunofluorescens, 4 hade ett C-ANCA-mönster med immunofluorescens och 2 uppvisade inte något immunofluorescensmönster. Två av proverna som hade ett C-ANCA-mönster med immunofluorescens och ett positivt RELISA® PR3 var från patientern med diagnosen Wegeners granulomatos och ett av proverna som hade ett P-ANCA-mönster med immunofluorescens och ett positivt RELISA® PR3 var från en patient med diagnosen Churg-Strauss syndrom. Dessa prover kan eventuellt visas som "falskt negativa" resultat på den prediktiva utrustningen.

Följande data erhöles med hjälp av den valfria enpunktsmetoden för kalibrering:

Immuno Concepts RELISA® PR3 Antikroppstest	Predikativt anti-PR3-test	
	Positiva	Negativa
Positiva	176	4
Negativa	7	567

Dessa data ger följande statistik: relativ sensitivitet: 96,2 %; relativ specificitet: 99,3 % och övergripande överensstämmelse: 98,5 %.

## REPRODUCERBARHET

Precisionen för analysen mättes med sju prover som hade PR3-ANCA-värden inom intervallet för kalibreringskurvan. Dessa prover kördes med duplikat på tre olika lotnummer med antigenbelagda mikrobrunnsstrips vid tre olika tillfällen av tre olika tekniker. Precisionen inom-analys och mellan-analys visas i följande tabeller:

### PRECISION MELLAN-ANALYS

n=21	Koncentration (enheter)	SD	%CV
Prov 1	125	7	5
Prov 2	97	8	8
Prov 3	74	3	4
Prov 4	65	4	6
Prov 5	59	4	7
Prov 6	117	6	5
Prov 7	240	11	5

## PRECISION INOM-ANALYS

n=3	Koncentration (enheter)	SD	%CV
Prov 1	125	9	7
Prov 2	97	7	8
Prov 3	74	6	9
Prov 4	65	10	15
Prov 5	59	8	14
Prov 6	117	16	14
Prov 7	240	12	5

## LINEARITET

Inom intervallet för kalibreringskurvan är analysen linjär, vilket påvisats med de metoder som visas i riktlinjerna från NCCLS, *Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods* (10).

## VALIDERING AV ENPUNKTSKALIBRERING

Användning av en enpunktskalibrator validerades med samma panel på 754 sera som användes för jämförelsen med den predikativa utrustningen. Regressionsanalys av denna jämförelse hade en regressionskoefficient ( $r^2$ ) på 99,2 % och variansanalysen (ANOVA) av data visade att det inte fanns någon statistiskt signifikant skillnad mellan de två metoderna. Från en praktisk synpunkt fann vi i denna jämförelse bara tre prover (0,4 %) som hade diagnostiska diskrepanser mellan fempunktskalibreringssystemet och det valfria enpunktskalibreringssystemet. Alla dessa prover hade PR3-enhetsvärden nära brytpunkten på 35 enheter, mellan 31 och 40 enheter (10). Denna typ av prov är ett diagnostiskt problem i alla analysystem och behöver beaktas noga av laboratoriepersonalen som analyserar proverna och tolkar data.

## STUDIER AV KORSREAKTIVITET

Totalt 40 sera som innehåller andra autoantikroppar än anti-PR3-ANCA testades med hjälp av Immuno Concepts RELISA<sup>®</sup> PR3 testsystem. Dessa prover finns med i de vanliga antinukleära antikroppsmönstren, t.ex. homogena, fläckiga och nukleolara, samt antikroppar om cytoplasmakomponenter, t.ex. mitokondrier, Golgiapparaten och cytoskelettet. Tjugo av proverna innehåller reumatoid faktor. Inga av dessa prover gav ett positivt resultat i Immuno Concepts RELISA<sup>®</sup> PR3-testsystem.

# BIBLIOGRAFI

1. Faber, V., Elling, P., Norup, G., et al. An Antinuclear Factor Specific for Leucocytes. *Lancet* 2:344-345, 1964.
2. Davies, D.J., Moran, J.E., Niall, J.F., et al. Segmental Necrotizing Glomerulonephritis with Antineutrophil Antibody: Possible Arbovirus Aetiology? *Br. Med. J.* 285:606, 1982.
3. van der Woude, F.J., Rasmussen, N., Lobatto, S., et al. Autoantibodies Against Neutrophils and Monocytes: Tool for Diagnosis and Marker of Disease Activity in Wegener's Granulomatosis. *Lancet* 1:425-429, 1985.
4. Falk, R.J., Jennette, J.C. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies with Specificity for Myeloperoxidase in Patients with Systemic Vasculitis and Idiopathic Necrotizing and Crescentic Glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med.* 318:1651-1657, 1988.
5. Jennette, J.C., Wilkman, A.S., Falk, R.J. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody-associated Glomerulonephritis and Vasculitis. *Am. J. Pathol.* 135:921-930, 1989.
6. Savige, J., Gillis, D., Benson, E., et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am. J. Clin. Pathol.* 111:507-513, 1999.
7. Kallenberg, C.G.M. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies with Specificity for Myeloperoxidase. In: Peter, J.B. and Shoenfeld, Y., eds. *Autoantibodies*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V. 1996: 53-60.
8. Nölle, B., Specks, U., Lüdemann, J., Rohrbach, M.S., DeRemee, R.A., and Gross, W.L. Anticytoplasmic Autoantibodies: Their Immunodiagnostic Value in Wegener Granulomatosis. *Ann. Int. Med.* 111:28-40, 1989.
9. Falk, R.J., Jennette, J.C. ANCA Small-Vessel Vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8:314-322, 1997.
10. Data on file, Immuno Concepts, N.A., Ltd.

Kontakta Immuno Concepts innan du använder produkten om skyddsföpackningen är skadad.



Fabrikant



Auktoriserad Representant  
europeiska unionen



Temperatur  
begränsning



Innehåller tillräckligt för <n> test



Se instruktionerna



In vitro diagnostiska medicinapparat



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827  
 Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649  
 Email: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

4.11.02.003.082-Sv

Rev 6.0 © Copyright 2011

## IVD-direktiv (2001/59/EG) riskfraser



**REF 7035: Substratlösning**

<b>R23/ 24/ 25</b>	Giftigt vid inandning, hudkontakt och förtäring.
<b>R39/ 23/ 24/ 25</b>	Giftigt: risk för mycket allvarliga bestående hälsoskador vid inandning, hudkontakt och förtäring.
<b>S1/2</b>	Förvaras i låst utrymme och oåtkomligt för barn.
<b>S7</b>	Förpackningen förvaras väl tillsluten.
<b>S36/ 37</b>	Använd lämpliga skyddskläder och skyddshandskar.
<b>S45</b>	Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare. Visa om möjligt etiketten.

# TESTPROCEDUR FÖR RELISA® ANCA-PR3

Alla prover reagenser (inklusive tvättbuffertlösningen) och mikrobrunnar måste ha rumstemperatur före användning.

- FÖRBERED ARBETSBLADET**

Märk arbetsbladet som medföljer paketet för att ange placeringen av proverna i mikrobrunnarna. Analysera kalibratorsera i duplikat. Om multipunktskurvan ska användas måste alla fem kalibratorsera köras. Om den valfria enpunktskalibreringsmetoden ska användas kör du endast Kalibrator nr 3 i duplikat. En brunn används för reagensblankning. Vi rekommenderar att varje kontroll och patientprov analyseras i duplikat till en accepterbar precision för analysen har fastställts på laboratoriet.
- FÖRBERED TVÄTTBUFFERTLÖSNING (PBS-Tween)**

Lös upp innehållet i en påse PBS-buffert i en liter avjoniserat eller destillerat vatten. Tillsätt hela innehållet i en flaska tvättbuffertkoncentrat till enlitersbehållaren med upplöst PBS. Blanda väl. Tvättbuffertlösningen kan täckas över och lagras vid 2–10°C i upp till fyra veckor.
- SPÄD PATIENTPROVERNA**

Späd patientproverna 1:40 genom att tillsätta 25 µl serum till 975 µl provspädning. Om den valfria utspädda analyserade positiva PR3-kontrollen används späder du den på samma sätt som patientproverna. Blanda väl. Kalibrator, positiv kontroll och negativ kontroll tillhandahålls i brukspädning och behöver inte någon ytterligare spädning.
- FÖRBERED MIKROBRUNNARNA**

Ta bort det begärda antalet mikrotiter strips från påsen och placera dem i ramhållaren. Mikrotiter stripen måste fästas stadigt i ramhållaren. Tryck bestämt ner i båda ändarna av stripen så de säkert fäster i ramhållaren. Vid bruk av individuella brunnar eller mindre än en hel strip med brunnar bör du vara säker på att varje brunn sitter riktigt på plats. Brunnar som är ordentligt på plats i ramhållaren trillar inte ut när ramhållaren är omvänd. Om mindre än 8 brunnar behövs för testet kan brunnen delas genom att knäppa dem itu. Oanvända brunnar kan förvaras i foliepåsen förseglad och kylt i upp till 45 dagar.
- DISPENSERA SERUMSPÄDNINGAR**

Dispensera 100 µl av kalibratorer, kontroller och spädda patientprover i lämpliga brunnar enligt skissen på arbetsbladet. Dispensera 100 µl provspädning i reagensblankbrunnen.
- INKUBERA STRIPSEN (30 minuter i rumstemperatur, dvs. 18–24°C)**

Inkubera i rumstemperatur i 30 minuter. Stripsen ska skyddas från drag och temperaturförändringar under inkuberingen. Om så önskas kan stripsen täckas över med genomskinlig tejp eller en pappersduk för att skydda dem från damm eller andra främmande föremål.
- TVÄTTA STRIPSEN (Se Allmänna procedurer anmärkning 5 och 6)**

Tvätta brunnarna 3 till 5 gånger med PBS-Tween tvättbuffertlösning. Vid manuell tvättning aspireras innehållet från brunnarna. Fyll därefter varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik korskontaminering av brunnarna, speciellt i den första tvätten efter aspirationen. Töm ut all tvättbuffert från brunnarna genom att vända dem upp och ned. Skaka därefter bort resterna av tvättbufferten från brunnarna med en snabb snärtande rörelse med handleden. Upprepa fyllningen och tömningen i totalt 3 till 5 tvättar. Brunnarna bör därefter svepas in i rikligt med pappersdukar eller annat absorberande material som tar bort alla rester av tvättbuffert.
- DISPENSERA ENZYMAKROPPSREAGENS**

Dispensera 100 µl enzymantikroppreagens i var och en av brunnarna.
- INKUBERA STRIPSEN (30 minuter i rumstemperatur, dvs. 18–24°C)**

Inkubera i rumstemperatur i 30 minuter. Stripsen ska skyddas från drag och temperaturförändringar under inkuberingen. Om så önskas kan stripsen täckas över med genomskinlig tejp eller en pappersduk för att skydda dem från damm eller andra främmande föremål.
- TVÄTTA STRIPSEN**

Tvätta brunnarna 3 till 5 gånger med PBS-Tween tvättbuffertlösning. Vid manuell tvättning aspireras innehållet från brunnarna. Fyll därefter varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik korskontaminering av brunnarna, speciellt i den första tvätten efter aspirationen. Töm ut all tvättbuffert från brunnarna genom att vända dem upp och ned. Skaka därefter bort resterna av tvättbufferten från brunnarna med en snabb snärtande rörelse med handleden. Upprepa fyllningen och tömningen i totalt 3 till 5 tvättar. Brunnarna bör därefter svepas in i rikligt med pappersdukar eller annat absorberande material som tar bort alla rester av tvättbuffert.
- DISPENSERA SUBSTRATLÖSNING**

Använd en timer för att säkerställa konsekventa intervall och dispensera 100 µl substratlösning i var och en av brunnarna. Substratlösningen måste tillsättas brunnarna med jämn hastighet så att varje brunn inkuberas exakt lika länge (15 minuter). Substratlösningen i brunnarna som inkuberats med positiva prover kommer att bli blå och lösningen i brunnarna som inkuberats med negativa prover blir ofärgade eller mycket svagt blå.
- INKUBERA STRIPSEN (Exakt 15 minuter i rumstemperatur, dvs. 18–24°C)**

Inkubera i rumstemperatur i exakt 15 minuter. Stripsen ska skyddas från drag och temperaturförändringar under inkuberingen.
- DISPENSERA STOPPREAGENS**

Efter att den första brunnen har inkuberats i exakt 15 minuter tillsätts 100 µl stoppreagens i varje brunn, i samma ordning och med samma hastighet som substratlösningen tillsattes till brunnarna. Vid tillsatsen av stoppreagenset blir blå substratlösning gul och färglös lösning förblir ofärgad.
- LÄS AV ABSORBANSEN FÖR BRUNNARNA**

Inom 30 minuter efter tillsats av stoppreagens måste brunnarna läsas av i en spektrofotometer för plattavläsning. Brunnarna läses av vid 450 nm mot den blanka kontrollbrunnen. Om en spektrometer med dubbel våglängd finns tillgänglig ska våglängden för referensfiltret ställas in på 600-650 nm. Avlägsning av mikrobrunnarna vid 450 nm utan referensfilter resulterar i högre absorptionsvärden.

FÖR TEKNISK HJÄLP: +1-916- 363-2649  
eller E-post: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

