



SISTEMA DI TEST RELISA® PR3-ANCA PER GLI ANTICORPI ALLA PROTEINASI 3

Per uso diagnostico in vitro

Per uso professionale

Numero di catalogo: 7096-16

IMPIEGO PREVISTO: si tratta di un sistema di test immunoenzimatico per la rilevazione degli anticorpi alla proteinasi 3 (PR3) nel siero umano. Questo sistema di test deve essere usato come aiuto per la rilevazione degli anticorpi associati alla granulatosi con poliangite e altre vasculiti.

RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE

ANCA (Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies – Autoanticorpi citoplasmatici antineutrofili) sono un gruppo di anticorpi che reagisce con gli antigeni citoplasmatici nei neutrofili umani. Sebbene questi anticorpi siano stati riportati originariamente nel 1964 (1), il primo articolo che collega questi anticorpi alla patologia è del 1982, quando Davies et al. hanno rilevato anticorpi in otto pazienti affetti da glomerulonefrite necrotizzante segmentale (2). Nel 1984, sono stati riportati altri quattro pazienti con vasculite e glomerulonefrite. Nel 1985, van der Woude et al. hanno dimostrato che ANCA ha un'elevata associazione con la granulatosi con poliangite e mostra un livello di anticorpi correlato con l'attività della patologia (3). Nel 1988, Falk e Jennette hanno riportato che ANCA presenta più di una specificità agli antigeni (4). Un articolo successivo ha mostrato che la specificità di ANCA è correlata con le caratteristiche patologiche della vasculiti (5).

Lo screening per ANCA viene in genere eseguito usando un dosaggio immunofluorescente indiretto. In questo test, è possibile vedere vari modelli di colorazione cellulare. Due modelli principali di colorazione sono stati descritti e ben caratterizzati quando vengono utilizzati neutrofili di etanolo fissati con il test ANCA immunofluorescente. Gli autoanticorpi che mostrano un modello citoplasmatico granulare fine, denominati C-ANCA, vengono in genere diretti contro una proteasi serica, Proteinase 3 (PR-3). Questi autoanticorpi hanno mostrato un'elevata associazione con la granulatosi con poliangite. L'altro modello di colorazione principale, il perinucleare o modello P-ANCA, in genere dovuto agli anticorpi diretti contro la mieloperossidasi (MPO), è stato associato alle vasculiti sistemiche e alla glomerulonefrite necrotizzante idiopatica e falciforme (4). Tutti i campioni che mostrano un test immunofluorescente indiretto positivo devono essere come MPO-ANCA o PR3-ANCA usando come immunodosaggio enzimatico (EIA). Alcuni autori ritengono che tutti i campioni dai pazienti clinicamente sospetti devono essere testati con EIA, dal momento che il 5% dei campioni sono positivi solo con EIA (6). Sebbene i PR3-ANCA vengano riscontrati più di comune nei pazienti affetti da granulatosi con poliangite (fino all'85% dei pazienti), questi non sono specifici di questa patologia, dal momento che possono essere visti anche in percentuali inferiori di pazienti affetti da glomerulonefrite idiopatica necrotizzante e falciforme. Allo stesso modo, gli MPO-ANCA sono associati alla glomerulonefrite necrotizzante falciforme nel 65% dei pazienti, ma possono essere visti in una percentuale inferiore di pazienti affetti da granulatosi con poliangite. Sia MPO-ANCA che PR3-ANCA possono essere visti nella poliangite microscopica, ognuna in approssimativamente il 45% dei pazienti (7, 8, 9).

PRINCIPIO DEL TEST

Questo test è un EIA indiretto. Gli antigeni PR3 umani stabilizzati sono stati rivestiti sulla superficie dei micropozzetti in modo da servire come substrato antigenico in questo sistema. I campioni paziente diluiti vengono inseriti nei micropozzetti e incubati, consentendo agli anticorpi specifici nel campione di reagire con l'antigene in fase solida. Dopo il lavaggio per la rimozione degli anticorpi non legati e delle altre proteine del siero, i pozzetti vengono incubati con anticorpi anti-umani di capra che vengono etichettati con perossidasi di rafano. La preparazione degli anticorpi coniugati da digossina-perossidasi di rafano che viene inclusa nel sistema di test è specifica per le catene di gamma IgG umane.

Dopo l'incubazione di un coniugato perossidasi di rafano, si forma un complesso stabile in tre parti stabile se i risultati sono positivi. Questo complesso è formato da anticorpo anti-umano coniugato perossidasi di rafano legato agli anticorpi umani a PR3, che è legato all'antigene stabilizzato sulla superficie di plastica.

Dopo un altro passo di lavaggio, questo complesso viene rilevato aggiungendo una soluzione di tetrametilbenzidine (TMB) e H₂O₂ come substrato cromogenico. Il grado di sviluppo del colore in ogni pozzetto è proporzionale alla concentrazione di anticorpi a PR3 in ciascun campione di siero. Ogni micropozzetto viene letto in uno spettrofotometro a 450 nm.

COMPONENTI DEL SISTEMA – MATERIALI FORNITI

Conservazione: tutti i componenti devono essere conservati in frigorifero tra 2-10°C. Non congelare.

Stabilità: tutti i componenti restano stabili per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Non utilizzare nessun componente oltre la data di scadenza.

REAGENTI REATTIVI

Strisce per micropozzetto rivestite RELISA® PR3 PLATE: n. di catalogo 7008-16. Un armadietto per micropozzetti che contengono centoventotto strisce rivestite con PR3 umana. Queste strisce sono codificate con colore verde. Se per il test sono necessari meno di otto pozzetti, i pozzetti possono essere separati staccandoli. Le strisce non usate possono essere rimesse nella busta di alluminio con feltrini essiccanti, sigillati con una chiusura lampo e in frigorifero fino a 45 giorni.

Diluyente per campioni RELISA® SOLN|DIL: n. di catalogo 7100 (100 ml). Il diluyente per campioni con tampone proprietario usato per diluire i campioni paziente.

Reagente per anticorpi enzimatico RELISA® - specifico per la catena gamma IgG umana CONJ|HRP: n. di catalogo 7009-16 (14 ml). IgG anti-umano (specifico della catena gamma) coniugato alla perossidasi di rafano (HRP). Reagente pronto per l'uso.

Soluzione substrato RELISA® SOLN|SUB   : n. di catalogo 7035 (14 ml). Soluzione di substrato enzimatico specifico per HRP, contenente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidine (TMB) stabilizzata e perossido di idrogeno (H₂O₂). Reagente pronto per l'uso. **PERICOLO:** Infiammabile. Questo reagente contiene meno del 25% di metanolo e acetone. Tenere fuori dalla portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

Reagente di arresto RELISA® SOLN|STOP   : numero di catalogo 7033 (14 ml). Esclusivo reagente bloccante per sistemi di analisi EIA della Immuno Concepts. Il reagente è pronto per l'uso. **PERICOLO:** corrosivo. Questo reagente contiene acidi cloridrico e solforico (meno del 3% ciascuno in volume), e deve essere maneggiato con cura. Tenere fuori della portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente con acqua abbondante e consultare un medico. Non aggiungere mai acqua a questo reagente.

Sieri calibratore RELISA® PR3 CAL: n. di catalogo 7261-16, 7262-16, 7263-16, 7264-16, 7265-16 (2 ml ciascuno). Sieri umani che contengono anticorpi al PR3. Il valore di dosaggio per ciascun siero è indicato sull'etichetta della fiala. Questi sieri sono alla diluizione operativa e pronti per l'uso.

Controllo positivo RELISA® PR3 CONTROL|+: n. di catalogo 7021-16 (2 ml). Siero umano positivo che contiene anticorpi al PR3. Questo siero è alla diluizione operativa e pronto per l'uso.

Controllo negativo RELISA® [CONTROL] -: n. di catalogo 7031 (2 ml). Siero umano negativo che non contiene anticorpi al PR3. Questo siero è alla diluizione operativa e pronto per l'uso.

Controllo positivo dosato non diluito opzionale RELISA® PR3 [OPT+]: n. di catalogo 7022-16 (0,25 ml). Siero umano positivo che contiene anticorpi al PR3. Trattare questo controllo positivo come siero non diluito. Il valore di dosaggio per questo siero è indicato sull'etichetta della fiala.

COMPONENTI NON REATTIVI

Supporto per micropozzetti

Soluzione tampone di lavaggio:

Tampone PBS [PWDR|PBS]: n. di catalogo 1011. Polvere fisiologica con tampone fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Ogni sacchetto contiene polvere tampone sufficiente per fare un litro. Due sacchetti di polvere fisiologica vengono forniti per ciascuna piastra con 96 micropozzetti nei kit di test completi.

Concentrato tampone di lavaggio [SOLN|WASH]: n. di catalogo 1031 (10 ml). 5% di soluzione Tween 20 da usare nel tampone di lavaggio. Due flaconi di concentrato di tampone vengono forniti per ciascuna piastra con 96 micropozzetti nei kit di test completi.

Preparazione: sciogliere un sacchetto di polvere tampone in un litro di acqua deionizzata o distillata. Aggiungere l'intero contenuto di un flacone di concentrato di tampone di lavaggio nel PBS sciolto. . Mescolare bene e tenere alla di 2-25°C fino a 4 settimane o fino a che non si presentino segni di contaminazione o altri cambiamenti visibili. La soluzione del tampone di lavaggio deve essere a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso.

ALTRI MATERIALI NECESSARI - MA NON FORNITI

I pipettatori di precisione volumetrici per l'erogazione fino a 25-1000 µl

Premere il flacone per erogare soluzione del tampone di lavaggio nei micropozzetti oppure un sistema di lavaggio automatico o semiautomatico per i micropozzetti

Contenitore da un litro per soluzione di tampone di lavaggio PBS

Acqua deionizzata o distillata

Spettrometro per la lettura della piastra in grado di leggere l'assorbanza a 450 nm

Provette di test per preparare le diluizioni di siero

Carta assorbente o tovaglioli di carta

Pipettatore multicanale in grado di erogare fino a 8 pozzetti

Guanti monouso

Timer di laboratorio

PRECAUZIONI

1. Tutti i materiali di origine umana utilizzati per questo prodotto sono stati testati e ritenuti negativi (non ripetutamente reattivi) agli anticorpi del virus dell'immunodeficienza umana-1 (HIV-1), al virus dell'immunodeficienza umana-2 (HIV-2), al virus dell'epatite C (HCV) e all'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) tramite metodi approvati dalla FDA. Tuttavia, nessun metodo di analisi è in grado di garantire l'assenza assoluta dei virus HIV-1, HIV-2, epatite C, epatite B o di qualunque altro agente infettivo. Perciò, tutti i materiali del kit devono essere trattati allo stesso modo come potenzialmente infettivi.
2. Tutti i campioni dei pazienti devono essere gestiti a livello di biosicurezza 2 come raccomandato per tutti i campioni di siero o sangue umano nei Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La diluizione dei componenti o la sostituzione dei componenti diverse da quelle indicate in questo sistema può portare a risultati non congruenti.
4. La sodio azide (0.09%) è usata come conservante. La sodio azide può reagire con tubature in piombo o rame e formare sali azide metallici esplosivi. Quando si smaltiscono i reagenti, lavare con ampi volumi di acqua di rubinetto per evitare potenziali residui nelle tubature. La sodio azide è un veleno e può essere tossica se ingerito.
5. Questo kit è solo per uso diagnostico *in vitro*.
6. Non pipettare mai per bocca ed evitare il contatto di reagenti e campioni con la cute e le membrane mucose. Se si verifica il contatto, lavare con sapone germicida e abbondante quantità di acqua.
7. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui si maneggiano campioni o reagenti in kit.
8. Evitare di schizzare o generare aerosol in qualsiasi momento.
9. Tempi di incubazione e temperature diverse da quelle specificate possono portare a risultati erranei.

10. La contaminazione incrociata di reagenti o campioni può portare a risultati falsificati. I campioni devono rimanere confinati nei micropozzetti durante il test.
11. Il vetro riciclabile deve essere lavato e sciacquato accuratamente da residui di detersivi prima dell'uso. Tutto il vetro deve essere pulito e asciugato prima dell'uso.
12. Tutti i reagenti, micropozzetti e campioni devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso (18-25°C).
13. Indossare guanti monouso quando si maneggiano campioni e reagenti e dopo l'uso lavare accuratamente le mani.
14. La contaminazione microbica di reagenti o campioni può portare a risultati falsificati.
15. Il reagente bloccante è corrosivo e può causare ustioni. Questo reagente contiene acidi cloridrico e solforico (meno del 3% ciascuno in volume), e deve essere maneggiato con cura. Tenere fuori della portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente con acqua abbondante e consultare un medico. Non aggiungere mai acqua a questo reagente.

RACCOLTA DI CAMPIONI

Prelievo: il siero è il campione preferenziale. Prelevare circa 5 ml di sangue intero in modo asettico tramite venipuntura usando una provetta di raccolta vuota sterile o altri sistemi di raccolta adeguati. Il sangue deve coagularsi a temperatura ambiente (18-25°C). Il siero deve essere separato dal coagulo tramite centrifugazione appena possibile per ridurre al minimo l'emolisi.

Sostanze interferenti: i sieri che mostrano un grado elevato di emolisi, ittero, lipemia o crescita microbica non devono essere usati in quanto queste condizioni possono causare risultati aberranti. I campioni che contengono particolato visibile devono essere ripuliti tramite centrifugazione prima del test.

Conservazione: i sieri possono essere conservati a 2-10°C fino a una settimana. Se il test viene ulteriormente ritardato, i sieri devono essere conservati congelati a -20°C o a temperature inferiori. Non conservare i sieri in frigoriferi/congelatori dotati di sbrinamento automatico.

ATTENZIONE: il ripetuto congelamento/scongelamento dei campioni pazienti può portare a risultati falsi positivi o falsi negativi.

NOTE PROCEDURALI GENERALI

1. È estremamente importante che tutti i componenti del kit e i campioni di siero siano a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso. Dopo essere stato prelevato dal frigorifero, un litro intero di tampone di lavaggio può impiegare varie ore per riscaldarsi a 20°C. Le temperature di incubazione al di sopra o al di sotto dell'intervallo indicato possono produrre risultati non accurati. Dopo l'uso, rimettere i campioni e i reagenti non usati nel frigorifero.
2. Mescolare bene i reagenti prima dell'uso capovolgendo con delicatezza. Non creare vortici e non agitare i reagenti. Evitare di formare schiuma.
3. Quando si preparano le diluizioni dei campioni, i puntali delle pipette devono essere lavati prima di erogare il siero nel diluente del campione. Eccesso di campione che aderisce alla parte esterna del puntale della pipetta può alterare i risultati.
4. Si raccomanda di usare un pipettatore multicanale in quanto garantisce erogazione di reagente, tempi di incubazione e tempi di reazione più uniformi.
5. **È estremamente importante lavare bene i pozzetti.** I pozzetti lavati male riportano valori di background elevati e possono mostrare valori falsi positivi. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, quindi riempire ogni pozzetto con soluzione di tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti, in particolare durante il primo lavaggio dopo l'aspirazione. Drenare tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti invertendo, quindi agitando il tampone di lavaggio residuo dai pozzetti con un movimento netto "a scatto" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e drenaggio per un totale di 3 – 5 lavaggi. I pozzetti devono essere picchiettati vigorosamente su un tovagliolo di carta o altro materiale assorbente per rimuovere tutte le tracce di tampone di lavaggio residuo. Si raccomanda l'uso di un sistema di lavaggio per micropozzetti automatico che assicuri un lavaggio consistente dei pozzetti.
NOTA: a causa dei vari tipi di tecniche di lavaggio e di sistemi automatici, il numero di lavaggi può essere regolato in modo da ottenere risultati ottimali. Ogni laboratorio deve determinare il numero più efficiente di lavaggi per il proprio sistema di lavaggio.
6. Una rimozione inadeguata dei residui di tampone di lavaggio può causare uno sviluppo del colore non consistente. Le strisce per micropozzetto devono essere asciugate su carta assorbente o tovaglioli per ridurre al minimo i residui di tampone di lavaggio.

7. La temporizzazione di tutte le fasi è critica. Tutti i campioni di siero devono essere diluiti prima di iniziare la procedura e devono essere erogati nei micropozzetti nel più breve intervallo di tempo possibile (non più di cinque minuti). Anche le dimensioni del batch devono essere impostate in modo che la gestione dei campioni possa essere compiuta in modo più confortevole in questo periodo di tempo. Si raccomanda l'uso di un pipettatore multicanale in quanto facilita la gestione dei campioni e dei reagenti.
8. Ad eccezione dell'ultima incubazione (soluzione di substrato), l'avvio di ogni periodo di incubazione inizia con il completamento del campione o l'erogazione del reagente. L'incubazione della soluzione di substrato deve essere esattamente di 15 minuti per ciascun pozzetto. Tutti i campioni e i reagenti devono essere erogati nella stessa sequenza e a una velocità costante.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

CALCOLI

1. Sottrarre il valore di assorbanza del pozzetto del bianco di riferimento dai valori di assorbanza ottenuti in pozzetti di campioni calibratore, di controllo e paziente. Calcolare i valori di assorbanza media per i pozzetti duplicati.
2. Tracciare il grafico del valore di assorbanza medio di ogni standard sul foglio di lavoro del set calibratura RELISA® PR3. Tracciare una linea di miglior adattamento tra i punti calibratore. Se si utilizza un lettore di micropiastre programmabile la curva standard dovrebbe essere calcolata utilizzando il metodo lin-lin per l'interpolazione dei dati.
3. Ottenere il valore unitario di ciascun campione paziente interpolando dalla linea calibratura.

METODO DI CALIBRAZIONE SINGOLO PUNTO OPZIONALE

1. Sottrarre il valore di assorbanza del pozzetto del bianco di riferimento dai valori di assorbanza ottenuti in pozzetti di campioni calibratore, di controllo e paziente. Calcolare i valori di assorbanza media per i pozzetti duplicati.
2. Dividere la concentrazione di anticorpi specifica del siero calibratore numero 3 (indicato sull'etichetta) tramite il valore di assorbanza medio dei pozzetti del calibratore per ottenere il fattore di conversione.
3. Moltiplicare i valori di assorbanza di ciascun campione per il fattore di conversione in modo da ottenere la concentrazione di anticorpi specifica nelle unità.
4. La forma semplificata di questi calcoli può essere espressa nel modo seguente:

$$\frac{\text{Valore calibratore n. 3 (Unità)} \times \text{Assorbanza del campione}^*}{\text{Assorbanza dello calibratore numero 3}} = \text{Valore unitario per il campione}$$

*Se gli calibratori e i campioni vengono analizzati in duplicato, usare l'assorbanza media dei pozzetti duplicati.

CONTROLLO DI QUALITÀ

1. Il valore di assorbanza media dello calibratore numero 3 deve essere di almeno 0,400. I valori di assorbanza inferiori a 0,400 indicano uno sviluppo del colore non adeguato e un'analisi non valida. Lo sviluppo del colore non adeguato è in genere dovuto all'utilizzo di reagenti a freddo o a una temporizzazione non corretta di una o più fasi del dosaggio. Fare riscaldare i reagenti a temperatura ambiente (18-25°C) e ripetere l'analisi facendo particolare attenzione alla temporizzazione di tutte le fasi.
2. Il pozzetto di controllo del bianco deve presentare un valore di assorbanza inferiore a 0,150. I valori di assorbanza del bianco superiori a 0,150 indicano un lavaggio o contaminazione dei reagenti non adeguati e un'analisi non valida.
3. I campioni con valori di anticorpi specifici superiori al limite superiore dello calibratore numero 5 devono essere riportati come superiori al valore unitario dello calibratore numero 5.
4. Per ogni dosaggio è necessario tracciare la linea calibratura (o è necessario calcolare il fattore di conversione se si utilizza la calibrazione a singolo punto opzionale). L'uso di una linea calibratura o di un fattore di conversione da un altro dosaggio invalida i risultati.
5. Ogni laboratorio deve stabilire e mantenere i propri valori di intervallo (normale) di riferimento, in base alla popolazione dei pazienti e ad altri fattori locali.
6. Il siero di controllo positivo è un siero umano che contiene anticorpi al PR3. Si tratta di un controllo qualitativo al quale deve essere assegnato un valore di più di 35 unità.
7. Il siero di controllo negativo è un pool di sieri umani che non contiene anticorpi al PR3. Questo controllo deve dare valori inferiori a 35 unità.
8. Il siero di controllo positivo non diluito è un siero umano che contiene anticorpi al PR3. Il valore di dosaggio di questo controllo, in unità PR3, è indicato sull'etichetta. Questo intervallo è stato stabilito per racchiudere il 99% dei valori previsti a causa della variazione statisticamente normale. Sono previste piccole deviazioni occasionali al di fuori di questi intervalli. Ogni laboratorio deve stabilire i propri criteri di accettazione/rifiuto in base alla propria esperienza con questo dosaggio.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL PAZIENTE

È stato dimostrato che i livelli di anticorpi al PR3 salgono e scendono nel corso della malattia, ma il significato clinico di un singolo livello di anticorpi è ancora in esame (9). I valori unitari ottenuti in questo dosaggio sono intesi meramente alla separazione dei pazienti nei seguenti gruppi ampi. I pozzetti dei campioni paziente che hanno calcolato valori superiori o uguali a 35 unità devono essere considerati positivi. I pozzetti dei campioni paziente che hanno calcolato valori inferiori a 35 unità devono essere considerati negativi. Ogni laboratorio deve stabilire il proprio intervallo di riferimento e i propri valori di cut-off in base alla popolazione di pazienti testati. I valori unitari vengono alterati dai fattori paziente, da considerazioni meccaniche (come la precisione e l'accuratezza del pipettamento) e dalle condizioni dei dosaggi (come la temperatura e la temporizzazione delle fasi). Le determinazioni seriali dei livelli di anticorpi in un paziente possono indicare l'innalzamento o la caduta dei livelli di anticorpi.

REPORT DEI RISULTATI

I risultati devono essere riportati come positivi o negativi per gli anticorpi al PR3, con il valore unitario. I livelli di anticorpi trovati in un singolo campione hanno un significato clinico limitato. Le determinazioni seriali dei livelli di anticorpi in un paziente possono indicare l'innalzamento o la caduta dei livelli di anticorpi, che è stato dimostrato seguono il decorso della malattia.

LIMITI DEL TEST

1. La diagnosi non può essere eseguita sulla sola base della rilevazione degli anticorpi PR3-ANCA. Il medico deve interpretare questi risultati insieme all'anamnesi e ai sintomi del paziente, ai reperti fisici e alle altre procedure diagnostiche.
2. La terapia non deve essere avviata sulla sola base di un test positivo agli anticorpi al PR3. Le indicazioni cliniche diverse dai reperti di laboratorio e il giudizio clinico del medico devono essere tenuti in considerazione prima dell'inizio di qualsiasi terapia.
3. I risultati di questo test devono essere usati insieme alle informazioni disponibili dalla valutazione clinica e alle altre procedure diagnostiche per determinare lo stato clinico del paziente.

VALORI ATTESI

In una popolazione normale, il valore atteso è inferiore a 35 unità (negativo). PR3-ANCA vengono rilevati nell'85% dei pazienti affetti da granulomatosi con poliangite, nel 45% dei pazienti affetti da poliangite microscopica e in una piccola percentuale di pazienti affetti da glomerulonefrite idiopatica necrotizzante e falciforme (9).

INTERVALLO DI RIFERIMENTO

L'intervallo di riferimento è stato stabilito testando sieri di 500 donatori sani, 239 femmine e 261 maschi, nessuno dei quali presentava un'anamnesi nota di patologie reumatiche. In base a una curva operativa di ricezione generata da questi dati, il valore di cut-off normale è stato stabilito come inferiore a 35 PR3 unità.

A causa della variabilità inerente dei dosaggi ELISA, i valori unitari all'interno delle cinque unità al di sopra o al di sotto del valore di cut-off positivo/negativo (ovvero tra 30 e 40 unità) devono essere interpretati con attenzione. I reperti clinici, i segni, i sintomi, l'impressione del medico e gli altri risultati di laboratorio devono essere valutati per l'interpretazione dei risultati di questo dosaggio.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Il sistema di test RELISA® PR3 della Immuno Concepts è stato confrontato con un altro sistema di test ELISA PR3 distribuito in commercio. La popolazione esaminata consisteva di 173 campioni inviati ai laboratori clinici per i test ANCA, MPO e PR3, ma senza diagnosi specifica, 10 campioni provenivano da pazienti con una diagnosi di poliangite microscopica, 15 campioni provenivano da pazienti con una diagnosi di glomerulonefrite necrotizzante falciforme, 12 provenivano da pazienti affetti da poliarterite nodosa, 7 campioni provenivano da pazienti con diagnosi di granulomatosi eosinofila con poliangite, 12 pazienti con una diagnosi di vasculite, 25 pazienti con una diagnosi di granulomatosi con poliangite, 261 campioni provenivano da donatori maschi e 239 campioni da donatrici femmine. Tutti i campioni sono stati testati in parallelo sul dispositivo dichiarato e sul dispositivo oggetto dello studio. In base a questi confronti, sono stati ottenuti i seguenti dati usando la curva di calibrazione a cinque punti:

Immuno Concepts RELISA® PR3 Test anticorpi		Test anti-PR3 dichiarato	
		Positivo	Negativo
	Positivo	179	8
	Negativo	4	563

Questi dati portano alle seguenti statistiche: sensibilità relativa, 97,8%; specificità relativa, 98,6% e concordanza totale, 98,4%.

Tra gli 8 campioni "falsi positivi", 2 hanno mostrato un modello P-ANCA da immunofluorescenza, 4 hanno mostrato un modello C-ANCA da immunofluorescenza, 2 non hanno mostrato alcun modello da immunofluorescenza. Due dei campioni che hanno mostrato un modello C-ANCA da immunofluorescenza e un RELISA® PR3 positivo erano di pazienti con una diagnosi di granulomatosi con poliangite e uno dei campioni che ha mostrato un modello P-ANCA da immunofluorescenza e un RELISA® PR3 positivo da un paziente con una diagnosi di granulomatosi eosinofila con poliangite. Questi campioni possono in realtà rappresentare risultati "falsi negativi" sul dispositivo dichiarato.

I seguenti dati sono stati ottenuti usando il metodo di calibrazione a singolo punto opzionale:

Immuno Concepts RELISA® PR3 Test anticorpi		Test anti-PR3 dichiarato	
		Positivo	Negativo
	Positivo	176	4
	Negativo	7	567

Questi dati portano alle seguenti statistiche: sensibilità relativa, 96,2%; specificità relativa, 99,3% e concordanza totale, 98,5%.

RIPRODUCIBILITÀ

La precisione del dosaggio è stata misurata usando sette campioni che presentavano valori PR3-ANCA entro l'intervallo della curva di calibrazione. Questi campioni sono stati eseguiti in duplicato su tre diversi numeri di lotto di strisce di micropozzetti rivestiti da antigeni in tre diverse occasioni da tre tecnici diversi. I risultati intra-test e inter-test sono evidenziati nelle tabelle seguenti:

PRECISIONE INTRA-TEST

n=21	Concentrazione (Unità)	D.S.	C.V.%
Campione 1	125	7	5
Campione 2	97	8	8
Campione 3	74	3	4
Campione 4	65	4	6
Campione 5	59	4	7
Campione 6	117	6	5
Campione 7	240	11	5

PRECISIONE INTER-TEST

n=3	Concentrazione (Unità)	D.S.	C.V.%
Campione 1	125	9	7
Campione 2	97	7	8
Campione 3	74	6	9
Campione 4	65	10	15
Campione 5	59	8	14
Campione 6	117	16	14
Campione 7	240	12	5

LINEARITÀ

All'interno dell'intervallo della curva di calibrazione, il dosaggio è lineare e, come dimostrato dall'uso dei metodi riportati nella direttiva NCCLS, *Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods* (10).

CONVALIDA DI UNA CALIBRAZIONE A SINGOLO PUNTO

L'uso di un calibratore a singolo punto è stato convalidato usando lo stesso pannello di 754 sieri che sono stati usati per il confronto con il dispositivo dichiarato. L'analisi della regressione di questo confronto ha mostrato un coefficiente di regressione (r^2) del 99,2% e un'analisi della varianza (ANOVA) dei dati ha mostrato che non vi era alcuna differenza statisticamente significativa tra i due metodi. Da un punto di vista pratico, in questo confronto abbiamo visto solo tre campioni (0,4%) che mostravano discrepanze diagnostiche tra il sistema di calibrazione a cinque punti e il sistema di calibrazione opzionale a singolo punto. Tutti questi campioni presentavano valori PR3 vicini al cut-off di 35 unità, che andava da 31 a 40 unità (10). Questo tipo di campione rappresenta un problema diagnostico in un sistema di dosaggi e deve essere considerato attentamente dai professionisti del laboratorio che analizzano i campioni e interpretano i dati.

STUDI SULLA REATTIVITÀ INCROCIATA

Sono stati testati un totale di 40 sieri che contenevano autoanticorpi diversi dagli anti-PR3-ANCA usando il sistema di test RELISA® PR3 della Immuno Concepts. Questi campioni includevano i modelli di anticorpi antinucleari comuni, come gli anticorpi omogenei, macchiati e nucleolari, oltre che gli anticorpi diretti contro i componenti citoplasmatici come i mitocondri, l'apparato di Golgi e il citoscheletro. Venti campioni contenevano fattori reumatoidi. Nessuno di questi campioni ha prodotto un risultato positivo nel sistema di test RELISA® PR3 della Immuno Concepts.

RIFERIMENTI

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.

In caso di danni alla confezione, contattare la Immuno Concepts prima dell'uso.



Produttore



Mandatario per la
Comunità Europea



Limiti di
temperatura



Contenuto sufficiente per <n> test



Vedere le istruzioni
per l'uso



Prodotto medico per la diagnostica in vitro



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

PROCEDURA DI TEST RELISA® ANCA-PR3

Tutti i campioni, i reagenti (inclusa la soluzione del tampone di lavaggio) e i micropozzetti devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso.

- 1. PREPARAZIONE DEL FOGLIO DI LAVORO**

Etichettare il foglio di lavoro che è incluso nel kit per indicare la posizione dei campioni nei micropozzetti. Analizzare gli calibratori in duplicato. Per usare la curva multipunto, è necessario analizzare tutti e cinque i sieri calibratori. Per il metodo di calibrazione a singolo punto opzionale, eseguire solo lo standard numero 3 in duplicato. Un pozzetto viene utilizzato per un bianco reagente. Raccomandiamo di analizzare ogni controllo e campione paziente in duplicato fino a stabilire una precisione accettabile per il dosaggio nel proprio laboratorio.
- 2. PREPARARE LA SOLUZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO (PBS-Tween)**

Sciogliere il contenuto di un sacchetto di tampone PBS in un litro di acqua deionizzata o distillata. Aggiungere l'intero contenuto di un flacone di concentrato di tampone di lavaggio nel contenitore da un litro di PBS sciolto. Miscelare bene. La soluzione del tampone di lavaggio può essere coperta e conservata a 2-25 °C fino a quattro settimane.
- 3. DILUIRE I CAMPIONI PAZIENTE**

Diluire i campioni paziente a 1:40 aggiungendo 25 µl di siero a 975 µl di diluente per campioni. Per usare il controllo positivo dosato non diluito PR3 opzionale, diluirlo allo stesso modo dei campioni paziente. Miscelare bene. Il calibratore, il controllo positivo e il controllo negativo vengono forniti alla diluizione operativa e non devono essere diluiti ulteriormente.
- 4. PREPARAZIONE DEI MICROPOZZETTI**

Rimuovere i micropozzetti necessari dalle rispettive buste e metterli nel supporto. I micropozzetti devono essere saldamente sistemati nel supporto. Premere con forza su entrambe le estremità delle strisce in modo che stiano ben ferme nel supporto. Se si usano pozzetti singoli o meno di una striscia completa di pozzetti, assicurarsi che ogni pozzetto sia ben fermo. I pozzetti ben sistemati nel supporto non cadono quando il supporto viene capovolto. Se per l'analisi sono necessari meno di otto pozzetti, questi possono essere separati staccandoli. Le strisce non utilizzate possono essere rimesse nel sacchetto con essiccatore provvisto di un'apposita chiusura a zip per sigillarlo e refrigerate fino a 45 giorni.
- 5. EROGAZIONE DELLE DILUIZIONI DEL SIERO**

Erogare 100 µl di calibratori, controlli e campioni paziente diluiti nei pozzetti appropriati come illustrato nel foglio di lavoro. Erogare 100 µl di diluente per campioni nel pozzetto del bianco del reagente.
- 6. INCUBARE LE STRISCE** (30 minuti a temperatura ambiente, ovvero, 18-25 °C)

Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Le strisce devono essere protette da cali o cambiamenti di temperatura durante l'incubazione. Se lo si desidera, le strisce possono essere ricoperte di nastro trasparente o con un foglio di carta per proteggerle dalla polvere o da altri corpi estranei.
- 7. STRISCE DI LAVAGGIO** (Vedere le note generali alla procedura 5 e 6)

Lavare i pozzetti 3 - 5 volte con soluzione per il tampone di lavaggio PBS-Tween. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, quindi riempire ogni pozzetto con soluzione di tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti, in particolare durante il primo lavaggio dopo l'aspirazione. Drenare tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti invertendo, quindi agitando il tampone di lavaggio residuo dai pozzetti con un movimento netto "a scatto" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e drenaggio per un totale di 3 - 5 lavaggi. I pozzetti devono essere picchiettati vigorosamente su un tovagliolo di carta o altro materiale assorbente per rimuovere tutte le tracce di tampone di lavaggio residuo.
- 8. EROGARE REAGENTE PER ANTICORPO ENZIMATICA**

Erogare 100 µl di reagente per anticorpi enzimatico a ogni pozzetto.
- 9. INCUBARE LE STRISCE** (30 minuti a temperatura ambiente, ovvero, 18-25 °C)

Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Le strisce devono essere protette da cali o cambiamenti di temperatura durante l'incubazione. Se lo si desidera, le strisce possono essere ricoperte di nastro trasparente o con un foglio di carta per proteggerle dalla polvere o da altri corpi estranei.
- 10. STRISCE DI LAVAGGIO**

Lavare i pozzetti 3 - 5 volte con soluzione per il tampone di lavaggio PBS-Tween. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, quindi riempire ogni pozzetto con soluzione di tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti, in particolare durante il primo lavaggio dopo l'aspirazione. Drenare tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti invertendo, quindi agitando il tampone di lavaggio residuo dai pozzetti con un movimento netto "a scatto" del polso. Ripetere le fasi di riempimento e drenaggio per un totale di 3 - 5 lavaggi. I pozzetti devono essere picchiettati vigorosamente su un tovagliolo di carta o altro materiale assorbente per rimuovere tutte le tracce di tampone di lavaggio residuo.
- 11. EROGAZIONE DELLA SOLUZIONE SUBSTRATO**

Usando un timer per assicurare intervalli costanti, erogare 100 µl di soluzione di substrato in ogni pozzetto. La soluzione di substrato deve essere aggiunta ai pozzetti a una velocità costante in modo che ogni pozzetto venga incubato per lo stesso intervallo di tempo (15 minuti). La soluzione substrato nei pozzetti incubati con campioni positivi diventa blu e la soluzione nei pozzetti diventa blu e la soluzione nei pozzetti incubati con campioni negativi diventa o incolore o blu chiarissimo.
- 12. INCUBARE LE STRISCE** (Esattamente a 15 minuti a temperatura ambiente, ovvero, 18-25 °C)

Incubare a temperatura ambiente per esattamente 15 minuti. Le strisce devono essere protette da cali o cambiamenti di temperatura durante l'incubazione.
- 13. EROGARE REAGENTE DI ARRESTO**

Dopo che il primo pozzetto è stato in incubazione per esattamente 15 minuti, aggiungere 100 µl di Reagente di arresto in ciascun pozzetto, nello stesso ordine e alla stessa velocità in cui la soluzione di substrato è stata aggiunta ai pozzetti. Dopo aver aggiunto il reagente di arresto, la soluzione di substrato blu diventa gialla e la soluzione incolore resta incolore.
- 14. LEGGERE L'ASSORBANZA DEI POZZETTI**

Dopo 30 minuti dall'aggiunta del reagente di arresto, i pozzetti devono essere letti in uno spettrofotometro per lettura della piastra. I pozzetti vengono letti a 450 nm rispetto al pozzetto di controllo del bianco. Se è disponibile uno spettrofotometro con lunghezza d'onda duale, la lunghezza d'onda per il filtro di riferimento deve essere impostata a 600-650 nm. Leggendo i micropozzetti a 450 nm senza un filtro di riferimento risulta in valori di assorbanza più elevati.

PER ASSISTENZA TECNICA: +1-916-363-2649
oppure a mezzo e-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com