CE

DiaMetra
care for quality

DCM091-8
Ed. 09/2018

Anti PR-3 (c-ANCA)

per analisi di routine

Determinazione semiquantitativa degli anticorpi IgG contro la proteinasi 3 (PR-3) nel siero o plasma umano.

IVD | **LOT** Vedere etichetta esterna | 2°C 8°C | Σ = 96 test | **REF DKO091**

DESTINAZIONE D'USO
Il kit Anti PR-3 (c-ANCA) è un test immunoenzmatico indiretto in fase solida (ELISA) per la determinazione semiquantitativa degli autoanticorpi di classe IgG diretti contro la proteinasi 3 (PR-3) nel siero o plasma umano. Il test è da intendersi per uso diagnostico in vitro come supporto nella diagnosi di alcune vasculiti autoimmuni quali la granulomatosi di Wegener.
Il kit Anti PR-3 (c-ANCA) è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Gli anticorpi anti citoplasma-neutrofilico (ANCA) rappresentano un gruppo di autoanticorpi diretti contro le componenti citoplasmatiche dei granulociti neutrofili e dei monociti. I metodi classici per la determinazione degli ANCA sono i test di immunofluorescenza (IF). Con queste tecniche di immunofluorescenza indiretta si riconoscono 2 modelli, il tipo citoplasmatico (c-ANCA) e il tipo perinucleare (p-ANCA).
L'antigene principale per il c-ANCA è la proteinasi 3 (PR-3) presente nei granuli primari. Gli anticorpi anti p-ANCA presenti nei sieri positivi sono principalmente diretti contro la mieloperossidasi (MPO). Anticorpi diretti verso altri antigeni quali ad esempio la lattoferrina, l'elastasi, la catepsina-G e anche il lisozima spesso danno origine a positività per p-ANCA. Questo rende difficile l'esatta interpretazione e classificazione dei profili di immunofluorescenza. Perciò ogni risposta positiva all'IF per ANCA dovrebbere essere differenziata mediante tecnica ELISA utilizzando antigeni purificati.
PR-3-ANCA e MPO-ANCA sono marcatori sierologici affidabili nella diagnosi di vasculite. PR-3-ANCA è l'autoantigene classico nella granulomatosi di Wegener con una specificità clinica maggiore del 95%. La presenza di c-ANCA è stata documentata in diverse malattie. Gli anticorpi anti–MPO sono altamente specifici per glomerulonefriti a semilune idiopatiche e associate a vasculiti e per la poliartrite nodosa, la sindrome di Churg-Strauss e la poliangite senza coinvolgimento renale.
I metodi ELISA specifici per PR-3 e MPO possono fornire un importante risultato di conferma oltre all'interpretazione di risultati di difficile lettura per l'immunofluorescenza, ad esempio nei casi in cui questa rilevi positività contemporanea per più anticorpi o elevato background di fluorescenza.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Anti PR-3 (c-ANCA) si basa sul legame degli anticorpi presenti nel campione con la proteinasi 3 da neutrofili umani legata sulle micropiastre. Durante la prima fase, gli anticorpi presenti nei calibratori, nei controlli e nei campioni prediluiti dei pazienti si legano sulla superficie interna dei pozzetti. Dopo 60 minuti di incubazione, la micropiastra viene lavata con un tampone di lavaggio per rimuovere le componenti del siero che non hanno reagito.
Nella seconda fase, una soluzione di immunoglobuline anti-human IgG coniugate con perossidasi di rafano (HRP) riconosce gli anticorpi di classe IgG legati agli antigeni immobilizzati. Dopo 30 minuti di incubazione, l'eccesso di coniugato enzimatico che non si è legato specificamente viene rimosso mediante un lavaggio con tampone.
Successivamente si aggiunge ai pozzetti una soluzione substrato cromogenica contenente TMB. Dopo 15 minuti di incubazione si blocca lo sviluppo del colore mediante aggiunta della soluzione di stop. Il colore della soluzione diventa giallo. La quantità di colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi IgG presenti nel campione originale. La concentrazione di anticorpi IgG presenti nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (5 flaconi, 1,2 mL ciascuno)
Tampone fosfato 0,1M, NaN_3 < 0,1%, siero umano

CAL0	**REF DCE002/09106-0**
CAL1	**REF DCE002/09107-0**
CAL2	**REF DCE002/09108-0**
CAL3	**REF DCE002/09109-0**
CAL4	**REF DCE002/09110-0**

2. Controls (2 flaconi, 1,2 mL ciascuno, pronti all'uso)
Tampone fosfato 0,1M, NaN_3 < 0,1%, siero umano

Controllo negativo	**REF DCE045/09101-0**
Controllo positivo	**REF DCE045/09102-0**

3. Sample Diluent (1 flacone, 100 mL)
Tampone fosfato 0,1M, NaN_3 < 0,1%
REF DCE053-0

4. Conjugate (1 flacone 15 mL)
Anticorpo anti h-IgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP), BSA 0,1%, Proclin < 0,0015%
REF DCE002/09102-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)
Proteinasi 3 da neutrofili umani adsorbita su micropiastra
REF DCE002/09103-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)
H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) *(evitare il contatto con la pelle)*
REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)
Acido solforico 0,15M *(evitare il contatto con la pelle)*
REF DCE005-0

8. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)
Tampone fosfato 0,2M, pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit
Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare
Dispensatori automatici.
Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note
Conservare tutti i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce.
Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE
- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori ed i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN_3) o di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H_2O_2 a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI
- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- **ATTENZIONE**: **il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni**; si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso.
  A tale scopo Diametra rende disponibile separatamente un reattivo decontaminante per il lavaggio degli aghi.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione degli Calibratori (C_0…C_4)
Dal momento che non sono disponibili preparati di riferimento internazionale per gli anticorpi anti PR-3, il sistema di analisi è calibrato in unità relative arbitrarie.
I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4
AU/mL	0	10	20	40	160

Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2÷8°C.

6.2. Preparazione del campione

Per l'esecuzione del test si possono utilizzare campioni di siero o plasma umano. I campioni da utilizzare devono essere limpidi. Si consiglia di evitare contaminazioni dovute a iperlipemia, anche se queste non interferiscono con l'analisi. I campioni possono essere conservati refrigerati a 2-8°C fino a 5 giorni, oppure conservati a -20°C fino a 6 mesi. Si consiglia di evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni di siero o plasma che potrebbero determinare una perdita variabile dell'attività degli autoanticorpi. Non è raccomandata l'analisi di campioni inattivati al calore.

Tutti i campioni di siero o plasma devono essere prediluiti 1:100 con sample diluent; per esempio 10 µL di siero o plasma possono essere diluiti con 990 µL di sample diluent.

I Controlli sono pronti all'uso.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C_0-C_4), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagenti	Calibratore	Campione /Controlli	Bianco
Calibratore C_0-C_4	**100 µL**		
Controlli		**100 µL**	
Campione diluito		**100 µL**	
Incubare 60 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. **Nota importante**: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. **Lavaggi automatici**: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
Coniugato	**100 µL**	**100 µL**	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. **Lavaggi**: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.			
TMB Substrato	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente al riparo dalla luce (22-28°C).			
Stop Solution	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO DI QUALITA'

- Il Controllo Positivo ed il Controllo Negativo devono essere inclusi ogni volta che si esegue il test per assicurare che tutti i reagenti ed il test funzionino in modo corretto.
- Poichè i Controlli sono prediluiti, essi non rappresentano un controllo procedurale per le tecniche di diluizione utilizzate per i campioni.
- Ulteriori sieri di controllo possono essere preparati raccogliendo un pool dei sieri umani, aliquotandolo e conservandolo a < -20°C.
- Perchè i risultati del test siano considerati validi, tutti i seguenti criteri devono essere soddisfatti. Se anche uno solo non rientra nei valori specificati, i risultati non dovrebbero essere considerati validi ed il test dovrebbe essere ripetuto:
  - L'assorbanza del Controllo Positivo deve essere maggiore di quella del Controllo Negativo.
  - Il Controllo Negativo e quello Positivo servono per controllare un'eventuale malfunzionamento dei reagenti. e non assicurano la precisione in corrispondenza del valore soglia del test.
  - Il test è valido solo se la densità ottica a 450 nm del Controllo Negativo e del Controllo Positivo come pure quelle dei calibratori (C_0-C_4) coincidono con gli intervalli corrispondenti indicati nel Certificato di Controllo di Qualità incluso nel kit.

8. CALCOLO DEI RISULTATI

Per il test Anti PR-3 (c-ANCA) il metodo di scelta per il trattamento dei risultati è una elaborazione 4 parametri con assi lin-log per densità ottica e concentrazione rispettivamente. Inoltre si possono utilizzare un'approssimazione spline e coordinate log-log. Tuttavia si raccomanda di utilizzare una curva Lin-Log.

Innanzitutto occorre calcolare la media delle densità ottiche relative ai calibratori. Utilizzare un foglio di carta lin-log e tracciare le densità ottiche medie di ogni calibratore verso la rispettiva concentrazione. Disegnare la curva che approssima nel modo migliore tutti i punti di calibrazione. I punti dei calibratori possono anche essere collegati con segmenti di linea retta. La concentrazione dei campioni incogniti può essere determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

In uno studio sui valori normali eseguito con campioni di siero provenienti da donatori sani sono stati determinati i seguenti intervalli di normalità con il test Anti PR-3 (c-ANCA):

Anti PR-3 (c-ANCA)	
Negativo	< 20 AU/mL
Positivo	≥ 20 AU/mL

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.
I risultati positivi dovrebbero essere verificati relativamente allo stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione relativa alla terapia dovrebbe essere presa individualmente. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i suoi propri intervalli serici normale e patologico di anticorpi anti PR-3.

10. LIMITAZIONI DEL TEST

La presenza nel campione di complessi immuni o di altri aggregati di immunoglobuline può determinare delle reazioni aspecifiche con conseguenti risultati falsi positivi.

11. PARAMETRI CARATTERISTICI

11.1. Precisione e riproducibilità

Per determinare la precisione e riproducibilità del kit sono stati utilizzati 4 differenti campioni sierici e 1 siero di controllo commerciale (KC).
La tabella sottostante indica il Within Run e il Total CV%.

Campione	n°	Media (AU/mL)	Within Run CV%	Total CV%
KC	20	82.0	1.8	5.9
PS1	20	7.9	6.0	14.0
PS2	20	19.5	6.2	13.8
PS3	20	22.9	3.8	12.6
PS4	20	161.6	2.5	4.4

11.2. Parametri diagnostici

I parametri diagnostici del kit sono stati indagati utilizzando 67 campioni sierici e un kit ELISA Anti PR3 (c-ANCA) commercialmente disponibile.
I risultati ottenuti sono indicati nella tabella sottostante:

Sensibilità	80%
Specificità	95%
PPV	91%
NPV	89%

11.3. Parametri analitici

Le caratteristiche del kit in termini di sensibilità analitica sono state studiate indagando il LOB (Limit of Blank), LOD (Limit of Detection), LOQ (Limit of Quantitation) e la sensibilità analitica (Analitycal Sensitivity, A.S.).
La tabella sottostante mostra i criteri dello studio e i risultati ottenuti.

	Criteri di studio	***Risultato***
LOB	Sono stati effettuati 60 replicati del Cal 0, utilizzato come "Blank", in 5 differenti sessioni	1.52
LOD	Sono stati analizzati 6 campioni sierici bassi in 10 differenti sessioni	3.41
LOQ	Sono stati analizzati 6 campioni sierici bassi in 10 differenti sessioni	5.69
A.S.	Sono stati testati 20 replicati di Cal 0 e 5 replicati di Cal 1. A.S. è stata calcolata attraverso regressione lineare.	0.87

11.4. Studio su campioni plasmatici

L'utilizzo di plasma con questo kit è stato valutato effettuando il dosaggio in parallelo tra siero e plasma appartenenti ad uno stesso soggetto.
Sono stati utilizzati 10 differenti soggetti.
È stato investigato plasma ottenuto con EDTA, Litio-Eparina, Sodio-Eparina e tubi SST.
L'interferenza è stata valutata come "significativa" se provoca una differenza di concentrazione nella quantificazione del campione tra siero e plasma > 10%.
La tabella sottostante mostra i risultati ottenuti:

Plasma	Quantificazione	Interferenza
EDTA	-2.3%	No
Litio-Eparina	-0.5%	No
Sodio-Eparina	-2.2%	No
Tubi SST	-0.7%	No

Conclusione: a seguito dello studio effettuato, campioni sierici e plasmatici possono essere utilizzati indifferentemente con il kit Anti PR-3 (C-ANCA).

11.5. Interferenze

Le interferenze del kit nei riguardi di Bilirubina, Emoglobina e Trigliceridi sono state testate aggiungendo la sostanza interferente al campione sierico e comparando la concentrazione ottenuta con lo stesso campione originale.
Sono stati analizzati campioni con concentrazione iniziale differente di Anti PR-3 (c-ANCA)
L'interferenza è stata valutata come "significativa" se provoca una differenza di concentrazione nella quantificazione del campione > 10%.
La tabella sottostante mostra i risultati ottenuti:

Interferente	Conc. testata	Interferenza
Bilirubina	30 mg/dL	No
Emoglobina	500 mg/dL	No
Trigliceridi	1000 mg/dL	No

Conclusione: a seguito dello studio effettuato, non si ha interferenza significativa da Bilirubina, Emoglobina e Trigliceridi alle concentrazioni testate per il kit Anti PR-3 (C-ANCA).

12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Jennette, J.C. and Falk, R.J. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies and Associated Diseases: a Review. Am. J. Kidney Dis. 1990,Vol. XV,No. 6: 517 - 529.
2. Gross, W.L. et al. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Associated Diseases: A Rheumatologist‘s Perspective. Am. J. Kidney Dis. 1991,Vol. XVIII, No. 2: 175 - 179.
3. Wieslander, J.How are Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies Detected ? Am.J.Kidney Dis. 1991,Vol. XVIII, No. 2: 154 - 158.
4. Lesavre, P. Antineutrophil cytoplasmic antibodies antigen specificity. Am. J. Kidney Dis. 1991,Vol. XVIII, No. 2: 159 - 163.
5. Hagen, E.C. et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: a review of the antigens involved, the assays, and the clinical and possible pathogenic consequences.Blood 1993,Vol.81: 1996 - 2000.
6. Gross,W.L. et al.Immunodiagnostische und immunopathogenetische Bedeutung von Anti-Neutrophilen-Cytoplasma-Antikörpern. Deutsche Medizinische Wochenschrift 1993, Vol. 118: 191 - 199.

Ed. 09/2018 **DCM091-8**

Dia.Metra S.r.l.
Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

CE

DiaMetra
care for quality

DCM091-8
Ed. 09/2018

Anti PR-3 (c-ANCA)

for routine analysis

Semiquantitative determination of IgG class antibodies against proteinase 3 (PR-3) in human serum or plasma.

IVD | LOT See external label | 2°C 8°C | Σ = 96 tests | REF DKO091

INTENDED USE

Anti PR-3 (c-ANCA) is an indirect solid phase enzyme immunoassay (ELISA) for the semiquantitative measurement of IgG class autoantibodies against proteinase 3 (PR-3) in human serum or plasma. The assay is intended for in vitro diagnostic use only as an aid in the diagnosis of certain autoimmune vasculitides such as Wegener´s granulomatosis.
Anti PR-3 (c-ANCA) kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Anti-neutrophilic-cytoplasm antibodies (ANCA) represents a group of autoantibodies directed towards the cytoplasmatic components of the neutrophilic granulocytes and monocytes. The classical methods for the determination of ANCA are the immunofluorescent methods. With these indirect immunofluorescence techniques two main patterns are recognized, a cytoplasmatic (c-ANCA) and a perinuclear (p-ANCA) type.
The main antigen for the c-ANCA is the proteinase 3 (PR-3), which is a serine proteinase present in primary granules. Antibodies of p-ANCA positive sera are mainly directed to myeloperoxidase (MPO). Antibodies to other antigens e.g. lactoferrin, elastase, cathepsin-G and also lysozyme often result in a similar p-ANCA pattern. Beside different untypical variants of p-ANCA IF patterns granulocyte specific antinuclear antibodies (GS-ANA) is indistinguishable from p-ANCA. This makes a clear interpretation and classification of the IF patterns difficult.
Therefore every positive IF-ANCA findings esp. p-ANCA should be differenciated by ELISA techniques using purified antigens. A survey of documented clinical indications of specific ANCA is given in the table below. PR-3- ANCA and MPO-ANCA are reliable serologic markers in the diagnostics of vasculitides.
PR-3- ANCA is the classical autoantigen in Wegener´s granulomatosis with a clinical specificity of more than 95%. c-ANCA is documented to be present in different diseases. Anti-MPO antibodies are highly specific for idiopathic and vasculitis associated crescentic glomerulonephritis and also for classic polyarteritis nodosa, Churg-Strauss syndrome and the polyangitis overlap syndrome without renal involvement. With respect to sensitivity, either MPO or PR-3 antibodies were found in 77 to 100% of patients with idiopathic and vasculitis associated crescentic glomerulonephritis. In WG, anti-MPO antibodies were detected only occasionally and generally in patients negative for PR-3 antibodies.
The MPO and PR-3 specific ELISA methods can provide an important confirmatory result for two of the more important of the identified antigens. ELISA is also useful for interpreting "difficult" samples by IFA such as those which exhibit several antibodies simultaneously or those with high background fluorescence.

2. PRINCIPLE

Anti PR-3 (c-ANCA) test is based on the binding of the antibodies in the sample with human neutrophil proteinase 3 coated into the microplates. In the first step the antibodies in calibrators, controls or prediluted patient samples bind to the inner surface of the wells. After a 60 minutes incubation the microplate is washed with wash buffer for removing non-reactive serum components. In the second step an anti-human-IgG horseradish peroxidase conjugated solution recognizes the IgG class antibodies bound to the immobilized antigens. After a 30 minutes incubation any excess enzyme conjugate which is not specifically bound is washed away with the wash buffer.
Then a chromogenic substrate solution containing TMB is dispensed into the wells. After 15 minutes of incubation the color development is stopped by adding the Stop Solution. The solution color change into yellow. The amount of color is directly proportional to the concentration of IgG antibodies present in the original sample.
The concentration of IgG antibodies in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (5 vials, 1.2 mL each)
Phosphate buffer 0,1M, NaN_3 < 0,1%, human serum

CAL0	REF DCE002/09106-0
CAL1	REF DCE002/09107-0
CAL2	REF DCE002/09108-0
CAL3	REF DCE002/09109-0
CAL4	REF DCE002/09110-0

2. Controls (2 vials, 1.2 mL each)
Phosphate buffer 0,1M, NaN_3 < 0,1%, human serum

Negative control	REF DCE045/09101-0
Positive control	REF DCE045/09102-0

3. Sample Diluent (1 vial, 100 mL)
Phosphate buffer 0,1 M NaN_3 < 0,1%
REF DCE053-0

4. Conjugate (1 vial, 15 mL)
Anti h-IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP), BSA 0,1%, Proclin < 0,0015% REF DCE002/09102-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)
Microplate coated with human neutrophil proteinase 3
REF DCE002/09103-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)
H_2O_2-TMB 0.26 g/L *(avoid any skin contact)*
REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15M *(avoid any skin contact)*
REF DCE005-0

8. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)
Phosphate buffer 0,2M, pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reagents necessary not supplied
Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation
Automatic dispenser.
Microplate reader (450 nm, 620-630 nm).

Notes
Store all reagents between 2÷8°C in the dark.
Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit.

4. WARNINGS
- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, Calibrators and Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN_3) or Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H_2O_2 to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS
- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.
  For this purpose, Diametra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemeic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C_0…C_4)
Since no international reference preparation for Anti-proteinase 3 antibodies is available, the assay system is calibrated in relative arbitrary units. The Calibrators are ready to use and have the following concentration:

	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4
AU/mL	0	10	20	40	160

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of the Sample
Either human serum or plasma samples can be used for the test execution. Test samples should be clear.

Contamination by lipemia is best avoided, but does not interfere with this assay.
Specimens may be refrigerated at 2-8°C for up to five days or stored at -20°C up to six months. Avoid repetitive freezing and thawing of serum or plasma samples. This may result in variable loss of autoantibody activity.
Testing of heat-inactivated serum or plasma samples is not recommended.
All serum or plasma samples must be prediluted 1:100 with sample diluent; for example 10 L of sample should be diluted with 990 L of sample diluent.
The Controls are ready to use.

6.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.
In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care to transfer completely the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C_0-C_4), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Calibrator C_0-C_4	**100 µL**		
Controls		**100 µL**	
Diluted Sample		**100 µL**	
Incubate 60 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. **Important note**: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. **Automatic washer**: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
Conjugate	**100 µL**	**100 µL**	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. **Washing**: follow the same indications of the previous point.			
TMB Substrate	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).			
Stop Solution	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Shake the microplate gently Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

- The PR-3 IgG Positive and the Negative Control should be run with every batch of samples to ensure that all reagents and procedures perform properly.
- Because Positive and the Negative Control are prediluted, they do not control for procedural methods associated with dilution of specimens.
- Additional suitable control sera may be prepared by aliquoting pooled human serum specimens and storing at < -20°C.
- In order for the test results to be considered valid, all of the criteria listed below must be met. If any of these are not met, the test should be considered invalid and the assay repeated:

- The absorbance of the prediluted PR-3 IgG Positive must be greater than the absorbance of the prediluted Negative Control.
- The Negative and Positive Control are intended to monitor for substantial reagent failure and they will not ensure precision at the assay cutoff.
- This test is only valid if the optical density at 450 nm for Negative Control (1) and Positive Control (2) as well as for the Calibrator S_0-S_4 complies with the respective range indicated on the Quality Control Certificate enclosed to each test kit: if any of these criteria is not met, the results are invalid and the test should be repeated.

8. RESULTS

For the Anti PR-3 (c-ANCA) test a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice. Smoothed-Spline Approximation and log-log coordinates are also suitable. We recommend using a Lin-Log curve.
First calculate the averaged optical densities for each calibrator well. Use lin-log graph paper and plot the averaged optical density of each calibrator versus the concentration. Draw the best fitting curve approximating the path of all calibrator points. The calibrator points may also be connected with straight line segments. The concentration of unknowns may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

9. REFERENCE VALUES

In a normal range study with serum samples from healthy blood donors the following ranges have been established with the Anti PR-3 (c-ANCA) test:

Anti PR-3 (c-ANCA)	
Negative	< 20 AU/mL
Positive	≥ 20 AU/mL

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as

specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacurer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.
Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually. It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of serum anti PR-3 antibodies.

10. LIMITATIONS OF PROCEDURE

The presence of immune complexes or other immunoglobulin aggregates in the patient sample may cause an increased level of non-specific binding and produce false positives in this assay.

11. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

11.1. Precision and reproducibility

To determine precision and reproducibility four different serum samples and one commercial control serum (KC) have been used.
The table below shows the Whithin Run and Total CV%.

Sample	n°	Mean (AU/mL)	Within Run CV%	Total CV%
KC	20	82.0	1.8	5.9
PS1	20	7.9	6.0	14.0
PS2	20	19.5	6.2	13.8
PS3	20	22.9	3.8	12.6
PS4	20	161.6	2.5	4.4

11.2. Diagnostic parameters

Diagnostic parameters of the kit has been investigated with 67 serum samples and one Anti PR3 (c-ANCA) ELISA kit commercially available.
The results obtained are shown in the table below:

Sensitivity	80%
Specificity	95%
PPV	91%
NPV	89%

11.3. Analytical parameters

Analytical sensitivity has been investigated through the LOB (Limit of Blank), LOD (Limit of Detection), LOQ (limit of Quantitation) and Analitycal Sensitivity (A.S.).
The table below shows the criteria of the study and the results obtained.

	Criteria	*Results*
LOB	60 replicates of Cal 0, used as "Blank", have been investigated in 5 different sessions	1.52
LOD	6 low serum samples have been analyzed in 10 different sessions	3.41
LOQ	6 low serum samples have been analyzed in 10 different sessions	5.69
A.S.	20 replicates of Cal 0 and 5 replicates of Cal 1 have been assayed. A.S. has been calculated by linear regression.	0.87

11.4. Serum-plasma study

The use of plasma with this kit has been evaluated by performing the assay in parallel with serum and plasma belonging to the same subject.
10 different subjects have been used.
Plasma obtained with EDTA, lithium-heparin, sodium-heparin and SST tubes has been investigated.
The interference has been evaluated as "significant" if it causes a concentration difference > 10% of the sample between serum and plasma.
The table below shows the results obtained:

Plasma	Quantification	Interference
EDTA	-2.3%	No
Lithium-Heparin	-0.5%	No
Sodium-Heparin	-2.2%	No
SST pipes	-0.7%	No

Conclusion: following the study, serum and plasma samples can be used indifferently with the Anti PR-3 kit (C-ANCA).

11.5. Interference

Interferences by Bilirubin, Hemoglobin and Triglycerides have been investigated by adding the interfering substance to the serum sample and by comparing the concentration.
Samples with different initial concentration of Anti PR-3 (c-ANCA) have been analyzed.
The interference has been evaluated as "significant" if it causes a difference in sample concentration > 10%.
The table below shows the results obtained:

Interference	Conc. assayed	Interference
Bilirubin	30 mg/dL	No
Hemoglobin	500 mg/dL	No
Triglycerids	1000 mg/dL	No

Conclusion: following the study, there is no significant interference by Bilirubin, Hemoglobin and Triglycerides at the concentrations assayed for the Anti PR-3 kit (C-ANCA).

12. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Jennette, J.C. and Falk, R.J. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies and Associated Diseases: a Review. Am. J. Kidney Dis. 1990,Vol. XV,No. 6: 517 - 529.
2. Gross, W.L. et al. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Associated Diseases: A Rheumatologist‘s Perspective. Am. J. Kidney Dis. 1991,Vol. XVIII, No. 2: 175 - 179.
3. Wieslander, J.How are Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies Detected ? Am.J.Kidney Dis. 1991,Vol. XVIII, No. 2: 154 - 158.
4. Lesavre, P. Antineutrophil cytoplasmic antibodies antigen specificity. Am. J. Kidney Dis. 1991,Vol. XVIII, No. 2: 159 - 163.
5. Hagen, E.C. et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: a review of the antigens involved, the assays, and the clinical and possible pathogenic consequences.Blood 1993,Vol.81: 1996 - 2000.
6. Gross,W.L. et al.Immunodiagnostische und immunopathogenetische Bedeutung von Anti-

Neutrophilen-Cytoplasma-Antikörpern. Deutsche Medizinische Wochenschrift 1993, Vol. 118: 191 - 199.

Ed. 09/2018 **DCM091-8**

Dia.Metra S.r.l.
Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

CE

DiaMetra
care for quality

DCM091-8
Ed. 09/2018

Anti PR-3 (c-ANCA)

para análisis de rutina

Determinación semicuantitativa de los anticuerpos IgG contra la proteinasa 3 en suero o plasma humano.

IVD | **LOT** Ver etiqueta externa | 2°C – 8°C | Σ = 96 ensayos | **REF DKO091**

USO PREVISTO

Anti PR-3 (c-ANCA) es un ensayo inmunoenzimático indirecto en fase sólida (ELISA) para la determinación semicuantitativa de los autoanticuerpos de clase IgG directos contra la proteinasa 3 (PR-3) en suero o plasma humano. El ensayo está destinado al uso diagnóstico in vitro como apoyo en el diagnóstico de algunas vasculitis autoinmunes, como la granulomatosis de Wegener.
El kit Anti PR-3 (c-ANCA) está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

Los anticuerpos anti citoplasma-neutrofílico (ANCA) representan un grupo de autoanticuerpos directos contra los componentes citoplasmáticos de los granulocitos neutrófilos y de los monocitos. Los métodos clásicos para la determinación de los ANCA son los ensayos de inmunofluorescencia (IF). Con estas técnicas de inmunofluorescencia indirecta se reconocen 2 modelos, el tipo citoplasmático (c-ANCA) y el tipo perinuclear (p-ANCA). El antígeno principal para el c-ANCA es la proteinasa 3 (PR-3) presente en los gránulos primarios. Los anticuerpos anti p-ANCA presentes en los sueros positivos son principalmente directos contra la mieloperoxidasa (MPO). Anticuerpos directos contra otros antígenos, como por ejemplo lactoferrina, elastasa, catepsina G y también lisozima, a menudo dan lugar a positividad para p-ANCA. Esto dificulta la interpretación y clasificación exactas de los perfiles de inmunofluorescencia. Por lo tanto, cada respuesta positiva a IF para ANCA debe diferenciarse mediante la técnica ELISA usando antígenos purificados.
PR-3-ANCA y MPO-ANCA son marcadores serológicos fiables en el diagnóstico de vasculitis. PR-3-ANCA es el autoantígeno clásico en la granulomatosis de Wegener con una especificidad clínica superior al 95%. La presencia de c-ANCA se ha documentado en distintas enfermedades. Los anticuerpos anti-MPO son altamente específicos para glomerulonefritis semilunar idiopática y asociada con vasculitis, y para la poliarteritis nodosa, el síndrome de Churg-Strauss y la poliangeítis sin afectación renal. Los métodos ELISA específicos para PR-3 y MPO pueden proporcionar un resultado importante de confirmación además de la interpretación de resultados de difícil lectura para la inmunofluorescencia, por ejemplo, en casos en los que esta detecta positividad simultánea para varios anticuerpos o elevado fondo de fluorescencia.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo Anti PR-3-IgG se basa en la unión de los anticuerpos presentes en la muestra con la proteinasa 3 de neutrófilos humanos unida a las microplacas. Los anticuerpos presentes en los calibradores, en los controles y en las muestras prediluidas de los pacientes se unen a la superficie interna de los pocillos. Tras 60 minutos de incubación, la microplaca se lava con un tampón de lavado para retirar los componentes del suero que no han reaccionado.
Una solución de inmunoglobulinas anti-IgG humana conjugadas con peroxidasa reconoce los anticuerpos de clase IgG unidos a los antígenos inmovilizados. Tras 30 minutos de incubación, el exceso de conjugado enzimático que no se ha unido específicamente se retira mediante un lavado con el tampón.
Se añade a los pocillos una solución de substrato cromogénico que contiene TMB. Tras 15 minutos de incubación se bloquea el desarrollo del color mediante la adición de la solución de interrupción. El color de la solución se vuelve amarillo. La cantidad del color desarrollado es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos IgA presentes en la muestra original.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (5 frascos, 1,2 mL cada uno)
Tampón fosfato 0,1 M, NaN_3 < 0,1%, suero humano

CAL0	**REF DCE002/09106-0**
CAL1	**REF DCE002/09107-0**
CAL2	**REF DCE002/09108-0**
CAL3	**REF DCE002/09109-0**
CAL4	**REF DCE002/09110-0**

2. Controles (2 frascos, 1,2 mL cada uno, listo para usar)
Tampón fosfato 0,1 M, NaN_3 < 0,1%, suero humano

Control negativo	**REF DCE045/09101-0**
Control positivo	**REF DCE045/09102-0**

3. Diluyente de muestra (1 frasco, 100 mL)
Tampón fosfato 0,1 M, NaN_3 < 0,1%,
REF DCE053-0

4. Conjugado (1 frasco, 15 mL)
Anti h-IgG conjugado con peroxidasa de rabano (HRP), BSA 0,1%, Proclin < 0,0015% **REF DCE002/09102-0**

5. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)
Proteinasa 3 de neutrófilos humanos absorbida en la microplaca **REF DCE002/09103-0**

6. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)
H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) *(evítese el contacto con la piel)*
REF DCE004-0

7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)
0,15M ácido sulfúrico *(evítese el contacto con la piel)*
REF DCE005-0

8. Solución de lavado conc. 10X (1 frasco, 50 mL)
Tampón fosfato 0,2M pH 7.4

REF DCE054-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.
Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8 ºC.

Atemperar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; *una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.*

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los Calibradores y de los controles se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los controles positivo y negativo deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio (NaN_3) o Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H_2O_2 a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- **ATENCIÓN**: **se ha estudiado el reactivo conjugado para garantizar la máxima sensibilidad en la determinación y, por lo tanto, si no se usa adecuadamente, podría contaminarse por agentes externos**; se recomienda utilizar consumibles (puntas, frascos, bandejas, etc.) desechables. Para determinaciones fraccionadas, tomar la cantidad necesaria exacta de conjugando y evitar volver a introducir los posibles restos en el frasco original. Además, **para determinaciones realizadas con la ayuda de instrumentación automática y semiautomática**, se recomienda, antes de usar el conjugado, realizar una fase de limpieza de la fluídica, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteinización y descontaminación resulten eficaces para evitar la contaminación del conjugado; este procedimiento se recomienda especialmente cuando el kit se procesa con analizadores que no están dotados de puntas monouso. Para tal fin, Diametra pone a su disposición por separado un reactivo descontaminante para el lavado de las agujas.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el substrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de interrupción. Tanto el sustrato como la solución de interrupción deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C_0….C_4)

Puesto que no hay disponibles preparados de referencia internacional para los anticuerpos Anti PR-3, el sistema de análisis se calibra en unidades relativas arbitrarias.
Los Calibradores son listos para usar y tienen las siguientes concentraciones:

	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4
AU/mL	0	10	20	40	160

Una vez abiertos, los Calibratores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8°C.

6.2. Preparación de la muestra

Para realizar el ensayo se pueden usar muestras de suero o plasma humano. Las muestras que se van a usar deben estar limpias. Se recomienda evitar la contaminación por hiperlipemia, aunque esta no interfiera con el análisis. Las muestras pueden conservarse refrigeradas a 2-8°C durante 5 días, o a -20 °C hasta 6 meses. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras de suero o plasma, puesto que esto podría provocar una pérdida variable de la actividad de los autoanticuerpos. No se recomienda el análisis de muestras inactivadas por calor.
Todas las muestras de suero o plasma deben prediluirse 1:100 con diluyente de muestras; por ejemplo, 10 µL de suero o plasma pueden diluirse con 990 µL de diluyente de muestras.
Los Controles son listo para usar.

6.3. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido de cada frasco de solución de lavado concentrada (10x) con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL. Mantener refrigerada: estable a 2-8 °C durante al menos 30 días tras la preparación.
En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C_0-C_4), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivos	Calibrador	Muestra/ Controles	Blanco
Calibrador C_0-C_4	**100 µL**		
Controles		**100 µL**	
Muestra diluida		**100 µL**	
Incubar 60 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar la mezcla de reacción y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida. **Nota importante**: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. **Lavados automático**: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Conjugado	**100 µL**	**100 µL**	
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28 °C). Retirar la mezcla de reacción y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida. **Lavados**: siga las mismas instrucciones del punto anterior.			
Substrato TMB	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22-28 °C), en la oscuridad.			
Solución de parada	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

- Los controles positivo para IgG Anti PR-3 y negativo deben incluirse cada vez que se realice el ensayo para asegurar que todos los reactivos y el ensayo funcionen de forma correcta.
- Puesto que los controles están prediluidos, no representan un control de procedimiento para las técnicas de dilución usadas para las muestras.
- Se pueden preparar sueros de control adicionales recogiendo un pool de sueros humanos, dividiéndolo en alícuotas y conservándolo a < -20 °C.
- Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, se deben cumplir todos los criterios siguientes. Aunque solo uno no se encuentre dentro de los valores especificados, los resultados no deberán considerarse válidos y el ensayo deberá repetirse:
  - La absorbancia del control positivo debe ser mayor que la del control negativo.
  - El control negativo y el positivo sirven para controlar un eventual malfuncionamiento de los reactivos y no aseguran la precisión en correspondencia con el valor límite del ensayo.
  - El ensayo es válido solo si la densidad óptica a 450 nm del control negativo y del control positivo, así como las de los calibradores (C_0-C_4), coinciden con los intervalos correspondientes indicados en el Certificado de control de calidad incluido en el kit.

8. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Para Anti PR-3 IgG, el método de elección para el tratamiento de los resultados es un procesamiento de 4 parámetros con ejes lin-log para la densidad óptica y la concentración respectivamente. Además, se pueden usar una aproximación spline y coordenadas log-log. Sin embargo, se recomienda usar una curva Lin-Log.
En primer lugar, calcular la media de las densidades ópticas relativas a los calibradores. Usar una hoja de papel lin-log y trazar las densidades ópticas medias de cada calibrador frente a la respectiva concentración. Dibujar la curva que mejor se aproxime a todos los puntos de calibración. Los puntos de los calibradores también pueden unirse con segmentos de línea recta. La concentración de las muestras desconocidas puede determinarse por interpolación de la curva de calibración.

9. VALORES DE REFERENCIA

En un estudio sobre los valores normales realizado con muestras de suero procedentes de donantes sanos se han determinado los siguientes intervalos de normalidad con el ensayo Anti PR-3 IgG:

Anti PR-3 (c-ANCA)	
Negativo	< 20 AU/mL
Positivo	≥ 20 AU/mL

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.
Los resultados positivos deben verificarse con relación al estado clínico del paciente. Además, cada decisión relativa a la terapia debe tomarse individualmente. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos normal y patológico de Anti PR-3 sérica.

10. LIMITACIONES DEL ENSAYO

La presencia en la muestra de complejos inmunes o de otros agregados de inmunoglobulinas puede dar lugar a reacciones no específicas con resultados falsos positivos.

11. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

11.1. Precisión y reproducibilidad

La precisión y la reproducibilidad se han evaluado comprobando 4 sueros y 1 suero de control comercial (KC). La tabla indica el “Within Run” y el “Total CV%”.

Muestra	n°	Media (AU/mL)	Within Run CV%	Total CV%
KC	20	82.0	1.8	5.9
PS1	20	7.9	6.0	14.0
PS2	20	19.5	6.2	13.8
PS3	20	22.9	3.8	12.6
PS4	20	161.6	2.5	4.4

11.2. Parámetros de diagnóstico

Ensayos de correlación frente a un kit similar de referencia disponible en el mercado, realizados con 67 sueros han mostrado:

Sensibilidad	80%
Especificidad	95%
PPV	91%
NPV	89%

11.3. Parámetros analíticos

Los parametros analiticos se han estudiado investigando el LOB (Límite de blanco), LOD (Límite de detección), LOQ (Límite de cuantificación) y la sensibilidad analítica (A.S.).
La siguiente tabla muestra los criterios del estudio y los resultados obtenidos.

	Criterios	***Resultados***
LOB	Se realizaron 60 réplicas de Cal 0, utilizadas como "blanco", en 5 sesiones diferentes	1,52
LOD	Se analizaron 6 muestras de suero bajo en 10 sesiones diferentes.	3,41
LOQ	Se analizaron 6 muestras de suero bajo en 10 sesiones diferentes.	5,69
A.S.	Se probaron 20 réplicas de Cal 0 y 5 réplicas de Cal 1. A.S. se calculó mediante regresión lineal.	0,87

11.4. Estudio de plasma

El uso de plasma con este kit se evaluó realizando la dosificación paralela entre suero y plasma perteneciente al mismo sujeto.
Se utilizaron 10 sujetos diferentes.
Se investigó el plasma obtenido con EDTA, heparina de litio, heparina de sodio y tubos SST.
La interferencia se evaluó como "significativo" si causa una diferencia en la cuantificación de la muestra entre suero y plasma > 10%.
La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

Plasma	**Cuantificación**	**Interferencia**
EDTA	-2.3%	No
Heparina de litio	-0.5%	No
Heparina de sodio	-2.2%	No
Tubos SST	-0.7%	No

Conclusión: después del estudio, las muestras de suero y plasma se pueden usar indistintamente con el kit Anti PR-3 (C-ANCA).

11.5. Interferencias

Las interferencias del kit con bilirrubina, hemoglobina y triglicéridos se probaron agregando la sustancia interferente a la muestra de suero y comparando la concentración obtenida con la misma muestra original.
Se analizaron muestras con diferente concentración inicial de Anti PR-3 (c-ANCA).
La interferencia se evaluó como "significativa" si causa una diferencia en la concentración de la muestra > 10%.
La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

Sustancia	Concentración	Interferencia
Bilirrubina	30 mg/dL	No
Hemoglobina	500 mg/dL	No
Triglicéridos	1000 mg/dL	No

Conclusión: después del estudio, no hay una interferencia significativa de bilirrubina, hemoglobina y triglicéridos en las concentraciones analizadas para el kit Anti PR-3 (C-ANCA).

12. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jennette, J.C. and Falk, R.J. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies and Associated Diseases: a Review. Am. J. Kidney Dis. 1990,Vol. XV,No. 6: 517 - 529.
2. Gross, W.L. et al. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Associated Diseases: A Rheumatologist‘s Perspective. Am. J. Kidney Dis. 1991,Vol. XVIII, No. 2: 175 - 179.
3. Wieslander, J.How are Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies Detected ? Am.J.Kidney Dis. 1991,Vol. XVIII, No. 2: 154 - 158.
4. Lesavre, P. Antineutrophil cytoplasmic antibodies antigen specificity. Am. J. Kidney Dis. 1991,Vol. XVIII, No. 2: 159 - 163.
5. Hagen, E.C. et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: a review of the antigens involved, the assays, and the clinical and possible pathogenic consequences.Blood 1993,Vol.81: 1996 - 2000.
6. Gross,W.L. et al.Immunodiagnostische und immunopathogenetische Bedeutung von Anti-Neutrophilen-Cytoplasma-Antikörpern. Deutsche Medizinische Wochenschrift 1993, Vol. 118: 191 - 199.

Ed. 09/2018 **DCM091-8**

DiaMetra S.r.l.
Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1

IVD	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção,consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 Σ = xx	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
Max  Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitaciôn de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Nûmero de catálogo Référéncès du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers

insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run

- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)

too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)

- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del substrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs