



Instruction

Wieslab[®] Capture PR3-ANCA

Enzyme immunoassay for detection of autoantibodies
against proteinase 3

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



Document No. E-23-0187-02
July, 2008

Wieslab[®] Capture PR3-ANCA	
English:	page 2
Français:	page 10
Español:	page 14
Deutsch:	seite..... 17
Italiano:	pagina 20
Dansk:	side..... 23
Norsk:	side..... 26
Svenska:	sida..... 29



CapPR3 IU



Instruction en abrégé

Utilisation

La trousse d'analyse Wieslab® Capture PR3-ANCA est un dosage immunoenzymatique (ELISA) destiné à la détection et à la détermination quantitative des anticorps IgG dirigés contre la protéinase 3 (PR3) dans le sérum humain. Le dosage est utilisé pour détecter les anticorps dans un échantillon unique de sérum. Les résultats du dosage constituent un aide dans le diagnostic d'une granulomatose de Wegener. L'analyse ne doit être réalisée que par du personnel de laboratoire qualifié.

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

Précautions

- Pour le diagnostic in vitro uniquement.
 - Les composants à base de sérum humain utilisés dans la préparation des contrôles et des étalons de la trousse ont été analysés suivant des méthodes approuvées par la FDA pour dépister la présence d'anticorps dirigés contre le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et 2 (VIH 1 et 2), contre le virus de l'hépatite C (VHC) et pour dépister la présence l'antigène de surface de l'hépatite B et ils ont produit un résultat négatif. Étant donné qu'aucune méthode de dépistage ne peut garantir complètement l'absence du VIH, du VHC, du virus de l'hépatite B ou d'autres agents infectieux, les échantillons et les réactifs d'origine humaine doivent être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.
- Les Centre de prévention et de contrôle de maladies (CDC) et l'Institut national de santé (NIH) recommandent de traiter les agents potentiellement infectieux avec précaution, conformément au niveau de biosécurité 2.
- Toutes les solutions contiennent du ProClin 300 comme conservateur. Ne jamais pipeter à la bouche ; ne pas laisser les réactifs ou les échantillons patients entrer en contact avec la peau. Les réactifs contenant du ProClin peuvent être irritants. Éviter le contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, rincer abondamment avec de l'eau.
 - Les concentrations en anticorps anti-PR3 d'un échantillon donné, déterminées avec des dosages des différents fabricants, peuvent varier en raison des différences de méthodes de dosage et de spécificité des réactifs.

Prélèvement des échantillons

Le dosage Wieslab® Capture PR3-ANCA utilise du sérum. Manipuler comme étant potentiellement infectieux.

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

Les sérums inactivés par la chaleur peuvent donner lieu à des réactions non spécifiques et ne doivent pas être utilisés.

Conserver le sérum entre 2 °C et 8 °C si le dosage doit être réalisé dans les cinq jours suivant le prélèvement. Si les échantillons doivent être conservés pendant plus longtemps, les conserver à une température inférieure ou égale à -20 °C. Ne pas utiliser de congélateur sans givre car les échantillons risqueraient d'être soumis à des cycles de congélation-décongélation, ce qui dégraderait les anticorps. Les échantillons qui ne sont pas conservés correctement ou qui sont soumis à de multiples cycles de congélation-décongélation peuvent produire des résultats erronés.

Le CLSI donne des recommandations sur la conservation des échantillons de sang (document H18A, Procédures standard approuvées pour la manipulation et le traitement des échantillons de sang, 1990).

Composants de la trousse et conservation de réactifs

- Un cadre avec 96 puits (couleur rouge) recouverts d'anticorps monoclonaux anti-protéinase 3 et de protéinase 3, un couvercle emballé dans un sachet en aluminium avec un dessiccant.
- Contrôle négatif (CN) de 1,5 ml contenant du sérum humain dans du diluant.
- Contrôle positif (CP) de 1,5 ml contenant du sérum humain dans du diluant.
- Conjugué de 13 ml contenant des anticorps anti-IgG humaines marqués à la phosphatase alcaline (couleur bleue).
- Diluant (Dil) de 2 x 32 ml contenant du PBS (couleur rouge).
- Substrat de pNPP de 13 ml.
- Solution d'arrêt de 13 ml.
- Solution de lavage de 30 ml (concentrée 30x).

- Six étalons (cinq étalons, Étal 2-6, contenant du sérum humain) dans du diluant. Étalon 1 de 1,5 ml (Étal 1) = 0 UI/ml, étalon 2 de 1,5 ml (Étal 2) = 2 UI/ml, étalon 3 de 1,5 ml (Étal 3) = 10 UI/ml, étalon 4 de 1,5 ml (Étal 4) = 30 UI/ml, étalon 5 de 1,5 ml (Étal 5) = 100 UI/ml, étalon 6 de 1,5 ml (Étal 6) = 200 UI/ml.

Tous les réactifs de la trousse sont prêts à l'emploi, à l'exception de la solution de lavage, et ils doivent être conservés entre 2 °C et 8 °C.

Retirer de l'emballage en aluminium uniquement le nombre de barrettes nécessaires pour le dosage, puis le refermer avec soin.

Matériel ou équipement nécessaire mais non fourni

- Lecteur de microplaques avec filtre de 405 nm.
- Pipettes de précision avec embouts jetables.
- Laveur de plaque pour les barrettes de puits, papier absorbant, tubes à essai et chronomètre.

PROCÉDURE

Toutes les solutions doivent être à température ambiante. Les incubations de toutes les étapes doivent être réalisées à température ambiante (18-25 °C) avec le couvercle. Incuber le sérum pendant 60 minutes, le conjugué pendant 30 minutes et le substrat pendant 30 minutes.

Préparation de la solution de lavage

Diluer 10 ml de solution de lavage concentrée (30x) dans 290 ml d'eau distillée. La solution de lavage diluée est stable jusqu'à la date de péremption de la trousse si elle est conservée entre 2 °C et 8 °C .

Dilution du sérum et incubation

Diluer le sérum du patient au 1/100 avec du diluant (990 µl de diluant +10 µl de sérum).

Pipeter 100 µl/puits, en double, d'étalon 1, 2, 3, 4, 5, 6, de contrôle positif (CP), de contrôle négatif (CN) et de sérum du patient dilué (P) conformément au diagramme suivant. Incuber pendant 60 minutes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Étal 1	Étal 5	P1									
B	Étal 1	Étal 5	P1									
C	Étal 2	Étal 6	P2									
D	Étal 2	Étal 6	P2									
E	Étal 3	CP	etc.									
F	Étal 3	CP										
G	Étal 4	CN										
H	Étal 4	CN										

Après l'incubation du sérum

Laver 3 fois avec 300 µl de solution de lavage / puits, en remplissant et en vidant les puits chaque fois ; après le dernier lavage, vider les puits en tapotant les barrettes sur du papier absorbant.

Ajout du conjugué

Pipeter 100 µl de conjugué dans chaque puits. Incuber pendant 30 minutes.

Après l'incubation du conjugué

Laver comme auparavant.

Ajout de la solution du substrat de pNPP

Pipeter 100 µl de substrat de pNPP dans chaque puits ; incuber pendant 30 minutes.

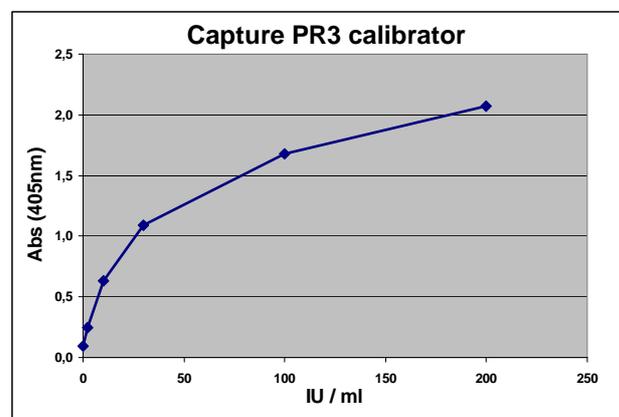
Ajout de la solution d'arrêt

Pipeter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits, puis lire l'absorbance dans les 2 heures suivantes à 405 nm sur un lecteur de microplaques.

Calculs

Tracer une courbe d'étalonnage représentant la DO en fonction des concentrations en UI/ml des 6 étalons. Les six étalons fournis ont été titrés conformément à la norme AF-CDC, ce qui correspond à une concentration de 0 UI/ml pour l'étalon 1, de 2 UI/ml pour l'étalon 2, de 10 UI/ml pour l'étalon 3, de 30 UI/ml pour l'étalon 4, de 100 UI/ml pour l'étalon 5 et de 200 UI/ml pour l'étalon 6. Extrapoler la concentration en UI/ml de l'échantillon patient à l'aide de la courbe tracée. Les concentrations supérieures à 200 UI/ml doivent être communiquées comme > 200 UI/ml ou bien répéter l'analyse avec une dilution plus grande. La trousse Wieslab® Capture PR3-ANCA est étalonnée par rapport à l'étalon international de l'AF-CDC.

Exemple :	Étalon	UI/ml	Absorbance
	1	0	0,093
	2	2	0,248
	3	10	0,633
	4	30	1,091
	5	100	1,677
	6	200	2,073



Un échantillon dont l'absorbance est de 1,529 donne une concentration en PR3-ANCA de 70 UI/ml, lue sur l'axe des abscisses. Dans cet exemple, un lissage par la méthode des 4 paramètres logistiques est appliqué.

Important : La courbe est un exemple qui ne doit pas être utilisé pour interpréter des échantillons patients réels.

Contrôle qualité

La DO de l'étalon 1 doit être < 0,2.

La DO de l'étalon 6 doit être > 1,0.

Consulter le certificat du lot pour connaître la valeur des contrôles négatif et positif.

Les contrôles positif et négatif servent à surveiller qu'il n'existe pas d'échec substantiel des réactifs. La contrôle positif ne garantit pas la précision du seuil du dosage. Il est recommandé de doser un contrôle supplémentaire correspondant au seuil du dosage. Comme le contrôle positif est prêt à l'emploi, il n'indique pas une éventuelle erreur de dilution de l'utilisateur. Il est recommandé d'utiliser un contrôle interne pour cela.

Si l'une des valeurs des contrôles se situe hors de son intervalle, le dosage doit être considéré comme invalide et doit être répété. Des contrôles supplémentaires peuvent être analysés conformément aux recommandations ou aux exigences de la réglementation nationale, régionale et/ou locale ou des organismes d'accréditation. Se référer au document C24-A du CLSI pour obtenir des recommandations sur les bonnes pratiques de CQ.

Interprétation des résultats

< 5 UI/ml = **Négatif**

5-7 UI/ml = **Indéterminé** ; répéter l'analyse, si le résultat est encore indéterminé, répéter l'analyse avec une autre méthode ou analyser un nouvel échantillon.

> 7 UI/ml = **Positif**

Limites

La concentration en anticorps d'un échantillon patient ne peut pas servir à évaluer la gravité de la maladie, car les anticorps de patients différents peuvent avoir des affinités différentes. Par conséquent, il est difficile d'obtenir une normalisation absolue des résultats. Le dosage ne doit pas servir de base unique pour décider un traitement clinique, mais il doit être utilisé en combinaison avec les symptômes cliniques et les résultats d'autres tests disponibles.

Le sérum de patients souffrant d'autres maladies auto-immunes et d'individus normaux peut contenir des auto-anticorps pouvant donner lieu à des réactions croisées. Certains individus peuvent donner un résultat positif pour les anticorps anti-PR3 avec peu ou aucun signe clinique de la maladie. D'autre part, certains patients avec une maladie active peuvent avoir une concentration indétectable de ces anticorps. Les personnes recevant dans anticorps de souris anti-humains pour un traitement ou un diagnostic ou les patients qui ont été exposés d'une autre façon à des immunoglobulines de souris peuvent produire des anticorps humains anti-souris (HAMA). Ces anticorps peuvent interférer avec les dosages qui utilisent des anticorps monoclonaux de souris et peuvent entraîner des résultats faussement élevés. Aucun traitement immunosuppresseur ne doit être démarré sur la base d'un résultat positif pour les ANCA. Le démarrage ou le changement de traitement ne doit pas se baser uniquement sur les variations des concentrations en ANCA, mais plutôt sur un examen clinique minutieux.

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

	Batch number. Numéro de lot. El número de la serie. Lot Nummer. Il numero di lotto. Lot number. Lot-nummer. Lot number.
	Product number. Référence. El número del producto. Produktzahl. Il numero di prodotto. Bestillingsnummer. Katalognummer. Produktnummer.
	Expiration date. Date d'expiration. Fecha de caducidad. Verfalldatum. La data di scadenza. Udløbsdato. Brukes innen. Utgångsdatum.
	Store at. Conserver à. Almacenar a. Lagerung bei. La conservatione. Opbevaringstemperatur. Temperaturbegrensning. Förvaringstemperatur.
	Biological material. Matériel biologique. Material biológico. Biologisches Material. Il materiale biologico. Biologisk materiale. Biologisk risiko. Biologiskt material.
	See instruction for use. Voir notice d'emploi. Siehe Anweisung zum Gebrauch. Veá la instrucción para el uso. Vedere l'istruzione per l'uso. Se brugsanvisning. Les bruksanvisningen. Se bruksanvisning.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical pour diagnostic in vitro. En vitro artefacto médico diagnóstico. In Vitro diagnostische medizinische Vorrichtung. In vitro diagnostico medico congegno. In vitro diagnostisk brug. Til In vitro diagnostisk bruk. In vitro diagnostika.
	Manufacturer. Fabricant. El fabricante. Hersteller. Il fabbricante. Producent. Tilvirker. Tillverkare.
	Number of tests. Nombre de tests. Número de pruebas. Anzahl der Tests. Numero di test. Antall tester. Antal tester. Siffror i symbolen anger antalet test.
	Irritant, Harmful. Irritant, Nocif. Irritante, Nocivo. Reizend, Gesundheitsgefährdend. Irritante, Nocivo. Irriterende, Helsefarlig. Irriterande, Hälssofarlig. Irriterande, hälsofarlig.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Washsolution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffer 30x koncentreret. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
SOLN STOP	Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de Parada. Stopplösung. Soluzione bloccante. Stopløsning. Stoppløsning. Stopplösning.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

Performance characteristics

Table 1. Clinical sensitivity and specificity. A total of 377 frozen retrospective sera with clinical characterisation were assayed. The following table summarises the results

Control and Disease groups	Total number	Negative < 5 IU/mL	Equivocal 5 - 7 IU/mL	Positive > 7 IU/mL
Blood donors:	120	120	0	0
WG:	83	3	1	79
MP:	79	56	2	21
SLE:	14	13	1	0
RA:	14	14	0	0
Sjögren's syndrome	12	11	0	1
GBM:	55	51	0	4

WG = Wegener's granulomatosis, MP = microscopic polyangiitis
 SLE = systemic lupus erythematosus RA = rheumatoid arthritis
 GBM = glomerular basement membrane

Clinical sensitivity (equivocal samples excluded from calculations)

WG = $79/82 = 96.3\%$ 95% CI = 89.7-99.2 %

MP = $21/77 = 27.3\%$ 95% CI = 17.7-38.6 %

Clinical specificity (equivocal samples excluded from calculations)

GBM = $51/55 = 92.7\%$ 95% CI = 82.4-98.0 %

SLE = $13/13 = 100\%$ 95% CI = 75.3-100 %

RA = $14/14 = 100\%$ 95% CI = 76.8-100 %

Normal = $120/120 = 100\%$ 95% CI = 97.0-100 %

Sjögren's syndrome = $11/12 = 91.7\%$ 95% CI = 61.5-99.8 %

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

Table 2. Agreement between the Capture PR3-ANCA kit and an alternative ELISA. A total of 377 frozen retrospective sera were assayed. The following table summarises the results.

Wieslab® Capture PR3-ANCA kit					
Alternative ELISA		Positive	Equivocal	Negative	Total
	Positive	103	1	0	104
	Equivocal	1	2	0	3
	Negative	1	1	268	270
	Total	105	4	268	377

Sera falling in the equivocal range were excluded from the following calculations

Positive Percent Agreement: = $103/103 = 100\%$ 95% CI = 96.5-100 %

Negative Percent Agreement: = $268/269 = 99.6\%$ 95% CI = 97.9-100 %

Overall Percent Agreement = $371/372 = 99.7\%$ 95% CI = 98.5-100 %

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

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

	1	2	3	4	5	6
Mean value (IU/mL)	3	6	7	18	30	44
SD	0.48	0.96	0.75	2.62	4.05	7.76
% CV	15	17	10	14	14	18

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

	1	2	3	4	5	6
Mean value (IU/mL)	4	7	9	21	37	56
SD	0.47	0.67	1.09	2.97	4.90	9.22
% CV	11	10	12	14	13	16

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

	1	2	3	4	5	6
Mean value (IU/mL)	7	8	13	29	53	70
SD	0.69	0.43	0.94	0.57	1.84	4.49
% CV	10	5	7	2	3	6

Table 6. Dilution recovery was determined by testing five serial dilutions for three different samples.

Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (IU/mL)	Calculated Concentration (IU/mL)	Dilution Corrected % Recovery
1	1/100	194	194	100
	1/200	114	97	85
	1/400	52	49	93
	1/800	24	24	101
	1/1600	11	12	110
Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (IU/mL)	Calculated Concentration (IU/mL)	Dilution corrected % Recovery
2	1/100	120	120	100
	1/200	65	60	92
	1/400	34	30	88
	1/800	16	15	94
	1/1600	6	8	125
Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (IU/mL)	Calculated Concentration (IU/mL)	Dilution corrected % Recovery
3	1/100	73	73	100
	1/200	37	37	99
	1/400	16	18	114
	1/800	7	9	130
	1/1600	3	5	152

Since patient sera contain heterogeneous antibody populations some samples may exhibit non-linearity, especially at very high sample dilutions.

Troubleshooting

Problem:	Possible causes:	Corrective action:
One or more calibrators out of range.	<ol style="list-style-type: none"> 1. One or more reagents not added, or added in wrong sequence. 2. Improper pipetting. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Test invalid. Repeat test. 2. Test invalid. Repeat test.
Control values out of range.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Incorrect temperature, timing or pipetting; reagents not mixed. 2. Cross contamination of controls. 3. Improper dilution. 4. Optical pathway not clean. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Check that the time and temperature was correct. See "Poor precision" below. Repeat test. 2. Pipette carefully. 3. Repeat test. 4. Check for dirt or air bubbles in the wells. Wipe bottom and reread.
All test results negative.	<ol style="list-style-type: none"> 1. One or more reagents not added, or added in wrong sequence. 2. Antigen coated plate inactive. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Recheck procedure. Check for unused reagent. Repeat test. 2. Check for obvious moisture in unused wells. Wipe bottom and reread.
All test results yellow.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Contaminated buffers or reagents. 2. Washing solution contaminated. 3. Improper dilution of serum. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Check all solutions for turbidity. 2. Use clean container. Check quality of water solution used to prepare. 3. Repeat test.
Poor precision.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pipette delivery CV greater than 5%. 2. Serum or reagents not mixed sufficiently or not equilibrated to room temperature. 3. Reagent addition taking too long; inconsistency in timing intervals. 4. Optical pathway not clean. 5. Washing not consistent; trapped bubbles; washing solution left in the wells. 6. Improper pipetting. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Check calibration of pipette. Use reproducible technique. 2. Mix all reagents gently but thoroughly and equilibrate to room temperature. 3. Develop consistent uniform technique and use multi-tip device or auto dispenser to decrease time. 4. Check for air bubbles in the wells. Wipe bottom and reread. 5. Check that all wells are filled and aspirated uniformly. Dispense liquid above level of reagent in well. After the last wash, empty the wells by tapping the strip on an absorbent tissue. 6. Avoid air bubbles in pipette tips.

References:

- 1. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Proteinase 3, in van Venrooij W, Maini R (eds): Manual of
- 2. Jenne DE. Et al.** Wegeners autoantigen decoded. Nature 1990; 346:520. Biological Markers of Disease. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 3. Wieslander J, Wiik A.** ANCA antigens: Myeloperoxidase, in van Venrooij W, Maini R (eds): Manual of Biological Markers of Disease. Dordrecht, Kluwer; 1994:1-9.
- 4. Jennette C, Falk R, review.** Small vessel vasculitis. New Engl J Med 1997, 337, 1512-
- 5. Segelmark M. et al.** Heterozygosity for the alpha 1-antitrypsin PiZ gene affects the outcome of PR3-ANCA positive vasculitis. Kidney Int 1995, 48, 844-850.
- 6. Boomsma MM. et al.** Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. Arthritis Rheum, 2000, 43 2025-33
- 7. Baslund B. et al.** Screening for ANCA: is IIF the method of choice. Clin Exp J Imm. 1995,99, 486-492.
- 8. Westman K. et al.** Clinical evaluation of a Capture ELISA for detection of proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasmic antibody. Kidney Int 53: 1230-1236 1998
- 9. Westman K. et al.** Relaps rate, renal survival and cancer morbidity in patients with Wegener's granulomatosis or microscopic polyangiitis with renal involvement. J Am Soc Nephrol 9: 842-852, 1998
- 10. Segelmark M. et al.** How and why should we detect ANCA ? Clin Exp Rheumatol 2000, 18, 629-635.
- 11. Arranz O. et al.** Comparison of anti-PR3 capture and anti-PR3 direct ELISA for detection of ANCA in long-term clinical follow-up of PR3-ANCA-associated vasculitis patients. Clinical Nephrology 2001, 56, 295-301.
- 12. Giesslen K. et al.** Relationship between ANCA determined with conventional binding and the capture assay and long-term clinical course in vasculitis. I. Intern Med 2002, 251,0129-135.
- 13. Csernok E, Ahlquist D, Ullrich S, Gross W.L.** A critical evaluation of commercial immunoassays for antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 and myeloperoxidase in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis.