



DCM091-10

Ed. 01/2024

Anti PR-3 (c-ANCA)

per analisi di routine

Determinazione quantitativa degli anticorpi di classe IgG contro la proteinasi 3 (PR-3) nel siero o nel plasma umano

IVD

LOT

Vedere l'etichetta
esterna2 °C  8 °C $\Sigma = 96$ test

REF DKO091

1. SCOPO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro*

Per uso professionale in laboratorio

Il dosaggio Anti PR-3 (c-ANCA) è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione quantitativa di anticorpi di classe IgG diretti contro la proteinasi 3 (PR-3) nel siero o nel plasma umano da una popolazione adulta. I risultati devono essere impiegati in associazione ad altri dati clinici e di laboratorio come ausilio nella diagnosi di determinate vasculiti autoimmuni, come ad esempio la granulomatosi di Wegener.

2. RILEVANZA CLINICA

La proteinasi 3 (PR-3 o PR3) è una piccola serina proteasi localizzata nei granuli primari e nelle vescicole secretorie del citoplasma dei neutrofili. La PR3 è immagazzinata nei granuli citoplasmatici dei neutrofili a riposo, mentre l'espressione della proteina sulla superficie cellulare aumenta durante l'attivazione dei neutrofili e durante l'apoptosi¹. La PR3 si trova anche nelle trappole extracellulari dei neutrofili (NET), che consistono in cromatina rilasciata dai neutrofili come difesa dagli agenti patogeni.

Gli autoanticorpi contro la PR3 sono frequentemente rilevati in una classe specifica di vasculiti autoimmuni, nota come vasculite associata (AAV) agli autoanticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA). Queste vasculiti sono caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi contro i componenti citoplasmatici dei neutrofili, che possono avere una colorazione citoplasmatica (c-ANCA) o perinucleare (p-ANCA)¹⁻³.

Il meccanismo dell'autoimmunità per gli antigeni ANCA non è ancora stato valutato. I neutrofili attivati possono subire l'apoptosi creando i NET, che sono coinvolti nell'induzione dell'infiammazione. La persistenza dei NET durante l'infezione può portare a una risposta autoimmune^{3,4}. L'aumento dell'espressione di MPO e PR3 nei neutrofili e nei monociti può influenzare la risposta autoimmune patogena che porta all'attivazione dei neutrofili correlata ad ANCA³.

Le vasculiti ANCA-associate sono classificate come vasculiti dei piccoli vasi (SVV), che colpiscono prevalentemente i piccoli vasi, le arterie intraparenchimali, le arteriole, i capillari e le venule⁵. Le vasculiti ANCA-associate sono vasculiti necrotizzanti caratterizzate dalla mancanza di depositi immunitari nelle pareti dei vasi, che causano condizioni come la poliangioite microscopica (MPA) e la granulomatosi con poliangioite (GPA, precedentemente nota come sindrome di Wegner).

La frequenza del sierotipo (MPO o PR3), la manifestazione clinica e la distribuzione geografica delle vasculiti ANCA-associate variano, suggerendo un ruolo dell'ambiente e del background genetico dei pazienti affetti da questa categoria di patologie^{1,3,6}.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Anti PR-3 (c-ANCA) è un dosaggio immunometrico enzimatico indiretto (ELISA) in cui l'anticorpo anti-PR3 presente nel campione si lega alla proteinasi 3 neutrofila umana rivestita nella micropiastra (fase solida). Eventuali anticorpi presenti nei calibratori, nei controlli o nei campioni prediluiti dei pazienti si legano alla superficie interna dei pozzetti. Dopo un'incubazione di 60 minuti, la micropiastra viene lavata per rimuovere i componenti non reattivi del siero. Nella seconda fase, una soluzione coniugata con perossidasi di rafano (HRP) anti-IgG umane si lega agli anticorpi di classe IgG legati agli antigeni immobilizzati. Dopo un'ulteriore fase di incubazione, il coniugato enzimatico in eccesso, che non è specificamente legato, viene lavato via.

Una soluzione di substrato cromogenico contenente TMB viene quindi erogata nei pozzetti. Dopo un'ulteriore fase di incubazione, l'enzima HRP nella parte legata reagisce con il substrato (H₂O₂) e il substrato TMB, sviluppando un colore blu che cambia in giallo quando viene aggiunta la soluzione di arresto (H₂SO₄). L'intensità del colore è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi IgG nel campione.

La concentrazione di anticorpi IgG anti-PR3 nel campione viene calcolata mediante una curva di calibrazione.

4. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

4.1. Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibratori (5 fiale, 1,2 mL ciascuna)

Tampone fosfato 0,1 M, 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. Controlli (2 fiale, 1,2 mL ciascuna)

Tampone fosfato 0,1 M, NaN_3 <0,1%, siero umano

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

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

3. Diluente per campione (1 fiala, 100 mL)

Tampone fosfato 0,1 M, NaN_3 <0,1%

REF DCE053-0

4. Coniugato (1 fiala, 15 mL)

Coniugato anti h-IgG con perossidasi di rafano (HRP), BSA 0,1%, ProClin >0,0015%

REF DCE002/09102-0

5. Micropiastra rivestita (1 micropiastra frangibile)

Micropiastra rivestita con proteinasi 3 neutrofila umana

REF DCE002/09103-0

6. Substrato TMB (1 fiala, 15 mL)

H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (evitare qualsiasi contatto con la pelle).

ProClin <0,0015% **REF** DCE004-0

7. Soluzione di arresto (1 fiala, 15 mL)

Acido solforico 0,15 M (evitare qualsiasi contatto con la pelle)

REF DCE005-0

8. Soluzione di lavaggio conc. 10X (1 fiala, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2 M, pH 7,4, ProClin >0,0015%

REF DCE054-0

4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

4.3. Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico

Pipette di precisione

Letto di micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
-  Il materiale di origine animale utilizzato nella preparazione del kit è stato ottenuto da animali certificati come sani e la proteina bovina è stata ottenuta da Paesi non infettati dalla BSE, ma tali materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti (coniugato e soluzione di lavaggio) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.

- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Contiene: ProClin 300

Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Alcuni reagenti (calibratori, controlli e diluente per campioni) contengono piccole quantità di l'azoturo di sodio <0,1% può essere tossico se ingerito o assorbito attraverso la pelle o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame per formare azoturi metallici potenzialmente esplosivi. Se si utilizza un lavandino per rimuovere i reagenti, lavare con abbondante acqua per evitare l'accumulo di azoturi.
- Il substrato TMB contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito per via cutanea. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con pelle e occhi.
- La soluzione di arresto consiste in una soluzione diluita di acido solforico. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire ustioni chimiche, evitare il contatto con pelle e occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/ H_2O_2 a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

6. PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2-8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente convalidato per il suo utilizzo/scopo previsto.

- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, **itterici** o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- AVVERTENZA: il reagente coniugato è progettato per garantire la massima sensibilità per la dose e può essere contaminato da agenti esterni se non utilizzato correttamente;** pertanto, si raccomanda di utilizzare materiali di consumo monouso (puntali, flaconi, vassoi, ecc.). Per le dosi divise, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria e non reintrodurre alcun prodotto di scarto nel flacone originale. Inoltre, **per le dosi erogate con l'ausilio di dispositivi automatici e semiautomatici**, prima di utilizzare il coniugato, è consigliabile pulire il sistema per la gestione dei fluidi, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci per evitare la contaminazione del coniugato; **questa procedura è altamente raccomandata quando il kit viene elaborato con analizzatori non dotati di puntali monouso.** A tale scopo, DiaMetra fornisce un reagente di decontaminazione separato per la pulizia degli aghi.
- Quando si pipettano i reagenti del dosaggio, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare puntali monouso nuovi per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2-8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, il kit è stabile a 2-8 °C per 6 mesi.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastra rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su campioni di siero (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o plasma (litio eparina, sodio eparina o EDTA di potassio).

Conservazione dei campioni	Durata
2-8 °C	96 ore
Cicli di congelamento/scongelamento	3 cicli

9. PROCEDURA

9.1. Preparazione di calibratori e controlli

Poiché non è disponibile una preparazione di riferimento internazionale per gli anticorpi anti-proteinasi 3, il sistema di analisi è calibrato in unità arbitrarie relative. I calibratori sono pronti per l'uso e hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	10	20	40	160

I controlli sono pronti per l'uso; la concentrazione del controllo è stampata sull'etichetta.

9.2. Preparazione del coniugato

Il coniugato è pronto per l'uso. Miscelare delicatamente per 5 minuti in un mixer a rotazione.

9.3. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Soluzione di lavaggio conc. 10X" con acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:10.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura anche di trasferire completamente i cristalli sciogliendo il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

9.4. Preparazione dei campioni

La determinazione delle IgG Anti PR-3 può essere eseguita in campioni di siero o plasma umano.

Tutti i campioni di siero o plasma devono essere prediluiti con diluente per campione 1:100; ad esempio, 10 µL di campione devono essere diluiti con 990 µL di diluente per campione.

Non sono necessari campioni a digiuno e non sono richieste preparazioni speciali dei campioni.

Raccogliere il sangue mediante puntura venosa in contenitori vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule mediante centrifugazione. Non è raccomandata l'analisi di campioni inattivati al calore.

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione.

9.5. Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2-8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2-8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati del test, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₄), due per ogni controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controlli	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₄	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (22- 28 °C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita. Nota importante: durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente. Lavatore automatico: se si utilizzano apparecchiature automatiche, lavare i pozzetti almeno 5 volte.			
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (22- 28 °C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita. Lavaggio: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL

Incubare per 15 minuti, al buio, a temperatura ambiente (22-28 °C).

Soluzione di arresto	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 o contro il bianco entro 5 minuti.			

10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DiaMetra raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e % CV. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi⁷.

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. È necessario un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) **che includa il calibratore 0**. È possibile utilizzare un adattamento uniforme della curva spline o un grafico doppio-logaritmico che includa il calibratore 0. Gli altri algoritmi di adattamento della curva non sono raccomandati.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e

la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

Affinché i risultati del test siano considerati validi, devono essere soddisfatti tutti i criteri elencati di seguito. Se una qualsiasi di queste condizioni non è soddisfatta, il test deve essere considerato non valido e il dosaggio deve essere ripetuto:

- L'assorbanza del controllo positivo IgG PR-3 prediluito deve essere maggiore dell'assorbanza del controllo negativo prediluito.
- I controlli negativi e positivi hanno lo scopo di monitorare l'errore sostanziale del reagente e non garantiscono la precisione del cut-off del dosaggio.
- Questo test è valido solo se la densità ottica a 450 nm per il controllo negativo e il controllo positivo nonché per il calibratore C₀-C₄ rientra nel rispettivo intervallo indicato sul Certificato di controllo qualità allegato a ciascun kit del test: se uno qualsiasi di questi criteri non è soddisfatto, i risultati non sono validi e il test deve essere ripetuto.

12. INTERVALLO DI MISURAZIONE

L'intervallo di misurazione del dosaggio (AMR) è 3-160 AU/mL.

Qualsiasi valore inferiore 3 AU/mL deve essere indicato come "< 3 AU/mL". Qualsiasi valore superiore a 160 AU/mL deve essere indicato come "> 160 AU/mL".

13. METROLOGIA E TRACCIABILITÀ

I calibratori di questo kit sono tracciabili al siero umano di riferimento n. 16 per anti-proteinasi 3, Centres for Disease Control (CDC) n. catalogo Ab IS2721.

14. VALORI ATTESI

I seguenti intervalli sono stati determinati utilizzando il dosaggio Anti PR-3 (c-ANCA) e sono forniti unicamente a scopo informativo. Il 90% degli intervalli di riferimento per adulti apparentemente sani è stato calcolato attraverso un metodo non parametrico secondo le linee guida tratte dal documento CLSI C28-A3 "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

N. di soggetti	73
Media (AU/mL)	8,71
DS (AU/mL)	3,21
Mediana (AU/mL)	8,12
Intervallo di riferimento (AU/mL)	4,19-14,40

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

15. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Concentrazione	Interpretazione
< 16 AU/mL	Il campione deve essere considerato negativo
16-20 AU/mL	Il campione deve essere classificato equivoco e la ripetizione dei test/campionamenti deve essere eseguita secondo le pratiche interne
≥ 20 AU/mL	Il campione deve essere considerato positivo

L'indice e l'interpretazione sopra indicati devono essere considerati esclusivamente come linee guida. I risultati positivi devono essere verificati relativamente all'intero stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione per la terapia deve essere presa in base alle condizioni di ciascun paziente.

È consigliabile che ogni laboratorio stabilisca i propri intervalli normali e patologici di anti-PR3.

16. CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

16.1. Capacità di rilevamento

Il limite del bianco (LoB), il limite di rilevamento (LoD) e il limite della determinazione quantitativa (LoQ) sono stati definiti basandosi sulla procedura CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" utilizzando 6 bianchi e 6 campioni a basso livello.

Sensibilità	Concentrazione
Limite del bianco (LoB)	0,6 AU/mL
Limite di rilevamento (LoD)	1,6 AU/mL
Limite della determinazione quantitativa (LoQ)	3,2 AU/mL

16.2. Esattezza

L'esattezza è stata dimostrata attraverso un test di recupero del dosaggio Anti PR-3 (c-ANCA) con il siero di riferimento umano n.16 per anti-proteinasi 3, Centres for Disease Control and Prevention (CDC).

16.3. Precisione

La precisione del dosaggio Anti PR-3 (c-ANCA) è stata determinata eseguendo un complesso studio di precisione.

Ripetibilità: un totale di 6 campioni di è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori. I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (AU/mL)	Intra-test (ripetibilità)	
			DS	% CV
1	75	16,51	0,96	5,8%
2	75	23,94	0,93	3,9%
3	75	40,03	1,23	3,1%
4	75	59,68	3,40	5,7%
5	75	86,96	2,80	3,2%
6	75	136,70	6,24	4,6%

Riproducibilità: un totale di 6 campioni di è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori. I risultati per i dati combinati di due lotti sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (AU/mL)	All'interno del laboratorio (riproducibilità)	
			DS	% CV
1	150	16,57	1,49	9,0%
2	150	23,95	1,53	6,4%
3	150	40,59	2,67	6,6%
4	150	60,11	4,15	6,9%
5	150	86,69	6,12	7,1%
6	150	137,19	9,63	7,0%

16.4. Linearità

La linearità è stata valutata in base al documento CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Per la concentrazione di anti-PR3 mediante il dosaggio Anti PR-3 (c-ANCA), la procedura di misurazione mostra linearità per l'intervallo compreso tra 1,73 e 162,62 AU/mL entro la deviazione ammissibile di linearità (ADL) di $\pm 15\%$.

16.5. Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità e la specificità sono state determinate in base al documento CLSI EP-24 "Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves" utilizzando 73 campioni negativi e 50 positivi eseguiti su due lotti di reagenti.

		DKO091		Totale
		Positivo	Negativo	
Stato reale	Positivo	50	0	50
	Negativo	2	71	73
Totale		52	71	123

Sensibilità diagnostica: 100%

Specificità diagnostica: 97,3%

16.6. Interferenti

Le seguenti sostanze non interferiscono con un bias $> \pm 15\%$ nel dosaggio Anti PR-3 (c-ANCA) quando le concentrazioni sono inferiori alla soglia dichiarata presentata nella tabella seguente.

Reagente potenzialmente interferente	Concentrazione di soglia
Bilirubina, coniugata	15 mg/dL
Bilirubina, non coniugata	15 mg/dL
Emoglobina	200 mg/dL
Proteine totali	10 g/dL
Trigliceridi	500 mg/dL

16.7. Studio su siero-plasma

È stato condotto uno studio di confronto tra matrici del dosaggio Anti PR-3 (c-ANCA) per valutare la differenza tra i tipi di provette (provette per la separazione del siero (SST), per plasma in litio eparina, per plasma in sodio eparina e plasma in K2 EDTA) rispetto ai campioni di controllo (siero tappo rosso, senza additivo) secondo le linee guida CLSI EP9-A3. È stato valutato un totale di 20 campioni (16 nativi, 4 additivati o diluiti) per coprire l'intervallo da 2,80 a 74,40 AU/mL. L'analisi di regressione lineare è stata effettuata su dati comparativi:

Tipo di campione	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (AU/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
SST	1,0 [da 0,97 a 1,08]	0,14 [da -1,17 a 1,45]	0,99
Litio eparina	1,1 [da 1,06 a 1,21]	-0,46 [da -2,09 a 1,17]	0,99
Sodio eparina	1,1 [da 1,05 a 1,14]	-0,91 [da -1,88 a 0,06]	1,00
EDTA	1,1 [da 1,0 a 1,12]	0,00 [da -1,79 a 1,78]	0,99

17. LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*⁸. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere

soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

18. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

Tutti i materiali che sono entrati in contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

19. BIBLIOGRAFIA

1. Cornec D, Cornec-Le Gall E, Fervenza FC, Specks U. ANCA-associated vasculitis - clinical utility of using ANCA specificity to classify patients. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Oct;12(10):570-9.
2. Rasmussen N, Wiik A, Jayne DR. A historical essay on detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Nephrol Dial Transplant*. 2015 Apr;30 Suppl 1:i8-13.
3. Jennette JC, Nachman PH. ANCA Glomerulonephritis and Vasculitis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017 Oct 6;12(10):1680-1691.
4. Grau RG. Drug-Induced Vasculitis: New Insights and a Changing Lineup of Suspects. *Curr Rheumatol Rep*. 2015 Dec;17(12):71.
5. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, *et al*. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum*. 2013 Jan; 65(1):1-11
6. Alberici F, Martorana D, Vaglio A. Genetic aspects of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant*. 2015 Apr;30 Suppl 1:i37-45.
7. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
8. Boscatto, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

20. IDENTIFICATORE DELLE REVISIONI

Le aggiunte o le modifiche alle istruzioni per l'uso sono indicate dall'evidenziazione in grigio.

21. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regolamento 2017/746/UE relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM091-10



DCM091-10

Ed. 01/2024

Anti PR-3 (c-ANCA)

for routine analysis

Quantitative 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

1. INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use
For Laboratory Professional Use

Anti PR-3 (c-ANCA) assay is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of IgG class autoantibodies against proteinase 3 (PR-3) in human serum or plasma from an adult population. Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data as an aid in the diagnosis of certain autoimmune vasculitides such as Wegener's granulomatosis.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Proteinase 3 (PR-3 or PR3) is a small serine protease located in the primary granules and secretory vesicles in the cytoplasm of neutrophils. PR3 is stored in the cytoplasmic granules in resting neutrophils, whilst the expression of the protein on cell surface increases during the activation of neutrophils and during apoptosis¹. PR3 is also found in neutrophil extracellular traps (NETs), that consist of chromatin released by neutrophils as defence against pathogens.

Autoantibodies against the PR3 are frequently detected in a specific class of autoimmune vasculitides known as Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) associated vasculitis (AAV). These vasculitides are characterised by the presence of autoantibodies against cytoplasmic components of neutrophils that may have, cytoplasmatic staining (c-ANCA) or a perinuclear staining (p-ANCA)¹⁻³.

The mechanism of autoimmunity for ANCA antigens is not still being evaluated. Activated neutrophils can undergo apoptosis creating NETs, which are involved in the induction of inflammation. Persistence of NETs during the infection can lead to an autoimmune response^{3,4}. Increased expression of MPO and PR3 in neutrophils and monocytes can influence the pathogenic autoimmune response leading to ANCA-neutrophils activation³.

ANCA-associated vasculitides is classified as small vessel vasculitis (SVV), which predominantly affect the small vessels, intraparenchymal arteries, arterioles, capillaries and venules⁵. ANCA-associated vasculitides are necrotising vasculitis characterised by a lack of immune deposits in

vessel walls causing conditions such as Microscopic polyangiitis (MPA) and Granulomatosis with polyangiitis (GPA, formerly known as Wegner's syndrome).

The frequency of serotype (MPO or PR3), clinical manifestation and geographic distribution of ANCA-associated vasculitides varies, suggesting a role of the environment and the genetic background of patients affected by this category of pathologies^{1,3,6}.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The Anti PR-3 (c-ANCA) assay is an indirect enzyme immunometric assay (ELISA) where anti- PR3 (antibody) in the sample binds to human neutrophil proteinase 3 coated into the microplate (solid phase). In the first step the antibodies in calibrators, controls or prediluted patient samples bind to the inner surface of the wells. After a 60-minute incubation, the microplate is washed to remove non-reactive serum components. In the second step an anti-human-IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugated solution binds to the IgG class antibodies bound to the immobilised antigens. After a further incubation step, any excess enzyme conjugate which is not specifically bound is washed away.

A chromogenic substrate solution containing TMB is then dispensed into the wells. After a further incubation step, the enzyme HRP in the bound fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added. The colour intensity is directly proportional to the concentration of IgG antibodies in the sample.

The concentration of anti- PR3 IgG antibodies in the sample is calculated through a calibration curve.

4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

4.1. 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%, contains 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). Contains

ProClin™ <0.0015% **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, contains ProClin™

>0.0015% **REF** DCE054-0

4.2. Materials required but not provided

Distilled water

4.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Precision Pipetting Devices

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

5. 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.
-  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 (conjugate and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.

- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- Some reagents (calibrators, controls and sample diluent) contain small amounts of Sodium Azide (NaN_3) <0.1% which 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, wash through with large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which 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, 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 direct sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

6. 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.
- 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.
- 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 lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- **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, deproteinisation and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analysers which are not equipped with disposable tips.** For this purpose, Diametra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8°C in the dark.

- The kit is stable at 2 – 8°C until the expiry date stated on the external kit label.
- Once opened, the kit is stable at 2 – 8°C for 6 months.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin, or potassium EDTA) samples.

Sample Storage	Duration
2 – 8 °C	96 hours
Freeze/thaw cycles	3 cycles

9. PROCEDURE

9.1. Preparation of Calibrators and Controls

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

The controls are ready to use; the concentration of the control is printed on the label.

9.2. Preparation of the Conjugate

The conjugate is ready to use. Mix gently, for 5 minutes, on a roller mixer.

9.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial "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.

It is possible to observe the presence of crystals within the concentrated wash solution; 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 also to transfer crystals completely by rinsing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

9.4. Preparation of Samples

The determination of Anti PR-3 IgG can be performed in human serum or plasma samples.

All serum or plasma samples must be prediluted 1:100 with sample diluent; for example, 10 µL of sample should be diluted with 990 µL of sample diluent.

Fasting samples are not necessary and no special sample preparations are required.

Collect blood by venepuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation. Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a roller mixer.

9.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, immediately store the reagents at 2-8°C: avoiding 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

(C₀-C₄), 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.			

10. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit controls provided in the kit should be tested as unknowns and are intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

The mean concentration of each control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

DiaMetra recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run,

including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories⁷.

11. CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) curve fit, **including Calibrator 0 is required**. A smoothed spline and log-log fit including Calibrator 0 can be used. Other curve fitting algorithms are not recommended.

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Calibrator 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

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 Control must be greater than the absorbance of the prediluted Negative Control.
- The negative and positive controls are intended to monitor for substantial reagent failure and they will not ensure precision at the assay cut-off.
- This test is only valid if the optical density at 450 nm for Negative Control and Positive Control as well as for the Calibrator C₀-C₄ 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.

12. MEASURING RANGE

The assay measuring range (AMR) is 3 – 160 AU/mL.

Any value that reads below 3 AU/mL should be reported as “< 3 AU/mL”. Any value that reads above 160 AU/mL should be reported as “> 160 AU/mL”.

13. METROLOGY AND TRACEABILITY

The calibrators of this kit are traceable to the Centres for Disease Control and Prevention (CDC) Human Reference Serum #16 for Anti-Proteinase 3 Ab Catalogue #IS2721.

14. EXPECTED VALUES

The following ranges were determined using the Anti PR-3 (c-ANCA) assay and are provided for information only. The 90 % reference interval for apparently healthy adults were calculated by a non-parametric method following guidance from CLSI C28-A3 "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

No. of subjects	73
Mean (AU/mL)	8.71
SD (AU/mL)	3.21
Median (AU/mL)	8.12
Reference Interval (AU/mL)	4.19 – 14.40

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

15. INTERPRETATION OF RESULTS

Concentration	Interpretation
< 16 AU/mL	The sample should be considered negative
16 – 20 AU/mL	The sample should be graded equivocal and repeat testing / sampling should be performed according to internal practices
≥ 20 AU/mL	The sample should be considered positive

The above index and interpretation should be considered as guidelines only. Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also, every decision for therapy should be taken on an individual patient basis.

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of anti- PR3.

16. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

16.1. Detection Capability

The limit of blank (LoB), limit of detection (LoD) and limit of quantitation (LoQ) were determined with guidance from CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" using 6 blanks and 6 low level samples.

Sensitivity	Concentration
Limit of Blank (LoB)	0.6 AU/mL
Limit of Detection (LoD)	1.6 AU/mL
Limit of Quantitation (LoQ)	3.2 AU/mL

16.2. Trueness

Trueness has been demonstrated through a recovery test of the Anti PR-3 (c-ANCA) assay with the human Anti-Proteinase 3 reference serum #16 from the Centres for Disease Control and Prevention (CDC).

16.3. Precision

Precision of the Anti PR-3 (c-ANCA) assay was determined by performing a complex precision study.

Repeatability: A total of 6 samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators.

Data from one representative lot is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (AU/mL)	Within run (Repeatability)	
			SD	CV%
1	75	16.51	0.96	5.8%
2	75	23.94	0.93	3.9%
3	75	40.03	1.23	3.1%
4	75	59.68	3.40	5.7%
5	75	86.96	2.80	3.2%
6	75	136.70	6.24	4.6%

Reproducibility: A total of 6 samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators

Results for the combined data from two lots is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (AU/mL)	Within Laboratory (Reproducibility)	
			SD	CV%
1	150	16.57	1.49	9.0%
2	150	23.95	1.53	6.4%
3	150	40.59	2.67	6.6%
4	150	60.11	4.15	6.9%
5	150	86.69	6.12	7.1%
6	150	137.19	9.63	7.0%

16.4. Linearity

Linearity was evaluated based on CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". For anti- PR3 concentration by Anti PR-3 (c-ANCA) assay, the measurement procedure shows linearity for the interval from 1.73 to 162.62 AU/mL within the allowable deviation of linearity (ADL) of ±15 %.

16.5. Diagnostic Sensitivity and Specificity

The sensitivity and specificity were determined with guidance from CLSI EP-24 "Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves" using 73 negative and 50 positive samples run on a single reagent lot.

		DKO091		Total
		Positive	Negative	
True state	Positive	50	0	50
	Negative	2	71	73
Total		52	71	123

Diagnostic sensitivity: 100%

Diagnostic specificity: 97.3%

16.6. Interferents

The following substances do not interfere with a bias of $> \pm 15\%$ in the Anti PR-3 (c-ANCA) assay when the concentrations are below the stated threshold presented in the following table.

Potentially Interfering Reagent	Threshold Concentration
Bilirubin, conjugated	15 mg/dL
Bilirubin, unconjugated	15 mg/dL
Haemoglobin	200 mg/dL
Total Protein	10 g/dL
Triglycerides	500 mg/dL

16.7. Serum-plasma study

The Anti PR-3 (c-ANCA) assay matrix comparison study was performed to evaluate the difference across tube types (serum separator tubes (SST), lithium heparin plasma, sodium heparin plasma and K2 EDTA plasma) versus the control samples (red top serum, without additive) following CLSI EP9-A3 guidelines. A total of 20 samples (16 native, 4 spiked or diluted) to cover the range of 2.80 to 74.40 AU/mL were evaluated. Linear regression analysis was performed on the comparative data:

Sample type	Slope [95% CI]	Intercept (AU/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
SST	1.0 [0.97 to 1.08]	0.14 [-1.17 to 1.45]	0.99
Lithium Heparin	1.1 [1.06 to 1.21]	-0.46 [-2.09 to 1.17]	0.99
Sodium Heparin	1.1 [1.05 to 1.14]	-0.91 [-1.88 to 0.06]	1.00
EDTA	1.1 [1.0 to 1.12]	0.00 [-1.79 to 1.78]	0.99

17. LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.

- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays⁸. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.

18. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

19. BIBLIOGRAPHY

1. Cornec D, Cornec-Le Gall E, Fervenza FC, Specks U. ANCA-associated vasculitis - clinical utility of using ANCA specificity to classify patients. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Oct;12(10):570-9.
2. Rasmussen N, Wiik A, Jayne DR. A historical essay on detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Nephrol Dial Transplant*. 2015 Apr;30 Suppl 1:i8-13.
3. Jennette JC, Nachman PH. ANCA Glomerulonephritis and Vasculitis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017 Oct 6;12(10):1680-1691.
4. Grau RG. Drug-Induced Vasculitis: New Insights and a Changing Lineup of Suspects. *Curr Rheumatol Rep*. 2015 Dec;17(12):71.
5. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, *et al*. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum*. 2013 Jan; 65(1):1-11
6. Alberici F, Martorana D, Vaglio A. Genetic aspects of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant*. 2015 Apr;30 Suppl 1:i37-45.
7. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
8. Boscatto, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

20. REVISION IDENTIFIER

Additions or changes to the IFU are indicated by grey highlighting.

21. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority.

The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found below and on the company website: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM091-10

Legal Manufacturer

Dia.Metra Srl



DCM091-10

Ed. 01/2024

Anti PR-3 (c-ANCA)

para el análisis de rutina

Determinación cuantitativa de anticuerpos de clase IgG contra la proteinasa 3 (PR-3) en suero o plasma humano

IVD

LOT

Ver etiqueta
externa

2°C  8°C

 $\Sigma = 96$ pruebas

REF DKO091

1. FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

El ensayo Anti PR-3 (c-ANCA) es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa de anticuerpos de clase IgG dirigidos contra la proteinasa 3 (PR-3) en suero o plasma humano de una población adulta. Los resultados deben utilizarse como ayuda en el diagnóstico de determinadas vasculitis autoinmunes como la granulomatosis de Wegener junto con otros datos clínicos y de laboratorio.

2. IMPORTANCIA CLÍNICA

La proteinasa 3 (PR-3 o PR3) es una pequeña serina proteasa localizada en los gránulos primarios y en las vesículas secretoras del citoplasma de los neutrófilos. La PR3 se almacena en los gránulos citoplasmáticos en los neutrófilos en reposo, mientras que la expresión de la proteína en la superficie celular aumenta durante la activación de los neutrófilos y durante la apoptosis¹. La PR3 también se encuentra en las trampas extracelulares de neutrófilos (NET), que consisten en la cromatina liberada por los neutrófilos como defensa contra los patógenos.

Los autoanticuerpos contra la PR3 se detectan con frecuencia en una clase específica de vasculitis autoinmune conocida como autoanticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA) asociados a la vasculitis (AAV). Estas vasculitis se caracterizan por la presencia de autoanticuerpos contra los componentes citoplasmáticos de los neutrófilos, que pueden tener una tinción citoplasmática (c-ANCA) o una tinción perinuclear (p-ANCA)¹⁻³.

El mecanismo de autoinmunidad para los antígenos ANCA aún no se ha evaluado. Los neutrófilos activados pueden sufrir apoptosis creando NET, que están implicadas en la inducción de la inflamación. La persistencia de las NET durante la infección puede dar lugar a una respuesta autoinmune^{3,4}. El aumento de la expresión de MPO y PR3 en los neutrófilos y monocitos puede influir en la respuesta autoinmune patógena que conduce a la activación de los neutrófilos ANCA³.

Las vasculitis asociadas a ANCA se clasifican como vasculitis de pequeños vasos (SVV), que afectan predominantemente a los vasos pequeños, arterias intraparenquimatosas, arteriolas, capilares y vénulas⁵. Las vasculitis asociadas a los ANCA son vasculitis necrosantes caracterizadas por la ausencia de depósitos inmunitarios en las paredes de los vasos que causan afecciones como la poliangeítis microscópica (MPA) y la granulomatosis con poliangeítis (GPA, antes conocida como síndrome de Wegener).

La frecuencia del serotipo (MPO o PR3), la manifestación clínica y la distribución geográfica de las vasculitis asociadas a ANCA varían, lo que sugiere un papel del entorno y de los antecedentes genéticos de los pacientes afectados por esta categoría de patologías^{1,3,6}.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo Anti PR-3 (c-ANCA) es un ensayo enzimático inmunométrico indirecto (ELISA) en el que el anticuerpo anti PR3 de la muestra se une a la proteinasa 3 de neutrófilos humanos que recubre la microplaca (fase sólida). En el primer paso, los anticuerpos presentes en los calibradores, controles o muestras de pacientes prediluidas se unen a la superficie interior de los pocillos. Tras una incubación de 60 minutos, la microplaca se lava para eliminar los componentes de suero no reactivos. En el segundo paso, una solución anti-IgG humana conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) se une a los anticuerpos de clase IgG unidos a los antígenos inmovilizados. Tras un paso adicional de incubación, el exceso de conjugado enzimático que no se ha unido específicamente se elimina mediante lavado.

Una solución de sustrato cromogénico que contiene TMB se dispensa a continuación a los pocillos. Tras un paso más de incubación, la enzima HRP de la fracción ligada reacciona con el sustrato (H₂O₂) y el sustrato de TMB, y desarrolla un color azul que cambia a amarillo cuando se añade la solución de detención (H₂SO₄). La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de los anticuerpos IgG de la muestra.

La concentración de anticuerpos IgG anti PR3 en la muestra se calcula mediante una curva de calibración.

4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (5 viales de 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. Control (2 viales de 1,2 mL cada uno)

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 muestras (1 vial, 100 mL)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN_3 <0,1 %

REF DCE053-0

4. Conjugado (1 vial, 15 mL)

IgG antihumano conjugado con peroxidasa de rábano

picante (HRP), BSA 0,1 %, contiene ProClin™ >0,0015%

REF DCE002/09102-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca que se puede romper)

Microplaca recubierta con proteinasa humana de neutrófilo 3

REF DCE002/09103-0

6. Sustrato de TMB (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (evitar el contacto con la piel).

ProClin™ <0,0015% **REF** DCE004-0

7. Solución de detención (1 vial, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 M (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

8. Conc. 10X Solución de lavado (1 vial, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2 M pH 7,4, contiene ProClin™ >0,0015%

REF DCE054-0

4.2. Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada

4.3. Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

5. ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
-  El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEB, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos (conjugado y solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.

- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]

Sensibilización cutánea, categoría 1



Contiene: ProClin 300

Atención

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- Algunos reactivos (calibradores, controles y diluyente de muestras) contienen pequeñas cantidades de azida sódica (NaN_3) <0,1% que puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si elimina los reactivos en un fregadero, lávelos con gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azida.
- El sustrato de TMB contiene un irritante que es perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.
- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/ H_2O_2 a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

6. PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente validado para su uso previsto.

- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo y/o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles y/o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, ictéricas o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.
- **ADVERTENCIA: el reactivo conjugado está diseñado para garantizar la máxima sensibilidad de la dosis y puede contaminarse con agentes externos si no se utiliza correctamente;** por lo tanto, se recomienda utilizar consumibles desechables (puntas, frascos, bandejas, etc.). Para dosis divididas, tome la cantidad exacta de conjugado necesaria y no vuelva a introducir ningún producto de desecho en el frasco original. Además, **para las dosis dispensadas mediante dispositivos automáticos y semiautomáticos,** antes de utilizar el conjugado, es aconsejable limpiar el sistema de manipulación de fluidos, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteización y descontaminación sean eficaces para evitar la contaminación del conjugado; **este procedimiento es muy recomendable cuando el kit se procesa con analizadores que no están equipados con puntas desechables.** Para ello, DiaMetra proporciona un reactivo de descontaminación independiente para la limpieza de las agujas.
- Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras, los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2-8 °C en un lugar oscuro.

- El kit es estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, el kit es estable a 2-8 °C durante 6 meses.

- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

• Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de suero (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel de separación de suero) o plasma (heparina de litio, heparina de sodio o EDTA de potasio).

Almacenamiento de muestras	Duración
2-8 °C	96 horas
Ciclos de congelación/descongelación	3 ciclos

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Preparación de calibradores y controles

Dado que no se dispone de una preparación de referencia internacional para los anticuerpos antiproteína 3, el sistema de ensayo se calibra en unidades arbitrarias relativas. Los calibradores están listos para utilizarse y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	10	20	40	160

Los controles están listos para su uso; la concentración del control está impresa en la etiqueta.

9.2. Preparación del conjugado

El conjugado está listo para su uso. Mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.3. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial «10X Conc. Wash Solution» con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:10.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado también de transferir los cristales enjuagando completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

9.4. Preparación de las muestras

La determinación de IgG Anti PR-3 se puede realizar en muestras de suero o plasma humano.

Todas las muestras de suero o plasma deben diluirse previamente con diluyente de muestra 1:100; por ejemplo, 10 µL de muestra pueden diluirse con 990 µL de diluyente de muestra.

Las muestras en ayunas no son necesarias ni se requieren preparaciones especiales de las muestras.

Recoja la sangre mediante venopunción en vacutainers y separe el suero (después de la formación del coágulo) o el plasma de las células mediante centrifugación. No se recomienda el análisis de muestras de suero o plasma inactivadas por calor.

Almacenar la muestra a -20°C si la determinación no se lleva a cabo el mismo día que se recoge la muestra. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.5. Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a $2-8^{\circ}\text{C}$: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a $2-8^{\circ}\text{C}$.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana y/o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C_0-C_4), dos para el control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Controles	Blanco
Calibrador C_0-C_4	100 μL		
Controles		100 μL	
Muestra diluida		100 μL	
Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$). Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 μL de solución de lavado diluida. Nota importante: en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente. Lavadora automática: si utiliza un equipo automático, lave los pocillos al menos 5 veces.			
Conjugado	100 μL	100 μL	
Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$). Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 μL de solución de lavado diluida. Lavado: siga las mismas indicaciones del punto anterior.			
Sustrato de TMB	100 μL	100 μL	100 μL

Incube durante 15 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$).

Solución de detención	100 μL	100 μL	100 μL
-----------------------	-------------------	-------------------	-------------------

Agite suavemente la microplaca.

Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.

10. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

DiaMetra recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control⁷.

11. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. Es necesario un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL), **incluido el calibrador 0**. Se puede usar un ajuste de splines suavizado y un ajuste logarítmico-logarítmico que incluya el calibrador 0. No se recomiendan otros algoritmos de ajuste de curva.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El calibrador 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

Para que los resultados de las pruebas se consideren válidos, deben cumplirse todos los criterios enumerados a continuación. Si alguno de ellos no se cumple, la prueba debe considerarse no válida y el ensayo debe repetirse:

- La absorbancia del control positivo PR-3 IgG prediluido debe ser mayor que la absorbancia del control negativo prediluido.
- Los controles negativos y positivos están destinados a detectar fallos sustanciales de los reactivos y no garantizan la precisión en el punto de corte del ensayo.
- Esta prueba solo es válida si la densidad óptica a 450 nm del control negativo y del control positivo, así como del calibrador C₀-C₄ cumple con el rango respectivo indicado en el Certificado de control de calidad que se incluye con cada kit de prueba: si no se cumple alguno de estos criterios, los resultados no son válidos y debe repetirse la prueba.

12. RANGO DE MEDICIÓN

El rango de medición del ensayo (AMR) es de 3-160 AU/mL. Cualquier valor que sea inferior a 3 AU/mL debe informarse como "<3 AU/mL". Cualquier valor que sea superior a 160 AU/mL debe informarse como ">160 AU/mL".

13. METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD

Los calibradores de este kit son trazables al Suero de Referencia Humano n.º 16 de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) para el Ab Anti-Proteína 3 con N.º de catálogo IS2721.

14. VALORES ESPERADOS

Los rangos siguientes se determinaron usando el ensayo Anti PR-3 (c-ANCA) y se facilitan solo con fines informativos. El intervalo de referencia del 90 % para adultos aparentemente sanos se calcularon mediante un método no paramétrico siguiendo la orientación de CLSI C28-A3 "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

N.º de sujetos	73
Media (AU/mL)	8,71
DE (AU/mL)	3,21
Mediana (AU/mL)	8,12
Intervalo de referencia (AU/mL)	4,19-14,40

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

15. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Concentración	Interpretación
<16 AU/mL	La muestra debe considerarse negativa.
16-20 AU/mL	La muestra debe ser calificada como equívoca y la repetición de la prueba/muestreo debe realizarse de acuerdo con las prácticas internas.
≥20 AU/mL	La muestra debe considerarse positiva.

El índice y la interpretación anteriores deben tenerse en cuenta solamente como una guía. Los resultados positivos deben verificarse en función del estado clínico del paciente en su totalidad. Además, cada decisión terapéutica debe tomarse de forma individual para cada paciente.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales y patológicos de anti-PR3.

16. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

16.1. Capacidad de detección

El límite de blanco (LoB), el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se determinaron con orientación del documento CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation, usando 6 blancos y 6 muestras de bajo nivel.

Sensibilidad	Concentración
Límite de blanco (LoB)	0,6 AU/mL
Límite de detección (LoD)	1,6 AU/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	3,2 AU/mL

16.2. Veracidad

Se ha demostrado la veracidad mediante una prueba de recuperación del ensayo Anti PR-3 (c-ANCA) con el suero de referencia de antiproteína 3 humana N.º 16 de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC).

16.3. Precisión

La precisión de Anti PR-3 (c-ANCA) se determinó mediante la realización de un estudio de precisión complejo.

Repetibilidad: Se analizaron un total de 6 muestras en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores. A continuación se muestran los datos de un lote representativo:

Muestra	n	Concentración media (AU/mL)	Intraprueba (repetibilidad)	
			DE	CV %
1	75	16,51	0,96	5,8 %
2	75	23,94	0,93	3,9 %
3	75	40,03	1,23	3,1 %
4	75	59,68	3,40	5,7 %
5	75	86,96	2,80	3,2 %
6	75	136,70	6,24	4,6 %

Reproducibilidad: Se analizaron un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores. A continuación se muestran los resultados de los datos combinados de dos lotes:

Muestra	n	Concentración media (AU/mL)	Dentro del laboratorio (reproducibilidad)	
			DE	CV %
1	150	16,57	1,49	9,0 %
2	150	23,95	1,53	6,4 %
3	150	40,59	2,67	6,6 %
4	150	60,11	4,15	6,9 %
5	150	86,69	6,12	7,1 %
6	150	137,19	9,63	7,0 %

16.4. Linealidad

La linealidad se evaluó en base a "CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Para la concentración de anti- PR3 mediante el ensayo Anti PR-3 (c-ANCA), el procedimiento de medición muestra linealidad para el intervalo de 1,73 a 162,62 AU/mL dentro de la desviación de linealidad permitida (ADL) de ± 15 %.

16.5. Sensibilidad y especificidad del diagnóstico

La sensibilidad y la especificidad se determinaron con orientación del documento CLSI EP-24 "Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves", usando 73 muestras negativas y 50 positivas realizadas en dos lotes de reactivos.

		DKO091		Total
		Positivo	Negativo	
Estado real	Positivo	50	0	50
	Negativo	2	71	73
Total		52	71	123

Sensibilidad del diagnóstico: 100 %

Especificidad del diagnóstico: 97,3 %

16.6. Interferencias

Las siguientes sustancias no interfieren con un sesgo de $> \pm 15$ % en el ensayo Anti PR-3 (c-ANCA) cuando las concentraciones están por debajo del umbral indicado presentado en la siguiente tabla.

Reactivos que pueden interferir	Límite máximo de concentración
Bilirrubina, conjugada	15 mg/dL
Bilirrubina, no conjugada	15 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Proteína total	10 g/dL
Triglicéridos	500 mg/dL

16.7. Estudio en suero-plasma

El estudio de comparación de la matriz del ensayo Anti PR-3 (c-ANCA) se realizó para evaluar la diferencia entre los tipos de tubos (tubos separadores de suero [SST], plasma de heparina de litio, plasma de heparina sódica y plasma K2 EDTA) frente a las muestras de control (tapón rojo para suero, sin aditivos) siguiendo las directrices CLSI EP9-A3. Se evaluó un total de 20 muestras (16 nativas, 4 con aditivos) para cubrir el intervalo de 2,80 a 74,40 AU/mL. Se realizó un análisis de regresión lineal sobre los datos comparativos:

Tipo de muestra	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (AU/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
SST	1,0 [0,97 a 1,08]	0,14 [-1,17 a 1,45]	0,99
Heparina de litio	1,1 [1,06 a 1,21]	-0,46 [-2,09 a 1,17]	0,99
Heparina sódica	1,1 [1,05 a 1,14]	-0,91 [-1,88 a 0,06]	1,00
EDTA	1,1 [1,0 a 1,12]	0,00 [-1,79 a 1,78]	0,99

17. LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*⁸. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta

interferencia y puede que se observen valores anómalos.

18. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

19. BIBLIOGRAFÍA

1. Cornec D, Cornec-Le Gall E, Fervenza FC, Specks U. ANCA-associated vasculitis - clinical utility of using ANCA specificity to classify patients. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Oct;12(10):570-9.
2. Rasmussen N, Wiik A, Jayne DR. A historical essay on detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Nephrol Dial Transplant*. 2015 Apr;30 Suppl 1:i8-13.
3. Jennette JC, Nachman PH. ANCA Glomerulonephritis and Vasculitis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017 Oct 6;12(10):1680-1691.
4. Grau RG. Drug-Induced Vasculitis: New Insights and a Changing Lineup of Suspects. *Curr Rheumatol Rep*. 2015 Dec;17(12):71.
5. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, *et al*. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum*. 2013 Jan; 65(1):1-11
6. Alberici F, Martorana D, Vaglio A. Genetic aspects of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant*. 2015 Apr;30 Suppl 1:i37-45.

7. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
8. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

20. IDENTIFICADOR DE REVISIÓN

Las adiciones o cambios en las instrucciones de uso se han resaltado en gris.

21. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar: Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro; si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante y/o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional.

Puede contactar con el fabricante a través del servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM091-10

	DE ES FR EN IT PT	<i>In vitro</i> Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> Dispositif medical de diagnostic <i>in vitro</i> <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Dispositivos medicos de diagnostico <i>in vitro</i>		DE ES FR EN IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR EN 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 EN 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 EN IT PT	Verwendbar bis Estable 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 día do mês)		DE ES FR EN IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR EN 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		DE ES FR EN IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR EN 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		DE ES FR EN IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR EN IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR EN IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR EN 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			