



Instructions for Use

c-ANCA (PR3) capture ELISA

IVD



REF EIA-5980

 96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
 Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
 Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
 Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.
 Por favor, usar a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.**

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Índice / Table des matières /
 Tabela de conteúdos**

1	OVERVIEW	2
2	WARNINGS AND PRECAUTIONS	2
3	PRINCIPLE OF THE TEST	2
4	CONTENTS OF THE KIT	3
5	MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	3
6	STORAGE OF THE KIT	3
7	REAGENT AND SAMPLE PREPARATION / SPECIMEN REQUIREMENTS	4
8	ASSAY PROCEDURE	5
9	EVALUATION AND QUALITY CONTROL	6
10	INTERPRETATION OF RESULTS / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	7
11	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	7
12	DECLARATION	11
13	SUMMARY FLOW CHART	11
1	ÜBERSICHT	12
2	SICHERHEITSHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	12
3	TESTPRINZIP	12
4	INHALT DES TESTKITS	13
5	BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN	13
6	AUFBEWAHRUNG DES TESTKITS	13
7	REAGENZIE- UND PROBENVORBEREITUNG / ANFORDERUNGEN AN DIE PROBEN	14
8	DURCHFÜHRUNG DES TESTS	15
9	AUSWERTUNG UND QUALITÄTSKONTROLLE	16
10	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE / GRENZEN DER METHODE	17
11	TESTCHARAKTERISTIKA	17
12	GARANTIE UND HAFTUNG	21
13	KURZANLEITUNG	22
14	REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / LETTERATURA / LITERATURA / LITTÉRATURE / LITERATURA	23
	SYMBOLS USED	24

1 OVERVIEW

1.1 Introduction and background

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), originally identified by immunofluorescence assays (IFA), are directed against cytoplasmic components of neutrophil granulocytes and monocytes. They have proven to be a useful serologic marker for a number of systemic, autoimmune mediated vasculitides (1, 2, 3).

A granular cytoplasmic (c-ANCA) staining pattern of the neutrophil substrate is indicative for autoantibodies against Proteinase 3 (PR3), a 29 kDa serine proteinase present in the azurophilic granules of human granulocytes and monocytes (4, 5).

PR3 autoantibodies occur in patients with Wegener's granulomatosis (WG), a systemic vasculitis affecting the respiratory tract (5). Their specificity is about 95 %, their sensitivity depends on the phase and activity of the disease. (6).

The present enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) is intended for the quantitative or qualitative determination of IgG autoantibodies in human serum or plasma (cf. section 7), directed against PR3. It is calibrated against the international standard for PR3-serology, AF-CDC (human reference serum 16, code IS2721). The immobilised antigen is a highly purified preparation of PR3, isolated from human granulocytes.

During recent years it has been shown that capture technique of antigen immobilisation achieves improved sensitivity, as compared to conventional (adsorptive) fixation (7, 8, 9). The present ELISA takes advantage from this technique, with the additional feature that the PR3 molecule is exposed in two distinctly different orientations.

The test is fast (incubation time 30 / 30 / 30 minutes) and flexible (divisible solid phase, ready-to-use reagents). Six calibrators allow quantitative measurements; a negative and a positive control check the assay performance.

1.2 Intended purpose

c-ANCA (PR3) capture ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) intended for the quantitative or qualitative determination of IgG class antibodies directed against Proteinase 3 (PR3) in human serum or plasma samples. Its function is the aid to differential diagnosis of various autoimmune vasculitic disorders characterized by elevated levels of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), such as Wegener's granulomatosis and other vasculitides.

This product is intended for manual or automated professional *in vitro* diagnostic use only.

2 WARNINGS AND PRECAUTIONS

The test kit is intended for *in vitro* diagnostic use only; not for internal or external use in humans or animals.

It must be executed by trained professional staff.

The kit has been tested for transport stability and can be shipped unrefrigerated for up to 3 days. Store at 2 °C – 8 °C on arrival. In case of doubt, contact your local distributor or the manufacturer.

Do not use reagents beyond their expiration dates. Adherence to the protocol is strongly recommended.

The sample buffer, calibrators and controls contain Na-azide as antimicrobial agent. The wash buffer contains bromonitrodioxane and the conjugate methylisothiazolone / bromonitrodioxane as preservative. The substrate contains 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H₂O₂). The stop solution, 0.2 M sulfuric acid (H₂SO₄), is acidic and corrosive.

The above mentioned reagents may be toxic if ingested. Follow routine precautions for handling hazardous chemicals. Avoid all body contact, wear gloves and eye protection. If one of the reagents comes into contact with skin or mucous membrane, wash thoroughly with water. Never pipette by mouth. Dispose in a manner complying with local/national regulations.

Na-Azide may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal, flush with a large amount of water to prevent azide build-up.

The calibrators and controls contain components of human origin. They were tested for human immunodeficiency virus (HIV)-Ag, hepatitis B surface (HBs)-Ag and antibodies against HIV 1/2 and hepatitis C virus (HCV) and showed negative results; either in an FDA-approved or a CE-compliant test, according to European Directive 98/79/EC.

However, no test can guarantee that material of human origin is not actually infectious. The preparations should therefore be treated as potentially infectious and disposed of accordingly, as should the samples (and residues thereof); according to CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA) or other local / national guidelines on laboratory safety and decontamination.

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The wells of the solid phase are coated with PR3 by a special capture technique. On this surface, the following immunological reactions take place:

1st reaction: PR3-specific antibodies present in the sample bind to the immobilised antigen, forming the antigen-antibody complex. Then, non-bound sample components are washed away from the solid phase.

2nd reaction: A second antibody, directed at human IgG antibodies and conjugated with horse-radish peroxidase (HRP), is added. This conjugate binds to the complex. Then, excess conjugate is washed away from the solid phase.

3rd reaction: The enzyme-labelled complex converts a colourless substrate into a blue product. The degree of colour development reflects the concentration of PR3 IgG in the sample.

4 CONTENTS OF THE KIT

1. **MWP 12x8 PR3 capture Coated Microwell Plate**
1 microwell plate, coated with PR3 and hermetically packed in a foil laminate pouch together with a desiccant bag. The plate consists of 12 strips, each of which can be broken into 8 individual wells.
2. **BUF SPL Sample buffer**
Sample buffer, 100 mL, ready-to-use, orange coloured.
Contains Tris-buffered saline (TBS), bovine serum albumin (BSA), Tween and NaN₃.
3. **BUF WASH 10x Wash buffer**
Wash buffer, 100 mL, 10x-concentrate, blue coloured.
Contains TBS, Tween and bromonitrodioxane.
4. **CAL 1-6 PR3 capture IgG Calibrator 1-6**
6 calibrators, 2.0 mL each, 0 - 1.0 - 3.0 - 10 - 30 and 100 IU PR3 IgG/mL, ready-to-use, gradually blue coloured.
Contain TBS, BSA, Tween and NaN₃.
5. **CONTROL - CONTROL + PR3 capture IgG Negative and Positive Control**
Negative and positive control, 2.0 mL each, ready-to-use, green and red coloured, respectively. Contain TBS, BSA, Tween and NaN₃.
6. **CONJ IgG PR3 capture IgG 14 mL Conjugate**
Anti-human IgG HRP conjugate, 14 mL, ready-to-use, red coloured.
Buffered solution containing stabilising protein, methylisothiazolone and bromonitrodioxane.
7. **SUBS TMB Substrate**
Substrate solution, 14 mL, ready-to-use, colourless.
Contains a buffered solution of TMB and H₂O₂. Contained in a vial impermeable to light.
8. **SOLN STOP Stop solution**
Stop solution (0.2 M H₂SO₄), 14 mL, colourless, ready-to-use.
Caution: sulfuric acid is corrosive.
9. Instructions for use
10. Lot-specific certificate of analysis

5 MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

1. Deionised or distilled water
2. Graduated cylinder, 1000 mL
3. Tubes for sample dilution (transfer tubes in the microwell plate format recommended)
4. Pipettes for 10, 100 and 1000 µL (1- and 8-channel pipettes recommended)
5. Microwell plate washer (optional)
6. Microwell plate photometer fitted with a 450 nm filter
7. ELISA evaluation program (recommended)

6 STORAGE OF THE KIT

Store kit at 2 °C - 8 °C, do not freeze.

It is stable up to the expiry date stated on the label of the box. Do not use kit beyond its expiry date.

7 REAGENT AND SAMPLE PREPARATION / SPECIMEN REQUIREMENTS

Do not exchange or pool corresponding components from different kits, due to possibly different shipping or storage conditions.

If the kit is to be used for several tests, only the currently needed amount of reagents should be withdrawn. It is crucially important that no cross-contamination between the reagents occurs. Use only clean pipettes and do not pour back residues into the original flasks.

- a. The **solid phase** must reach room temperature before opening the pouch. Remove the supernumerary microwells from the frame and immediately put them back into the pouch, together with the desiccant bag. Reseal the pouch hermetically and keep it refrigerated for future use.
- b. Dilute the **wash buffer 10x-concentrate** (100 mL, blue) with 900 mL deionised water. Mix thoroughly. The diluted buffer is stable for several weeks if stored refrigerated (2 °C - 8 °C).
- c. **Preparation of the samples:**
Handle patient specimens as potentially infectious agents.
Besides serum, EDTA-, citrate- or heparin-treated plasma is suitable sample material as well.

Specimen requirements:

Highly lipemic, haemolysed or microbially contaminated sera may cause erroneous results and should be avoided.

Prepare samples using normal laboratory techniques.,

Turbid samples must first be clarified (centrifuged). The clarified or clear samples are mixed and then diluted 1/100, e.g. 10 µL serum or plasma + 990 µL sample buffer. Also mix the dilution.

For rapid dispensing during the assay procedure, preparation of the calibrators, controls and samples in microwell transfer tubes is recommended. This allows the operation of an 8-channel pipette during the assay procedure.

If samples are not assayed immediately, they should be stored at 2 °C - 8 °C and assayed within 3 days.

Repeated freezing and thawing of samples should be avoided. Thawed samples must be mixed prior to diluting.

Biotin concentrations up to 150 µg/mL in the undiluted sample do not interfere with the assay.

8 ASSAY PROCEDURE

8.1 Manual operation

Before starting the assay, all components of the kit must have reached room temperature (23 °C ± 3 °C).

To achieve best results, i.e. the maximum ratio between specific and background signal, **careful washing** is essential (steps a, c and e). It is **crucially important to remove the wash solution completely**. For that purpose, tap the plate firmly on several layers of absorbent tissue. Automated washers must be verified according to results obtained by manual washing.

- a) Immediately prior to use, wash the solid phase once:
fill wells with **350 µL wash buffer each**, let soak for about 10 seconds in the wells and remove.
- b) Dispense the **calibrators** (2.0 mL each, ready-to-use, gradually blue), controls (2.0 mL each, ready-to-use, green and red) and the **diluted samples** rapidly into the microwells;
100 µL per well. Duplicate measurements are recommended.

Incubate the plate for 30 minutes at room temperature (23 °C ± 3 °C).

- c) Wash the wells 4 times as in step a.
- d) Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the **conjugate** (14 mL, ready-to-use, red); **100 µL per well**.
Incubate the plate as in step b.
- e) Repeat wash step c.
- f) Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the **substrate solution** (14 mL, ready-to-use, colourless, black vial); **100 µL per well**.

Incubate the plate as in step b.

As the substrate is photosensitive, avoid intense light exposure (e.g. direct sunlight) during incubation.

- g) Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the **stop solution** (14 mL, ready-to-use, colourless. Caution: corrosive!); **100 µL per well**. Use the same sequence as for the substrate. The colour changes from blue to yellow. Agitate the plate, preferably on an orbital shaker, for about 10 seconds.
- h) Immediately read the absorbance in the microwell plate photometer at 450 nm.

Refrigerate the remainder of the reagents (2 °C - 8 °C) if they are to be used again.

8.2 Dynex DS2 automated ELISA system

This product has been validated for use with the Dynex DS2 automated ELISA system.

A description of the program flow for the assay execution and evaluation can be provided as a pdf file.

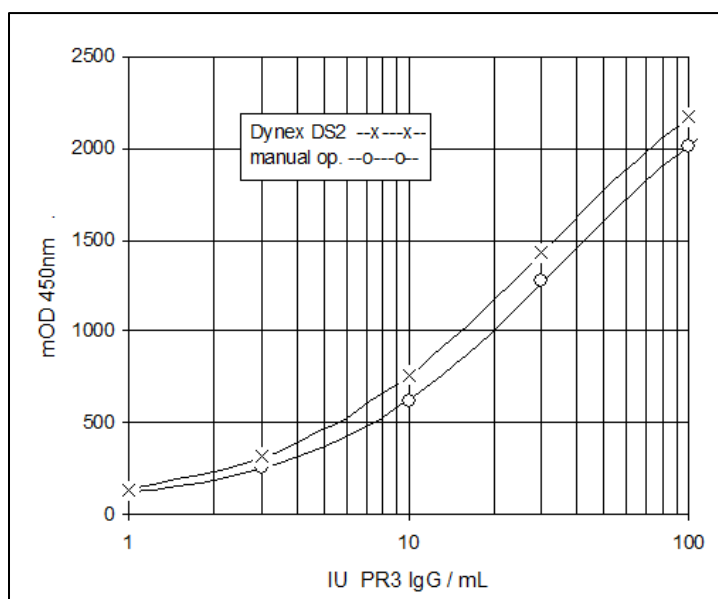
The parameters of this program are merely a proposal and may need to be adapted by the operator to the requirements of the actual assay. In general terms, we have attempted to stick as close as possible to the protocol of manual operation, as above. However, due to the necessarily elevated temperature within the DS2, the substrate incubation period had to be shortened.

Section 11.8 gives a performance comparison between manual assay operation and the DS2 ELISA system.

9 EVALUATION AND QUALITY CONTROL

Quantitative evaluation:

The data obtained are quantitatively evaluated with the standard curve, as shown below. However, the depicted curve can only serve as a model. It cannot substitute the measurement of the calibrators, together with the controls and actual samples. The curve has been constructed with a conventional ELISA evaluation program, using a 4-parameter function. The Spline approximation is also appropriate.



If no computer-supported evaluation is possible, the standard curve may be drawn by hand. It allows transformation of the absorbance value of a sample into its concentration, i.e. into IU PR3 IgG per mL sample.

Qualitative evaluation:

The test may also be evaluated in a qualitative manner. This requires measurement of the positive control only. Nevertheless, measurement and examination of the negative control is recommended (see below: quality control).

In qualitative test evaluation, the absorbance of the samples is compared with the borderline absorbance (= cut-off). It is determined according to the following formula:

$$\text{absorbance}_{\text{borderline}} = \text{absorbance}_{\text{positive control}} \times \text{factor}$$

The factor depends on the kit lot and is quoted in the lot-specific certificate of analysis which is included with each test kit.

Example:

$$\begin{aligned} \text{absorbance}_{\text{positive control}} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{factor} &= 0.35 \\ \text{absorbance}_{\text{borderline}} &= 1250 \text{ mOD} \times 0.35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

In order to gain an impression of how positive a particular sample is for PR3 IgG, one may calculate the ratio, according to the formula:

$$\text{ratio} = \text{absorbance}_{\text{sample}} / \text{absorbance}_{\text{borderline}}$$

Example:

$$\begin{aligned} \text{absorbance}_{\text{borderline}} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{absorbance}_{\text{sample}} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{ratio} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3.4 \end{aligned}$$

Quality control:

The positive and negative control check the assay performance. Their authorised values and acceptable ranges, respectively, are quoted in the lot-specific certificate of analysis. Values of the controls must fall within the indicated ranges; otherwise, the results of the assay are invalidated.

10 INTERPRETATION OF RESULTS / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Based on the measurement of a series of blood donor sera and positive sera (see below), we suggest for the assessment of patient sera:

	quantitative evaluation IU PR3 IgG per mL sample	qualitative evaluation ratio
normal (negative) range	< 1.7	< 0.88
cut-off	2.0	1.00
equivocal range	1.7 - 2.4	0.88 - 1.14
positive range	> 2.4	> 1.14

These specifications are given as an indication only; in order to check their accuracy, each analysis should include parallel samples of normal sera.

A **negative test result** indicates that the patient does not have an elevated level of IgG antibodies to PR3. It does not preclude the presence of autoantibodies against other neutrophilic antigens (e.g. CAP 57) which can be responsible for cytoplasmic staining pattern in IFA analysis but are generally not used for the diagnosis of PR3-associated vasculitides.

As antibodies to PR3 are rarely found in healthy individuals, a **positive result** should be considered as an indication for WG. However, the test should be positive on at least two occasions, separated by several weeks. Less often (prevalence < 50 %, depending on methodology), PR3 antibodies occur in patients with microscopic polyangiitis and Churg-Strauss syndrome (6).

Specimens exhibiting **results within the borderline range** quoted above should be considered as equivocal and reported as such. It is recommended that a second sample be collected two weeks later and run in parallel with the first sample to document a possible change of antibody titer.

As with any serological test, the results should be interpreted in the light of the patient's symptoms and other diagnostic criteria.

11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1 Standardisation

The test is standardised with a purified serum containing IgG antibodies specifically directed at PR3. This preparation is calibrated against the international standard for PR3-serology, AF-CDC (human reference serum 16, code IS2721). The degree of sample reactivity is measured in international units (IU/mL).

11.2 Analytical specificity

The test allows the specific determination of human IgG antibodies directed against PR3.

Interference with anticoagulants (EDTA, Citrat, Heparin) in samples has been tested and no interference effects have been observed.

11.3 Detection limit (analytical sensitivity)

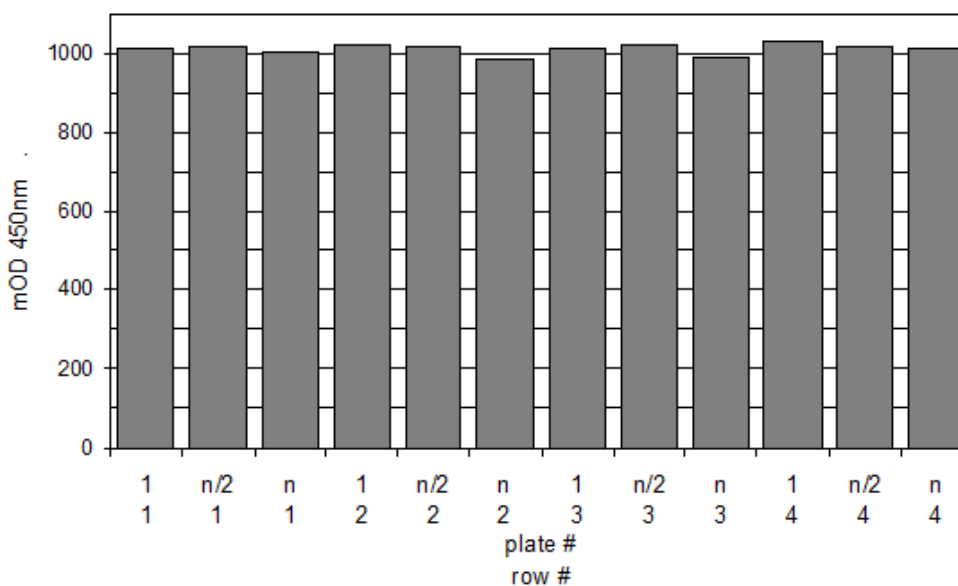
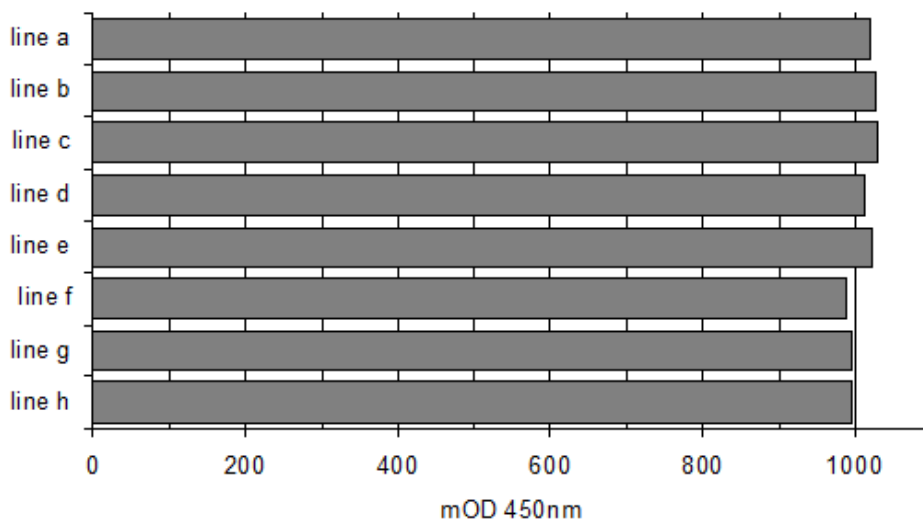
The detection limit is defined as that concentration of analyte that corresponds to the mean absorbance of sample buffer plus 3-fold standard deviation (s). It was determined as < 0.2 IU PR3 IgG per mL sample (n = 24).

Recommended measuring range: 0.3 - 50 IU/mL (cf. section 11.5).

11.4 Homogeneity of the solid phase

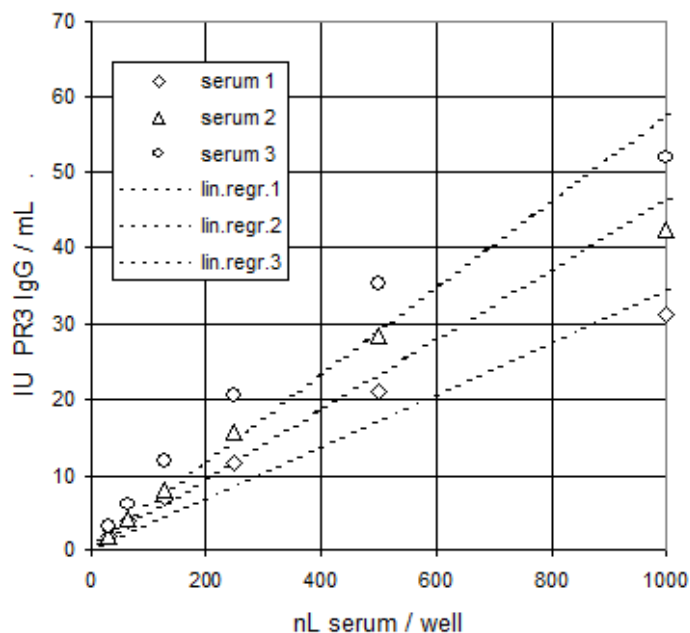
Measurement of the solid phase homogeneity is regular QC part of each production lot. This is determined by 288-fold measurement of a positive but non-saturating sample on 3 selected plates. Acceptance criterion: mOD-coefficient of variation (cv) over the plates < 8 %. The figure below shows a representative excerpt (solid phase lot no. 1306O) of such an analysis.

plate row	1 1	n/2 1	n 1	1 2	n/2 2	n 2	1 3	n/2 3	n 3	1 4	n/2 4	n 4	mean	Cv %
line a	1003	1023	1022	1011	1023	974	1017	1045	1015	1034	1020	1036	1019	1.8
line b	1031	1021	1000	1027	1048	1006	1036	1047	1001	1050	1022	1026	1026	1.7
line c	1000	1039	1014	1032	1038	1008	1028	1053	1008	1062	1042	1014	1028	1.9
line d	1020	1027	992	1031	1035	989	985	1013	999	1019	1010	1012	1011	1.6
line e	1038	1032	1031	1024	1018	988	1017	1032	987	1030	1041	1012	1021	1.7
line f	965	990	956	1004	987	973	995	998	986	1010	996	1001	988	1.6
line g	1003	981	1005	996	985	973	996	997	962	1035	1006	995	995	1.9
line h	1007	986	998	1035	991	960	1008	979	961	1013	982	999	993	2.2
mean	1008	1012	1002	1020	1016	984	1010	1021	990	1032	1015	1012	1010	
cv %	2.2	2.3	2.3	1.4	2.5	1.7	1.7	2.7	2.0	1.7	2.1	1.4		2.3



11.5 Linearity

In order to assess the dose-response relationship of the test, positive sera were measured in serial 2-fold dilution. Acceptance criterion: linear regression of 4 successive dilutions must yield a correlation factor > 0.98. A typical result is depicted below. Obviously, an approximately linear relation between dose and response is limited to results < 30 IU/mL.



11.6 Precision

For the assessment of the test precision, the variability of results under the following conditions was determined: a. within 1 assay and between 3 assays, b. between 3 operators and c. between 2 kit lots.

a) Intra- and inter-assay variability (n = 24 and 72, respectively)

sample	mean (IU/mL)	variability (cv, %)	
		intra-assay	inter-assay
1	10.4	3.8	5.5
2	23.8	4.6	7.4
3	35.7	4.4	4.4

b) Operator to operator variability (n = 12)

sample	mean (IU/mL)	variability (cv, %)
1	11.4	4.6
2	25.7	6.8
3	36.9	4.2

c) Variability between 2 kit lots (n = 12)

sample	Mean (IU/mL)	variability (cv, %)
1	10.7	3.6
2	23.8	6.0
3	35.5	5.1

11.7 Frequency distribution of PR3 IgG

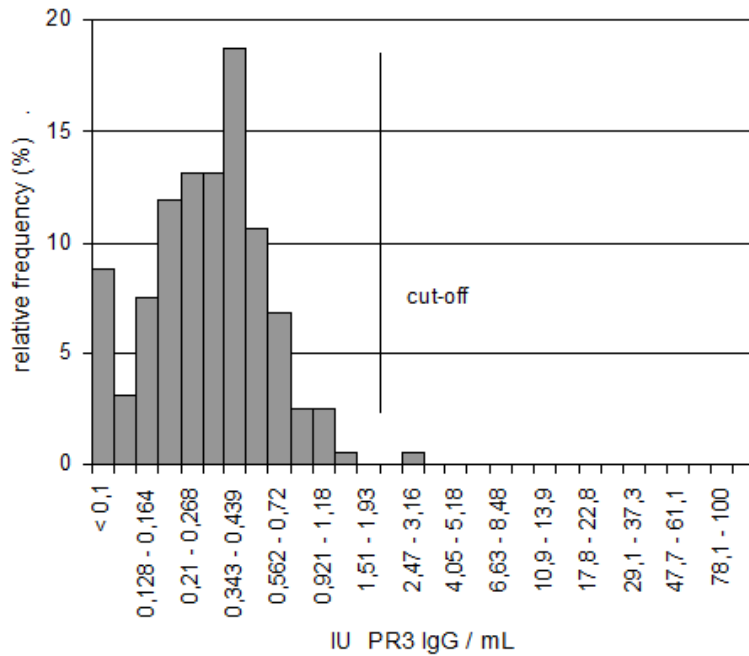
This was analysed in a sera collective of blood donors, equally distributed by sex and age, and a collective of sera intended-positive in different ring trials or clinically defined and/or found positive for PR3 IgG autoantibodies according to a FDA-approved, CE-compliant reference ELISA. The following distribution of the analyte was observed:

blood donor sera	
n:	160
mean:	0.4 IU/mL
mean + s:	0.7 IU/mL
mean + 2s:	1.0 IU/mL
median:	0.3 IU/mL
95 th percentile:	0.8 IU/mL

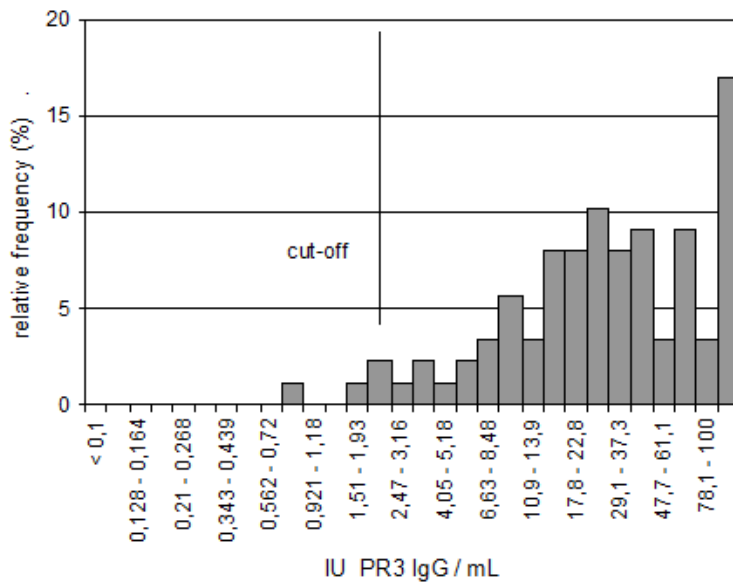
positive sera	
n:	88
mean:	102 IU/mL
mean - s:	< 0 IU/mL
mean - 2s:	< 0 IU/mL
median:	29.3 IU/mL
5 th percentile:	2.9 IU/mL

ROC-analysis of these data was used to determine the cut-off as 2.0 IU/mL (10). The data presented here suggest a diagnostic specificity and sensitivity of the ELISA of 99 % and 98 %, respectively. These values apply for the measured sera only; other collectives may yield different results.

blood donor sera



positive sera



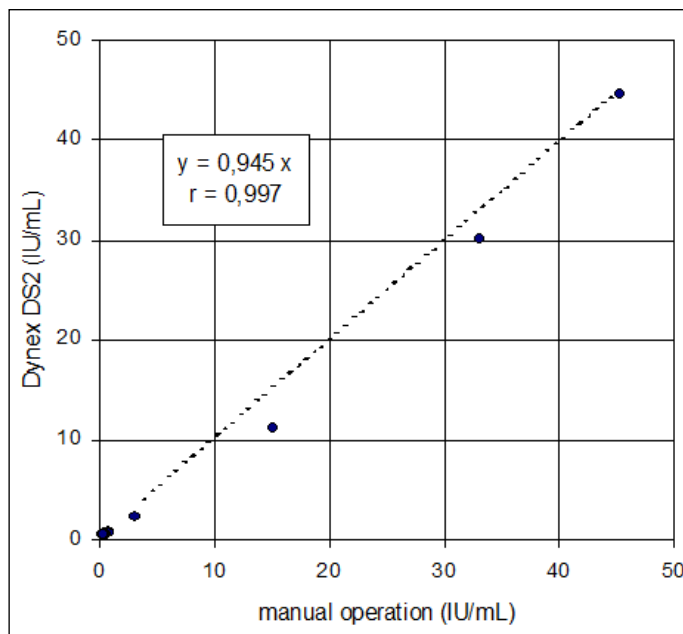
11.8 Manual operation vs. Dynex DS2 automated ELISA system

Variability: Using test kits from one and the same production batch, the variability of assay results were compared between manual operation and the Dynex DS2 automated ELISA system:

	manual operation	Dynex DS2
intra-assay variability (n = 16)	mean cv = 4.3 %	mean cv = 4.9 %
inter-assay variability(n = 48)	mean cv = 4.5 %	mean cv = 5.4 %

Standard curve: depicted in section 9

Correlation:



12 DECLARATION

DRG guarantees that the product delivered has been thoroughly tested to ensure that its properties specified herein are fulfilled. No further warranties are given. The performance data presented here were obtained using the procedure indicated. Any modification in the procedure may affect the results in which case DRG disclaims all warranties whether expressed, implied or statutory. Moreover, DRG accepts no liability for any damage, whether direct, indirect or consequential, which results from inappropriate use or storage of the product.

13 SUMMARY FLOW CHART

- Dilute the samples 1/100 in sample buffer and mix.
- Dilute the wash buffer 10x-concentrate with water and mix.
- Wash the wells once with 350 μ L wash buffer each.
- Dispense 100 μ L of the calibrators and controls and of the diluted samples into the wells of the solid phase. Duplicate measurements are recommended. Incubate for 30 minutes at room temperature ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Wash the wells 4 times with 350 μ L wash buffer each.
- Dispense 100 μ L of the conjugate into the wells. Incubate as in step d.
- Repeat washing step e.
- Dispense 100 μ L of the substrate solution per well. Incubate as in step d.
- Then, add 100 μ L stop solution per well and agitate the plate briefly.
- Immediately measure the absorbance at 450 nm.
- Quantitative evaluation: Determine the standard curve and, using this curve, transform the absorbance of the samples into their respective antibody concentration (IU PR3-IgG/mL).
- Qualitative evaluation: Determine the borderline absorbance by multiplying the absorbance of the positive control with the factor shown in the certificate of analysis. Then, calculate the ratio of the samples by dividing their absorbance by the borderline absorbance.

1 ÜBERSICHT

1.1 Einführung und Hintergrund

Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) richten sich gegen zytoplasmatische Komponenten neutrophiler Granulozyten und Monozyten. Ursprünglich wurden sie mit Immunfluoreszenz-Assays (IFA) detektiert. Sie haben sich als serologischer Marker für eine Reihe systemischer, autoimmun-bedingter Vaskulitiden bewährt (1, 2, 3).

Ein granuläres zytoplasmatisches (c-ANCA) Färbemuster des neutrophilen Substrates zeigt Autoantikörper gegen Proteinase 3 (PR3) an; eine 29 kDa große Serin-Proteinase, die in den azurophilen Granula der humanen Granulozyten und Monozyten vorkommt (4, 5). PR3-Autoantikörper treten meist in Patienten mit Wegenerscher Granulomatose (WG) auf; eine systemische Vaskulitis, die bevorzugt die Atmungsorgane angreift (5). Die Spezifität der PR3-Antikörper beträgt ca. 95 %; ihre Sensitivität hängt von Phase und Aktivität der WG ab. (6).

Der vorliegende Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist dazu bestimmt, IgG-Autoantikörper in menschlichem Serum oder Plasma (vgl. Abschnitt 7) quantitativ oder qualitativ zu messen, die gegen PR3 gerichtet sind.

Er ist kalibriert gegen den internationalen Standard der PR3-Serologie, AF-CDC (human reference serum 16, code IS2721). Das immobilisierte Antigen ist eine hochgereinigte, aus humanen Granulozyten isolierte PR3-Präparation.

Während der letzten Jahre wurde gezeigt, dass "capture-Technik" der Antigen-Immobilisierung eine verbesserte Empfindlichkeit des Tests erzielt, verglichen mit der konventionellen, adsorptiven Fixierung (7, 8, 9). Der vorliegende ELISA nutzt diese Technik, mit der zusätzlichen Besonderheit, dass das PR3-Molekül in zwei deutlich unterschiedlichen Orientierungen exponiert wird.

Der Test ist schnell (Inkubationszeit 30 / 30 / 30 Minuten) und flexibel (teilbare Festphase, gebrauchsfertige Reagenzien).

6 Standards erlauben quantitative Messungen; eine negative und eine positive Kontrolle prüfen die Funktion des Testansatzes.

1.2 Zweckbestimmung

c-ANCA (PR3) capture ELISA ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) zur quantitativen oder qualitativen Bestimmung von Antikörpern der Klasse IgG gegen Proteinase 3 (PR3) in humanen Serum- oder Plasmaproben. Seine Funktion ist die Hilfe bei der Differentialdiagnose verschiedener autoimmuner vaskulitischer Erkrankungen, die durch erhöhte Spiegel antineutrophiler zytoplasmatischer Antikörper (ANCA) gekennzeichnet sind, wie z. B. die Wegenersche Granulomatose und andere Vaskulitiden.

Dieses Produkt ist nur für den manuellen oder automatisierten Einsatz durch professionelle Anwender in der In-vitro-Diagnostik bestimmt.

2 SICHERHEITSHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Test ist ausschließlich für die *in vitro*-Diagnostik bestimmt; nicht für die interne oder externe Anwendung an Menschen oder Tieren. Er darf nur von geschultem Fachpersonal eingesetzt werden.

Die Reagenzien nicht über ihr Verfallsdatum hinaus verwenden.

Das Kit wurde auf Transportstabilität getestet und kann bis zu 3 Tage ungekühlt versandt werden. Nach der Ankunft bei 2 °C – 8 °C lagern. Im Zweifelsfall wenden Sie sich an Ihren lokalen Händler oder den Hersteller.

Es wird nachdrücklich empfohlen, das Protokoll genau einzuhalten.

Als antimikrobielles Reagenz enthalten Probenpuffer, Standards und Kontrollen Na-Azid; der Waschpuffer Bromonitrodioxan und das Konjugat Methylisothiazolon / Bromonitrodioxan. Das Substrat enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Die Stopplösung, 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄), ist sauer und ätzend. Diese Reagenzien sind giftig, wenn sie aufgenommen werden. Daher müssen die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung gefährlicher Chemikalien getroffen werden. Jeden Körperkontakt vermeiden, Handschuhe und Schutzbrille tragen. Sollte dennoch Haut (oder Schleimhaut) von einem Reagenz benetzt werden, die betroffene Stelle sofort mit viel Wasser abspülen. Nicht mit dem Mund pipettieren. Die Reagenzien gemäß lokalen / nationalen Vorschriften entsorgen. Na-Azid kann mit Kupfer- und Bleirohren reagieren und explosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit Wasser nachspülen, um eine Akkumulation zu verhindern.

Die Standards und Kontrollen enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Sie wurden daraufhin geprüft, ob Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Ag, Hepatitis B-Oberflächen (HBs)-Ag und Antikörper gegen HIV 1/2 und Hepatitis C-Virus (HCV) vorliegen und zeigten negative Resultate; entweder in einem FDA-zugelassenen oder einem CE-konformen Test, entsprechend der Europäischen Richtlinie 98/79/EC.

Allerdings kann kein Test garantieren, dass Material humanen Ursprungs tatsächlich nicht infektiös ist. Die Präparate sollten daher als potenziell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, ebenso wie die Proben (und Reste von ihnen); gemäß CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA)- oder anderen lokalen / nationalen Richtlinien zu Laborsicherheit und Dekontaminierung.

3 TESTPRINZIP

Die Festphase-Kavitäten sind durch eine besondere capture-Technik mit PR3 beschichtet. An dieser Oberfläche laufen folgende immunologischen Reaktionen ab:

1. Reaktion: PR3-Antikörper aus der Probe binden an das immobilisierte Antigen; es bildet sich der Antigen-Antikörper-Komplex. Nicht-gebundene Probenbestandteile werden anschließend von der Festphase gewaschen.

2. Reaktion: Ein zweiter, gegen human-IgG gerichteter und mit Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper wird zugesetzt. Dieses Konjugat bindet seinerseits an den Antigen-Antikörper-Komplex. Überschüssiges Konjugat wird anschließend von der Festphase gewaschen.

3. Reaktion: Der Enzym-markierte Komplex setzt ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt um. Das Ausmaß der Farbentwicklung spiegelt die Menge an PR3 IgG in der Probe wider.

4 INHALT DES TESTKITS

1. **MWP 12x8 PR3 capture Coated Microwell Plate**
1 Mikrowell-Platte, beschichtet mit PR3 und hermetisch in einem Beutel aus laminiertes Metallfolie verpackt, zusammen mit Trockenmittel. Die Platte besteht aus 12 Streifen, die sich jeweils in 8 Einzelkavitäten teilen lassen.
2. **BUF SPL Sample buffer**
Probenpuffer, 100 mL, gebrauchsfertig, orange gefärbt.
Enthält Tris-gepufferte Saline (TBS), bovines Serumalbumin (BSA), Tween und NaN_3 .
3. **BUF WASH 10x Wash buffer**
Waschpuffer, 100 mL, 10x-Konzentrat, blau gefärbt.
Enthält TBS, Tween und Bromonitrodioxan.
4. **CAL 1-6 PR3 capture IgG Calibrator 1-6**
6 Standards à 2,0 mL, 0 - 1,0 - 3,0 - 10 - 30 und 100 IU PR3 IgG / mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau gefärbt.
Enthalten TBS, BSA, Tween und NaN_3 .
5. **CONTROL - CONTROL + PR3 capture IgG Negative and positive control**
Negative und positive Kontrolle, je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot gefärbt.
Enthalten TBS, BSA, Tween und NaN_3 .
6. **CONJ IgG PR3 capture IgG 14 mL Conjugate**
Anti-human IgG HRP-Konjugat, 14 mL, gebrauchsfertig, rot gefärbt.
Gepufferte Lösung mit stabilisierendem Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan.
7. **SUBS TMB Substrate**
Substrat, 14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Enthält eine gepufferte Lösung von TMB und H_2O_2 , abgefüllt in einem Licht-undurchlässigen Gefäß.
8. **SOLN STOP Stop solution**
Stopplösung (0,2 M H_2SO_4), 14 mL, farblos, gebrauchsfertig. Vorsicht: Schwefelsäure ist ätzend.
9. Gebrauchsanweisung
10. Chargen-spezifisches Analysen-Zertifikat

5 BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

1. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
2. Messzylinder, 1000 mL
3. Reagenzröhrchen für die Probenverdünnung (Transfer-Röhrchen im Mikrowell-Plattenformat empfohlen)
4. Pipetten für 10, 100 und 1000 μL (1- und 8-Kanalpipetten empfohlen)
5. Mikrowell-Plattenwaschgerät (optional)
6. Mikrowell-Plattenphotometer mit 450 nm-Filter
7. ELISA Auswertungsprogramm (empfohlen)

6 AUFBEWAHRUNG DES TESTKITS

Das Testkit muss bei 2 °C – 8 °C gelagert werden, es darf nicht eingefroren werden.

Es ist bis zum Verfallsdatum einsetzbar, das auf dem Etikett der Verpackung angegeben ist; danach nicht mehr verwenden.

7 REAGENZIIEN- UND PROBENVORBEREITUNG / ANFORDERUNGEN AN DIE PROBEN

Wegen möglicherweise unterschiedlichen Lagerungs- und Transport-Bedingungen dürfen korrespondierende Komponenten aus verschiedenen Kits nicht vermischt oder gegeneinander ausgetauscht werden.

Wird der Kit in mehreren Portionen verwendet, sollten nur die für den aktuellen Test benötigten Volumina den verschiedenen Fläschchen entnommen werden. Dabei ist **ganz wichtig**, dass es zu keinerlei Kreuzkontamination zwischen den Reagenzien kommt! Nur saubere Pipetten verwenden; Reagenzienreste **nicht** in die Original-Fläschchen zurückgeben.

- a. Den Beutel mit der **Festphase** akklimatisieren lassen, erst dann öffnen. Die für den aktuellen Test evtl. nicht benötigten Kavitäten sofort aus dem Gitterrahmen nehmen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Folienbeutel zurücklegen. Diesen hermetisch verschließen und bis zur künftigen Verwendung weiter gekühlt lagern.
- b. Das **Waschpuffer-10x-Konzentrat** (100 mL, blau) wird mit 900 mL deionisiertem Wasser verdünnt und gut durchmischt. Gekühlt bei 2 °C - 8 °C ist diese Lösung für mehrere Wochen stabil.
- c. **Präparation der Proben:**
Patientenseren als potenziell infektiös betrachten und entsprechend vorsichtig handhaben.
Neben Serum ist auch EDTA-, Citrat- oder Heparin-behandeltes Plasma als Probenmaterial geeignet.

Anforderungen an die Proben:

Stark lipämische oder hämolysierte Proben sowie mikrobiell verunreinigte Seren können falsche Ergebnisse liefern und sollten daher vermieden werden.

Die Proben mit üblicher Labortechnik präparieren.

Trübe Proben müssen zunächst geklärt (zentrifugiert) werden.

Die klaren oder geklärten Proben werden mit dem Probenpuffer **1:100** in Reagenzröhrchen verdünnt; bspw. 10 µL Serum + 990 µL Probenpuffer. Die Verdünnungen gut durchmischen.

Zum schnellen Dispensieren während des Testablaufs empfiehlt es sich, Standards, Kontrollen und Proben in Transferröhrchen (Microwell-Format) vorzulegen. Dann kann mit einer 8-Kanal-Pipette gearbeitet werden.

Proben, die nicht sofort analysiert werden können, müssen bei 2 °C - 8 °C gelagert und innerhalb von 3 Tagen gemessen werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Aufgetaute Proben vor dem Verdünnen durchmischen.

Biotin-Konzentrationen bis 150 µg/mL in der unverdünnten Probe haben keinen Einfluss auf das Messergebnis des Tests.

8 DURCHFÜHRUNG DES TESTS

8.1 Manuelle Durchführung

Bevor der Test gestartet wird, müssen alle Kitkomponenten Raumtemperatur (23 °C ± 3 °C) angenommen haben.

Um das bestmögliche Ergebnis (d.h. ein maximales Verhältnis zwischen spezifischem und Hintergrund-Signal) zu erreichen, ist **sorgfältiges Waschen** ganz wesentlich (Schritte a, c und e). Insbesondere ist es wichtig, die **Waschlösung vollständig aus den Kavitäten zu entfernen**. Dazu klopft man die Festphase auf Saugpapier aus. Automatische Waschgeräte müssen daraufhin geprüft werden, ob ihre Ergebnisse mit denen vergleichbar sind, die mit manuellem Waschen erzielt werden.

- a. Unmittelbar vor Testbeginn die Kavitäten einmal mit **je 350 µL Waschpuffer** füllen, ca. 10 Sekunden einwirken lassen und wieder entleeren.
- b. **Je 100 µL** der **Standards** (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau), der **Kontrollen** (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün und rot) und der **verdünnten Proben** zügig in die Kavitäten pipettieren. Doppelbestimmungen werden empfohlen.
Die Kavitätenplatte 30 Minuten bei Raumtemperatur (23 °C ± 3 °C) inkubieren.
- c. Die Kavitäten 4x wie in Schritt a waschen.
- d. **Je 100 µL Konjugat** (14 mL, gebrauchsfertig, rot) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren.
Inkubieren wie in Schritt b.
- e. Waschschritt c wiederholen.
- f. **Je 100 µL Substrat** (14 mL, gebrauchsfertig, farblos, im schwarzen Gefäß) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren.
Inkubieren wie in Schritt b.
Das Substrat ist lichtempfindlich; direkte Belichtung (bspw. Sonnenlicht) während der Inkubation vermeiden.
- g. **Je 100 µL Stopplösung** (14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Vorsicht ätzend!) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren; in derselben Reihenfolge wie beim Substrat: Farbumschlag von blau nach gelb. Die Festphase für ca. 10 Sekunden vorsichtig agitieren, am besten auf einem Schüttler.
- h. Die Platte sofort im Mikrowell-Plattenphotometer bei 450 nm messen.

Überschüssige Reagenzien weiter bei 2 °C - 8 °C lagern, wenn sie später noch einmal verwendet werden sollen.

8.2 Dynex DS2 automatisches ELISA System

Der Test wurde validiert für die Verwendung mit dem Dynex DS2-Automaten.

Eine Beschreibung des Programmablaufs für die Assay-Durchführung und -Auswertung kann als pdf-Datei zur Verfügung gestellt werden.

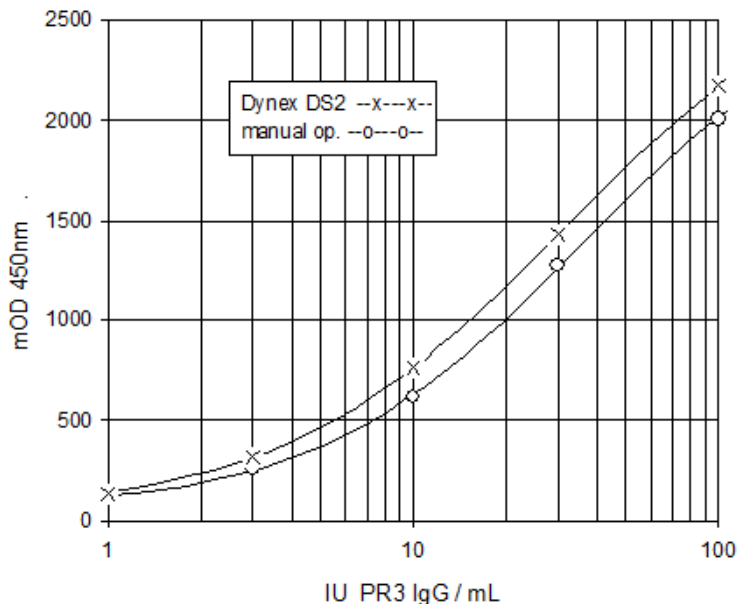
Die Parameter dieses Programms sind nur als Vorschlag zu verstehen und müssen evtl. vom Anwender an die Erfordernisse des aktuellen Tests angepasst werden. Generell haben wir versucht, so eng wie möglich am manuellen Protokoll (s.o.) zu bleiben. Allerdings musste die Substrat-Inkubationsdauer verkürzt werden wegen der zwangsläufig erhöhten Temperatur innerhalb des Geräts.

Abschnitt 11.8. vergleicht Ergebnisse der manuellen Durchführung und des DS2 ELISA Systems.

9 AUSWERTUNG UND QUALITÄTSKONTROLLE

Quantitative Auswertung:

Die Messdaten werden anhand einer Standardkurve quantitativ ausgewertet. Die unten dargestellte Kurve kann jedoch nicht die Messung der Standards bei der Testdurchführung ersetzen, zusammen mit den Kontrollen und den aktuellen Proben. Sie dient lediglich als Modell. Die Kurve wurde von einem üblichen ELISA Auswertungsprogramm mit einer 4-Parameter-Funktion errechnet; die Spline-Approximation ist ebenso geeignet.



Steht keine Rechner-gestützte Auswertung zur Verfügung, so zeichnet man die Standardkurve per Hand und liest an ihr die AK-Konzentration in den Proben ab (IU PR3 IgG / mL Probe).

Qualitative Auswertung:

Der Test kann auch auf qualitative Art ausgewertet werden. Dazu muss nur die positive Kontrolle gemessen werden; allerdings empfiehlt es sich, auch die negative Kontrolle zu messen (s.u.: Qualitätskontrolle).

Bei der qualitativen Testauswertung wird die Absorption der Proben mit der grenzwertigen Absorption (= cut-off) verglichen. Diese errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Absorption}_{\text{cut-off}} = \text{Absorption}_{\text{positive Kontrolle}} \times \text{Faktor}$$

Der Faktor hängt von der Kit-Charge ab und ist im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben; dies liegt jedem Kit bei.

Beispiel:

Absorption _{positive Kontrolle}	= 1250 mOD
Faktor	= 0,35
Absorption _{cut-off}	= 1250 mOD × 0,35 = 438 mOD

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie hoch positiv eine bestimmte Probe an PR3 IgG ist, kann man ihre Ratio berechnen, nach der Formel:

$$\text{Ratio} = \text{Absorption}_{\text{Probe}} / \text{Absorption}_{\text{cut-off}}$$

Beispiel:

Absorption _{cut-off}	= 438 mOD
Absorption _{Probe}	= 1480 mOD
Ratio	= 1480 mOD / 438 mOD = 3,4

Qualitätskontrolle:

Die positive und die negative Kontrolle dienen der Überprüfung des Tests. Ihre jeweiligen Sollwerte und akzeptablen Bereiche sind im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben. Die Messwerte der Kontrollen müssen innerhalb der Toleranzgrenzen liegen; ansonsten sind die Ergebnisse des Tests nicht gültig.

10 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE / GRENZEN DER METHODE

Basierend auf der Messung einer Serie von Blutspenderseren und von positiven Seren (s.u.), schlagen wir für die Beurteilung von Patientenseren vor:

	quantitative Auswertung IU PR3 IgG / mL Probe	qualitative Auswertung Ratio
normaler (negativer) Bereich	< 1,7	< 0,88
cut-off	2,0	1,00
grenzwertiger Bereich	1,7 - 2,4	0,88 - 1,14
positiver Bereich	> 2,4	> 1,14

Diese Spezifikationen sind nur als Anhaltspunkt zu verstehen. Zu ihrer Überprüfung sollten in jedem Test Normalseren mitgeführt werden.

Ein **negatives Ergebnis** zeigt an, dass der Patient keinen erhöhten Titer an IgG-Antikörpern gegen PR3 aufweist. Allerdings können Autoantikörper gegen andere neutrophile Antigene (bspw. CAP57) vorliegen, die ein zytoplasmatisches Färbemuster bei der IFA-Analyse verursachen. Sie sind jedoch im Allgemeinen diagnostisch irrelevant bzgl. PR3-assoziiierter Vaskulitiden.

PR3-Antikörper kommen kaum in gesunden Individuen vor. Ein **positives Ergebnis** sollte daher als Hinweis auf WG verstanden werden. Der Test sollte jedoch mindestens zweimal positiv ausfallen, getrennt durch ein paar Wochen. Vergleichsweise seltener (Prävalenz, abhängig von der Methode, ca. 50 %) treten PR3-Antikörper bei Patienten mit mikroskopischer Polyangiitis und Churg-Strauss Syndrom auf (6).

Proben mit **grenzwertigen Resultaten** sollten als zweifelhaft betrachtet und als solche berichtet werden. Es empfiehlt sich, nach etwa 2 Wochen eine weitere Probe zu messen, parallel mit der zuerst entnommenen, um eine mögliche Änderung des Antikörper-Titers zu erfassen.

Wie bei jedem serologischen Test sollten dessen Resultate nicht isoliert interpretiert werden, sondern im Zusammenhang mit den Symptomen des Patienten und anderen diagnostischen Kriterien.

11 TESTCHARAKTERISTIKA

11.1 Standardisierung

Der Test wird mit einem gereinigten Serumpräparat standardisiert, das IgG-Antikörper enthält, die spezifisch gegen PR3 gerichtet sind. Es wird seinerseits kalibriert am internationalen Standard für die PR3-Serologie, AF-CDC (human reference serum 16, code IS2721). Der Grad der Reaktivität einer Probe wird in internationalen Einheiten (IU/mL) angegeben.

11.2 Analytische Spezifität

Der Test weist spezifisch humane IgG-Antikörper gegen PR3 nach.

Die Interferenz mit Antikoagulanzen (EDTA, Citrat, Heparin) in den Proben wurde getestet und es wurden keine Interferenzeffekte festgestellt.

11.3 Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)

Die Nachweisgrenze ist definiert als diejenige Konzentration des Analyten, die dem OD-Mittelwert des Probenpuffers entspricht, zu dem die 3-fache Standardabweichung (s) addiert wurde. Sie wurde zu < 0,2 IU PR3 IgG / mL Probe bestimmt (n = 24).

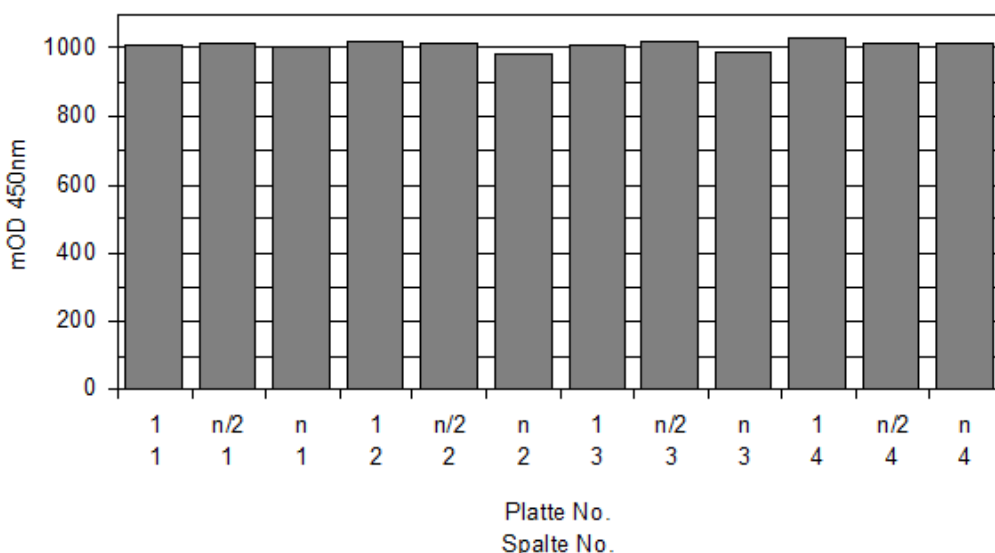
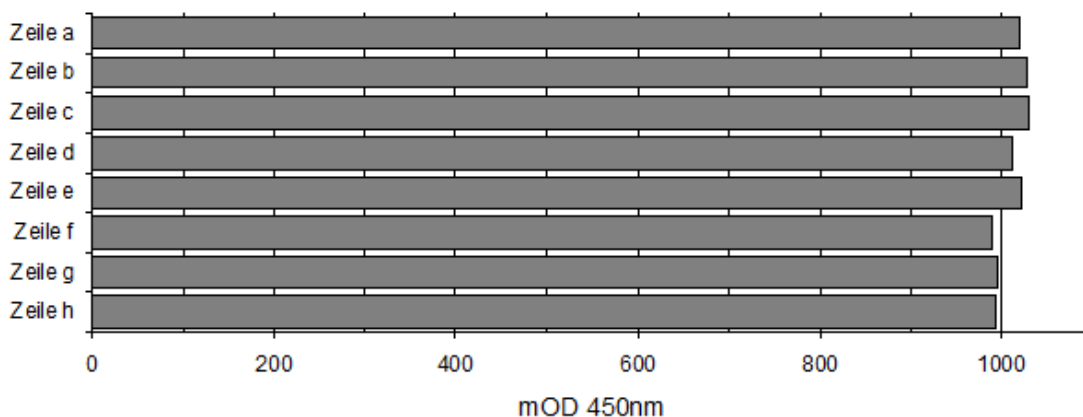
Empfohlener Messbereich: 0,3 - 50 IU/mL Probe.

11.4 Festphasen-Homogenität

Dieser Parameter ist regulärer Bestandteil der QC jeder Produktions-Charge. Die Homogenität wird bestimmt durch 288-fache Messung einer IgG-positiven, aber nicht sättigenden Probe auf 3 ausgewählten Platten. Akzeptanz-Kriterium: mOD-Variationskoeffizient (VK) über die Platten < 8 %.

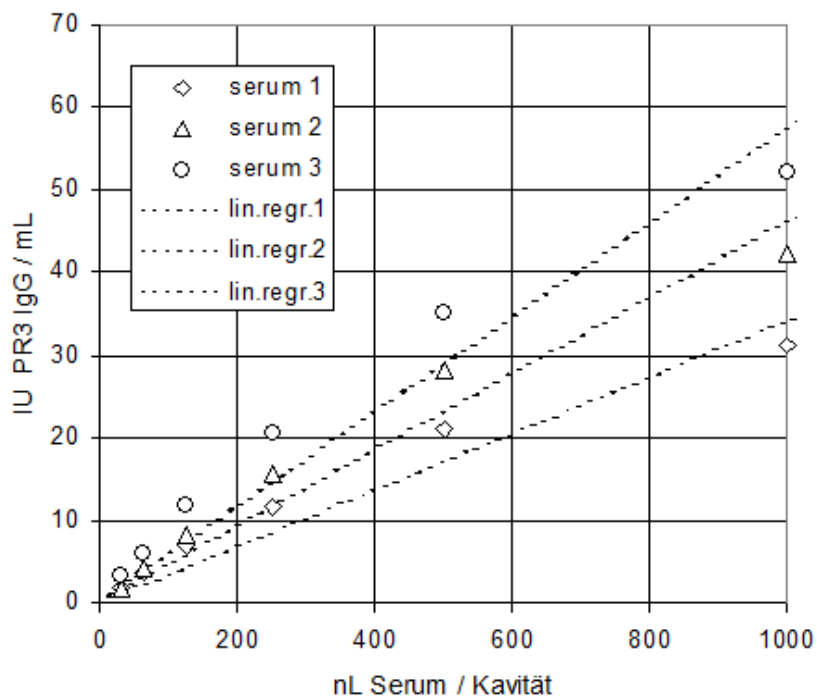
Die folgende Abbildung zeigt einen repräsentativen Auszug einer solchen Analyse (Ch.-Bez. der Festphase: 1306O).

Platte	1	n/2	n	1	n/2	n	1	n/2	n	1	n/2	n	MW	VK %
Spalte	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4		
Zeile a	1003	1023	1022	1011	1023	974	1017	1045	1015	1034	1020	1036	1019	1,8
Zeile b	1031	1021	1000	1027	1048	1006	1036	1047	1001	1050	1022	1026	1026	1,7
Zeile c	1000	1039	1014	1032	1038	1008	1028	1053	1008	1062	1042	1014	1028	1,9
Zeile d	1020	1027	992	1031	1035	989	985	1013	999	1019	1010	1012	1011	1,6
Zeile e	1038	1032	1031	1024	1018	988	1017	1032	987	1030	1041	1012	1021	1,7
Zeile f	965	990	956	1004	987	973	995	998	986	1010	996	1001	988	1,6
Zeile g	1003	981	1005	996	985	973	996	997	962	1035	1006	995	995	1,9
Zeile h	1007	986	998	1035	991	960	1008	979	961	1013	982	999	993	2,2
MW	1008	1012	1002	1020	1016	984	1010	1021	990	1032	1015	1012	1010	
VK %	2,2	2,3	2,3	1,4	2,5	1,7	1,7	2,7	2,0	1,7	2,1	1,4		2,3



11.5 Linearität

Um die Dosis / Wirkungs-Beziehung des Tests zu bestimmen, wurden positive Seren in serieller Zweifachverdünnung gemessen. Akzeptanz-Kriterium: Die lineare Regression vierer sukzessiver Verdünnungen muss einen Korrelationsfaktor > 0,98 ergeben. Ein typisches Ergebnis ist hier abgebildet. Offensichtlich ist eine annähernd lineare Beziehung zwischen Dosis und Wirkung begrenzt auf Ergebnisse < 30 IU/mL.



11.6 Präzision

Um die Präzision des Tests zu ermitteln, wurde die Variabilität der Ergebnisse unter folgenden Bedingungen ermittelt: a. innerhalb eines Assays und zwischen 3 Assays, b. zwischen 3 Anwendern und c. zwischen 2 Kit-Chargen.

a) Intra- und Inter-Assay Variabilität (n = 24 bzw. 72)

Probe	Mittelwert (MW)	Variabilität (VK, %)	
		Intra-Assay	Inter-Assay
1	10,4	3,8	5,5
2	23,8	4,6	7,4
3	35,7	4,4	4,4

b) Operator-zu-Operator Variabilität (n = 12)

Probe	Mittelwert (MW)	Variabilität (VK, %)
1	11,4	4,6
2	25,7	6,8
3	36,9	4,2

c) Variabilität zwischen 2 Kit-Chargen (n = 12)

Probe	Mittelwert (MW)	Variabilität (VK, %)
1	10,7	3,6
2	23,8	6,0
3	35,5	5,1

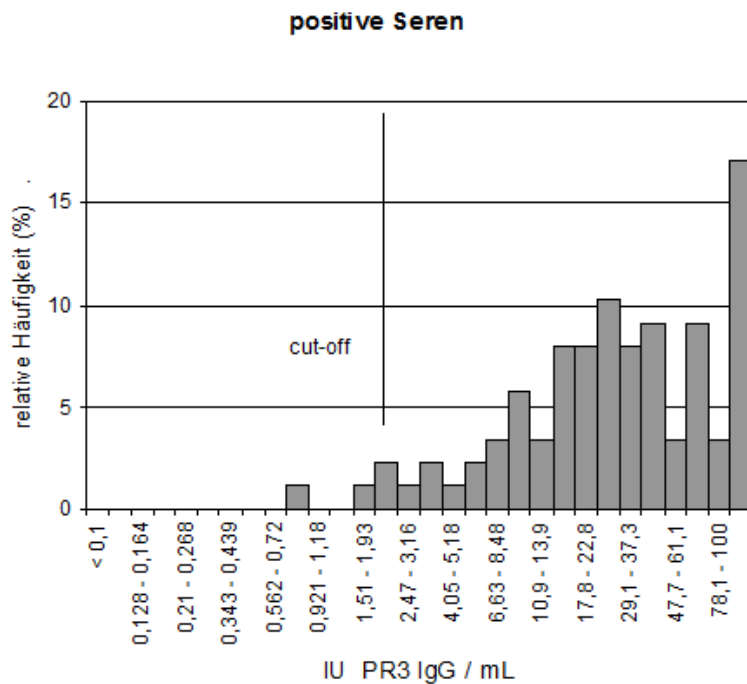
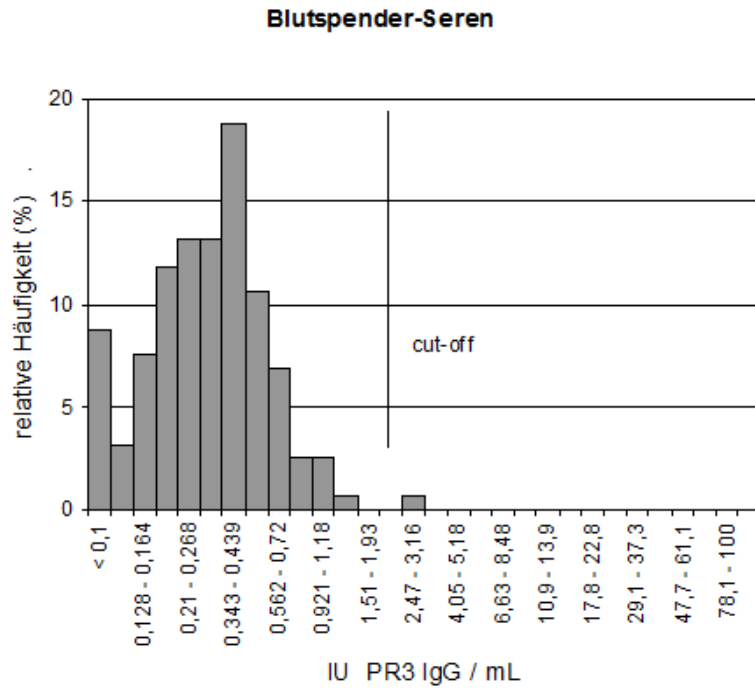
11.7 Häufigkeitsverteilung von PR3 IgG

Diese wurde bestimmt in einem Serenkollektiv von Blutspendern, gleichmäßig nach Alter und Geschlecht verteilt, und einem Kollektiv von Seren, die entweder in verschiedenen Ringversuchen als positiv für PR3 IgG galten oder klinisch definiert waren und/oder positiv gefunden worden waren in einem FDA-zugelassenen, CE-konformen Referenz-ELISA. Folgende Verteilung des Analyten wurde beobachtet:

Blutspender-Seren	
n:	160
MW:	0,4 IU/mL
MW:+ s:	0,7 IU/mL
MW:+ 2s:	1,0 IU/mL
Median:	0,3 IU/mL
95. Perzentile:	0,8 IU/mL

positive Seren	
n:	88
MW:::	102 IU/mL
MW:- s:	< 0 IU/mL
MW:- 2s:	< 0 IU/mL
Median:	29,3 IU/mL
5. Perzentile:	2,9 IU/mL

Mittels ROC-Analyse dieser Daten wurde der cut-off des ELISAs zu 2,0 IU/mL bestimmt (10). Aus den hier gezeigten Daten ergibt sich eine diagnostische Spezifität und Sensitivität des Tests von 99 bzw. 98 %. Diese Werte gelten nur für die gemessenen Seren; andere Kollektive können abweichende Ergebnisse erzielen.



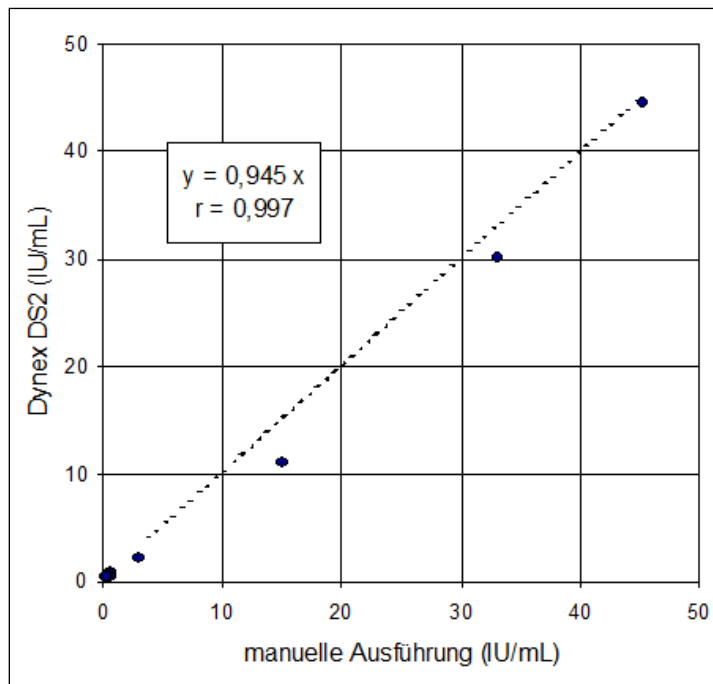
11.8 Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System

Variabilität: Mit Testkits aus einer einzigen Produktionscharge wurde die Variabilität der Assayergebnisse verglichen zwischen manueller Durchführung und dem automatischen DS2 ELISA System:

	manuelle Durchführung	Dynex DS2
Intra-Assay Variabilität (n = 16)	mittl. VK = 4,3 %	mittl. VK = 4,9 %
Inter-Assay Variabilität (n = 48)	mittl. VK = 4,5 %	mittl. VK = 5,4 %

Standardkurve: abgebildet in Abschnitt 9

Korrelation:



12 GARANTIE UND HAFTUNG

DRG garantiert, dass das ausgelieferte Produkt gründlich getestet wurde, um sicherzustellen, dass es seine Spezifikationen erfüllt und der hier gegebenen Beschreibung entspricht. Weitergehende Garantien werden nicht gegeben. Die hier genannten Testcharakteristika wurden mit der angegebenen Methode ermittelt. Jede Änderung der Methode kann die Ergebnisse beeinflussen. In einem solchen Fall verweigert DRG jede Haftung, ob ausgesprochen, impliziert oder gesetzlich. Darüber hinaus kann DRG keinerlei Haftung für Schäden übernehmen, die aufgrund einer unkorrekten Lagerung oder Anwendung des Produktes entstanden sind; direkt, indirekt oder als Konsequenz.



13 KURZANLEITUNG













- a) Die Proben 1/100 in Probenpuffer verdünnen und durchmischen.
- b) Das 10x-Konzentrat des Waschpuffers mit Wasser verdünnen und durchmischen.
- c) Die Kavitäten der Festphase einmal mit je 350 µL Waschpuffer waschen.
- d) Dann je 100 µL der Standards, der Kontrollen und der verdünnten Proben in die Kavitäten pipettieren.
Doppelbestimmungen sind zu empfehlen.
30 Minuten bei Raumtemperatur ($23\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$) inkubieren.
- e) Die Kavitäten 4x mit je 350 µL Waschpuffer waschen.
- f) Je 100 µL des Konjugats in die Kavitäten pipettieren.
Inkubieren wie in Schritt d.
- g) Waschschrift e wiederholen.
- h) Je 100 µL des Substrats in die Kavitäten pipettieren.
Inkubieren wie in Schritt d.
- i) Dann je 100 µL Stopplösung zusetzen und die Platte kurz schütteln.
- j) Sofort die Absorption bei 450 nm messen.
- k) Quantitative Auswertung:
Die Standardkurve ermitteln und anhand dieser Kurve die Absorption der Proben in ihre jeweilige Antikörper-Konzentration (IU PR3 IgG/mL) umformen.
- l) Qualitative Auswertung:
Die grenzwertige Absorption ermitteln, indem die Absorption der positiven Kontrolle mit dem Faktor multipliziert wird, der im Analysen-Zertifikat angegeben ist. Dann die Ratio-Werte der Proben berechnen, indem ihre Absorption durch die grenzwertige Absorption dividiert wird.

14 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / LETTERATURA / LITERATURA / LITTÉRATURE / LITERATURA

1. Van der Woude, F. J., et al.: Autoantibodies to neutrophils and monocytes: a new tool for diagnosis and a marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 2 (1985), 425 - 429
2. Falk, R. J., Jenette, J. C.: Wegener's granulomatosis, systemic vasculitis, and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Annu Rev Med* 42 (1991), 459 - 469
3. Gross, W. L., et al.: Immunodiagnostic and immunopathogenic significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Dtsch Med Wochenschr* 118 (1993), 191 - 199
4. Lüdemann, J., et al.: Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *J Exp Med* 171 (1990), 357 - 361
5. Gross, W. L., et al.: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for proteinase 3. In: Peter, J. B., Shoenfeld, Y. (eds.): *Autoantibodies* (1996), 61 - 67, Elsevier, Amsterdam
6. Radice, A., et al.: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for proteinase 3. In: Shoenfeld, Y., et al. (eds.): *Autoantibodies* (2007), 105 - 110, Elsevier, Amsterdam
7. Westman, K., et al.: Clinical evaluation of a Capture ELISA for detection of proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasmic antibody. *Kidney Int* 53 (1998), 1230 - 1236
8. 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* 251 (2002), 129 - 135
9. Csernok, E., et al.: A critical evaluation of commercial immunoassays for antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 and myeloperoxidase in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Rheumatol* 41 (2002), 1313 - 1317
10. Sommer, R., and Eitelberger, F.: Wertigkeit der Gliadin-Antikörper im Serum zur Diagnose der Zöliakie. *Wien Klin Wochenschr* 104/4 (1992), 86 - 92

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Fertigungslosnummer, Charge *	Codice del lotto	Código de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Estable hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Biological risks*	Biologische Risiken*	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité

Symbol	Português	Ελληνικά
	Conformidade europeia	Ευρωπαϊκή Σήμανση Συμμόρφωσης
	Consultar as instruções de utilização	Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης.
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>	<i>In vitro</i> διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό βοήθημα
	Número de catálogo	Αριθμός καταλόγου
	Código de lote	Κωδικός παρτίδας
	Contém o suficiente para <n> ensaios	Περιεχόμενο επαρκές για <n> εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Όριο θερμοκρασίας
	Utilizar até	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Κατασκευαστής
		
	Atenção	Προσοχή
	Apenas para fins de pesquisa	Για ερευνητική χρήση μόνο.
<i>Distributed by</i>	Distribuído por	Διανέμεται από την
<i>Content</i>	Conteúdo	Περιεχόμενο
<i>Volume/No.</i>	Volume/Quantidade	Όγκος/Αρ.