



**ELISA** ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

**Microwell Method**

## **ANCA Combi**

PR3, MPO, BPI, Elastase, Cathepsin G, Lysozyme, Lactoferrin

**Cat. No. R97434**

*Pro in vitro diagnostické použití*

P ř í b a l o v ý l e t á k

ELISA souprava pro **cut-off** detekci protilátek k cytoplazmě neurofilů (ANCA) - PR3, MPO, BPI, elastáze, katepsinu G, lysozimu a laktoferinu v lidském séru nebo plazmě



---

**Microwell Method - 96 jamek**

(12 proužků x 8 jamek potažených specifickým antigenem)

---

## ZÁKLADNÍ INFORMACE

- **Vlnová délka**
  - Měřicí filtr: 450 nm
  - Volitelný referenční filtr: 600-690 nm
- **Inkubační doba**
  - 60 minut v laboratorní teplotě (30/15/15)
- **Enzyme Conjugate**
  - HRP (Křenová peroxidáza)
- **Substrate**
  - TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin)
- **Vzorek**
  - Sérum nebo plazma
- **Stabilita vzorků**
  - neředěné: 5 dní ve 2-8°C; až 6 měsíců při -20 °C
- **Doba použitelnosti a stabilita komponent**

Souprava:	18 měsíců od data výroby
Komponenty:	viz datum expirace na štítku
Ředící pufr:	stabilní 30 dní po naředění
Promývací pufr:	stabilní 30 dní po naředění

### Indikace

**Myeloperoxidase ANCA:** Vasculitis, Microscopic Polyangiitis, Churg-Strauss Syndrome, SLE, Rheumatoid Arthritis

**Proteinase 3 ANCA:** Wegener's Granulomatosis

**BPI ANCA:** Chronically Infectious Diseases, Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa

**Elastase ANCA:** Emphysema, Rheumatoid Arthritis, Inflammatory Rheumatic Disorders

**Cathepsin G ANCA:** Inflammatory Rheumatic Diseases, SLE, Sjögren Syndrome, Felty Syndrome

**Lysozyme ANCA:** Rheumatoid Vasculitis, Inflammatory Bowel Disease, Colitis Ulcerosa

**Lactoferrin ANCA:** Rheumatoid Vasculitis, Colitis Ulcerosa, Primary Sclerosing Cholangitis

**SLOŽENÍ SOUPRAVY**

<b>Microwell plate</b> Mikrotitrační destička	12 <b>8 jamkové stripy</b> s odlamovatelnými jamkami potažené jedním z následujících vysoce purifikovaných antigenů (PR3, MPO, BPI, Elastase, Cathepsin G, Lysozyme a Lactoferrin) na vzorky pacientů a se směsí neurofilních cytoplasmických antigenů jako kontrolami; <b>k přímému použití.</b>
<b>Negative Control (A)</b> Negativní kontrola	1 lahvička, 1.5 ml, obsahuje protilátky k ANCA v séropufrovém matrixu, (PBS, BSA, detergent, NaN <sub>3</sub> 0.09%), žlutá kapalina, <b>k přímému použití.</b>  hodnota a rozmezí jsou uvedeny v quality control certificate
<b>Cut-Off Control (B)</b> Cut-off kontrola	1 lahvička, 1.5 ml, obsahuje protilátky k ANCA v séropufrovém matrixu, (PBS, BSA, detergent, NaN <sub>3</sub> 0.09%), žlutá kapalina, <b>k přímému použití.</b>  hodnota a rozmezí jsou uvedeny v quality control certificate
<b>Positive Control (C)</b> Pozitivní kontrola	1 lahvička, 1.5 ml, obsahuje protilátky k ANCA v séropufrovém matrixu, (PBS, BSA, detergent, NaN <sub>3</sub> 0.09%), žlutá kapalina, <b>k přímému použití.</b>  hodnota a rozmezí jsou uvedeny v quality control certificate
<b>Enzyme Conjugate</b> Enzym konjugát	1 lahvička polyklonálního rabbit anti-human-IgG HRP konjugátu, 15 ml, barevně značeno <b>růžová, k přímému použití.</b>
<b>Substrate Solution</b> Substrát	1 lahvička TMB; obsahuje 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin, 15 ml, <b>k přímému použití.</b>
<b>Stop Solution</b> Stopovací roztok	1 lahvička kyseliny fosforečné (<5%), 15 ml, <b>k přímému použití.</b>
<b>Sample Diluent</b> Ředící roztok	1 lahvička, 20 ml, obsahuje PBS, BSA, detergent, konzervans azid sodný 0.09%, <b>koncentrát (5x)</b> , barevně značeno <b>žlutá.</b>
<b>Wash Buffer</b> Promývací roztok	1 lahvička, 20 ml, obsahuje Tris, detergent, konzervans azid sodný 0.09%, <b>koncentrát (50x).</b>

**DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL**

- Reader mikrotitračních destiček sachoný měřit endpoint při 450 nm, volitelně, referenční filtr 620 nm
- Software na zpracování dat
- Multikanálový dispensor nebo opakovací pipeta na 100 µl
- Třepačka

- Pipety 10 µl, 100 µl a 1000 µl
- Laboratorní stopky
- Destilovaná nebo deionizovaná voda
- Odměrné válce na 1000 ml a 100 ml
- Plastová nádoba na uchování promývacího roztoku

Reader a Promývačku Vám v Dialabu nabídneme.

## SHRnutí A VÝZNAM

Protilátky proti cytoplasmě neutrofilů se vyskytují u systémových nekrotizujících vaskulitid a idiopatických rychle progredujících glomerulonefritid. Pozitivita autoprotilátek ANCA je typická pro vaskulitické syndromy typu Wegenerovy granulomatózy (cANCA se specifitou proti proteináze 3) a nodózní polyarteriitidy (pANCA se specifitou proti myeloperoxidáze). Autoprotilátky ANCA jsou často pozitivní i při chronických střevních zánětech (ulcerózní kolitida), cystické fibróze, sklerozující cholangitidě i jiných imunopatologických stavech.

Klinický význam testovaných protilátek při diagnostice:

PR3- proteináza 3- zvláště Wegenerova granulomatóza, Syndrom Churga-Straussové, cystická fibróza

MPO- myeloperoxidáza- Mikroskopická polyangiitida, Syndrom Churga-Straussové, Nodózní polyarteriitida, SLE,

nespecifikované střevní záněty a další autoimunitní onemocnění

BPI- nespecifikované střevní záněty jako jsou Crohnova nemoc nebo ulcerózní kolitida, cystická fibróza

Elastáza- SLE (zánětlivá revmatoidní onemocnění), ulcerózní kolitida

Katepsin G- zánětlivá střevní onemocnění, zánětlivá revmatoidní onemocnění

Lysozym- revmatoidní vaskulitida, ulcerózní kolitida

Laktoferin- revmatoidní artritida, zánětlivá onemocnění trávicího traktu, akutní hepatitida

Následující tabulka shrnuje využití ANCA protilátek k diagnostice autoimunitních onemocnění:

Onemocnění	IF	Antigen
Wegenerova granulomatóza	c-ANCA, vzácně p-ANCA	PR3, vzácně MPO
Mikroskopická polyangiitida	c-ANCA, p-ANCA	PR3, MPO
Churg-Straussové syndrom	p-ANCA	MPO
Nodózní polyarteriitida	vzácně ANCA	Vzácně PR3 a MPO
Neklasifikovaná vaskulitida	vzácně	Ne PR3 a MPO
Revmatoidní artritida	GS-ANA, P-ANCA, atypická ANCA	vzácně MPO, laktoferin p-ANCA, a-ANCA
SLE	p-ANCA	Vzácně MPO a Laktoferin
Ulcerózní kolitida		Katepsin, Iktoferin

## TEST PRINCIPLES

Jamky jednotlivých stripů mikrotitrační destičky jsou potaženy antigeny PR3, MPO, BPI, elastázy, katepsinu G, lysozomu a laktoferinu. Protilátky k tomuto antigenu, pokud jsou přítomny v séru nebo plazmě, se vážou na antigen. Promytím se z jamek odstraní nespecifické složky séra nebo plazmy. Přidaný enzym konjugát se váže na pacientovy protilátky za vzniku komplexu konjugát-protilátka-antigen. Promytím se odstraní nenavázaný konjugát. Přidaný substrát pak v přítomnosti vázaného konjugátu hydrolyzuje za vzniku modrého zbarvení. Po přidání kyseliny se reakce zastaví za vzniku žlutě zbarveného produktu. Intenzita žlutého zbarvení je přímo

úměrná koncentraci IgG, IgM a IgA protilátek ve vzorku.

## ČINIDLA

- Reagencie skladujte při 2 – 8 °C ve tmě.
- Během skladování reagencie nevystavujte reagencie horku, slunečnímu záření nebo intenzivnímu světlu.
- Mikrotitrační destičky skladujte hermeticky uzavřené v originálním obalu.
- Neotevřená souprava je stabilní po celou dobu použitelnosti (18 měsíců). Viz etikety.
- Jednou naředěné pufrы jsou stabilní, pokud jsou skladovány při teplotě 2 – 8 °C, po dobu 30 dní.

Nepoužívejte reagencie po uplynutí doby použitelnosti soupravy!

## SBĚR A MINIPULACE SE VZORKEM

- K odběru krevních vzorků použijte stanovené postupy.
- Obvyklým způsobem připravte sérum..
- Vysoce hemolyzované, lipemické nebo mikrobiologicky kontaminované vzorky by neměly být použity. Bilirubin nemá na stanovení vliv.
- Vzorky pro stanovení se mohou uchovávat při 2 – 8 °C po dobu maximálně 5 dní, po zamražení až po dobu 6 měsíců.
- Opakovaně nezmrazujte! Protilátka ztácí svou aktivitu.
- Nedoporučujeme testování tepelně inaktivovaného séra.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

- Všechny reagencie v soupravě jsou určeny pro profesionální in vitro diagnostické použití.
- Všechny složky lidského původu byly testovány na HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I a shledány negativními postupy doporučenými FDA. Přesto je se všemi deriváty lidské krve a se vzorky pacientů třeba zacházet jako s látkami potencionálně infekčními. Dodržujte SLP ve skladování, rozplňování, manipulaci s těmito materiály.
- Bovinní sérový albumin (BSA) použitý v činidlech byl testován a shledán negativním na BSE.
- Vyvarujte se styku TMB s pokožkou. Pokud dojde k potřísnění, omyjte důkladně vodou a mýdlem.
- Vyvarujte se styku Stopovacího roztoku s pokožkou. Pokud dojde k potřísnění, omyjte důkladně vodou a mýdlem.
- Kontroly, ředící roztok a promývací roztok obsahují azid sodný 0,09% jako konzervans. Tato koncentrace není klasifikována jako nebezpečná.
- Enzym konjugát ProClin 300 0.05% jako konzervační činidlo. Tato koncentrace není klasifikována jako nebezpečná.
- Při manipulaci s reagenty a vzorky dodržujte pravidla SLP.
- První pomoc: V případě kontaktu s pokožkou ihned opláchněte vodou a mýdlem. Sejměte kontaminovaný oděv a boty a před dalším použitím vyčistěte. Při vniknutí do očí důkladně oplachujte pod tekoucí vodou minimálně 10 minut. Podle potřeby vyhledejte lékařskou pomoc.
- Ochranné pomůcky a nouzové postupy: Dodržujte směrnice pro bezpečnou práci v laboratoři. Zabraňte potřísnění nebo vniknutí reagentů do očí. Nepipetujte ústy.

V laboratoři nejezte, nepijte, nekuřte a nenanášejte make-up. Při vylití nasajte inertním materiálem a zlikvidujte v souladu s předpisy.

- Expoziční limity, ochrana osob: Při práci používejte ochranné rukavice z nitrilové pryže nebo přírodního latexu. Používejte ochranné brýle. Při manipulaci podle zamýšleného účelu použití nejsou známy nebezpečné účinky.
- Situace, kterým je třeba předcházet: Substrát je citlivý na světlo, skladujte na tmavém místě.
- Při likvidaci laboratorního odpadu dodržujte platné předpisy.

## POSTUP

### Doporučení k pracovnímu postupu

- Nepoužívejte reagenty po uplynutí doby použitelnosti.
- Nepoužívejte reagenty ze souprav různých šarží.
- Před zahájením testu vytemperujte všechny reagenty na laboratorní teplotu (20-28°C).
- Před zahájením testu si připravte všechny reagenty a vzorky. Po zahájení musíte provést celý test bez přerušení.
- Doporučujeme pipetovat kontroly i vzorky v dubletu. Projeví se tak lépe případná chyba v pipetování.
- Všechny kroky testu provádějte ve stanoveném pořadí.
- Používejte vždy čerstvě naředěné vzorky.
- Reagenty a vzorky pipetujte na dno jamek.
- Pokaždé používejte čistou špičku, předejete tak křížové kontaminaci.
- Uvědomte si, že promývání je kritickým krokem testu, na jehož precizním provedení závisí reprodukovatelnost výsledku.
- Dodržujte časování mezi jednotlivými kroky.
- Nepoužívejte mikrotitrační destičku opakovaně.

### Příprava činidel

Ředící roztok (5x): Naředte před použitím na celkový objem 100 ml destilovanou vodou.

Promývací roztok (50x): Naředte před použitím na celkový objem 1000 ml destilovanou vodou.

### Preparation of Sample Dilutions

Vzorky séra nebo plazmy: Ředte 1:100 ředícím roztokem. Např.:

10 µl séra nebo plazmy	+ 990 µl ředícího roztoku
------------------------	---------------------------

*Pozn.: Kalibrátory/Kontroly jsou připraveny k přímému použití a nemusí se ředit*

### Postup:

Připravte si dostačující množství jamek.

1. Napipetujte **100 µl** kontrol a předředěných vzorků do příslušných jamek.
2. Inkubujte **30 minut** při laboratorní teplotě (20-28 °C).
3. Obsah jamek vylijte a 3 x vypláchněte 300 µl promývacího roztoku.
4. Do každé jamky napipetujte **100 µl** konjugátu a inkubujte 15 minut při laboratorní teplotě.
5. Obsah jamek vylijte a **3 x vypláchněte 300 µl** promývacího roztoku.

6. Do každé jamky napipetujte **100 µl** substrátu.
7. Inkubujte **15 minut** při laboratorní teplotě.
8. Reakci ukončete přidáním **100 µl** stopovacího roztoku. Dbejte na to, abyste roztok přidávali ve stejném pořadí jako substrát.
9. Absorbanci odečtete po cca **5 minutách** při 450/600–690 nm. Neodečítejte po více než 30 minutách.

Schéma pipetování:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
										0	1	2	Control
<b>a</b>	A	B	C										← mixed antigen A
<b>b</b>	P	P	P	P									← PR3 B
	1	2	3	..									
<b>c</b>	P	P	P	P									← MPO C
	1	2	3	..									
<b>d</b>	P	P	P	P									← BPI
	1	2	3	..									
<b>e</b>	P	P	P										← Elastase
	1	2	3										
<b>f</b>	P	P	P										← Cathepsin G
	1	2	3										
<b>g</b>	P	P	P										← Lysozyme
	1	2	3										
<b>h</b>	P	P	P										← Lactoferrin
	1	2	3										

## VALIDITA

Výsledky testu jsou validní, pokud OD při 450 nm kalibrátorů/kontrol a výsledky kontrol odpovídají referenčnímu rozmezí uvedenému v Certificate of Analysis, který je přiložen ke každé soupravě.

Pokud nejsou tato kritéria splněna, není test validní a je třeba jej opakovat.

## VÝPOČET VÝLEDKŮ

Každé řadě (typ antigenu) je pro každý LOT v Certifikátu kvality uveden specifický faktor, kterým je potřeba vynásobit změřenou absorbanci. Následně pak pro každý vzorek vypočítat Index:

$$OD_{vz.adj.} = OD_{vzorku} * \text{LOT faktor}$$

$$Index = \frac{OD \text{ sample}}{OD \text{ Control B}}$$

## HODNOCENÍ FUNKČNÍ ZPŮSOBILOSTI

### Kalibrace

Test je kalibrován v relativních arbitrážních jednotkách, protože dosud není k dispozici žádný mezinárodní referenční materiál.



**Očekávané hodnoty**

Testováním vzorků zdravých dárců byla stanovena cut-off Index = 1,0

**Interpretace výsledků**

Negativní Index < 1,0

Pozitivní Index ≥ 1,0

**Linearita**

Vzorky pacientů s vysokou hladinou protilátek byly sériově zředěny a testovány. Koncentrace byly odečteny z kalibrační křivky.

Vzorek	Ředění	Nalezený index	Očekávaný Index	N/O [%]
PR3	1:100	3.7	3.7	100
	1:200	1.9	1.8	103
	1:400	1.0	0.9	111
MPO	1:100	3.4	3.4	100
	1:200	1.8	1.7	106
	1:400	0.9	0.9	100
BPI	1:100	3.8	3.8	100
	1:200	2.0	1.9	105
	1:400	0.9	0.9	100
Elastase	1:100	3.0	3.0	100
	1:200	1.6	1.5	106
	1:400	0.7	0.7	100
Lysozyme	1:100	3.1	3.1	100
	1:200	1.5	1.6	94
	1:400	0.7	0.8	86
Lactoferrin	1:100	3.6	3.6	100
	1:200	1.7	1.8	94
	1:400	0.8	0.9	89

**Reprodukovatelnost**

Intra-assay- 24 opakování tří různých vzorků

Inter-assay- tři různé vzorky v šesti opakováních v pěti různých testech

Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample	Mean Index	CV %	Sample	Mean Index	CV %
PR3	1.8	3.2	PR3	1.7	2.8
MPO	2.0	2.8	MPO	1.9	2.0
BPI	1.3	4.2	BPI	1.3	2.8
Elastase	1.3	4.6	Elastase	1.2	3.3
Cathepsin G	1.4	5.1	Cathepsin G	1.4	2.8
Lysozyme	1.1	4.5	Lysozyme	1.0	3.7
Lactoferrin	1.9	3.0	Lactoferrin	1.8	2.4

## Interference

Nebyla pozorována interference se séry, která byla hemolytická (do 1000 mg/dl), lipemická (do 34 mmol/l triglyceridů) nebo s obsahem bilirubinu až do 684 µmol/l. Nebyly pozorovány interference s antikoagulačními činidly (EDTA, heparin, citrát). Přesto doporučujeme vysoce hemolyzované nebo lipemické vzorky netestovat.

## Studie na populaci

Sample description	n	n pos	%
ANCA vasculitis/non-ANCA vasculitis or other conditions	102	92	90.2
Healthy controls or non-rheumatological or non-ANCA vasculitis	234	32	13.7

## Imunologická

	Pos	Neg	
Pos	92	32	
Neg	10	202	
	102	234	336

Sensitivity: 90.2 %

Specificity: 86.3 %

Overall agreement: 87.5 %

## OMEZENÍ TESTU

Test je určen pro in-vitro diagnostické použití. Klinická diagnóza nemůže být stanovena pouze na základě výsledků tohoto testu, ale musí vycházet z celkového klinického obrazu a výsledků dalších testů. Každá laboratoř si podle ISO15189 nebo jiné vhodné metodiky musí stanovit vlastní rozmezí normálních a abnormálních hodnot.

## LITERATURA

1. Hauschild, S.; Schmitt, W.H.; Csernok, E.; Flesch, B. K.; Rautmann, A.; Gross, W.L.. ANCA in systemic vasculitides, collagen vascular diseases, rheumatic disorders and inflammatory bowel diseases. ANCA-associated Vasculitides: Immunological and clinical aspects. Edited by W. L. Gross, Plenum Press, New York, 1993, pp. 245 - 251.
2. Schmitt, W.H.; Csernok, E.; Flesch, B. K.; Hauschild, Gross, W.L.. Autoantibodies directed against Lysozyme: A new target Antigen for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). ANCA-associated Vasculitides: Immunological and clinical aspects. Edited by W. L. Gross, Plenum Press, New York, 1993, 267 - 272.
3. Skogh, T. and Peen, E.. Lactoferrin, anti-Lactoferrin antibodies and inflammatory disease. ANCA-associated Vasculitides: Immunological and clinical aspects. Edited by W. L. Gross, Plenum Press, New York, 1993, pp. 533 - 538.
4. Stoffel, M. P.; Csernok, E.; Herzberg, C.; Johnston, T.; Carroll, S.F. and Gross, W. L.. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against bactericidal/permeability increasing protein (BPI): a new seromarker for inflammatory bowel disease and associated disorders. Clin Exp. Immunol. 1996, No. 104, pp. 54 - 59.
5. Zhao, M. H.; Jayne, D. R. W.; Ardiles, L. G.; Culley, F.; Hodson, M.E. and Lockwood. Autoanti-

- bodies against bactericidal/permeability increasing protein in patients with cystic fibrosis. *J. Med.* 1996, No. 89, pp. 259 - 265.
6. Wiik, A.; Stumman, L.; Kjeldsen, L.; Borregaard, N.; Ullman, S.; Jacobsen, S. and Halberg, P.. The diversity of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) antigens. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> international ANCA workshop, France - July 1995*, pp. 15 - 17.
  7. Jenette, J. C. and Falk, R. J.. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases: A review. *Am. J. of Kidney Disease* 1990, Vol XV, No. 6, pp. 517 - 529.
  8. Schmitt, W. H. and Gross, W. L.. Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA). *Internist* 1995, No. 36, pp. 282 - 290.
  9. Gross, W. L. and Rheinhold-Keller, E.. ANCA-assoziierte Vaskulitiden (Wegener Granulomatose, Churg-Strauß-Syndrom, Mikroskopische Polyangiitis) - 1. Systematik, Pathogenese und Klinik. *Z. Rheumatol* (1995), No. 54, pp. 279 - 290.
  10. de Grot, K.; Schnabel, A. and Gross, W. L.. ANCA-assoziierte Vaskulitiden (Wegener Granulomatose, Churg-Strauß-Syndrom, Mikroskopische Polyangiitis) - 1. Diagnostisches Procedere. *Z. Rheumatol* (1995), No. 54, pp. 291 - 302.

## **ELISA** Enzyme Linked Immunosorbent Assay



DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch – technischen Produkten  
und Laborinstrumenten Gesellschaft m.b.H.  
A – 2351 Wiener Neudorf, Austria, IZ-NÖ Süd, Hondastrasse, Objekt M55  
Phone: ++43 (0) 2236 660910-0, Fax: ++43 (0) 2236 660910-30  
e-mail: office@dialab.at