



# Anti-Myeloperoxidase (MPO) Antibody ELISA

IVD

## PRODUCT INSERT

REF 1161 anti-Myeloperoxidase antibodies (MPO) 96 Determinations

### INTENDED USE

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and quantitation of antibodies to myeloperoxidase (MPO) in human serum.

### SUMMARY AND EXPLANATION

The presence of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in patients with vasculitis was first observed in 1982 by Davies<sup>1</sup>. ANCA are a group of autoantibodies directed against proteins in the granules of neutrophils and in peroxidase-positive lysosomes of peripheral blood monocytes. These antibodies can be detected by indirect immunofluorescence on ethanol-fixed neutrophils, producing a characteristic perinuclear staining pattern<sup>2,3</sup>. pANCA occur in vasculitis, glomerulonephritis, Churg-Strauss syndrome, polyarteritis nodosa, systemic lupus erythematosus, and rheumatoid arthritis<sup>4,5</sup>. A major antigen of pANCA is myeloperoxidase (MPO), which constitutes a potent microbicidal system within the neutrophil granulocytes. Additional target antigens such as human leukocyte elastase, and lactoferrin have also been associated with the pANCA fluorescence pattern<sup>6,7</sup>. Antibodies to MPO can also be induced by drugs such as hydralazine, clozapine, and L-tryptophan<sup>8</sup>. Occupational exposure to environmental factors such as silica dust may provoke an anti-MPO positive progressive glomerulonephritis<sup>8</sup>. Measurement of MPO-specific ANCA antibodies is an important adjunct to clinical findings in the evaluation of clinical subtypes within the systemic vasculitides.

### PRINCIPLES OF PROCEDURE

The ELISA is performed as a solid phase immunoassay. Microwells are coated with purified MPO antigen followed by blocking the unreacted sites to reduce non-specific binding. Controls, calibrators and patient serum samples are incubated in the antigen coated wells which allows specific antibodies present in the serum to bind to the MPO antigen.

Unbound antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. Bound antibodies are detected by adding an enzyme labeled anti-human IgG conjugate to the microwells. Unbound conjugate is removed by washing.

Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of pNPP substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in enzyme units per milliliter (EU/ml).

### REAGENTS

#### Storage and Preparation

Store all reagents at 2°-8°C. **Do not freeze.**

Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20°-25°C) prior to use.

When stored at 2°- 8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water.

Coated microwell strips are for one time use only.

### Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>9</sup>.

**WARNING** - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use beyond expiration date on the label.

### Materials provided









ImmLISA™ Anti-Myeloperoxidase (MPO) Antibody ELISA REF 1161

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>MPO</b>	<b>Microplate</b> with individual breakaway microwells coated with MPO antigen
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>A</b>   <b>MPO</b> *	Ready to use <b>Calibrator A</b> ( <i>green cap</i> ). Human serum containing antibodies to MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>B</b>   <b>MPO</b> *	Ready to use <b>Calibrator B</b> ( <i>violet cap</i> ). Human serum containing antibodies to MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>C</b>   <b>MPO</b> *	Ready to use <b>Calibrator C</b> ( <i>blue cap</i> ). Human serum containing antibodies to MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>D</b>   <b>MPO</b> *	Ready to use <b>Calibrator D</b> ( <i>yellow cap</i> ). Human serum containing antibodies to MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>+</b>   <b>MPO</b> *	Ready to use <b>Positive Control</b> ( <i>red cap</i> ). Contains human serum positive for MPO antibodies.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>-</b> *	Ready to use <b>Negative Control</b> ( <i>whitecap</i> ). Contains human serum.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b>   <b>ALKPHOS</b> *	Ready to use <b>anti-human Alk. Phos. Conjugate</b> . Color coded pink.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Ready to use <b>Serum Diluent</b> . Color coded blue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Ready to use <b>Enzyme Substrate</b> . Contains pNPP. <b>Protect from light.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Ready to use <b>Stop Solution</b> .
2 x	<b>BUF</b>   <b>WASH</b>	<b>Powder Wash Buffer</b> . Reconstitute to one liter each.

\* Contains <0.1% NaN<sub>3</sub>

**Symbols used on labels:**

-  Lot number
-  Catalog number
-  Use by
-  Storage temperature
-  Read instructions for use
-  In vitro diagnostic use
-  Manufacturer
-  Number of Tests

**Materials Required But Not Provided**

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer or Automatic microplate washer capable of dispensing 300 µl
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm

**SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING**

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

**PROCEDURE****Procedural Notes**

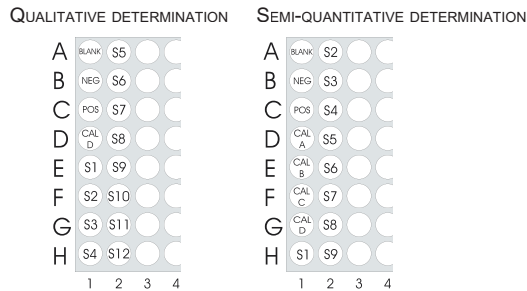
- Before starting with the assay read carefully the product insert.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate at room temperature before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Good washing technique is critical. If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.

EN

- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.

### Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate at room temperature.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** For a **qualitative determination** use only the Ready to Use Low Calibrator D (*vial with yellow cap*).  
or For a **semi-quantitative determination** use the Ready to Use Calibrators A through D as depicted in the sample layout below



- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **0.5 ml** of Serum Diluent.
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder .
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples to the appropriate microwells as per protocol sheet.  
**Note:** Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within 1 hour from adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or 405/630nm dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

### Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. The Calibrator A should

EN

have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <20 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of the Calibrator D must be greater than that of the negative control and lesser than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations, the positive control must give values in the range stated on the vial.

## RESULTS

### Calculations

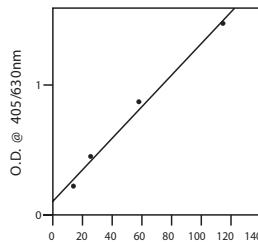
The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

#### 1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{EU/ml of Calibrator D} = \text{EU/ml Test Sample}$$

#### 2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value.



### Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such serum sample should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor.

### Interpretation

The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. The values depicted below were determined by testing 63 normal blood donors and represent the mean of the normals plus 3SD. Each laboratory must determine its own normal values.

Anti-MPO values	Interpretation
≤20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	Borderline
>25 EU/ml	Positive

**LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

Test results obtained by this assay alone, are not diagnostic and should be considered in conjunction with the clinical presentation of the patient.

**EXPECTED VALUES**

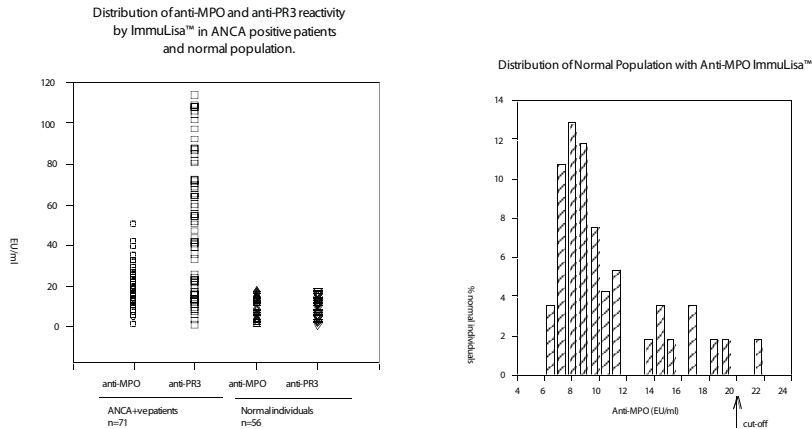
Expected values in a normal population are negative. However, 4% of apparently healthy, asymptomatic individuals may test positive for anti-MPO antibodies. Recently reported studies show patients, diagnosed for Rheumatoid Arthritis, chronic polyarthritis, undifferentiated connective tissue disease and SLE contain anti-MPO or pANCA antibodies<sup>5</sup>. Immunosuppressive therapy, initiation or alteration in treatment should not be started on the basis of just positive MPO antibody result, but rather on careful clinical observations.

The following table depicts the frequency of PR3 and MPO specific ANCA in sera from 112 ANCA associated vasculitides patients<sup>10</sup>.

**Incidence of anti-PR3 and anti-MPO in ANCA associated vasculitides**

	<b>Wegener's granulomatosis</b>	<b>Microscopic polyngitis</b>	<b>Churg-Strauss syndrome</b>
<b>ANCA positive by IFA</b>	78%	59%	67%
<b>anti-PR3 positive</b>	90%	0%	10%
<b>anti-MPO positive</b>	0%	62%	17%
<b>unknown specificity positive</b>	40%	31%	73%

The following figures depict the incidence of anti-PR3 and MPO antibodies in normals and selected group of ANCA positive individuals with the anti-MPO ImmuLisa™.



**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**Precision:**

Two anti-MPO-ANCA positive sera were tested with the ImmuLisa™ MPO ELISA to determine inter- and intra-assay variability. The results are as follows:

	<b>inter-assay %CV</b>	<b>intra-assay %CV</b>
<b>Sample 1</b>	7.4	5.5
<b>Sample 2</b>	8.6	5.3

EN

**Recovery:**

Samples with known anti-MPO antibody concentrations were mixed with appropriate dilutions of another positive sample with known amounts. Anti-MPO antibody levels of the mixed samples were determined and from the values obtained the percent recovery calculated. The results are as follows:

	<b>MPO-Ab conc. added (EU/ml)</b>	<b>MPO-Ab conc. obtained (EU/ml)</b>	<b>% Recovery</b>
<b>Sample 1</b>	66.0	72.6	110.0
<b>Sample 2</b>	55.0	54.9	99.8
<b>Sample 3</b>	49.5	46.1	93.1

Results obtained with the ImmuLisa™ Anti-MPO ELISA were compared with another commercially manufactured assay. The results are as follows:

		<b>ImmuLisa™</b>		
		<b>Positive</b>	<b>Negative</b>	<b>Total</b>
	<b>Positive</b>	19	4	23
<b>Other</b>	<b>Negative</b>	24	24	48
	<b>Total</b>	43	28	71

Relative Agreement: 60%

Relative Sensitivity: 82%

Relative Specificity: 50%

Results obtained with the ImmuLisa™ Anti-MPO ELISA were compared to results obtained by an immunofluorescence assay (IFA). They are tabulated below and indicate a high degree of correlation between the ImmuLisa™ anti-MPO ELISA and to the gold standard IF method:

		<b>ImmuLisa™</b>		
		<b>Positive</b>	<b>Negative</b>	<b>Total</b>
	<b>Positive</b>	22	1	23
<b>Other</b>	<b>Negative</b>	3	45	48
	<b>Total</b>	25	46	71

Relative Agreement: 94%

Relative Sensitivity: 93%

Relative Specificity: 95%



## Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1161 έθοδος L S για αντισώματα κατά της μυελοϋπεροξειδάσης ( PO) 96 Προσδιορισμοί

### ΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσοροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων κατά της μυελοϋπεροξειδάσης ( PO) σε ορό ανθρώπου.

### ΕΡΙΑΛΗΨΗ ΚΑΙ Ε ΕΞΗΓΗΣΗ

Η παρουσία των αντισωμάτων κατά του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων (ANCA) σε ασθενείς με αγγειίτιδα παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1982 από τον Da ie<sup>1</sup>. Τα ANCA είναι μια ομάδα αυτοαντισωμάτων τα οποία παράγονται κατά πρωτεϊνών που βρίσκονται στα κοκκία των ουδετερόφιλων και στα θετικά για υπεροξειδάση λυσοσώματα των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Τα αντισώματα αυτά μπορούν να ανιχνευθούν με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε καθλωμένα με αιθανόλη ουδετερόφιλα, όπου δημιουργούν ένα χαρακτηριστικό πρότυπο χρώσης γύρω από τον πυρήνα<sup>2,3</sup>. Τα ANCA εμφανίζονται στην αγγειίτιδα, στην σπειραματονεφρίτιδα, στο σύνδρομο Ch g-S a ss, στην οξώδη πολυαρθρίτιδα, στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο και στη ρευματοειδή αρθρίτιδα<sup>4,5</sup>. Ένα κύριο αντιγόνο των pANCA είναι η μυελοϋπεροξειδάση (MPO), η οποία αποτελεί ένα ισχυρό μικροβιοκτόνο σύστημα εντός των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων. Επιπρόσθετα αντιγόνα-στόχοι, όπως η ελαστάση των ανθρώπινων λευκοκυττάρων και η λακτοφερρίνη, έχουν επίσης συσχετιστεί με το πρότυπο ανοσοφθορισμού των pANCA<sup>6,7</sup>. Αντισώματα κατά της PO επάγονται επίσης από φάρμακα, όπως η υδραλαζίνη, η κλοζαπίνη και η L-τροπιποφάνη<sup>8</sup>. Η επαγγελματική έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι η σκόνη πυριτίου ενδέχεται να προκαλέσει θετική σε αντισώματα κατά της MPO εξελισσόμενη σειράματνεφρίτιδα<sup>8</sup>. Η μέτρηση των ειδικών για την MPO αντισωμάτων ANCA αποτελεί σημαντικό συμπλήρωμα των κλινικών ευρημάτων στην αξιολόγηση των κλινικών υποτύπων των συστηματικών αγγειίτιδων.

### ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση ELISA διενεργείται ως ανοσοπροσδιορισμός στερεάς φάσης. Οι μικροκυψελίδες επικαλύπτονται με κεκαθαρισμένο αντιγόνο PO και, στη συνέχεια, τα σημεία που δεν θα παρουσιάσουν αντίδραση αποκλείονται ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και τα δείγματα ορού ασθενών επωάζονται στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των ειδικών αντισωμάτων του ορού στο αντιγόνο PO.

Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν ανιχνεύονται με την προσθήκη στις μικροκυψελίδες σημασμένου με ένζυμο συζευκτικού αντισώματος κατά της ανθρώπινης IgG. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση.

Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος pNPP σε ένα έγχρωμο προϊόν αντίδρασης. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται από ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 M. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ενζύμου ανά χιλιοστόλιτρο (EU/MI).

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

#### Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.**

η χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση.

Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8 °C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου.

Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

### ροφυλάξεις

Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έκχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών<sup>9</sup>.

**ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ** – Το αζίδιο του νατρίου (NaN<sub>3</sub>) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. Ην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μικροβιακής ή διασταυρούμενης μόλυνσης των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό τους. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

### Υλικά που παρέχονται

έθοδος ELISA για αντισώματα κατά της μυελοϋπεροξειδάσης ( PO) ImmuLISA™ REF 1161

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>MPO</b>	<b>λακίδιο</b> ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με το αντιγόνο MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>A</b>   <b>MPO</b> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής A</b> (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>B</b>   <b>MPO</b> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής B</b> (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>C</b>   <b>MPO</b> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής C</b> (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>D</b>   <b>MPO</b> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής D</b> (κίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>+</b>   <b>MPO</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα θετικού ελέγχου</b> (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για αντισώματα MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>-</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα αρνητικού ελέγχου</b> (λευκό πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b>   <b>ALKPHOS</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση</b> . Χρώματος ροζ.

EL

1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>αραιωτικό διάλυμα ορού</b> . Χρώματος μπλε.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>ενζυμικό υπόστρωμα</b> . Περιέχει p-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). <b>Να προστατεύεται από το φως.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα τερματισμού</b> .
2 x	<b>BUF</b>   <b>WASH</b>	<b>Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης</b> . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

\* Περιέχει < 0,1% NaN<sub>3</sub>

#### Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

- LOT** Αριθμός παρτίδας
- REF** Αριθμός καταλόγου
-  Ημερομηνία λήξης
-  Θερμοκρασία αποθήκευσης
-  Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης
- IVD** In vitro διαγνωστική χρήση
-  Κατασκευαστής
-  Αριθμός αναλύσεων

#### Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης ή αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 300 μl
- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικά χαρτιά
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.

#### ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°- 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για πιο μακροχρόνια φύλαξη, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.



**Σημείωση:** Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μ** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριου. ηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου.

- Βήμα 7** Επωάστε επί **30 λεπτά** ( $\pm 5$  λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 8** Εκπλύνετε **4 φορές** με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Για μη αυτόματη έκπλυση, πληρώστε κάθε μικροκυψελίδα με ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Απορρίψτε το υγρό αναστρέφοντας το πλακίδιο και κτυπώντας το ελαφρά ώστε να αδειάσουν όλες οι κυψελίδες ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κυψελίδα. Για να στυπώσετε στο τέλος της τελευταίας έκπλυσης, αναστρέψτε τις ταινίες και κτυπήστε δυνατά τις κυψελίδες επάνω σε απορροφητικό χαρτί. Για αυτόματες συσκευές έκπλυσης, προγραμματίστε τη συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 9** Προσθέστε **100 μl** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.
- Βήμα 10** Επωάστε επί **30 λεπτά** ( $\pm 5$  λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 11** Εκπλύνετε όλες τις μικροκυψελίδες όπως στο βήμα 8.
- Βήμα 12** Προσθέστε **100 μl** ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το συζευκτικό αντίσωμα.
- Βήμα 13** Επωάστε επί **30 λεπτά** ( $\pm 5$  λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 14** Προσθέστε **100 μl** διαλύματος τερματισμού σε κάθε μικροκυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το ενζυμικό υπόστρωμα. Διαβάστε τις τιμές απορρόφησης εντός 1 ώρας από την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού.
- Βήμα 15** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος **405 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος 405/630 nm, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

### Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι  $<0,3$ . Ο Βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή  $<20$  EU/ml. Εάν η εξέταση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

### A ΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων του ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

#### 1. ΟΙΟΤΙΚΟΣ ΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

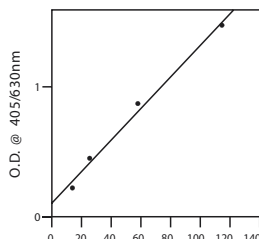
Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος

----- X EU/ l του Βαθμονομητή D = EU/ l του εξεταζόμενου δείγματος

Απ/ση του Βαθμονομητή D

#### 2. ΗΜΙ- ΟΣΟΤΙΚΟΣ ΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών A έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των X τη συγκέντρωση σε EU/ml και στον άξονα των Y την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης τους.



### Βαθμονομητής

Οι έτοιμοι προς χρήση βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή Α. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν με το συντελεστή αραιώσης.

### Ερμηνεία

Τα παρακάτω παρέχονται μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Οι τιμές που απεικονίζονται παρακάτω προσδιορίστηκαν με την εξέταση 63 φυσιολογικών αιμοδοτών και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των φυσιολογικών συν 3 τυπικές αποκλίσεις. Κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

Τιμές αντισωμάτων αντι-MPO	Ερμηνεία
≤20 EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	Οριακό
>25 EU/ml	Θετικό

### ΕΠΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτή την ανάλυση δεν αποτελούν από μόνα τους διάγνωση και θα πρέπει να ληφθούν υπόψη σε συνδυασμό με την κλινική εμφάνιση του ασθενούς.

### ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Οι αναμενόμενες τιμές σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό είναι αρνητικές. Ωστόσο, ένα 4% των φαινομενικά υγιών, ασυμπτωματικών ατόμων ενδέχεται να δώσει θετικό αποτέλεσμα σε εξέταση για την παρουσία αντισωμάτων κατά της PO. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι ασθενείς που διαγνώστηκαν με ρευματοειδή αρθρίτιδα, με χρόνια πολυαρθρίτιδα, με αδιαφοροποίητη νόσο του συνδετικού ιστού και με ΣΕΛ φέρουν αντισώματα αντι-MPO ή pANCA<sup>5</sup>. Ανοσοκατασταλτική θεραπεία, έναρξη ή αλλαγή θεραπείας δεν θα πρέπει να ξεκινήσουν με βάση μόνο τα τυχόν θετικά για τα αντισώματα κατά της PO αποτελέσματα, αλλά με βάση προσεκτικές κλινικές παρατηρήσεις.

Ο παρακάτω πίνακας απεικονίζει τη συχνότητα των ειδικών για την PR3 και την MPO αντισωμάτων ANCA σε ορούς από 112 ασθενείς με σχετιζόμενες με ANCA αγγειίτιδες<sup>10</sup>.

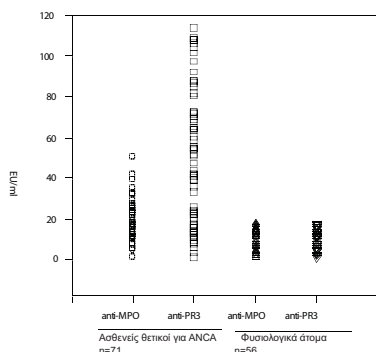
**Συχνότητα εμφάνισης των αντι-PR3 και των αντι-MPO αντισωμάτων σε ασθενείς με σχετιζόμενες με ANCA αγγειίτιδες**

	Κοκκιωμάτωση Wegener	Μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα	Σύνδρομο Churg-Strauss
ANCA θετικά με IFA	78%	59%	67%
αντι-PR3 θετικά	90%	0%	10%
αντι-MPO θετικά	0%	62%	17%
θετικά άγνωστης ειδικότητας	40%	31%	73%

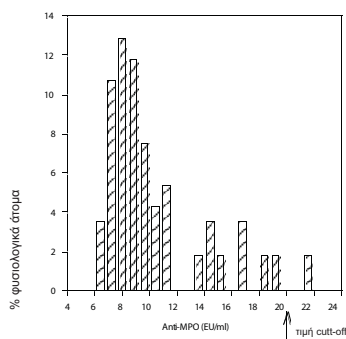
EL

Οι παρακάτω εικόνες απεικονίζουν τη συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων κατά της PR3 και της PO σε φυσιολογικά άτομα και σε μια επιλεγμένη ομάδα ANCA θετικών ατόμων, με τα αντισώματα αντι- PO Immulisa™.

Κατανομή της δραστηριότητας των αντισωμάτων με τη μέθοδο αντι-MPO και αντι-PR3 Immulisa™ σε ασθενείς θετικούς για ANCA και στο φυσιολογικό πληθυσμό.



Κατανομή στο φυσιολογικό πληθυσμό με τη μέθοδο αντι-MPO Immulisa™



## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ Α ΟΔΟΣΗΣ

### Ακρίβεια:

Δύο οροί θετικοί στα αντισώματα ANCA κατά της PO αναλύθηκαν με τη μέθοδο ELISA PO Immulisa™ προκειμένου να προσδιοριστεί ο συντελεστής ποικιλότητας (CV) εντός σειράς και μεταξύ σειρών. Τα αποτελέσματα ήταν ως εξής:

	Μεταξύ σειρών	Εντός σειράς
	%CV	%CV
<b>Δείγμα 1</b>	7,4	5,5
<b>Δείγμα 2</b>	8,6	5,3

Δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων κατά της PO αναμίχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις ενός άλλου θετικού δείγματος που περιείχε γνωστές ποσότητες αντισωμάτων αντι- PO. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των αντι- PO αντισωμάτων στα αναμεμιγμένα δείγματα και από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η επί τοις εκατό ανάκτηση. Τα αποτελέσματα ήταν ως εξής:

	Συγκεντρ. αντι-MPO. προστιθέμενη (EU/ml)	Συγκεντρ. αντι-MPO ληφθείσα (EU/ml)	% Ανάκτηση
<b>Δείγμα 1</b>	66,0	72,6	110,0
<b>Δείγμα 2</b>	55,0	54,9	99,8
<b>Δείγμα 3</b>	49,5	46,1	93,1

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη μέθοδο ELISA για αντισώματα κατά της TPO Immulisa™ συγκρίθηκαν με μια άλλη μέθοδο που διατίθεται στο εμπόριο. Τα αποτελέσματα ήταν ως εξής:

		Immulisa™		
		Θετικά	Αρνητικά	Σύνολο
<b>Άλλη</b>	<b>Θετικά</b>	19	4	23
	<b>Αρνητικά</b>	24	24	48
	<b>Σύνολο</b>	43	28	71

Σχετική συμφωνία: 60%  
 Σχετική ευαισθησία: 82%  
 Σχετική ειδικότητα: 50%

## EL

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη μέθοδο ELISA αντι-MPO ImmuLisa™ συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν με μια μέθοδο ανοσοφθορισμού (IFA). Τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω και υποδεικνύουν μεγάλο βαθμό συσχέτισης ανάμεσα στη μέθοδο ELISA αντι-MPO ImmuLisa™ και στην καλύτερη μέθοδο ανοσοφθορισμού:

		ImmuLisa™		
		Θετικά	Αρνητικά	Σύνολο
Άλλα	Θετικά	22	1	23
	Αρνητικά	3	45	48
	Σύνολο	25	46	71

Σχετική συμφωνία: 94%

Σχετική ευαισθησία: 93%

Σχετική ειδικότητα: 95%



## Ensayo ELISA para anticuerpos anti mieloperoxidasa (MPO)

IVD

PROSPECTO

REF 1161 L S anticuerpos anti mieloperoxidasa ( PO) 96 análisis

### USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para detección y cuantificación de anticuerpos anti mieloperoxidasa (MPO) en suero humano.

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La presencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) en pacientes con vasculitis fue observada por primera vez en 1982 por Davies<sup>1</sup>. Los ANCA son un grupo de autoanticuerpos dirigido contra las proteínas de los granulocitos de los neutrófilos y de los lisosomas peroxidasa-positivos de los monocitos periféricos de la sangre. Estos anticuerpos pueden detectarse mediante inmunofluorescencia indirecta en sustrato de neutrófilos fijados en etanol, obteniendo como resultado un patrón de tinción perinuclear característico<sup>2,3</sup>. Los pANCA están presentes en vasculitis, glomerulonefritis, síndrome de Churg-Strauss, poliarteritis nodosa, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide<sup>4,5</sup>. El principal antígeno de pANCA es la mieloperoxidasa (MPO), que constituye un poderoso sistema microbicida en el interior de los granulocitos de los neutrófilos. Otros antígenos objetivo, tales como la elastasa de leucocitos humanos y la lactoferrina se han asociado al patrón de fluorescencia pANCA<sup>6,7</sup>. Los anticuerpos anti MPO también pueden ser inducidos por fármacos tales como hidralazina, clozapina y L-triptófano<sup>8</sup>. La exposición por razones de trabajo a factores ambientales como el polvo de sílice puede provocar una glomerulonefritis progresiva positiva a anti MPO<sup>8</sup>. La medición de ANCA específicos para MPO es una ayuda importante en la evaluación de los subtipos clínicos dentro de las vasculitis sistémicas.

### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Ensayo inmunoenzimático de fase sólida. Los pocillos se recubren de antígeno MPO purificado; los puntos que no han reaccionado se bloquean para reducir las uniones no específicas. En los pocillos se incuban controles, calibradores y muestras de suero del paciente permitiendo que los anticuerpos presentes en el suero se unan al antígeno MPO.

Los anticuerpos no unidos y demás proteínas específicas se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se incuban con un conjugado de IgG anti humana marcado con enzima. El conjugado no unido se elimina mediante lavado.

Luego, se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP); la presencia de anticuerpos es revelada por el cambio de color producido por la conversión del sustrato pNPP en un producto de reacción coloreado. Se detiene la reacción y la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, se lee con espectrofotómetro a 405 nm. Los resultados se expresan en unidades enzimáticas por mililitro (EU/ml).

### REACTIVOS

#### Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele.** No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C). Conservado a 2-8°C, el tiempo de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya el tiempo de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

#### Precauciones

Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCV). De todos modos, los derivados de sangre humana y

las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respete las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales<sup>9</sup>.

**ADVERTENCIA:** la azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

**Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto.** No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc.

Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

### Material suministrado

ELISA para anticuerpos anti mieloperoxidasa (MPO) ImmuLisa™ **REF** 1161

Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 96 análisis.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> <b>MPO</b>	<b>Microplaca</b> con micropocillos individuales separables recubiertos con antígeno MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>A</b> <b>MPO</b> *	<b>Calibrador A</b> listo para usar ( <i>tapa verde</i> ). Suero humano con anticuerpos anti MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>B</b> <b>MPO</b> *	<b>Calibrador B</b> listo para usar ( <i>tapa morada</i> ). Suero humano con anticuerpos anti MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>C</b> <b>MPO</b> *	<b>Calibrador C</b> listo para usar ( <i>tapa azul</i> ). Suero humano con anticuerpos anti MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>D</b> <b>MPO</b> *	<b>Calibrador D</b> listo para usar ( <i>tapa amarilla</i> ). Suero humano con anticuerpos anti MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>MPO</b> *	<b>Control positivo</b> listo para usar ( <i>tapa roja</i> ). Contiene suero humano positivo a anticuerpos MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b> <b>-</b> *	<b>Control negativo</b> listo para usar ( <i>tapa blanca</i> ). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	<b>Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar.</b> Color rosado.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente de suero listo para usar.</b> Color azul.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato enzimático listo para usar.</b> Contiene pNPP. <b>Protéjase de la luz.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solución Stop lista para usar.</b>
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Tampón de lavado en polvo.</b> Reconstituir cada unidad hasta un litro.







\* Contiene <0.1%  $\text{NaN}_3$

### Símbolos utilizados en las etiquetas:

**LOT** Número de lote

**REF** Número de catálogo

ES

-  Fecha de caducidad
-  Temperatura de conservación
-  Léanse las instrucciones de uso
-  Para diagnóstico *in vitro*
-  Fabricante
-  Número de análisis

### **Materiales necesarios no suministrados**

- Agua desionizada o destilada
- Botella dispensadora para tampón de lavado diluido o lavador automático de microplacas con capacidad de 300 µl
- Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.

### **RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS**

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

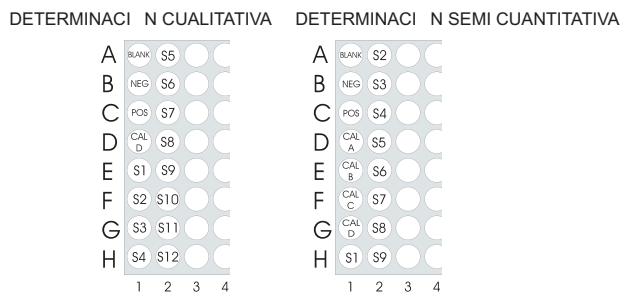
### **PROCEDIMIENTO**

#### **Advertencias preliminares**

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente por lo menos 30 minutos. Vuelva a poner de inmediato en la nevera los materiales que no utilice.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- Una buena técnica de lavado es crucial. Si efectúa el lavado manualmente, rocíe toda la microplaca con un fuerte chorro de solución de lavado utilizando una botella de boca ancha. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.
- Las muestras y reactivos deben añadirse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
- Saque las tiras de pocillos de su sobre y ciérrelo cuidadosamente para evitar condensación en los pocillos no utilizados. Vuelva a ponerlo de inmediato en la nevera.

### Procedimiento del ensayo

- Paso 1** Los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de dar comienzo al ensayo.
- Paso 2** Señale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado.
- Paso 3** Para la **determinación cualitativa**, use únicamente el Low Calibrator listo para usar (*tapa amarilla*). Para la **determinación semi cuantitativa**, utilice los calibradores listos para usar de A a D como se muestra en el ejemplo siguiente:



- Paso 4** Prepare una dilución en proporción **1:101** de las muestras del paciente **me cl a d** **5 µl de m e s a s** con **0.5 ml** de diluyente de suero.
- Paso 5** Coja los pocillos necesarios del sobre; guarde las tiras no utilizadas en el sobre hermético y póngalo en la nevera. Coloque los pocillos en el soporte suplementario.
- Paso 6** Pipetee **100 µl** de calibrador listo para usar, de controles positivo y negativo y muestras del paciente en los correspondientes pocillos, como se indica en la hoja de protocolo.  
**Nota:** Incluya un pocillo con **100 µl** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo.
- Paso 7** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Paso 8** Lave **4 veces** con el tampón de lavado. Para lavado manual, llene cada pocillo con el tampón de lavado reconstituido. Elimine el líquido invirtiendo y sacudiendo el pocillo, o bien aspire el líquido de cada pocillo. Al terminar el último lavado, invierta las tiras y sacúdalas enérgicamente sobre papel absorbente. Si utiliza un lavador automático, programe el ciclo de lavado siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Paso 9** Pipetee **100 µl** de conjugado en los pocillos.
- Paso 10** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave los pocillos repitiendo el paso 8.
- Paso 12** Pipetee **100 µl** de sustrato enzimático en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos del conjugado.
- Paso 13** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Paso 14** Pipetee **100 µl** de solución Stop en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el sustrato enzimático. Lea la absorbancia en el plazo de una hora después de haber añadido la solución Stop.
- Paso 15** Lea la absorbancia de cada pocillo a **405 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble 405/630nm, comparándola con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

### Control de Calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser  $<0,3$

ES

DO. La lectura de absorbancia del calibrador no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser <20 EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de las dos lecturas para determinar las EU/ml. En las determinaciones cualitativas, la densidad óptica del calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la absorbancia del control positivo. En las determinaciones semi cuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites indicados en el vial.

## RESULTADOS

### Cálculo

La concentración en la muestra del paciente puede determinarse por uno de los dos métodos siguientes:

#### 1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

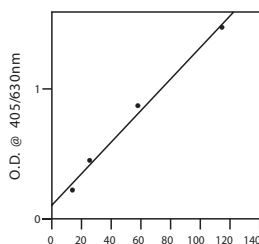
Abs. de muestra analizada

$$X \text{ EU/ml de calibrador D} = \text{EU/ml muestra analizada}$$

Abs. de calibrador D

#### 2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los Calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en EU/ml en el eje X en relación a la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia.



### Calibrador

Los calibradores proporcionan la semi cuantificación y deben utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del Calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

### Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Los valores indicados abajo se determinaron analizando 63 muestras de donantes de sangre normales y representan la media de los valores normales más 3 DS. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales.

Valores Anti-MPO	Interpretación
≤20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Incierto (valores límite)
>25 EU/ml	Positivo

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los resultados de este ensayo por sí solos no constituyen un diagnóstico, sino que deben evaluarse junto con el examen clínico del paciente.

**VALORES ESPERADOS**

Los valores esperados en una población normal son negativos. Sin embargo, un 4% de individuos aparentemente sanos y asintomáticos puede resultar positivo a los anticuerpos anti MPO. Estudios recientes informan de pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide, poliartritis crónica, enfermedad indiferenciada del tejido conectivo y LES que presentan anticuerpos anti MPO o pANCA<sup>5</sup>. Para instituir una terapia inmunosupresora, para iniciar o modificar un tratamiento, el médico no se ha de basar únicamente en un resultado ANCA positivo, sino que deberá efectuar una atenta exploración clínica.

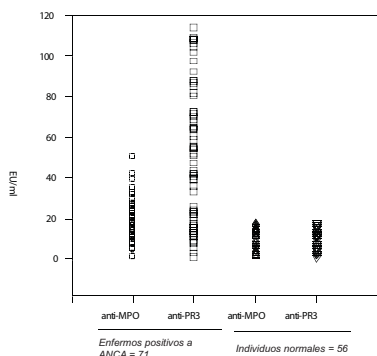
En la siguiente tabla se muestra la frecuencia de los ANCA específicos PR3 y MPO en el suero de 112 pacientes con vasculitis asociadas a ANCA<sup>10</sup>.

**Incidencia de anti PR3 y anti MPO en vasculitis asociadas a ANCA**

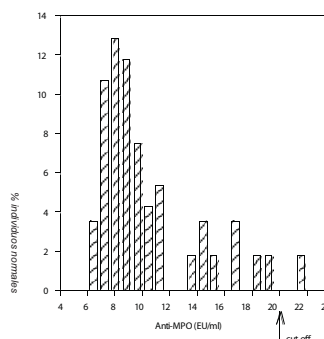
	<b>Granulomatosis de Wegener</b>	<b>Poliangitis microscópica</b>	<b>Síndrome de Churg-Strauss</b>
<b>ANCA positivo mediante IFA</b>	78%	59%	67%
<b>Positivo anti-PR3</b>	90%	0%	10%
<b>Positivo anti-MPO</b>	0%	62%	17%
<b>Positivo especificidad no conocida</b>	40%	31%	73%

En los siguientes gráficos se ilustra la incidencia de anticuerpos anti PR3 y MPO en individuos normales y en un grupo seleccionado de individuos positivos a ANCA, muestras analizadas con el método anti MPO ImmuLisa™.

*Distribución de la reactividad a anticuerpos anti MPO y anti PR3 según el análisis ImmuLisa™ en pacientes positivos a ANCA y en la población normal*



*Distribución de la población normal según el análisis de anticuerpos anti MPO ImmuLisa™*



**CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO**

**Precisión:**

Con el ensayo ELISA MPO ImmuLisa™ se analizaron dos sueros positivos a ANCA anti MPO para determinar la variabilidad intra ensayo e inter ensayo. Los resultados fueron los siguientes:

	<b>inter ensayo</b>	<b>intra ensayo</b>
	<b>%CV</b>	<b>%CV</b>
<b>Muestra 1</b>	7.4	5.5
<b>Muestra 2</b>	8.6	5.3

ES

### Recuperación:

Se mezclaron muestras con concentraciones conocidas de anticuerpos anti MPO con las diluciones adecuadas de otra muestra positiva con concentraciones conocidas. Se determinaron los niveles de anticuerpos anti-MPO de las muestras mezcladas y se calculó el porcentaje de recuperación. Los resultados fueron los siguientes:

	<b>Conc. ab MPO a adida (EU/ml)</b>	<b>Conc. ab MPO obtenida (EU/ml)</b>	<b>% Recuperación</b>
<b>Muestra 1</b>	66.0	72.6	110.0
<b>Muestra 2</b>	55.0	54.9	99.8
<b>Muestra 3</b>	49.5	46.1	93.1

Los resultados obtenidos con el ensayo ELISA anti-MPO ImmuLisa™ se compararon con los resultados de otro ensayo disponible en comercio. Los resultados fueron los siguientes:

		<b>ImmuLisa™</b>		
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
	<b>Positivo</b>	19	4	23
<b>Otro</b>	<b>Negativo</b>	24	24	48
	<b>Total</b>	43	28	71

Correlación relativa: 60%  
Sensibilidad relativa: 82%  
Especificidad relativa: 50%

Los resultados obtenidos con el ensayo ELISA anti-MPO ImmuLisa™ se compararon con los resultados de un ensayo de inmunofluorescencia (IF). Los resultados se indican en la tabla siguiente e indican un alto grado de correlación entre el ensayo ELISA anti-MPO ImmuLisa™ y el método IF estándar de referencia:

		<b>ImmuLisa™</b>		
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
	<b>Positivo</b>	22	1	23
<b>Otro</b>	<b>Negativo</b>	3	45	48
	<b>Total</b>	25	46	71

Correlación relativa: 94%  
Sensibilidad relativa: 93%  
Especificidad relativa: 95%



# Myeloperoxidase-Antikörper-ELISA (MPO)

IVD

## BEIPACKTEXT

REF 1161 Anti-Myeloperoxidase-Antikörper-ELISA (MPO) 96 Bestimmungen

### VERWENDUNGS WECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die quantitative Bestimmung von Antikörpern gegen Myeloperoxidase (MPO) in Humanserum.

### USAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Das Vorhandensein von antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) bei Patienten mit Vaskulitis wurde zum ersten Mal 1982 von Davies beobachtet<sup>1</sup>. ANCA sind eine Gruppe von Autoantikörpern, die sich gegen Proteine in den Granula der neutrophilen Granulozyten und in Peroxidase-positiven Lysosomen der peripheren Blutmonozyten richten. Diese Antikörper können mittels indirekter Immunfluoreszenz auf thanolfixierten neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden, wo sie ein charakteristisches perinukleäres Flockenmuster verursachen<sup>2,3</sup>. pANCA treten bei Vaskulitis, Glomerulonephritis, Churg-Strauss-Syndrom, Polyarteriitis nodosa, systemischem Lupus erythematoses und rheumatoider Arthritis auf<sup>4,5</sup>. Ein wichtiges Antigen von pANCA ist Myeloperoxidase (MPO), die ein starkes antimikrobielles System innerhalb der neutrophilen Granulozyten darstellt. Zusätzliche Zielantigene, z.B. humane Leukozytenelastase und Lactoferrin wurden ebenfalls mit dem Fluoreszenzmuster von pANCA in Verbindung gebracht<sup>6,7</sup>. Antikörper gegen MPO können auch durch Arzneimittel, z.B. Hydralazin, Clozapin und L-Tryptophan, hervorgerufen werden<sup>8</sup>. Eine berufsbedingte Belastung mit Umweltfaktoren wie z.B. Quarzstaub kann eine Anti-MPO-positiv progressive Glomerulonephritis auslösen<sup>8</sup>. Die Messung von MPO-spezifischen ANCA ist eine wichtige Ergänzung zu den klinischen Befunden bei der Bewertung von klinischen Untertypen innerhalb der systemischen Vaskulitiden.

### TESTPRINZIP

Der ELISA wird als Festphasenimmuntest durchgeführt. Mikrotiterplattenvertiefungen werden mit gereinigtem MPO-Antigen beschichtet, und die unreaktierten Stellen werden blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibratoren und Serumproben vom Patienten werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert; dies ermöglicht die Bindung der im Serum vorhandenen spezifischen Antikörper an das MPO-Antigen.

Nicht gebundene Antikörper und andere Serumproteine werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Gebundene Antikörper werden durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-human-IgG-Konjugats in die Vertiefungen nachgewiesen. Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt.

Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von Antikörpern wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des pNPP-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in Enzymeinheiten pro Milliliter (EU/ml) angegeben.

### REAGENZIEN

#### Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.**

Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.

Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren

DE

Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser.

Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

### Vorsichtsmaßnahmen

Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis<sup>9</sup>.

**WARNUNG** – Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in dieser Kitbeilage dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer. Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

### Mitgelieferte Materialien

ImmLisa™ Anti-Myeloperoxidase-Antikörper-ELISA (MPO) **REF** 1161

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen

12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>MPO</b>	<b>Mikrotiterplatte</b> mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit MPO-Antigen beschichtet
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>A</b>   <b>MPO</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator A</b> ( <i>grüne Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>B</b>   <b>MPO</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator B</b> ( <i>lila Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>C</b>   <b>MPO</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator C</b> ( <i>blaue Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>D</b>   <b>MPO</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator D</b> ( <i>gelbe Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>+</b>   <b>MPO</b> *	Gebrauchsfertiges <b>positives Kontrollserum</b> ( <i>rote Kappe</i> ). Enthält MPO-Antikörper-positives Humanserum.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>-</b> *	Gebrauchsfertiges <b>negatives Kontrollserum</b> ( <i>weiße Kappe</i> ). Enthält Humanserum.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b>   <b>ALKPHOS</b> *	Gebrauchsfertiges <b>Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat</b> . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Serumverdünner</b> . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Gebrauchsfertiges <b>Enzymsubstrat</b> . Enthält pNPP. <b>Vor Licht schützen</b> .
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Gebrauchsfertige <b>Stopplösung</b> .
2 x	<b>BUF</b>   <b>WASH</b>	<b>Waschpuffer in Pulverform</b> . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.

\* Enthält <0,1% NaN<sub>3</sub>

DE

#### Auf den Etiketten verwendete Symbole:

-  Chargennummer
-  Bestellnummer
-  Verwendbar bis
-  Lagerungstemperatur
-  Gebrauchsanleitung lesen
-  In-vitro-Diagnostikum
-  Hersteller
-  Anzahl an Tests

#### Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer oder automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 300 µl
- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.

#### PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

#### VERFAHREN

##### Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig die Produktbeilage, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Warten Sie vor Beginn des Testverfahrens, bis die Serumproben und Testreagenzien Raumtemperatur erreicht haben. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.
- Eine gute Waschmethode ist unerlässlich. Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer breiten Düse verwenden und einen starken Strahl Waschpuffer über die gesamte Mikrotiterplatte spritzen. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen verteilen kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.

DE

- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Alle Inkubationszeiträume beginnen, sobald das Zufügen der Reagenzien abgeschlossen ist.
- Das Zufügen aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungsstreifen; verschließen Sie dann den Beutel sorgfältig, um Kondensation in den nicht verwendeten Vertiefungen zu vermeiden. Legen Sie den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank.

### Testmethode

**Schritt 1** Lassen Sie alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.

**Schritt 2** Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.

**Schritt 3** Verwenden Sie für eine **qualitative Bestimmung** nur den gebrauchsfertigen niedrigen Kalibrator D (*Fläschchen mit gelber Kappe*).

**oder** Verwenden Sie für eine **semi-quantitative Bestimmung** die gebrauchsfertigen Kalibratoren A bis D, wie in der Probenanordnung unten angezeigt.

QUALITATIVE BESTIMMUNG	SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG
A BLANK S5	A BLANK S2
B NEG S6	B NEG S3
C POS S7	C POS S4
D CAL D S8	D CAL A S5
E S1 S9	E CAL B S6
F S2 S10	F CAL C S7
G S3 S11	G CAL D S8
H S4 S12	H S1 S9
1 2 3 4	1 2 3 4

**Schritt 4** Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** des Patientenserums mit **0,5 ml** Probenverdünner vermischen.

**Schritt 5** Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank. Setzen Sie die Vertiefungen sicher in den mitgelieferten Halter ein.

**Schritt 6** Pipettieren Sie **100 µl** der gebrauchsfertigen Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.

**Anmerkung:** Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null.

**Schritt 7** Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.

**Schritt 8** Waschen Sie **viermal** mit Waschpuffer. Wenn Sie manuell waschen, füllen Sie jede Vertiefung mit rekonstituiertem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit, indem Sie jede Vertiefung umdrehen und deren Inhalt ausklopfen, oder indem Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung absaugen. Drehen Sie zum Trocknen am Ende des letzten Waschens die Streifen um und klopfen Sie über saugfähigem Papier kräftig auf die Vertiefungen. Wenn Sie einen automatischen Wascher verwenden, programmieren Sie diesen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

**Schritt 9** Pipettieren Sie **100 µl** Konjugat in die Vertiefungen.

**Schritt 10** Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.

**Schritt 11** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 8 beschrieben.

**Schritt 12** Pipettieren Sie **100 µl** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.

DE

**Schritt 13** Inkubieren Sie **30 Minuten** ( $\pm$  5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.

**Schritt 14** Pipettieren Sie **100  $\mu$ l** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie den Extinktionswert innerhalb 1 Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ab.

**Schritt 15** Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **405 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 405/630 nm.

### Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte  $<0,3$  sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss  $<20$  EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, sollte der Mittelwert der beiden Messungen verwendet werden, um die EU/ml zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

## ERGEBNISSE

### Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

#### 1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

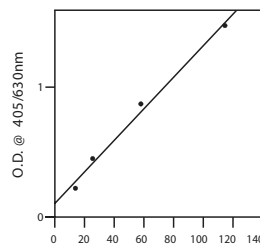
Ext. der Testprobe

----- X EU/ml von Kalibrator D = EU/ml der Testprobe

Ext. von Kalibrator D

#### 2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte.



### Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte bestimmen zu können, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorenkurve fallen. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

## Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Laborergebnisse. Die unten angegebenen Werte wurden bestimmt, indem 63 normale Blutspender getestet wurden; sie sind der Mittelwert der normalen Proben plus 3 Standardabweichungen. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen.

### Anti-MPO-Werte Interpretation

≤20 EU/ml	negativ
20-25 EU/ml	Grenzbereich
>25 EU/ml	positiv

## EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Die mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse sind nicht allein diagnostisch und sollten im Zusammenhang mit dem klinischen Zustand des Patienten erwogen werden.

## ERWARTETE WERTE

Die erwarteten Werte in einer normalen Bevölkerung sind negativ. Es können jedoch bei 4% von anscheinend gesunden Personen bei einem Test auf Anti-MPO-Antikörper positive Ergebnisse auftreten. Kürzlich veröffentlichte Studien haben gezeigt, dass bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, chronischer Polyarthrit, undifferenzierter Bindegewebskrankheit und SLE Anti-MPO-Antikörper oder pANCA vorliegen<sup>5</sup>. Eine Immunsuppressivtherapie oder andere Behandlung sollte nicht allein aufgrund eines positiven Ergebnisses beim MPO-Antikörpertest begonnen oder geändert werden, sondern nur nach einer sorgfältigen klinischen Beobachtung.

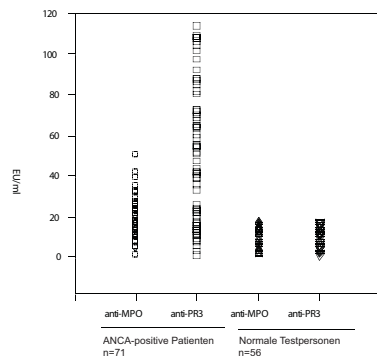
Die folgende Tabelle zeigt die Häufigkeit von PR3- und MPO-spezifischen ANCA in Seren von 112 Patienten mit ANCA-assoziierten Vaskulitiden<sup>10</sup>.

### Häufigkeit von Anti-PR3 und Anti-MPO bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden

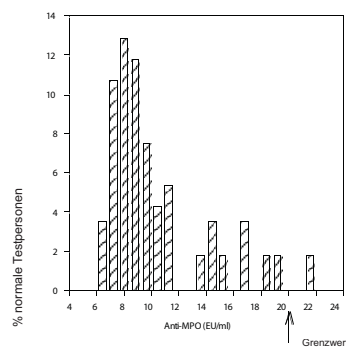
	Wegener-Granulomatose	Mikroskopische Polyangiitis	Churg-Strauss-Syndrom
<b>ANCA-positiv mit IFA</b>	78%	59%	67%
<b>Anti-PR3-positiv</b>	90%	0%	10%
<b>Anti-MPO-positiv</b>	0%	62%	17%
<b>positiv mit unbekannter Spezifität</b>	40%	31%	73%

Die folgenden Abbildungen zeigen die mit dem Immulisa™ Anti-MPO-Test bestimmte Häufigkeit von Anti-PR3- und Anti-MPO-Antikörpern bei normalen Personen und ausgewählten Gruppen von ANCA-positiven Personen.

Mit Immulisa™ bestimmte Verteilung von Anti-MPO- und Anti-PR3-Reaktivität bei ANCA-positiven Patienten und in der normalen Bevölkerung



Verteilung in der normalen Bevölkerung mit Anti-MPO Immulisa™



**LEISTUNGSMERKMALE****Genauigkeit:**

Zwei Anti-MPO-ANCA-positive Seren wurden mit dem ImmuLisa™ MPO-ELISA getestet, um die inter- und intraserielle Variabilität zu bestimmen. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

	<b>interserieller VK in %</b>	<b>intraserieller VK in %</b>
<b>Probe 1</b>	7,4	5,5
<b>Probe 2</b>	8,6	5,3

**Wiederfindung:**

Proben mit bekannten Anti-MPO-Antikörperkonzentrationen wurden mit geeigneten Verdünnungen einer anderen positiven Proben mit bekannten Mengen gemischt. Die Anti-MPO-Antikörperspiegel der gemischten Proben wurden bestimmt und die Wiederfindung in Prozent wurde aus den erhaltenen Werten errechnet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

	<b>MPO-AK-Konz. zugef gt (EU/ml)</b>	<b>MPO-AK-Konz gemessen (EU/ml)</b>	<b>% Wiederfindung</b>
<b>Probe 1</b>	66,0	72,6	110,0
<b>Probe 2</b>	55,0	54,9	99,8
<b>Probe 3</b>	49,5	46,1	93,1

Die mit dem ImmuLisa™ Anti-MPO-ELISA erhaltenen Ergebnisse wurden mit einem anderen für den Handel hergestellten Test verglichen. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

		<b>ImmuLisa™</b>		
		<b>Positiv</b>	<b>Negativ</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Anderer</b>	<b>Positiv</b>	19	4	23
	<b>Negativ</b>	24	24	48
	<b>Gesamt</b>	43	28	71

Relative bereinstimmung: 60%

Relative Sensitivität: 82%

Relative Spezifität: 50%

Die mit dem ImmuLisa™ Anti-MPO-ELISA erhaltenen Ergebnisse wurden mit den mit einem Immunfluoreszenztest (IFA) erhaltenen Ergebnissen verglichen. Sie sind unten tabellarisch aufgeführt und zeigen ein hohes Maß an Korrelation zwischen dem ImmuLisa™ Anti-MPO-ELISA und der als Goldstandard geltenden IF-Methode:

		<b>ImmuLisa™</b>		
		<b>Positiv</b>	<b>Negativ</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Anderer</b>	<b>Positiv</b>	22	1	23
	<b>Negativ</b>	3	45	48
	<b>Gesamt</b>	25	46	71

Relative bereinstimmung: 94%

Relative Sensitivität: 93%

Relative Spezifität: 95%



# Anticorps Anti-Myéloperoxidase (MPO) ELISA

IVD

## ENCART DU PRODUIT

REF 1161 Anticorps anti- MPO ELISA 96 Tests

Immco™ anti-MPO est un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection et la quantification des anticorps de la myéloperoxidase (MPO) dans le sérum humain.

### GENERALITES

La présence d'anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques (ANCA) chez des patients présentant des angéites a été observée pour la première fois par Davies en 1982<sup>1</sup>. Les ANCA sont un groupe d'anticorps dirigés contre les protéines des granules de neutrophiles et des lysosomes positifs la peroxydase des monocytes de la circulation périphérique. Ces anticorps peuvent être détectés par immunofluorescence indirecte sur des neutrophiles fixés à l'éthanol en produisant une conformation de coloration périnucléaire caractéristique<sup>2,3</sup>. Les p-ANCA se retrouvent dans les cas d'angéites, de néphrites glomérulaires, de syndrome de Churg-Strauss, de polyartérite noueuse, de lupus érythémateux endémique et d'arthrite rhumatoïde<sup>4,5</sup>. L'antigène majeur des p-ANCA est la myéloperoxidase (MPO), qui constitue un puissant système microbicide parmi les granulocytes neutrophiles. D'autres antigènes cibles tels que le leucocyte humain élastase et la lactoferrine ont également été associés à une conformation de fluorescence p-ANCA<sup>6,7</sup>. Les anticorps aux MPO peuvent également être induits par des drogues telles que l'hydralazine, la clozapine, et le L-tryptophane<sup>8</sup>. L'exposition occasionnelle à certains facteurs environnementaux tels que la poussière de silice peut provoquer une néphrite glomérulaire progressive anti-MPO<sup>9</sup>. La mesure de ces anticorps ANCA spécifiques aux MPO est une aide précieuse pour la recherche clinique dans l'évaluation des sous-types cliniques des diverses angéites.

### PRINCIPES DE LA METHODE

L'antigène MPO recombinant est fixé sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène et, ensuite, les sites n'ayant pas réagi sont immédiatement bloqués pour réduire l'attache non spécifique. Les contrôles, les étalons et les sérums de patients dilués sont ajoutés dans différents puits, autorisant chaque anticorps MPO présent à se lier à l'antigène en place. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique anti-IgG humaines est alors ajouté dans chaque puit pour révéler les anticorps du patient. Ces anticorps se lient spécifiquement à l'immunoglobuline humaine de la classe IgG. Après une étape d'incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage. L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat enzymatique (pNPP) suivie d'une étape de mesure de l'intensité de la coloration ainsi développée. Après avoir arrêté la production enzymatique de produit coloré, la présence ou l'absence d'anticorps anti-MPO sera déterminée par lecture au spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA (EU/ml).

### INFORMATION PRODUIT

#### Conservation et préparation des réactifs

Conservé tous les réactifs du coffret entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler.**

Ne pas employer le réactif si il est trouble ou si un précipité s'est formé. Tous les réactifs doivent être portés à la température ambiante (20-25°C) avant de les utiliser.

Le tampon de lavage est stable jusqu'à la date limite d'utilisation dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes. Reconstituer le tampon de lavage en y ajoutant de l'eau distillée ou déionisée pour un volume de 1 L.

Les micropuits ne peuvent être utilisés qu'une seule fois.

#### Précautions

Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés

contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage<sup>9</sup>.

**ATTENTION** - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption. Respectez les techniques de laboratoire réduisant au minimum la contamination microbienne et chimique. Ne pas employer après la date d'échéance.

### Matériel fourni

ImmuLISA™ anticorps anti-MPO ELISA **REF** 1161

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>MPO</b>	<b>Micro-lamelle</b> avec micropuits individuels, revêtus d'antigène MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>A</b>   <b>MPO</b> *	<b>Etalon A</b> ( <i>couvercle vert</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>B</b>   <b>MPO</b> *	<b>Etalon B</b> ( <i>couvercle violet</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>C</b>   <b>MPO</b> *	<b>Etalon C</b> ( <i>couvercle bleu</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>D</b>   <b>MPO</b> *	<b>Etalon D</b> ( <i>couvercle aune</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>+</b>   <b>MPO</b> *	<b>Contrôle positif</b> ( <i>couvercle rouge</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-MPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>-</b> *	<b>Contrôle négatif</b> ( <i>couvercle blanc</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b>   <b>ALKPHOS</b> *	<b>Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines</b> . Code couleur rose.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluant pour sérum</b> prêt à l'emploi. Code couleur bleue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrat enzymatique</b> prêt à l'emploi. Contient du pNPP. <b>Protéger de la lumière.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solution d'arrêt</b> prête à l'emploi.
2 x	<b>BUF</b>   <b>WASH</b>	<b>Tampon de lavage</b> en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.

\* Contient < 0.1%  $\text{NaN}_3$

### Symboles utilisés sur les étiquettes:

**LOT** Numéro de lot

**REF** Numéro de référence catalogue

FR



A utiliser avant



Température de conservation



Lire les instructions d'utilisation



Pour usage diagnostique In vitro



Fabricant



Nombre de tests

### Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau déionisée ou distillée  
Bouteille pour le tampon de lavage ou bac pour le lavage automatique capable de contenir 300 µl  
Pièces de 5 1000 µl
- Bouts de pipette jetables
- Petits tubes (ex : 12 X 75 mm) et porte-tubes
- Timer
- Papier absorbant
- Lecteur ELISA avec filtre de 405nm. Si la longueur d'onde double est disponible, le filtre de référence sera de 600-650 nm.

### PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

### METHODE

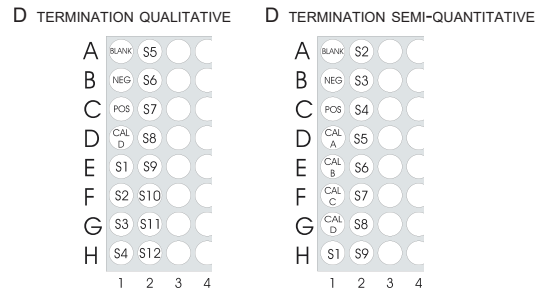
#### Préparation du test

- Lire ces instructions attentivement avant de commencer l'analyse.
- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante (20-26°C) pendant 30 minutes avant de les utiliser. Replacer les produits au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- Lavage: il est important d'utiliser une bonne technique. Si l'opération est réalisée manuellement, diriger un jet puissant de vapeur de tampon de lavage à l'aide d'une large bouteille sur toute la surface de la micro-lamelle. **Il est recommandé d'utiliser un bac de lavage des micro-lamelles automatique.**
- Utiliser une pipette multicanaux capable de remplir 8 puits simultanément. Ceci rend le processus plus rapide et fournit un temps d'incubation plus uniforme.
- La synchronisation est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution des réactifs.
- L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit être réalisé à la même cadence et selon la même séquence.
- Remettre immédiatement les micro-lamelles non utilisées dans le récipient contenant le dessiccateur, refermer hermétiquement pour minimiser toute exposition à l'humidité.

#### Exécution du test

1. Porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante.

- Indiquer sur une feuille du protocole la position des échantillons sur la micro-lamelle. C'est une bonne pratique de vérifier les échantillons en double.
- Détermination qualitative** : employer uniquement l'étalon D (*couvercle aune*). **ou Détermination semi-quantitative** : employer les étalons A - D comme montré dans l'exemple ci-dessous.



- Préparer une dilution de **1:101** de l'échantillon patient en mélangeant **5 µl** de l'échantillon patient à **0.5 ml** de diluant pour échantillons.
- Prendre les micropuits nécessaires, remettre immédiatement les micro-lamelles non utilisées dans le récipient scellé et le replacer au réfrigérateur. Placer les micropuits en sécurité sur le support fourni.
- Ajouter **100 µl** des étalons, des échantillons de patients dilués, des contrôles négatif et positif dans les puits indiqués sur la feuille de protocole.
 

**Note** : Inclure un puit avec **100 µl** de diluant pour échantillons comme blanco de réactif. La lecture ELISA de ce blanco devrait être nulle.
- Laisser incuber pendant **30 minutes** (+- 5 minutes) à température ambiante.
- Lavage: pour le lavage manuel, aspirer soigneusement le contenu de chaque puit. Ajouter le tampon reconstitué dans tous les puits et aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération trois fois supplémentaires pour un total de quatre lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque et la tapoter sur du papier absorbant pour enlever tout liquide de lavage résiduel. En cas d'utilisation de bacs de lavage automatiques, programmer l'appareil comme indiqué sur la notice d'utilisation.
- Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puit.
- Laisser incuber pendant **30 minutes** (+- 5 minutes) à température ambiante.
- Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 8.
- Ajouter 100 µl de substrat enzymatique dans chaque puit dans le même ordre et le même timing que le conjugué.
- Laisser incuber pendant **30 minutes** (+- 5 minutes) à température ambiante.
- Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puit. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du substrat enzymatique. Lire la densité optique (D.O.) dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.
- Lire la densité optique (D.O.) de chaque puit à **405nm** en utilisant un lecteur simple ou à longueur d'onde double 405/630 nm en prenant le blanco de réactif comme référence de D.O. nulle.

## CONTROLE QUALITE

Les étalons, les contrôles positifs et négatifs et un blanco doivent être présents dans chaque série de test pour garantir l'intégrité et la précision de ce dernier. La lecture de densité optique du blanco doit être inférieure à 0.3. L'étalon A doit avoir une lecture de densité optique supérieure à 1.0, sinon le test doit être répété. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est réalisé en double, prendre la moyenne des deux lectures pour déterminer les concentrations en anticorps. Lors des déterminations qualitatives, la densité optique de l'étalon D doit être plus grande que celle du contrôle négatif et plus petite que celle du contrôle positif. Pour les déterminations semi-quantitatives, le contrôle positif doit donner des valeurs se trouvant dans l'intervalle figurant sur le flacon.

## RESULTATS

### Calcul des résultats

Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

#### 1. DETERMINATION QUALITATIVE

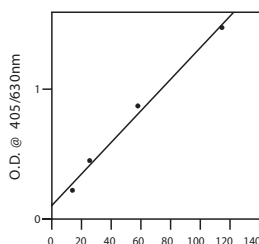
D.O. Echantillon

----- X EU/ml étalon D = EU/ml Echantillon

D.O. Etalon D

#### 2. DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Tracer l'absorbance des étalons A à D par rapport leur concentration respective sur un graphique linéaire. Tracer la concentration en EU / ml sur l'axe des X et l'absorbance sur l'axe Y et dessiner la courbe la plus proche. Déterminer les concentrations des échantillons patients provenant de la courbe par leurs valeurs correspondantes d'absorbance.



### étalons

Les étalons sont fournis pour une détermination semi-quantitative et doivent être employés lors de chaque test. Les échantillons patients contenant les niveaux les plus élevés d'anticorps peuvent donner des valeurs d'absorbance plus grandes que celles de l'étalon A. Pour la détermination des valeurs semi-quantitatives précises de tels échantillons, il faut les diluer et les retester jusqu'à ce que les résultats puissent être lus sur la courbe d'étalonnage. Pour la détermination en EU / ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

### Interprétation

L'information suivante sert seulement de guide dans l'interprétation des résultats de laboratoire. Les valeurs décrites ci-dessous ont été déterminées en testant 63 échantillons de sang de donneurs et représentent la moyenne avec déviation standard de 3. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

Valeurs Anti-MPO	Interprétation
≤20 EU/ml	Négatif(-)
20 – 25 EU/ml	Indéterminé
>25 EU/ml	Positif (+)

### LIMITES D'UTILISATION

Les résultats obtenus servent seulement d'aide dans le diagnostic et ne devraient pas être interprétés en tant que diagnostic à part entière.

### VALEURS PREVUES

Les valeurs d'une population normale sont négatives. Cependant, 4% des individus apparemment en bonne santé et asymptomatiques peuvent se révéler positifs lors de la recherche des anticorps anti-MPO. Des études récentes ont montré que des patients, diagnostiqués pour l'arthrite rhumatoïde, la polyarthrite chronique, diverses maladies indifférenciées du tissu conjonctif et pour le SLE présentent des anticorps anti-MPO ou p-ANCA<sup>5</sup>. Une thérapie immunosuppressive, un début ou une modification de traitement ne doivent pas être décidés sur la base d'une recherche anticorps anti-MPO positive mais confrontés attentivement aux observations cliniques.

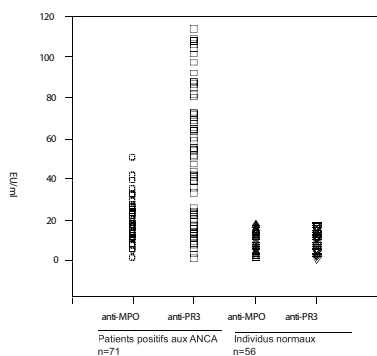
Le tableau suivant présente la fréquence des ANCA spécifiques PR3 et MPO dans les sérums de 112 patients présentant des angéites<sup>10</sup>.

**Incidence des anti-PR3 et anti-MPO chez les ANCA associés à des angéites**

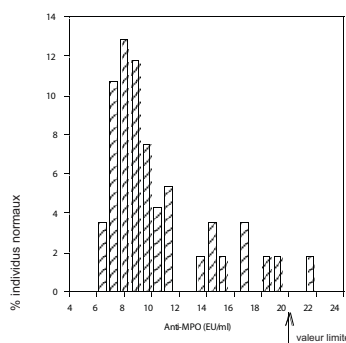
	<b>Granulomatose de Wegener</b>	<b>Polyangéite Microscopique</b>	<b>Syndrôme de Churg-Strauss</b>
<b>ANCA positif par IFA</b>	78%	59%	67%
<b>positif anti-PR3</b>	90%	0%	10%
<b>positif anti-MPO</b>	0%	62%	17%
<b>positif spécificité non connue</b>	40%	31%	73%

Les figures suivantes décrivent l'incidence des anticorps anti-PR3 et MPO avec le test anti-MPO Immulisa™ dans des groupes normaux et dans une sélection d'individus positifs aux ANCA.

Distribution des réactivités des tests anti-MPO et anti-PR3 Immulisa™ chez les patients positifs aux ANCA et dans une population normale.



Distribution de la Population Normale avec le test Anti-MPO Immulisa™

**PERFORMANCES****Précision:**

Deux sérums anti-MPO positifs aux ANCA ont été testés avec Immulisa™ MPO ELISA pour déterminer la variabilité inter et intra-test. Les résultats sont les suivants:

	<b>inter-essai</b>	<b>intra-essai</b>
	<b>%CV</b>	<b>%CV</b>
<b>Echantillon 1</b>	7,4	5,5
<b>Echantillon 2</b>	8,6	5,3

**Récupération**

Des échantillons avec des concentrations connues d'anticorps MPO ont été mélangés aux dilutions appropriées d'un autre échantillon positif avec des quantités connues. Les niveaux d'anticorps Anti-MPO des échantillons mélangés ont été déterminés et à partir de ces valeurs, le pourcentage de récupération calculé. Les résultats sont les suivants :

	<b>MPO-Ab conc. ajouté (EU/ml)</b>	<b>MPO-Ab conc. obtenu (EU/ml)</b>	<b>% Récupération</b>
<b>Echantillon 1</b>	66,0	72,6	110,0
<b>Echantillon 2</b>	55,0	54,9	99,8
<b>Echantillon 3</b>	49,5	46,1	93,1

Les résultats obtenus avec Immulisa™ Anti-MPO ELISA ont été comparés avec ceux obtenus avec d'autres tests ELISA du commerce. Les résultats sont les suivants:

FR

		ImmuLisa™		
		Positif	Négatif	Total
Autres	Positif	19	4	23
	Négatif	24	24	48
	Total	43	28	71

Concordance : 60%

Sensibilité relative: 82%

Spécificité relative: 50%

Les résultats obtenus avec ImmuLisa™ Anti-MPO ELISA ont été comparés avec ceux obtenus avec un test d'immunofluorescence (IFA). Ils sont repris dans le tableau ci-dessous et présentent un degré important de corrélation entre ImmuLisa™ anti-MPO ELISA et les méthodes standards d'IF:

		ImmuLisa™		
		Positif	Négatif	Total
Autres	Positif	22	1	23
	Négatif	3	45	48
	Total	25	46	71

Concordance: 94%

Sensibilité relative: 93%

Spécificité relative: 95%



# Anticorpi Anti-mieloperossidasi (MPO) ELISA

IVD

## INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1161 Anticorpi Anti-mieloperossidasi ( PO) 96 Determinazioni

### FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la rilevazione e la quantificazione di anticorpi anti-mieloperossidasi (MPO) nel siero umano.

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La presenza di anticorpi anti-neutrofili citoplasmatici (ANCA) in pazienti affetti da vasculite è stata osservata per la prima volta nel 1982 da Davies<sup>1</sup>. Gli ANCA sono un gruppo di autoanticorpi diretti contro le proteine nei granuli neutrofili e nei lisosomi perossidasi-positivi dei monociti periferici. Questi anticorpi possono essere individuati per immunofluorescenza indiretta su neutrofili fissati in etanolo, una metodologia che produce un pattern di colorazione perinucleare caratteristico<sup>2,3</sup>. I pANCA compaiono nelle vasculiti, nelle glomerulonefriti, nella sindrome di Churg-Strauss, nella poliarterite nodosa, nel lupus eritematoso sistemico e nell'artrite reumatoide<sup>4,5</sup>. Un importante antigene dei pANCA è la mieloperossidasi (MPO) che costituisce un potente sistema microbicida all'interno dei granulociti neutrofili. Lo stesso pattern di fluorescenza dei pANCA è stato associato anche ad altri antigeni target quali l'elastasi dei leucociti umani e la lattoferrina<sup>6,7</sup>. Lo sviluppo di anticorpi anti-MPO può essere indotto da farmaci come l'idralazina, la clopazina e L-triptofano<sup>8</sup>. L'esposizione occupazionale a fattori ambientali quali la polvere di silicio, può provocare una glomerulonefrite progressiva positiva agli anticorpi anti-MPO<sup>8</sup>. La misurazione degli ANCA MPO-specifici è uno strumento importante nella valutazione dei sottotipi clinici di vasculite sistemica.

### PRINCIPIO DELLA METODICA

Il test *Anti-mieloperossidasi ( PO)* viene eseguito come test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida. I pozzetti vengono rivestiti con antigeni MPO purificati; segue poi il blocco dei siti che non hanno reagito, per ridurre i legami non specifici. Controlli, calibratore e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene, e ciò permette agli anticorpi specifici presenti nel siero di legarsi all'antigene MPO.

L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Gli anticorpi legati vengono rilevati da un coniugato anti-IgG umane marcato con un enzima aggiunto ai pozzetti. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio.

Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di anticorpi viene rivelata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato pNPP in un derivato colorato della reazione. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono espressi in unità di enzima per millilitro (EU/ml).

### REAGENTI

#### Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.**

Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso.

Se conservato a 2 - 8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata.

Le strisce con i pozzetti sono monouso.

#### Precauzioni

Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali<sup>9</sup>.

**ATTENZIONE** – L'azide sodica ( $\text{NaN}_3$ ) pu reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica pu essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Seguire una buona prassi di laboratorio per ridurre al minimo la contaminazione microbica e crociata di reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

### Materiali forniti

Anticorpi Anti-mieloperossidasi (MPO) ELISA Immulisa™ **REF** 1161

Il kit contiene reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>MPO</b>	<b>Micropiastra</b> con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>A</b>   <b>MPO</b> *	<b>Calibratore A</b> (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>B</b>   <b>MPO</b> *	<b>Calibratore B</b> (tappo viola) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>C</b>   <b>MPO</b> *	<b>Calibratore C</b> (tappo blu) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>D</b>   <b>MPO</b> *	<b>Calibratore D</b> (tappo giallo) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>+</b>   <b>MPO</b> *	<b>Controllo Positivo</b> (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per anticorpi anti-MPO.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>-</b> *	<b>Controllo Negativo</b> (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b>   <b>ALKPHOS</b> *	<b>Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG umano pronto all'uso</b> ; di colore rosa.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente siero</b> pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato Enzimatico pronto all'uso</b> . Contiene pNPP. <b>Proteggere dalla luce.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Soluzione di Stop</b> pronta all'uso.
2 x	<b>BUF</b>   <b>WASH</b>	<b>Tampone di Lavaggio</b> in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

\* Contiene < 0,1%  $\text{NaN}_3$

### Simboli usati sulle etichette:

**LOT** Numero di lotto

**REF** Numero catalogo

IT



Scadenza



Temperatura di conservazione



Leggere le istruzioni per l'uso



Usò diagnostico in vitro



Produttore



Numero di test

### Materiali necessari ma non forniti

- Acqua distillata o deionizzata
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito o lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 300  $\mu$ l
- Pipette con capacità di dispensazione da 5  $\mu$ l a 1000  $\mu$ l
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Timer
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm

### RACCOLTA DEL CAMPIONE

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

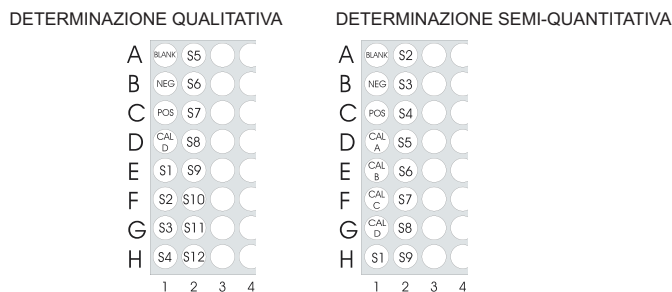
### PROCEDURA

#### Note sul test

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti prima di iniziare la procedura di analisi. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i campioni e reagenti non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. Se il lavaggio viene eseguito manualmente, dirigere un forte getto di tampone di lavaggio con un flacone a punta larga su tutta la micropiastra. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta pi rapida e il tempo di incubazione pi uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta di reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti dovrebbe essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.
- Togliere le strisce necessarie dalla busta e risigillarla accuratamente per impedire la formazione di condensa nei pozzetti non ancora utilizzati. Trasferire immediatamente la busta in frigo.

**Metodo del test**

- Fase 1** Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.
- Fase 2** Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- Fase 3** Per una **determinazione qualitativa** usare solo il Low Calibrator D pronto all'uso (fiala con tappo giallo). **mentre** per una determinazione **semi-quantitativa** usare i Calibratori da A a D pronti all'uso come illustrato nell'esempio di disposizione dei campioni riportato sotto:



- Fase 4** Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **0,5 ml** di Diluente del Siero.
- Fase 5** Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo. Sistemare in modo sicuro i pozzetti nel supporto extra fornito di corredo.
- Fase 6** Pipettare **100 µl** di Calibratore pronto all'uso, di Controllo Positivo e Negativo e di campioni del paziente negli appositi pozzetti come indicato nello schema riportato sopra.  
**Nota:** Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco.
- Fase 7** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Fase 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Eliminare il liquido capovolgendo e sbattendo i contenuti da ciascun pozzetto o aspirando il liquido da ciascun pozzetto. Per asciugare dopo l'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e battere vigorosamente i pozzetti su carta assorbente. Per i dispositivi di lavaggio automatico, programmare il dispositivo secondo le istruzioni del produttore.
- Fase 9** Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 10** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Fase 11** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 8.
- Fase 12** Pipettare **100 µl** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 13** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Fase 14** Pipettare **100 µl** di Soluzione di stop in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di Stop.
- Fase 15** Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (405/630nm) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

**Controllo di Qualit**

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere  $<0,3$ . Il calibratore

A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore <20 EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare le EU/ml si deve prendere la media delle due letture. Se si eseguono le determinazioni qualitative, la densità ottica del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore dell'assorbanza del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

## RISULTATI

### Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

#### 1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA:

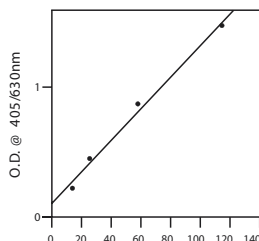
##### Assorbanza del campione del test

----- X EU/ml del Calibratore D = EU/ml del Campione

##### Assorbanza del calibratore D

#### 2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza.



### Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semiquantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

### Interpretazione

Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati. I valori illustrati sotto sono stati determinati analizzando 63 campioni di siero da donatori normali e rappresentano la media del normale + 3DS. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali.

Valori Anti-MPO	Interpretazione
≤20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Borderline
>25 EU/ml	Positivo

### LIMITAZIONI DEL TEST

I risultati di quest'analisi, presi singolarmente, non hanno valenza diagnostica e dovrebbero essere considerati in congiunzione con le evidenze cliniche del paziente.

## VALORI ATTESI

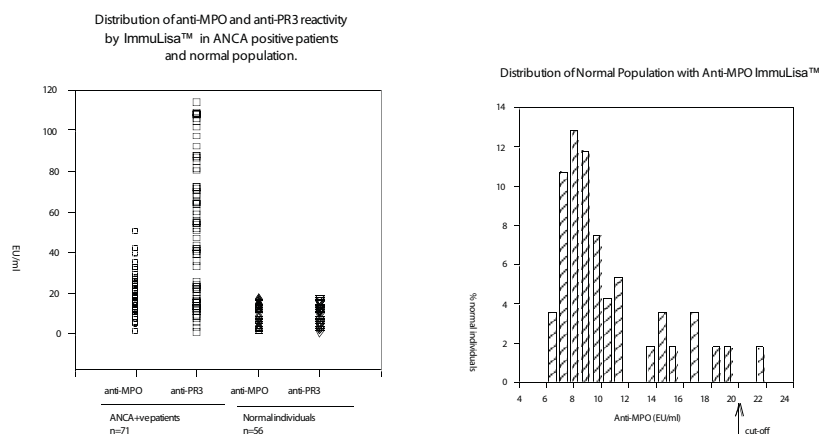
I valori attesi in una popolazione normale sono negativi. Tuttavia, il 4% degli individui apparentemente sani e asintomatici possono risultare positivi per gli anticorpi MPO. Studi recenti hanno dimostrato che i pazienti diagnosticati con artrite reumatoide, poliarterite cronica, malattia del tessuto connettivo indifferenziata e LES hanno anticorpi anti-MPO o pANCA<sup>5</sup>. La terapia immunosoppressiva, il trattamento o modifiche di quest'ultimo non dovrebbero essere basati unicamente sui risultati ANCA positivi, ma su accurate osservazioni cliniche.

La tabella che segue illustra la frequenza di ANCA PR3 e MPO specifici nei sieri di 112 pazienti con vasculite ANCA<sup>10</sup>. associata

### Incidenza di anti-PR3 e anti-MPO in vasculite associata agli ANCA

	Granulomatosi di Wegener	Poliangite Microscopica	Sindrome di Churg-Strauss
<b>ANCA positivi con IFA</b>	78%	59%	67%
<b>anti-PR3 positivi</b>	90%	0%	10%
<b>anti-MPO positivi</b>	0%	62%	17%
<b>positivi con specificità sconosciuta</b>	40%	31%	73%

La figura che segue illustra l'incidenza degli anticorpi anti-PR3 e MPO in soggetti normali e in gruppi di individui positivi agli ANCA ottenuta con il test anti-MPO ImmuLisa™.



## CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

### Precisione:

Due sieri positivi per gli anticorpi anti-MPO ANCA sono stati testati con il kit MPO ELISA ImmuLisa™ per determinare la variabilità all'interno di un saggio e tra un saggio e l'altro. I risultati ottenuti sono i seguenti:

	inter-analisi	intra-analisi
	%CV	%CV
<b>Campione 1</b>	7,4	5,5
<b>Campione 2</b>	8,6	5,3

### Recupero:

I campioni con concentrazioni note di anticorpi anti-MPO sono stati miscelati con diluizioni appropriate di un altro campione positivo con quantitativo noto di anticorpi anti-MPO. Sono stati determinati i livelli di anticorpi anti-MPO dei campioni miscelati e dai valori ottenuti è stata calcolata la percentuale di recupero. I risultati sono i seguenti:

IT

	<b>Conc. ass. MPO Addizionato (EU/ml)</b>	<b>Conc. ass. MPO Ottenuto (EU/ml)</b>	<b>% Recupero</b>
<b>Campione 1</b>	66,0	72,6	110,0
<b>Campione 2</b>	55,0	54,9	99,8
<b>Campione 3</b>	49,5	46,1	93,1

I risultati ottenuti con il Test Anti-MPO ELISA ImmuLisa™ sono stati comparati con quelli di un altro kit disponibile in commercio. I risultati sono i seguenti:

		<b>ImmuLisa™</b>		
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Totale</b>
<b>Altro</b>	<b>Positivo</b>	19	4	23
	<b>Negativo</b>	24	24	48
	<b>Totale</b>	43	28	71

Concordanza: 60%

Sensibilità: 82%

Specificità: 50%

I risultati ottenuti con il Test anti-MPO ELISA ImmuLisa™ sono stati comparati con quelli di un'analisi in immunofluorescenza (IFA). Sono raccolti nella tabella sotto e indicano un grado elevato di correlazione tra il Test Anti-MPO ELISA ImmuLisa™ e il metodo IF privilegiato:

		<b>ImmuLisa™</b>		
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Totale</b>
<b>Altro</b>	<b>Positivo</b>	22	1	23
	<b>Negativo</b>	3	45	48
	<b>Totale</b>	25	46	71

Concordanza: 94%

Sensibilità: 93%

Specificità: 95%



**IMMCO**  
DIAGNOSTICS

## ELISA para Anticorpos Anti-Mieloperoxidase (MPO)

IVD

### FOLHETO DO PRODUTO

REF 1161 ELISA para Anticorpos Anti- mieloperoxidase ( MPO) 96 Determinações

#### APLICAÇÃO

É um teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a detecção e quantificação de anticorpos anti-mieloperoxidase (MPO) em soro humano.

#### RESUMO E EXPLICAÇÃO

A presença de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) em doentes com vasculite foi observada pela primeira vez em 1982 por Davies<sup>1</sup>. Os ANCA são um grupo de auto-anticorpos dirigidos contra as proteínas nos grânulos de neutrófilos e em lisossomas positivos para a peroxidase dos monócitos do sangue periférico. Estes anticorpos podem ser detectados por imunofluorescência indirecta em neutrófilos fixados com etanol, produzindo um padrão de coloração perinuclear característico<sup>2,3</sup>. Os pANCA apresentam-se na vasculite, glomerulonefrite, síndrome de Churg-Strauss, poliartrite nodosa, Lúpus eritematoso sistémico e artrite reumatóide<sup>4,5</sup>. O principal antígeno de pANCA é a mieloperoxidase (MPO), a qual constitui um sistema microbicida potente no âmbito dos neutrófilos granulócitos. Também foram associados ao padrão de fluorescência de pANCA outros antígenos alvo, tais como elastase dos leucócitos humanos e lactoferrina com<sup>6,7</sup>. Os anticorpos anti-MPO também podem ser induzidos por drogas tais como hidralazina, clozapina e L-triptofano<sup>8</sup>. A exposição a factores ambientais, por motivos de trabalho, tais como pesticidas pode provocar uma glomerulonefrite progressiva positiva anti-MPO<sup>8</sup>. A medição dos anticorpos ANCA específicos da MPO é um auxílio importante dos exames clínicos para a avaliação de subtipos clínicos no âmbito das vasculites sistémicas.

#### PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O ELISA é executado como um imunoensaio de fase sólida. Os microporos são revestidos com MPO purificada seguido por um bloqueio das zonas sem reacção para reduzir a ligação específica. As amostras de controlo, calibradores e soro do doente são incubadas nos poros revestidos com antígeno que permite a ligação dos anticorpos específicos presentes no soro para o antígeno MPO.

Os anticorpos que não se ligaram e as outras proteínas do soro são eliminados com a lavagem dos microporos. Os anticorpos que se ligaram são detectados juntando um conjugado de IgG anti-humana marcado com enzima aos microporos. O conjugado que não se tiver ligado é eliminado por lavagem.

Depois junta-se um Substrato enzimático específico (pNPP) aos poros e a presença de anticorpos é detectada por uma alteração da cor provocada pela conversão do substrato pNPP num produto de reacção colorido. A reacção é interrompida e a intensidade de alteração da cor, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são apresentados em unidades enzima por mililitro (UE/ml).

#### REAGENTES

##### Conservação e Preparação

Conserva todos os reagentes entre 2 e 8 °C. **Não congele.**

Não utilize o reagente se não estiver limpo ou se apresentar precipitação. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (20-25 °C) no momento da utilização.

Quando é conservado entre 2 e 8 °C, o tempo de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade indicada no kit. Reconstitua o tempo de lavagem em 1 litro com água destilada ou desionizada.

As tiras de microporos revestidas devem ser utilizadas uma vez.

PT

### Precauções

Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais<sup>9</sup>.

AVISO: A azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deite grandes quantidades de água para evitar a formação dessas azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director de laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

As instruções devem ser seguidas exactamente como estão indicadas no folheto do kit para assegurar resultados válidos. Não misture componentes do kit com componentes de outras origens que não sejam do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Respeite as normas em vigor em matéria de processos laboratoriais para minimizar as possibilidades de contaminação microbiana ou química dos reagentes durante o seu manuseamento. Não use após a data de validade indicada no rótulo.

### Materiais fornecidos









ELISA para Anticorpos Anti-Mieloperoxidase (MPO) ImmuLisa™ REF 1161

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">MICROPLATE</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">MPO</span>	<b>Microplaca</b> com micropoços individuais destacáveis revestidos com antígeno MOP
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">A</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">MPO</span> *	<b>Calibrador A pronto a usar</b> ( <i>tampa verde</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-MPO.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">B</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">MPO</span> *	<b>Calibrador B pronto a usar</b> ( <i>tampa violeta</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-MPO.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">MPO</span> *	<b>Calibrador C pronto a usar</b> ( <i>tampa azul</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-MPO.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">D</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">MPO</span> *	<b>Calibrador D pronto a usar</b> ( <i>tampa amarela</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-MPO.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">+</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">MPO</span> *	<b>Controlo positivo pronto a usar</b> ( <i>tampa vermelha</i> ). Contém soro humano positivo para anticorpos anti-MPO.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">-</span> *	<b>Controlo negativo pronto a usar</b> ( <i>tampa branca</i> ). Contém soro humano.
1 x 12 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">IgG-CONJ</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">ALKPHOS</span> *	<b>Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina</b> pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">DIL</span> *	<b>Diluinte de soro</b> pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">SUBSTRATE</span> *	<b>Substrato enzimático</b> pronto a usar. Contém pNPP. <b>Proteger da luz.</b>
1 x 12 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STOP</span>	<b>Solução de paragem</b> pronta a usar.
2 x	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">BUF</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">WASH</span>	<b>Tampão de lavagem em pH 7.2</b> . Reconstituir cada unidade em um litro.

\* Contém <0,1%  $\text{NaN}_3$

**Símbolos utilizados nos rótulos:**

-  Número de lote
-  Número de catálogo
-  Prazo de validade
-  Temperatura de armazenamento
-  Ler as instruções de utilização
-  Utilização em diagnóstico in vitro
-  Fabricante
-  Número de testes

**Materiais necessários mas não fornecidos**

- Água destilada ou desionizada
- Frasco de esguicho para o tempo de lavagem diluído ou lavador automático de microplacas com a capacidade de distribuir 300 µl
- Pipetas para 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorvente
- Leitor de microplacas para a leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de dois comprimentos de onda, o filtro de referência deve ser regulado a 600-650 nm.

**COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA**

Nesta operação devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipêmicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o rendimento do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras de 2 a 8 °C e por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

**PROCEDIMENTO****Notas sobre o procedimento**

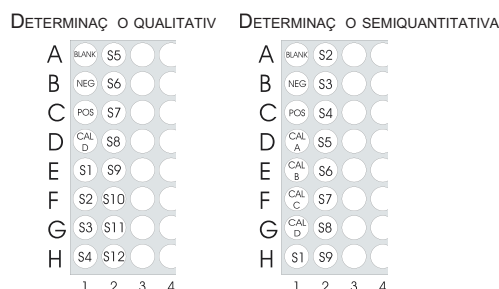
- Leia atentamente o folheto do produto antes de iniciar o teste.
- Deixe que as amostras de soro e os reagentes do teste estabilizem à temperatura ambiente antes de iniciar o teste. Guarde imediatamente no frigorífico todas as amostras e reagentes que não forem utilizados.
- As diluições das amostras do doente devem ser todas preparadas antes de iniciar o teste.
- É essencial uma boa técnica de lavagem. Se a lavagem for executada manualmente, o método de lavagem adequado é o de aplicar um jacto forte e directo de tempo de lavagem utilizando um frasco de lavagem com uma boca larga abrangendo toda a microplaca. **Aconselha-se um lavador automático de microplacas.**
- Use uma pipeta multicanal com capacidade de distribuição em 8 po os simultaneamente. Isso torna mais rápido o processo e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Em todos os passos é importante um cuidadoso controlo do tempo. O início de todos os períodos de incubação dá-se quando se adiciona o reagente.
- O adicionamento de todas as amostras e reagentes deve ser efectuado com a mesma proporção e na mesma sequência.

PT

- Retire do pacote as tiras de micropo os necessárias e feche bem o pacote para evitar condensação nos po os não utilizados. Guarde imediatamente o pacote no frigorífico.

### Método do teste

- Passo 1** Deixe que todos os reagentes estabilizem à temperatura ambiente.
- Passo 2** Indique na folha de protocolo a colocação das amostras nos po os. É aconselhável executar o teste nas amostras em duplicado.
- Passo 3** Para uma **determinação quantitativa** use somente o Calibrador D baixo pronto a usar (*frasco com tampa amarela*).  
**ou** Para uma **determinação semiquantitativa** use os Calibradores A a D prontos a usar como descrito no esquema abaixo.



- Passo 4** Prepare uma diluição a **1:101** das amostras do doente misturando **5 µl** de soro do doente com **0,5 ml** de Diluente para Soro.
- Passo 5** Retire do pacote os micropo os necessários e guarde no frigorífico o pacote selado com as tiras não utilizadas. Coloque correctamente os micropo os no suporte extra fornecido.
- Passo 6** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Calibradores prontos a usar, Controlos Positivos e Negativos e amostras do doente diluídas nos respectivos micropo os de acordo com a folha de protocolo.  
**Nota:** Inclua também um micropo o com **100 µl** de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente.
- Passo 7** Incube por **30 minutos** ( $\pm 5$  min) à temperatura ambiente.
- Passo 8** Lave **4 vezes** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropo o com tampão de lavagem reconstituído. Elimine o fluido virando ao contrário e batendo com os dedos para eliminar o conteúdo de cada po o ou aspirando o líquido de cada po o. Para enxugar no fim da última lavagem, vire as tiras ao contrário e bata com força os po os em toalhetes de papel absorvente. Em caso de lavadores automáticos, programe o lavador de acordo com as instruções do fabricante.
- Passo 9** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Conjugado nos micropo os.
- Passo 10** Incube por **30 minutos** ( $\pm 5$  min) à temperatura ambiente.
- Passo 11** Lave todos os micropo os como no Passo 8.
- Passo 12** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropo o, na mesma ordem e tempos, como descrito para o Conjugado.
- Passo 13** Incube por **30 minutos** ( $\pm 5$  min) à temperatura ambiente.
- Passo 14** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Solução de Interrupção em cada micropo o na mesma ordem e tempos descritos para o Substrato Enzimático. Leia os valores de absorvância no prazo de 1 hora depois de juntar a Solução de Interrupção.
- Passo 15** Leia a absorvância de cada micropo o a **405 nm** usando um leitor de microplacas de comprimento de onda simples ou duplo a 405/630 nm em comparação com o branco de reagente definido em absorvância zero.

### Controlo de qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o reagente nulo devem ser ensaiados em cada teste para verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura da absorvância do reagente nulo deverá ser  $< 0,3$ . O Calibrador A deverá ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário o teste deverá ser repetido. O controlo negativo deve ser  $< 20$  UE/ml. Se o teste for efectuado em duplicado, para determinar UE/ml deverá ser calculada a média das duas leituras. Quando se efectuam determinações qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. Para determinações semiquantitativas, o controlo positivo deve dar valores dentro do intervalo indicado no frasco.

## RESULTADOS

### Cálculos

As concentrações das amostras do doente podem ser determinadas em dois métodos:

#### 1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

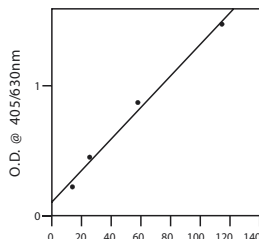
##### Abs. da Amostra de Teste

$$\text{----- X UE/ml Abs. do Calibrador D} = \text{UE/ml da Amostra de Teste}$$

##### Abs. do Calibrador D

#### 2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Registe a absorvância dos Calibradores A a D em relação à respectiva concentração num papel milimétrico linear. Registe a concentração em UE/ml na coordenada X em relação à absorvância na coordenada Y e trace a curva de melhor ajuste. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva em relação ao correspondente valor de absorvância.



### Calibrador

Os calibradores prontos a usar são incluídos para assegurar uma semiquantificação e devem ser usados em todos os testes. As amostras dos doentes com níveis de anticorpos mais elevados devem dar valores de absorvância mais elevados do que os do Calibrador A. Para a determinação com precisão dos valores semiquantitativos essas amostras de soro devem ser mais diluídas de modo que entrem no intervalo da curva do calibrador quando forem novamente testadas. Para a determinação de UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição.

### Interpretação

As seguintes informações servem apenas como guia na interpretação dos resultados de laboratório. Os valores abaixo descritos foram determinados testando 63 doadores de sangue normais e representam a média dos normais mais 3 DP. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais.

Valor Anti-MPO	Interpretação
$\leq 20$ UE/ml	Negativo
20-25 UE/ml	Indeterminado (Limiar)
$> 25$ UE/ml	Positivo

### LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Por si só, os resultados obtidos por este teste não servem como diagnóstico e devem ser considerados em conjunto com a situação clínica do doente.

### VALORES PREVISTOS

Os valores previstos numa população normal são negativos. Todavia, 4% dos indivíduos aparentemente saudáveis, assintomáticos pode apresentar um teste positivo a anticorpos anti-MPO. Estudos publicados recentemente mostram doentes, diagnosticados com Artrite Reumatóide, poliartrite crónica, doença indiferenciada do tecido conjuntivo e LES com anticorpos anti-MPO ou pANCA<sup>5</sup>. A terapia imunossupressora, em si só ou a alteração do tratamento não deve basear-se apenas num resultado positivo a anticorpos anti-MPO, mas sim em cuidadosas observações clínicas.

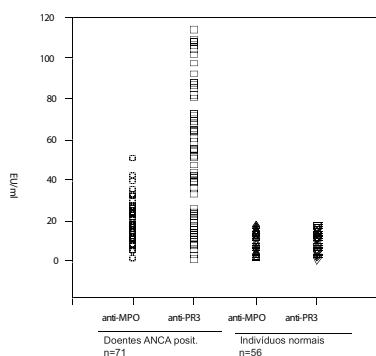
A tabela seguinte descreve a frequência de PR3 e ANCA específicos MPO em soros de 112 doentes com vasculite associada a ANCA<sup>10</sup>.

#### Incidência de anticorpos anti-PR3 e anti-MPO em vasculite associada a ANCA

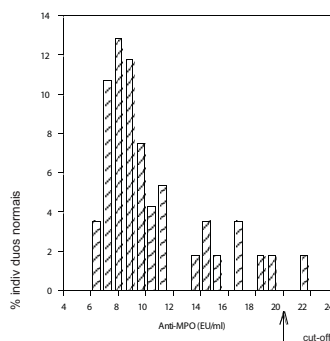
	Granulomatose de Wegener	Poliangite Microscópica	Síndrome de Churg-Strauss
<b>ANCA positivo por IFA</b>	78%	59%	67%
<b>anti-PR3 positivo</b>	90%	0%	10%
<b>anti-MPO positivo</b>	0%	62%	17%
<b>especificidade positivas desconhecida</b>	40%	31%	73%

As figuras seguintes ilustram a incidência de anticorpos anti-PR3 e anti-MPO em sujeitos normais e um grupo seleccionado de indivíduos positivos a ANCA com o anti-MPO Immulisa™.

Distribuição da reactividade de anticorpos anti-MPO e anti-PR3 em teste Immulisa™ em doentes positivos para ANCA e população normal.



Distribuição da população normal com teste para anticorpos anti-MPO Immulisa™



### CARACTERÍSTICAS DE RENDIMENTO

#### Precisão:

Foram testados dois soros positivos anti-MPO-ANCA com o ELISA para Anticorpos Anti-MPO Immulisa™ para determinar a variabilidade inter- e intra-teste. Os resultados são os seguintes:

	inter-teste %CV	intra-teste %CV
<b>Amostra 1</b>	7,4	5,5
<b>Amostra 2</b>	8,6	5,3

PT

### Recuperação:

Amostras com concentrações de anticorpos anti-MPO conhecidas foram misturadas com diluições adequadas de outra amostra positiva com quantidades conhecidas. Foram determinados os níveis de anticorpos anti-MPO das amostras misturadas e dos valores obtidos foi calculada a percentagem de recuperação. Os resultados são os seguintes:

	<b>MPO-Ab conc. adicionada (EU/ml)</b>	<b>MPO-Ab conc.. obtida (EU/ml)</b>	<b>% Recuperação</b>
<b>Amostra 1</b>	66,0	72,6	110,0
<b>Amostra 2</b>	55,0	54,9	99,8
<b>Amostra 3</b>	49,5	46,1	93,1

Os resultados obtidos com o ELISA para Anticorpos Anti-MPO ImmuLisa™ foram comparados com outro teste adquirido no comércio. Os resultados são os seguintes:

		<b>ImmuLisa™</b>		
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>Outro</b>	<b>Positivo</b>	19	4	23
	<b>Negativo</b>	24	24	48
	<b>Total</b>	43	28	71

Concordância Relativa: 60%  
Sensibilidade Relativa: 82%  
Especificidade Relativa: 50%

Os resultados obtidos com o ELISA para Anticorpos Anti-MPO ImmuLisa™ foram comparados com os resultados obtidos por um teste a imunofluorescência (IFA). Esses foram abaixo registrados e indicam um elevado grau de correlação entre o ELISA para Anticorpos Anti-MPO ImmuLisa™ e com o método padrão de IF preferido:

		<b>ImmuLisa™</b>		
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>Outro</b>	<b>Positivo</b>	22	1	23
	<b>Negativo</b>	3	45	48
	<b>Total</b>	25	46	71

Concordância Relativa: 94%  
Sensibilidade Relativa: 93%  
Especificidade Relativa: 95%

## REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕ • BIBLIOGRAFIA

1. Davies DJ, Moran JE, Niall JF et. al. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus etiology? Br Med J; 285:606, 1982.
2. Hagen EC, Ballieux BE, van Es LA et.al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: a review of the antigens involved, the assays, and the clinical and possible pathogenetic consequences. Blood; 81:1996-2002, 1993.
3. Wiik A, Van der Woude FJ. The new ACPA/ANCA nomenclature. Neth.J. Med. 36, 107-111, 1990.
4. Gross WL, Schmitt WH, Csernok E. ANCA and associated diseases: immunodiagnostic and pathogenetic aspects. Clin Exp Imm. 91:1-12, 1993.
5. D'Cruz D, Cervera R, Olkay-Aydintug A et. al. Systemic lupus erythematosus evolving into systemic vasculitis. A report of five cases.Br J Rheumatol; 32:154-157, 1993.
6. Goldschmeding R, van der Schoot CE, ten Bokkel Huinink D et. al. Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel di-isopropylfluorophosphate binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. J Clin Invest; 84:1577-1587, 1989.
7. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. N Eng J Med; 318:1651-1657, 1988.
8. Jaunkalns R. Shear NH. Sokoluk B et. al. Antimyeloperoxidase antibodies and adverse reactions to clozapine. Lancet. 339:1611-2, 1992.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Center for Disease Control, National Institute for Health, HHS Pub. No {CDC} 93-8395) 1993.
10. Stoffel MP, Csernok C, Herzberg T et. al. 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; 104, 54-59, 1996.



*For technical assistance please contact:*

**IMMCO Diagnostics, Inc.**

**60 Pineview Drive**

**Buffalo, NY 14228-2120**

**Telephone: (716) 691-0091**

**Fax: (716) 691-0466**

**Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST**

**E-Mail: [info@immco.com](mailto:info@immco.com)**

*or your local product distributor*



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante  
Autorizzato/Reprezentante Autorizado/Repräsentant Autorisé

EMERGO Group, Ijic.

Moleijstraat 15, 2513 BH, The Hague,  
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)