

**MASTAZYME™ ANCA
PR3 (c-ANCA)
MPO (p-ANCA)**

MASTAZYME™ Proteinase 3 (PR3)	REF 735013 UDI-01 4250729700392	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ Myeloperoxidase (MPO)	REF 735012 UDI-01 4250729700385	12 x 8 Tests

**Gebrauchsanweisung /
Instructions for Use /
Notice d'utilisation**

**Nur zur Verwendung durch Fachpersonal /
For professional use only
Usage *In vitro* uniquement**



MASTAZYME™ ANCA

PR3 (c-ANCA)

MPO (p-ANCA)

Domaine d'utilisation

MASTAZYME™ PR3 / MPO est un dosage immunoenzymatique pour la détection et la semi-quantification d'auto-anticorps spécifiques contre la protéinase 3 et la myéloperoxydase respectivement dans le sérum et le plasma humains, utilisés dans l'analyse des

Le test convient à une utilisation manuelle ou automatisée sur des systèmes de processeur EIA ouverts et est destiné à un usage professionnel de diagnostic in vitro uniquement. Les résultats des tests de laboratoire Ali doivent être interprétés en conjonction avec d'autres données cliniques. Le jugement clinique et les tests complémentaires doivent être pris en compte.

Note importante pour l'utilisation des instructions de ce kit

Toute modification de la notice d'utilisation du kit concernant les tests entraînera une modification du numéro de version figurant au bas de la dernière page. Les modifications apportées seront identifiées sur une feuille séparée ajoutée à la notice d'utilisation pendant une période de trois mois à compter de la date du changement de version. Veuillez-vous assurer que la dernière version de la notice est utilisée pour la procédure de test.

Principe du test

Le test ELISA peut être décrit en quatre étapes:

Incubation de sérum

Les anticorps spécifiques se lient aux antigènes sur la phase solide pour former un complexe immunitaire stable. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, les puits sont lavés pour éliminer tous les composants sériques non réactifs.

Incubation du conjugué

Le conjugué anti-IgG humain à la peroxydase de raifort est ajouté à tous les puits. Le conjugué se lie aux anticorps IgG sur l'antigène en phase solide pour former un complexe immunitaire sandwich stable. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, l'excès de conjugué est éliminé en lavant tous les puits avec un tampon de lavage.

Réaction du substrat et arrêt

Le substrat TMB est distribué dans chaque puits et la réaction enzyme/substrat peroxydase forme un chromogène bleu stable. La réaction et le développement de la couleur qui en découle sont arrêtés après une incubation de 15 minutes à température ambiante en ajoutant 0,25 M H₂SO₄ dans les puits. Le changement de pH entraîne également un changement de couleur du chromogène, qui passe du bleu au jaune.

Interprétation

L'intensité de la couleur est lue dans un lecteur de plaques de microtitration à 450 nm (longueur d'onde de référence recommandée pour les mesures biochromatiques : 600-690 nm). L'intensité de la couleur (DO) est directement proportionnelle à la concentration de l'anticorps spécifique dans l'échantillon du patient. Les résultats peuvent être lus à partir d'une courbe d'étalonnage ou à l'aide d'un logiciel de graphique électronique utilisant une courbe sigmoïdale à 4 paramètres.

Kit Contents

- STRIPS** Barrettes de microtitration
12 bandes individuelles dans un support, chacune avec 8 puits séparés enduits respectivement de PR3 ou de MPO purifiée.
- CONTROL+** Contrôle positif
1 x 1,5 ml de plasma humain stabilisé, prêt à l'emploi, peut être intégré dans la courbe d'étalonnage
- CONTROL-** Contrôle négatif
1 x 1,5 ml de plasma humain stabilisé, prêt à l'emploi, peut être intégré dans la courbe d'étalonnage
- CAL 1-4** Calibrateurs 1-4
4 x 1,5 ml de plasma humain stabilisé, prêt à l'emploi, contenant des anticorps dirigés contre les antigènes mentionnés ci-dessus.

	Concentration d'anti-PR3 / MPO [U/mL]
Calibrator 1	
Calibrator 2 (Seuil)	5
Calibrator 3	25
Calibrator 4	100
Contrôle positif *	12.5
Contrôle négatif *	2.5

* Pour la concentration spécifique au lot, voir le document de contrôle de qualité.

- DIL** Diluant
2 x 60 mL diluant d'échantillon, prêt à l'emploi.
- CONJ G** Enzyme conjugué
1 x 12 mL Anticorps de chèvre anti-IgG humain marqué à l'HRP, prêt à l'emploi
- SUBS** TMB substrat
1 x 12 mL 3,3', 5,5'Tetramethylbenzidine, prêt à l'emploi.
- STOP** Solution d'arrêt
1 x 12 mL 0.25 M H₂SO₄(sulfuric acid), prêt à l'emploi.
- WASH CONC** Solution de lavage 10 x concentré
2 x 50 mL de solution tampon de lavage, à diluer 1:10 avant utilisation ; le concentré doit être réchauffé à 37 °C pendant 15 minutes pour dissoudre les éventuels cristaux.
- Notice d'utilisation**

Autres abréviations

- RTU** prêt à l'emploi

Matériel nécessaire mais non fourni

1. 5 µl-, 100 µl- et 500 µl micropipettes et une pipette multicanaux (en option).
Lecteur de plaques de microtitration avec un filtre de 450 nm
2. Lecteur de plaques de microtitration avec un filtre de 450 nm (filtre de référence 600-690 nm).
3. Laveur de plaques de microtitration (si lavage nanométrique : bouteille de lavage).
4. Tubes de réactifs pour la dilution du sérum.
5. Éprouvette graduée,
6. Eau distillée ou désionisée.

Avertissement et précautions

1. Uniquement pour le diagnostic *in vitro* ! Ne pas ingérer ! Les mesures de sécurité du laboratoire doivent être respectées. Ne pas manger, boire ou fumer dans le laboratoire.
2. Les matériaux de contrôle/calibrage d'origine humaine fournis ont été testés pour les anticorps contre le VIH, le VHC et l'HBsAg et se sont révélés négatifs. Toutefois, ils doivent être traités comme des matériaux potentiellement infectieux et susceptibles de transmettre des maladies. Aucune garantie n'est donnée que les échantillons sont exempts d'infections ou de contamination microbienne.
3. Les déversements de sérum et de réactifs doivent être nettoyés à l'aide d'un désinfectant et les déchets doivent être éliminés de manière appropriée.
4. Les réactifs Ali doivent être amenés à la température ambiante (18 à 24 °C) avant le début de la procédure de test.
5. Avant de procéder au pipetage, tous les réactifs doivent être soigneusement mélangés. Il convient d'éviter toute agitation vigoureuse entraînant la formation de mousse.
6. Il est important de pipeter à intervalles de temps constants, de sorte que tous les puits de la plaque de microtitration soient soumis aux mêmes conditions de réaction.
7. Lors du pipetage des réactifs hors des flacons, il faut veiller à ce que les bouchons ne soient pas contaminés. En outre, il est fortement recommandé d'utiliser des embouts de pipette jetables afin d'éviter toute contamination croisée. Le contenu des flacons est généralement sensible à l'oxydation et ne doit donc être ouvert que pendant une courte période.
8. Aucun réactif provenant de lots de kits différents ne doit être utilisé et les réactifs ne doivent pas être mélangés entre eux.
9. Les réactifs Ali doivent être utilisés dans la limite de la durée de conservation indiquée.
10. Conformément aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL), l'exactitude et la précision de tous les équipements de laboratoire doivent être vérifiées régulièrement. Cela concerne par exemple les pipettes de microlitres et les instruments de lavage ou de lecture ELISA.
11. Certains réactifs sont irritants, en particulier la solution d'arrêt et le substrat TMB. Éviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas d'accident, rincer à l'eau et consulter un médecin. Nettoyer tout le matériel après utilisation pour éviter les incidents de contact secondaire.

Stockage et stabilité

Conserver tous les réactifs à 2-8 °C

La date de péremption de chaque réactif est imprimée sur les étiquettes individuelles. La solution de lavage diluée est stable jusqu'à 4 semaines lorsqu'il est conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Veillez toutefois à ce qu'il soit à température ambiante avant de procéder au test. Les kits doivent être utilisés dans les trois mois suivant leur ouverture.

Échantillon de matériel

Le sérum et le plasma peuvent être utilisés pour les tests. Les échantillons peuvent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 3 jours au maximum, mais pour des périodes de conservation plus longues, ils doivent être aliquotés et conservés à -20 °C. La congélation et la décongélation répétées sont contre-indiquées.

Les échantillons décongelés doivent être mélangés (vortex) avant d'être utilisés dans le test !

Les échantillons lipémiques, hémolytiques, ictériques ou contaminés par des bactéries peuvent donner des résultats faux positifs ou faux négatifs.

Test Procedure

1. Préparation des réactifs Échantillons :

Laisser tous les composants du kit et les échantillons atteindre la température ambiante (RT, 18-24 °C) avant utilisation et bien mélanger.

Préparation des échantillons :

Les sérums des patients doivent être pré-dilués au 1:101 dans le diluant de l'échantillon (par exemple 5 µl de sérum + 500 µl de diluant de l'échantillon) avant le test.

Tampon de lavage :

Dissoudre les cristaux éventuellement présents dans le flacon en le chauffant à 37 °C, puis bien mélanger.

Diluer le beurre de lavage concentré 1:10 avec de l'eau distillée ou déionisée (par exemple 50 ml de beurre concentré + 450 ml d'eau distillée). Bien mélanger.

. Suivre scrupuleusement les instructions. L'utilisateur est seul responsable de toute modification de la procédure de test.

. Les réactifs ne doivent pas être laissés à température ambiante plus longtemps que nécessaire.

. Une courbe d'étalonnage standard doit être établie pour chaque essai afin d'obtenir des résultats quantitatifs.

. Conserver les barrettes de microtitration non utilisées dans le sachet en aluminium refermable fourni et les stocker dans un endroit sec à une température comprise entre 2 et 8 °C.

2. Étapes du test

Préparer un nombre suffisant de puits de microtitration pour les calibrateurs, les contras et les échantillons.

Remarque : d'autres conditions d'incubation sont possibles. Toutefois, en cas de modification de la procédure de test recommandée (par exemple, une température d'incubation de 37 °C au lieu de RT), la performance du test doit être vérifiée par l'utilisateur.

1. Introduire à la pipette 100 µl de chacun des échantillons dilués (1:101), des calibrateurs prêts à l'emploi et des contre-échantillons dans les puits appropriés.
2. Incuber les bandelettes de test à température ambiante pendant 30 minutes.

3. Jeter le contenu des micropuits et laver 3 fois avec 300 µl de solution de lavage dilué.

3 fois avec 300 µl de beurre de lavage dilué. Éliminer ensuite le beurre de lavage résiduel en tapotant doucement la plaque de microtitration sur une serviette en papier.

4. Introduire à la pipette 100 µl de solution de conjugué enzymatique dans chaque puits.

5. Incuber les bandelettes pendant 30 minutes à température ambiante.

6. Effectuer l'étape de lavage conformément au point 3.

7. Introduire à la pipette 100 µl de substrat TMB dans chaque puits.

8. Incuber pendant 15 minutes dans l'obscurité (par exemple dans un tiroir) à température ambiante.

9. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits.

10. Après avoir soigneusement mélangé, lire la densité optique à 450 nm. Blanc contre air. Une mesure bichromatique utilisant une longueur d'onde de référence de 600-690 nm est recommandée. Les concentrations peuvent être tracées à l'aide d'un logiciel graphique électronique ou à la main par rapport à la courbe d'étalonnage.

Après l'ajout de la solution d'arrêt, la couleur développée est stable pendant au moins 30 minutes. Lire les densités optiques pendant cette période.

Interprétation des résultats

Qualitatif

Le calibrateur 2 est utilisé pour l'interprétation qualitative des testss. Une interprétation quantitative n'est pas possible si l'on utilise uniquement le calibrateur 2 définissant le seuil.

Quantitatif

La concentration dans l'échantillon du patient peut être calculée à l'aide d'un ordinateur et d'un logiciel approprié. Dans ce cas, les résultats sont calculés en utilisant, par exemple, un algorithme d'ajustement à 4 paramètres pour produire une courbe sigmoïdale. Facultatif : Une courbe standard est tracée en entrant l'absorbance moyenne de chaque calibrateur sur l'axe Y et la concentration correspondante sur l'axe X en utilisant du papier graphique log/log ou linéaire/log. La concentration du contre-échantillon et de l'échantillon peut alors être lue directement sur le graphique.

Valeurs normales suggérées

Une étude des valeurs normales réalisée à partir d'échantillons provenant de donneurs de sang sains et d'échantillons de personnes malades a permis d'établir les valeurs normales et élevées suivantes :

Négatif: < 5 U/ml

Positif: > 5 U/ml

Interprétation

Les résultats peuvent être influencés par plusieurs facteurs liés au patient. Le diagnostic clinique et le pronostic de la maladie ne doivent pas être basés sur un seul résultat de test. D'autres données de laboratoire et observations cliniques doivent être prises en considération avant qu'un diagnostic concluant puisse être posé.

c-ANCA: Proteinase 3

La phase solide du test est recouverte de protéinase 3 humaine hautement purifiée. L'antigène est séparé des autres sérine-protéases liées aux ANCA dans les granules a des granulocytes neutrophiles (c'est-à-dire la cathepsine G ou l'élastase).

qui élimine donc les réactions croisées dues à la contamination par l'antigène. Le MASTAZYME™ PR3 est idéal pour la confirmation ou la sous-spécification des sérums ayant réagi positivement lors d'un essai d'immunofluorescence spécifique à c-ANCA.

Les titres d'anti-PR3 sont en corrélation directe avec l'activité de la granulomatose de Wegener.

Les sérums séropositifs pour le VIH peuvent présenter des réactions croisées non spécifiques. Les tumeurs malignes peuvent également donner des résultats positifs non spécifiques en l'absence de données cliniques sur la vascularite. La plupart de ces résultats non spécifiques sont limités à l'IIFA et peuvent être exclus par ELISA.

p-ANCA : Myéloperoxydase

La phase solide du test est recouverte de myéloperoxydase humaine dérivée de granulocytes de trame. L'utilisation d'un antigène natif et d'une technique d'enrobage spéciale permet à l'antigène de conserver sa conformation protéique stable. C'est pourquoi aucune réactivité croisée avec le GS-ANA n'est observée.

Les résultats positifs sont hautement indicatifs des formes nécrosantes de vascularite, du syndrome de Churg et Strauss et de la granulomatose de Wegener.

Les enzymes peroxydase thyroïdienne et myéloperoxydase présentent physiologiquement des homologies dans leur séquence d'acides aminés. Aucune réaction croisée n'a été observée, mais il convient d'en tenir compte lorsque des résultats inhabituels sont obtenus.

Données de performance

Performance clinique

Pour démontrer la performance clinique, 44 (PR3), 27 (MPO) échantillons cliniques positifs et 42 (PR3), 69 (MPO) échantillons cliniques négatifs (sérum et plasma) ont été testés. Sur la base de ces échantillons, les paramètres de performance clinique suivants ont été calculés

	Formule	Value	
		PR3	MPO
Sensibilité du diagnostique	$\frac{TP}{(TP + FN)}$	97.7%	96.3%
Spécificité diagnostique	$\frac{TN}{(TN + FP)}$	94.2%	90.0%
Valeur prédictive positive (VPP)	$\frac{TP}{(TP + FP)}$	93.5%	78.8%
Valeur prédictive négative (VPN)	$\frac{TN}{(TN + FN)}$	98.0%	98.4%
Efficiency	$\frac{(TP + TN)}{total}$	95.8%	91.7%
Rapport de vraisemblance positif	$\frac{Sens}{(1 - Spec)}$	16.94	9.49
Rapport de vraisemblance négatif	$\frac{(1 - Sens)}{Spec}$	0.02	0.04

(Abréviations : TP : Vrai positif, TN : Vrai négatif, FN : Faux négatif, FP : Faux positif)

Precision

La répétabilité a été démontrée sur un lot avec deux paramètres différents sur plusieurs dates de mesure.

La reproductibilité a été démontrée sur plusieurs lots sur plusieurs dates de mesure.

Signalement d'incidents graves

Les incidents graves liés au dispositif doivent être signalés au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

References

Vous trouverez les références à la fin du mode d'emploi.

Referenzen / References:

1. Gross WL. et al., Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: immunobiological aspects, *Klin.Wochenschr*, 69, 558-566 (1991)
2. Gross WL et al., ANCA-assozierte Vaskulitiden (Wegener-Granulomatose, Churg-Strauss-Syndrom, Mikroskopische Polyangiitis) 1.Systematik, Pathogenese und Klinik; *Z.Rheumatol*, 54, 279-290 (1995)
3. Seibold F et al., Clinical significance of antibodies against neutrophils in patients with inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis; *Gut*, 33, 657-662 (1992)
4. Seibold F et al., Neutrophil Autoantibodies: A genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis, *Gastroenterol*, 107, 532-536 (1994)



Mast Diagnostica GmbH,
Feldstraße 20,
23858 Reinfeld,
Deutschland
Tel: +49 (0)4533 2007 0
Fax: +49 (0)4533 2007 68
email: mast@mast-diagnostica.de
Web: www.mast-group.com

Mast Group Ltd.
Mast House, Derby Road
Bootle, Merseyside, L20 1EA
United Kingdom
Tel: +44 (0)151 472 1444
Fax: +44 (0)151 944 1332
email: sales@mastgrp.com
Web: www.mast-group.com

Mast Diagnostic
12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1
France
Tél: +33 (3) 22 80 80 67
Fax: +33 (3) 22 80 99 22
email: info@mast-diagnostic.fr
Web: www.mast-group.com

Verwendete Symbole gemäß DIN EN ISO 15223-1

Icons are used according to DIN EN ISO 15223-1

**Les icônes sont utilisées conformément à la
norme DIN EN ISO 15223-1**