

REF 41429 	ZENIT RA PR3	Distribuito da 
ISTRUZIONI PER L'USO	   50	

FINALITA' D'USO

Il test *ZENIT RA PR3* è un test immunologico chemiluminescente (CLIA) per la determinazione quantitativa, con strumentazione dedicata *ZENIT RA Analyser*, degli anticorpi specifici di classe IgG diretti contro la proteinasi 3 (PR3) in campioni di siero o plasma umano (EDTA, Eparina).

Questo dosaggio viene impiegato come ausilio diagnostico nella valutazione delle vasculiti primitive sistemiche ANCA-associate, in particolare della granulomatosi di Wegener (GW).

ATTENZIONE: Qualunque decisione medica non può essere basata sul risultato di questo solo test, ma va fondata sulla valutazione dell'insieme di tutti i dati clinici e di laboratorio disponibili.

SIGNIFICATO CLINICO

Gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) sono autoanticorpi diretti contro antigeni contenuti nel citoplasma dei granulociti e dei monociti⁽¹⁾. Gli ANCA sono un marker sierologico di alcune vasculiti necrotizzanti dei vasi di piccolo (medio) calibro, in particolare la granulomatosi di Wegener (GW), la poliangioite microscopica (PAM), la glomerulonefrite necrotizzante extracapillare pauciimmune (GNNEP, una forma di PAM limitata al rene) e, in misura minore, la sindrome di Churg-Strauss (SCS), spesso collettivamente definite "vasculiti-ANCA-associate" (VAA)⁽²⁾.

Numerose evidenze sia cliniche che sperimentali, suggeriscono inoltre, un ruolo patogenetico degli ANCA nelle VAA, in particolare per ANCA-MPO⁽³⁾.

Mediante la metodica standard di immunofluorescenza indiretta (IFI) su neutrofili umani normali fissati con etanolo assoluto possono essere riconosciuti due quadri fluoroscopici principali : C-ANCA e P-ANCA. Meno frequentemente possono essere rilevati altri due pattern fluoroscopici, C-ANCA atipico e ANCA-At, generalmente non associati alla presenza di una vasculite idiopatica⁽⁴⁾.

Nei pazienti affetti da VAA i principali bersagli antigenici degli ANCA sono la mieloperossidasi (MPO) e la proteinasi 3 (PR 3)^(5,6).

La MPO è un enzima con importanti proprietà battericide, che esercita attraverso la catalisi di reazioni di perossidazione la formazione di prodotti tossici quali HOCl, H₂O₂ e radicali dell'ossigeno. Inoltre l'acido ipocloroso ed i suoi metaboliti possono inattivare gli inibitori delle proteasi e pertanto giocare un ruolo nella degradazione dei tessuti e nel mantenimento di un microambiente "infiammatorio"⁽³⁾. La MPO rappresenta circa il 5% del contenuto proteico totale dei neutrofili; è una molecola fortemente cationica costituita da un etero dimero di P.M. ~ 140 kDa.

La PR3 è una serin-proteasi debolmente cationica contenuta nei granuli primari (o azzurrofilici) di granulociti e monociti, costituita da 228 aminoacidi e con P.M. 29-31 kDa, dotata di attività antimicrobica verso batteri e funghi. La maggior parte delle sue funzioni biologiche dipende dall'attività proteolitica. In un contesto infiammatorio viene rilasciata all'esterno della cellula, insieme ad altri costituenti dei granuli e radicali dell'ossigeno, dove può degradare il collagene, i proteoglicani ed altri costituenti del tessuto connettivo. Un'attività proteolitica eccessiva, prolungata o inappropriata è però causa di danni all'organismo⁽³⁾. ANCA-PR3 interferiscono con l'inibizione enzimatica della PR3 da parte del suo inibitore fisiologico α 1-antitripsina.

Il pattern C-ANCA nella maggior parte dei casi è dovuto alla presenza di anticorpi specifici per la PR3, mentre un quadro P-ANCA può essere causato da anticorpi diretti verso numerose proteine tra cui la MPO è la più frequente. Ad oggi, ANCA diretti verso altre componenti citoplasmatiche, diverse da PR3 e MPO, non hanno un chiaro significato clinico e pertanto non sono utili nella diagnostica di laboratorio delle VAA^(7,8).

Successivamente alla pubblicazione dei risultati del prospetto multicentrico per la standardizzazione dei metodi per la determinazione degli ANCA⁽⁹⁾, sono state redatte le Linee Guida per la corretta esecuzione e refertazione dei test ANCA nei pazienti con sospetto di vasculite, a cui si rimanda per un approfondimento^(4,10,11). Da quanto chiaramente emerso nello studio suddetto, i cui risultati sono stati successivamente ampiamente confermati, la corretta determinazione degli ANCA si avvale dell'esecuzione combinata della metodica IFI e dell'identificazione della specificità antigenica riconosciuta, mediante sistemi antigeni-specifici per i due antigeni principali MPO e PR3 (metodi ELISA, FEIA, CLIA)^(12,13).

L'esecuzione combinata delle due metodiche consente di ottenere una specificità > 98% anche verso le patologie di controllo, molto maggiore di quella ottenibile con i test usati singolarmente.

Il titolo degli ANCA correla, seppure con alcune eccezioni, con l'attività di malattia, pertanto per il monitoraggio dei pazienti è raccomandato l'utilizzo di metodiche quantitative per il dosaggio di ANCA-MPO o ANCA-PR3⁽¹⁴⁾.

La specificità degli ANCA (MPO o PR3) non permette di differenziare le diverse VAA (GW, PAM, GNNEP,SCS), comunque la presenza di P-ANCA/MPO-ANCA è più suggestiva per una diagnosi di PAM o di GNNEP, mentre una positività C-ANCA/PR3-ANCA è più frequentemente associata alla GW.

Nella GW e nella PAM (compresa la forma limitata al rene) in fase attiva la prevalenza degli ANCA è del 70-90%, nella SCS gli ANCA sono invece presenti soltanto in $\approx$ 40% dei pazienti, con la MPO quale specificità antigenica prevalente.

Relativamente all'utilità diagnostica del dato di laboratorio è utile ricordare che i valori predittivi positivo e negativo (VPP, VPN) dipendono, oltre che dalla sensibilità e specificità del test, dalla prevalenza della malattia nella popolazione indagata. Una richiesta appropriata (elevata probabilità pre-test) consente di ottenere un risultato di reale utilità clinica e riduce significativamente la possibilità di risultati falsamente positivi⁽¹⁵⁾.

La ricerca degli ANCA dovrebbe pertanto essere effettuata in presenza di un fondato sospetto clinico e un risultato positivo, di per sé non sufficiente per la diagnosi di VAA, deve essere valutato alla luce del quadro clinico e istologico.

In letteratura sono occasionalmente segnalate ANCA-positività in patologie diverse dalle vasculiti ANCA-associate, seppure non sempre confermate mediante dimostrazione della specificità antigenica per MPO o PR3.

Numerose sono le patologie da considerare nella diagnostica differenziale, tra queste è utile ricordare, anche per la loro elevata frequenza, le patologie infettive ed in particolare l'endocardite batterica subacuta. Nonostante il VPN di un risultato negativo sia in generale elevato, questo non esclude completamente la possibilità di una VAA, soprattutto in pazienti con una forte evidenza clinica di vasculite primitiva sistemica⁽¹⁶⁾.

PRINCIPIO DEL METODO

Il kit *ZENIT RA PR3* per la determinazione quantitativa delle IgG specifiche anti-PR3 utilizza un metodo immunologico indiretto a due step basato sul principio della chemiluminescenza.

L'antigene specifico è utilizzato per rivestire le particelle magnetiche (fase solida) ed un anticorpo anti-IgG umane è marcato con un derivato dell'estere di acridinio (coniugato).

Durante la prima incubazione gli anticorpi specifici presenti nel campione, nei calibratori o nei controlli si legano alla fase solida.

Durante la seconda incubazione il coniugato reagisce con gli anticorpi anti-PR3 IgG sequestrati dalla fase solida.

Dopo ciascuna incubazione il materiale non legato alla fase solida è rimosso mediante aspirazione e susseguente lavaggio.

La quantità di coniugato marcato rimasto legato alla fase solida viene valutata mediante attivazione della reazione di chemiluminescenza e misura del segnale luminoso. Il segnale generato, espresso in unità relative di luce (RLU, Relative Light Unit), è indicativo della concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel campione, nei calibratori e nei controlli.

AUTOMAZIONE

Lo strumento *ZENIT RA Analyser* esegue in automatico tutte le operazioni previste dal protocollo di dosaggio: aggiunta nel contenitore di reazione dei campioni, calibratori, controlli, particelle magnetiche, coniugato e soluzioni di attivazione della chemiluminescenza; separazione magnetica e lavaggio delle particelle; misura della luce emessa.

Il sistema calcola i risultati del dosaggio per i campioni ed i controlli mediante curva di calibrazione memorizzata e stampa un rapporto che include tutte le informazioni relative al dosaggio ed al paziente.

MATERIALI E REAGENTI

Materiali e reagenti forniti

REAG	1	MP	2.5 mL
------	---	----	--------

Particelle magnetiche rivestite con antigene PR3 (proteinasi 3) in Tampone Fosfato contenente proteine stabilizzanti, tensioattivo, Pro-Clin 300 e sodio azide (< 0.1 %) come conservanti.

REAG	2	CONJ	15 mL
------	---	------	-------

Anticorpo policlonale di capra anti-IgG umane marcato con un derivato dell'estere di acridinio (coniugato), in Tampone Fosfato contenente proteine stabilizzanti e sodio azide (< 0.1 %) come conservante.

REAG	3	DIL	25 mL
------	---	-----	-------

Soluzione Diluente Campioni: Tampone Fosfato contenente sieralbumina bovina, un tensioattivo, un colorante blu inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ come conservanti.

REAG	4	CAL A	1.6 mL
------	---	-------	--------

Siero umano con bassa concentrazione di anticorpi anti-PR3 IgG in Tampone Fosfato contenente sieralbumina bovina, un tensioattivo, un colorante blu inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ come conservanti.

REAG	5	CAL B	1.6 mL
------	---	-------	--------

Siero umano con elevata concentrazione di anticorpi anti-PR3 IgG in Tampone Fosfato contenente sieralbumina bovina, un tensioattivo, un colorante blu inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ come conservanti.

Tutti i reagenti sono pronti per l'uso.

I reagenti 1, 2 e 3 sono assemblati in un unico insieme che costituisce la cartuccia reagenti.

Le concentrazioni dei Calibratori sono espresse in UA/mL (Unità Arbitrarie) e tarate contro uno standard di riferimento interno. I valori delle concentrazioni, specifici per lotto di prodotto, sono registrati nel DATA DISK inserito nel kit.

DATA DISK

Mini-DVD contenente le informazioni riguardanti tutti i prodotti della Linea ZENIT RA (Reagenti, Calibratori, Sieri di controllo) aggiornati all'ultimo lotto produttivo con l'esclusione dei prodotti scaduti alla data di compilazione del nuovo DATA DISK.

E' sufficiente conservare il DATA DISK con il numero di lotto più elevato per mantenere aggiornate le informazioni richieste per il corretto funzionamento del sistema.

Materiali e reagenti richiesti ma non forniti nel kit

- ZENIT RA Analyzer Cod. No. 41400
- ZENIT RA Cuvette Cube * Cod. No. 41402
Confezione da 960 cuvette.
- ZENIT RA System Liquid * Cod. No. 41409
1 bottiglia da 0.5 litri di soluzione 10x.
- ZENIT RA Wash Solution * Cod. No. 41407
1 bottiglia da 0.5 litri di soluzione 20x.
- ZENIT RA Trigger Set * Cod. No. 41403
1 flacone da 250 mL di Trigger A (soluzione di preattivazione)
1 flacone da 250 mL di Trigger B (soluzione di attivazione)
- ZENIT RA D-SORB Solution Cod. No. 41436
Confezione da 2 bottiglie da 1 litro di soluzione pronta per l'uso.
- ZENIT RA Cartridge Checking System * Cod. No. 41401
- ZENIT RA Top Cap Set Cod. No. 41566
300 tappi superiori per la chiusura dei contenitori dei calibratori dopo il primo utilizzo.

(*) Lo strumento ZENIT RA Analyzer e gli accessori identificati dall'asterisco sono fabbricati da Immunodiagnostic Systems S.A., Rue E. Solvay, 101, B-4000 Liège, Belgium e distribuiti da A. Menarini Diagnostics Srl.

Altri Reagenti Raccomandati

ZENIT RA ANCA/GBM CONTROL SET Cod. No. 41449
3 fiale da 1.5 mL di siero umano negativo e 3 fiale da 1.5 mL di siero umano positivo per anticorpi anti-PR3.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti forniti nel kit *ZENIT RA PR3* sono solo per uso diagnostico in vitro e non per uso in vivo in uomini o animali.

Questo prodotto deve essere utilizzato in stretta osservanza alle istruzioni riportate nel presente documento da utilizzatori professionali.

Menarini non può essere ritenuta responsabile di perdite o danni generati da un uso non conforme alle istruzioni fornite.

Precauzioni di sicurezza

Questo prodotto contiene materiale di origine animale e pertanto deve essere manipolato come se contenesse agenti infettanti.

Questo prodotto contiene componenti di origine umana. Tutte le unità di siero o plasma utilizzate per la fabbricazione dei reagenti di questo kit sono state analizzate con metodi FDA approvati e trovate non reattive per la presenza di HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 ed anti-HIV2.

Tuttavia, poiché nessun metodo di analisi è in grado di garantire l'assenza di agenti patogeni, tutto il materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto e manipolato come tale.

In caso di imballaggio danneggiato con fuoriuscita dei reagenti provvedere alla decontaminazione dell'area interessata con una soluzione diluita di Ipoclorito di Sodio dopo essersi protetti con idonei dispositivi di protezione individuale (camice, guanti, occhiali).

Provvedere allo smaltimento del materiale utilizzato per la pulizia e dei rifiuti di imballaggio coinvolti nella fuoriuscita, in base alle norme nazionali per lo smaltimento dei rifiuti potenzialmente infetti.

Alcuni reagenti contengono sodio azide come conservante. Poiché la sodio azide può reagire con piombo, rame e ottone piombato formando azidi esplosive nelle tubature, si raccomanda di non eliminare reagenti o rifiuti negli scarichi ma di seguire le norme nazionali in materia di smaltimento rifiuti potenzialmente pericolosi.

Precauzioni operative

Per ottenere risultati affidabili è necessario attenersi strettamente alle presenti Istruzioni per l'uso e seguire scrupolosamente quanto indicato nel manuale operativo dello strumento.

I reagenti forniti nel kit devono essere utilizzati esclusivamente con il sistema *ZENIT RA Analyzer*.

I componenti della cartuccia reagenti non possono essere rimossi dalla cartuccia e riassemblati.

Non usare il kit oltre la data di scadenza.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti forniti nel kit sono tutti pronti per l'uso.

CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

Conservare i reagenti forniti nel kit a 2-8 °C in posizione verticale ed al buio.

In queste condizioni la cartuccia reagenti ed i calibratori non aperti sono stabili sino alla data di scadenza.

La cartuccia reagenti dopo apertura può essere utilizzata per 60 giorni se conservata in frigorifero a 2-8 °C oppure a bordo macchina.

I calibratori dopo apertura possono essere utilizzati per 60 giorni se conservati in frigorifero a 2-8 °C e se la permanenza a bordo non supera le 6 ore per seduta.

Non congelare i reagenti ed i calibratori.

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere eseguito su campioni umani di siero e plasma (EDTA - Eparina).

Si sconsiglia l'uso di campioni lipemici, emolizzati e torbidi.

Se il dosaggio viene eseguito dopo più di 8 ore, separare il siero o il plasma dal coagulo, dai globuli rossi e dalle provette di separazione con gel.

Prima di essere analizzati i campioni possono essere conservati in frigorifero a 2-8 °C per 7 giorni al massimo.

Se il dosaggio viene eseguito dopo più di 7 giorni, conservare i campioni congelati (< - 20 °C).

Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.

PROCEDIMENTO OPERATIVO

Per ottenere prestazioni analitiche affidabili attenersi scrupolosamente alle istruzioni riportate nel manuale operativo dello strumento.

Caricamento dei reagenti

Tutti i reagenti forniti nel kit sono pronti per l'uso.

Prima di inserire la cartuccia reagenti nel sistema, il contenitore delle particelle magnetiche deve essere agitato per rotazione orizzontalmente in modo da favorire la risospensione delle particelle. Eseguire l'operazione evitando la formazione di schiuma.

Posizionare la cartuccia reagenti nell'area reagenti dello strumento utilizzando l'apposita guida e lasciare in agitazione per almeno 30 minuti prima dell'uso.

Il posizionamento della cartuccia reagenti determina contemporaneamente la lettura del codice a barre identificativo. In caso di danneggiamento dell'etichetta della cartuccia o in caso di mancata lettura, i dati identificativi della cartuccia reagenti possono essere inseriti manualmente.

Lo strumento mantiene automaticamente in agitazione continua le particelle magnetiche.

Se la cartuccia reagenti viene rimossa dallo strumento, conservarla verticalmente al buio a 2-8 °C.

Caricamento dei calibratori e dei controlli

I calibratori ed i controlli ZENIT RA sono pronti per l'uso. Lasciare i calibratori ed i controlli a temperatura ambiente per 10 minuti ed agitare delicatamente il contenuto, manualmente o mediante vortex, evitando la formazione di schiuma. Non capovolgere il contenitore e non togliere il tappo perforatore di chiusura (tappo giallo per i calibratori e tappi verdi o blu per i controlli).

Nel caso i calibratori o i controlli fossero utilizzati per la prima volta, premere il tappo perforatore verso il basso sino a completarne la sua corsa. Con questa operazione la membrana che sigilla il contenitore verrà perforata rendendo possibile il prelievo del liquido contenuto. L'avvenuto abbassamento del tappo perforatore è segnalato dalla contemporanea copertura della fascia di colore rosso presente nel lato superiore dell'etichetta (Fig. 1 – Contenitore sigillato e Contenitore perforato).

Nel caso i calibratori o i controlli fossero già stati utilizzati, il contenitore sarà provvisto del tappo superiore (tappo bianco) e la fascia rossa dell'etichetta sarà coperta.

Sullo strumento devono essere caricati esclusivamente i contenitori senza tappo superiore (tappo bianco) e con la fascia rossa dell'etichetta coperta (Fig. 1 – Contenitore perforato).

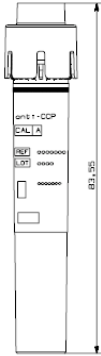
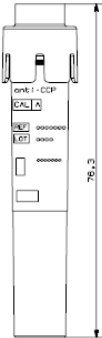
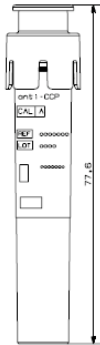
Inserire nello strumento i calibratori o i controlli nell'area campioni dopo lettura del bar code. I dati del bar code possono essere inseriti anche manualmente in caso di danneggiamento dell'etichetta o in caso di mancata lettura.

I valori della concentrazione degli anticorpi IgG anti-PR3 presente nei calibratori o nei controlli sono registrati nel DATA DISK ed automaticamente trasferiti nell'analizzatore. In caso di mancato trasferimento dei dati è possibile il loro inserimento manuale.

Al termine della seduta i contenitori dei calibratori e dei controlli devono essere chiusi con gli appositi tappi superiori (tappi bianchi) e trasferiti a 2-8 °C sino al loro successivo impiego (Fig. 1 – Contenitore chiuso).

I calibratori possono essere utilizzati per un massimo di quattro volte.

Figura 1: Layout contenitore

Contenitore sigillato	Contenitore perforato	Contenitore chiuso
		

Caricamento dei campioni

Identificare i campioni utilizzando il lettore di bar code ed inserirli nello strumento, nell'apposito contenitore. In caso di mancanza del bar code sul campione o in caso di mancata lettura, i dati identificativi del campione possono essere inseriti manualmente.

Selezionare per ogni campione i parametri richiesti.

Calibrazione

Lo strumento *ZENIT RA Analyzer* utilizza una curva di calibrazione memorizzata (master curve), generata dal produttore per ogni lotto di cartuccia reagenti.

I parametri delle "master curve", unitamente ai valori delle concentrazioni dei calibratori, sono memorizzati nel DATA DISK e trasferiti nel database dello strumento.

I calibratori A e B sono utilizzati per ricalibrare la "master curve" in funzione sia dello strumento utilizzato che dei reagenti a bordo.

Per eseguire la ricalibrazione analizzare in triplicato i due calibratori A e B ed in singolo i controlli. I valori di concentrazione ottenuti con i controlli permettono di validare la nuova calibrazione.

Una volta che la ricalibrazione della "master curve" sia stata accettata e memorizzata, tutti i campioni successivi possono essere analizzati senza ulteriore calibrazione, tranne nei seguenti casi:

- quando è caricata a bordo dello strumento una cartuccia reagenti con un nuovo lotto;
- quando i valori dei controlli non rientrano nell'intervallo di accettabilità;
- quando è eseguita la procedura di manutenzione dello strumento;
- quando è scaduta la validità della "master curve" ricalibrata.

La validità della "master curve" ricalibrata per il kit *ZENIT RA PR3* è di 15 giorni.

La gestione della ricalibrazione è attuata in automatico dallo strumento.

Dosaggio

Premere il tasto di avvio.

1. Il sistema aspira 80 µL di Diluente Campioni, 40 µL di Particelle Magnetiche, 100 µL di Diluente Campioni e 6 µL di campione o controllo (per i calibratori il siero positivo è fornito prediluito con il Diluente Campioni ed il volume prelevato è di 106 µL). Le soluzioni e la sospensione aspirate sono dispensate nella cuvetta di reazione.
2. La cuvetta di reazione è incubata nel rotore a 37 °C per 10 minuti.
3. Dopo questa fase di incubazione, le particelle magnetiche sono separate e lavate.
4. Nella cuvetta vengono dispensati 200 µL di coniugato.
5. La cuvetta di reazione è incubata nel rotore a 37 °C per 10 minuti.
6. Dopo questa ultima fase di incubazione, le particelle magnetiche sono separate e lavate e la cuvetta viene trasferita nella camera di lettura.
7. La quantità di coniugato legato alla fase solida, espressa in RLU, è direttamente proporzionale alla concentrazione di IgG anti-PR3 presente nel campione.
8. Le risposte ottenute sono interpolate sulla curva di taratura e trasformate in concentrazioni.

Campioni con valori di concentrazione più elevati del limite superiore dell'intervallo di misurabilità possono essere diluiti e ritestati. Il nuovo valore ottenuto viene moltiplicato, per ottenere il risultato finale, per il fattore di diluizione utilizzato.

CONTROLLO QUALITA'

Per assicurare la validità del dosaggio, sieri di controllo a differenti livelli di concentrazione (almeno un siero negativo ed un siero positivo) devono essere misurati ogni giorno in cui si esegue il dosaggio.

Se il proprio laboratorio richiede, per la verifica dei risultati del dosaggio, un uso più frequente o un numero più elevato di controlli, seguire le procedure del controllo qualità ivi stabilite.

Se vengono utilizzati i sieri di controllo ZENIT RA, i valori medi attesi ed i limiti di accettabilità sono quelli riportati nel DATA DISK presente anche nella confezione dei controlli.

Qualora venissero utilizzati sieri di controllo diversi, è necessario, prima del loro impiego, definire i valori attesi con reagenti e sistema ZENIT RA.

Qualora il valore dei controlli non rientri nel range di accettabilità specificato, i relativi risultati del dosaggio non sono validi ed i rispettivi campioni devono essere rianalizzati.

In questo caso è necessario eseguire prima della ripetizione del dosaggio una procedura di ricalibrazione.

CALCOLO ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcolo dei risultati

La concentrazione degli anticorpi IgG anti-PR3 presente nei campioni in esame è calcolata automaticamente dal sistema. I valori possono essere visualizzati mediante lettura sul video o attraverso stampa.

Le concentrazioni sono espresse in UA/mL.

Il calcolo della concentrazione di analita nel campione avviene attraverso lettura della risposta ottenuta per ogni campione su una curva di calibrazione elaborata mediante un sistema di "fitting" logistico a quattro parametri (4PL, Y ponderato), corretta periodicamente in funzione delle risposte ottenute nel dosaggio dei calibratori.

Per informazioni dettagliate su come il sistema calcola i risultati, consultare il manuale operativo del sistema.

Interpretazione dei risultati

Il range di misurabilità del dosaggio ZENIT RA PR3 è: 0.0 – 1067 UA/mL.

I valori inferiori a 0.0 UA/mL sono valori estrapolati e possono essere riportati come "uguali a 0.0 UA/mL".

I valori superiori a 1067 UA/mL possono essere riportati come "superiori a 1067 UA/mL", o ritestati dopo opportuna diluizione.

I risultati dei campioni possono essere interpretati nel seguente modo:

(UA/mL)	Interpretazione
< 10	Il campione è da considerare Negativo per la presenza di IgG anti-PR3
10÷20	Il campione è da considerare dubbio per la presenza di IgG anti-PR3
> 20	Il campione è da considerare Positivo per la presenza di IgG anti-PR3

I valori sopra riportati sono da considerare solo valori suggeriti. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri intervalli di riferimento.

LIMITI DEL DOSAGGIO

Per scopi diagnostici, i risultati ottenuti con il kit *ZENIT RA PR3* ed il sistema *ZENIT RA Analyzer* devono essere utilizzati unitamente agli altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.

La contaminazione batterica dei campioni e l'inattivazione al calore possono influenzare il risultato del dosaggio.

Gli anticorpi eterofili presenti nei campioni di siero umano possono reagire con i reagenti a base di immunoglobuline, causando interferenze nei dosaggi immunologici in vitro. Questi campioni possono dar luogo a valori anomali se analizzati con il kit *ZENIT RA PR3*.

VALORI ATTESI

Sono stati analizzati i campioni di 99 donatori selezionati casualmente per verificare la presenza di anticorpi IgG anti-PR3.

Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi, con un valore medio di 1.0 UA/mL ed una deviazione standard di 1.239 UA/mL.

Con i risultati ottenuti è stato calcolato il "Limit of Blank" (LoB = il più alto valore che possiamo attenderci in una serie di campioni che non contengono l'analita). Il "Limit of Blank", determinato come 95° percentile della popolazione negativa, è risultato pari a 3.5 UA/mL con il Lotto di reagenti n. 1.

SENSIBILITA' E SPECIFICITA' CLINICA

Sono stati testati con il kit *ZENIT RA PR3* un totale di 333 campioni di cui 50 campioni di pazienti affetti da vasculite primitiva sistemica ANCA-associata diagnosticata come granulomatosi di Wegener (GW), 45 campioni di pazienti affetti da vasculite primitiva sistemica ANCA-associata diagnosticata come poliangeite microscopica (PAM), 109 campioni di pazienti affetti da differenti patologie (14 malattie infiammatorie intestinali croniche, 44 lupus eritematoso sistemico, 7 connettiviti sistemiche, 20 vasculiti non ANCA-associate, 10 artrite reumatoide, 14 patologie infettive), 30 campioni di soggetti normali e 99 campioni di donatori.

Nella popolazione presumibilmente negativa (45 campioni di pazienti con diagnosi PAM, 109 campioni di pazienti affetti da differenti patologie non ANCA-associate, 30 campioni di soggetti normali e 99 campioni di donatori) studiata 9 campioni sono risultati positivi, 8 dubbi e 266 negativi.

- Specificità diagnostica: 94.0 % (266/283)

Dei 17 campioni risultati “non negativi”, 7 appartenevano al gruppo dei pazienti con diagnosi PAM, 9 al gruppo dei pazienti affetti da differenti patologie ed uno al gruppo dei soggetti normali.

Nella popolazione presumibilmente positiva (50 campioni di pazienti con diagnosi GW) studiata 11 campioni sono risultati negativi e 39 positivi.

- Sensibilità diagnostica: 78.0 % (39/50)

Degli 11 campioni risultati “non positivi”: 7 campioni erano risultati positivi al test “gold standard” di immunofluorescenza indiretta con pattern P-ANCA e 4 campioni erano risultati negativi al test “gold standard” di immunofluorescenza indiretta (uno di questi mostrava un pattern “atipico”).

In base ai risultati della specificità e della sensibilità diagnostica, l'**accordo diagnostico è del 91.6 % (305/333)**.

PRESTAZIONI

Avvertenza: i dati presentati non rappresentano le specifiche di funzionamento del kit, ma costituiscono evidenza sperimentale di come il kit funzioni entro tali specifiche nel modo previsto dal produttore.

Precisione e Riproducibilità

La precisione e riproducibilità del kit *ZENIT RA PR3* sono state valutate impiegando un protocollo basato sulle linee guida del documento EP5-A2 del Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

La **precisione** è stata calcolata analizzando i risultati di 20 replicati di cinque sieri (uno negativo e quattro positivi con diverse concentrazioni di anti-PR3 IgG) eseguiti con due diversi lotti di reagenti nella stessa seduta sperimentale.

La concentrazione del siero anti-PR3 IgG negativo (N2) è risultata compresa nell'intervallo da 0.0 a 3.0 UA/mL e da 2.1 a 4.4 UA/mL rispettivamente con il Lotto di reagenti n. 1 e n. 2.

In Tabella si riportano i risultati ottenuti con i 4 sieri positivi.

Campione	Reagenti Lot. no.	Concentrazione media (UA/mL)	SD	CV %
P1	1	23.0	0.80	3.5
	2	28.5	0.86	3.0
P2	1	70.0	1.83	2.6
	2	80.0	1.68	2.1
P3	1	110.2	3.74	3.4
	2	145.8	2.93	2.0
P4	1	386.7	6.64	1.7
	2	434.6	8.78	2.0

La **riproducibilità** è stata calcolata analizzando i risultati della determinazione di cinque sieri (uno negativo e quattro positivi con diverse concentrazioni di anti-PR3 IgG) eseguita in singolo, in 30 sedute diverse, con due diversi lotti di reagenti.

La concentrazione del siero anti-PR3 IgG negativo (N2) è risultata compresa nell'intervallo da 0.0 a 3.8 UA/mL.

In Tabella si riportano i risultati ottenuti con i 4 sieri positivi.

Campione	Concentrazione media (UA/mL)	SD	CV %
P1	24.5	1.56	6.4
P2	71.3	3.09	4.3
P3	124.6	11.05	8.9
P4	391.8	22.87	5.8

Linearità delle Diluizioni

La linearità delle diluizioni del kit *ZENIT RA PR3* è stata valutata impiegando un protocollo basato sulle linee guida del documento EP6-A del Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

Sono state dosate diluizioni scalari di 3 sieri a concentrazione elevata di IgG anti-PR3, eseguite con il Diluente Campioni.

I risultati di questo studio sono riassunti nella seguente tabella.

Campione	Fattore di diluizione	Concentrazione misurata (UA/mL)	Concentrazione attesa (UA/mL)	Recovery %
1	1	377.4	-	(100)
	2	186.7	188.7	98.9
	4	84.7	94.4	89.7
	8	37.0	47.2	78.4
2	1	957.1	-	(100)
	2	493.1	478.6	103.0
	4	256.1	239.3	107.1
	8	131.8	119.6	110.2
	16	71.0	59.8	118.7
3	1	206.9	-	(100)
	2	111.6	103.5	107.8
	4	64.0	51.7	123.8
	8	33.4	25.9	129.0

In ogni caso si rende necessario sottolineare che non tutti i sieri, quando misurati a diluizioni diverse, possono fornire risultati lineari all'interno dell'intervallo di misurabilità essendo il risultato dipendente non solo dalla concentrazione ma anche dall'affinità degli anticorpi presenti nel campione.

Sensibilità Analitica

La sensibilità analitica del kit *ZENIT RA PR3*, espressa come **limite di rilevazione** (*Limit of Detection – LoD*: ossia la più piccola quantità di analita che il metodo è in grado di misurare) è stata valutata utilizzando un protocollo basato sulle linee guida del documento EP17-A del Clinical and Laboratory Standards (CLSI) e la formula per il calcolo $LoD = LoB + C_{\beta} SD_s$ (dove *LoB* rappresenta il valore del “Limit of Blank”, *SD_s* la deviazione standard stimata della distribuzione del campione a bassa concentrazione e *C_β* è derivato dal 95 ° percentile della distribuzione standard gaussiana).

Sono stati utilizzati 4 campioni a bassa concentrazione di analita, determinati in singolo con due differenti Lotti di reagenti in 30 esperimenti diversi.

Il Limite di rilevazione del kit *ZENIT RA PR3* è risultato pari a 7.3 UA/mL.

I valori del limite di rilevazione, unitamente a considerazioni di carattere clinico ed ai risultati di comparazione con metodi di riferimento hanno contribuito alla definizione del valore cut-off.

Specificità Analitica: Interferenze

Uno studio basato sulle linee guida del documento EP7-A2 del CLSI ha dimostrato che le prestazioni del dosaggio non sono influenzate dalla presenza nel campione delle sostanze potenzialmente interferenti elencate nella seguente tabella, sino alla concentrazione sperimentata.

Sostanze Potenzialmente Interferenti	Massima concentrazione sperimentata
Bilirubina libera	20 mg/dL
Bilirubina coniugata	28 mg/dL
Emoglobina	1000 mg/dL
Acidi grassi	3000 mg/dL

L'uso di campioni lipemici, emolizzati o torbidi viene comunque sconsigliato.

Specificità Analitica: Reazioni crociate

Per valutare le potenziali reazioni crociate dell'antigene utilizzato per sensibilizzare le microparticelle, è stato condotto uno studio con 24 campioni, tutti con alti livelli di altri autoanticorpi e negativi per anti-PR3 IgG.

I campioni utilizzati erano così suddivisi: SS-A (2), SS-B (3), U1-snRNP (1), Jo-1 (2), Scl-70 (2), Cenp B (2), Istoni (1), Nucleolari (1), β_2 -GPI/CL IgG (2) e Gliadina/t-TG (3), CCP (1), RF (1), dsDNA (3).

Lo studio non ha mostrato alcuna significativa reazione crociata dell'antigene in fase solida con gli altri autoanticorpi.

Effetto saturazione ad alte dosi

Alcuni metodi immunologici impiegati per la determinazione di campioni contenenti l'analita a concentrazioni estremamente elevate possono fornire livelli apparenti di analita sottostimati (Effetto hook).

Il metodo utilizzato nel kit *ZENIT RA PR3*, essendo un metodo a due incubazioni, non risente di tale effetto.

Un campione con concentrazione estremamente elevata (al di sopra dell'intervallo di misura) di IgG anti-PR3 ha confermato l'assenza di effetto "hook" sino alla concentrazione di 20831 UA/mL.

Sensibilità e Specificità Relative

La presenza di anticorpi anti-PR3 IgG è stata determinata utilizzando il kit *ZENIT RA PR3* ed un metodo di dosaggio ELISA disponibile in commercio in 226 campioni: 50 campioni di pazienti affetti da vasculite primitiva sistemica ANCA-associata diagnosticata come granulomatosi di Wegener 43 campioni di pazienti affetti da vasculite primitiva sistemica ANCA-associata diagnosticata come poliangeite microscopica, 103 campioni di pazienti affetti da differenti patologie (malattie infiammatorie intestinali croniche, lupus eritematoso sistemico, connettiviti sistemiche, vasculiti non ANCA-associate, artrite reumatoide, patologie infettive) e 30 pazienti normali.

4 campioni hanno dato luogo a risultati discordanti tra il dosaggio ZENIT RA ed il dosaggio ELISA disponibile in commercio.

La **concordanza relativa** è risultata pertanto essere pari al 98.2 % (222/226).

La **sensibilità relativa** è risultata pari al 97.8 % (45/46).

La **specificità relativa** è risultata pari al 98.3 % (177/180).

Il campione risultato negativo con il kit *ZENIT RA PR3* e positivo con il kit ELISA apparteneva al gruppo dei campioni con lupus eritematoso sistemico.

I tre campioni risultati positivi con il kit *ZENIT RA PR3* e negativi con il kit ELISA appartenevano: due al gruppo dei campioni con granulomatosi di Wegener ed uno al gruppo dei campioni con poliangeite microscopica.

Siero di riferimento

La quantità di anticorpi anti-PR3 IgG presenti nel campione "PR3-ANCA HUMAN REFERENCE SERUM # 16 (CDC, Cat. No. IS2721, Lot. No. 07-0002) misurata con il kit *ZENIT RA PR3*, dopo opportuna diluizione, è risultata essere di 2282 UA/mL.

BIBLIOGRAFIA

1. Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 97 (Suppl 6) : S12-S13, 1989.
2. Jennette JC, Falk RJ. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases : a review. Am J Kidney Dis 1990; 15 : 517-29.
3. Chen M, Kallenberg CGM. New advantages in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. Clin Exp Rheumatol 2009, 27(s.52): 108-14. Review.
4. Savige J, Gillis D, Benson E, et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. Am J Clin Pathol 1999; 111: 507-13.

5. Sinico RA, Radice A, Pozzi C, et al. Diagnostic significance and antigen specificity of antineutrophil cytoplasmic antibodies in renal disease : a prospective multicentre study. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9 : 505-10.
6. Radice A, Sinico RA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity* 2005;38: 93-103.
7. Vecchi M, Bianchi MB, Sinico RA, Radice A, et al. Antibodies to neutrophil cytoplasm in Italian patients with ulcerative colitis : sensitivity,specificity and recognition of putative antigens. *Digestion* 1994 ; 55: 34-9.
8. Merkel PA, Polisson RP, Chang YC, Skates SJ, et al. Prevalence of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in a Large Inception Cohort of Patients with Connective Tissue Disease. *Ann Int Med* 1997; 126: 866-73.
9. Hagen EC, Daha MR, Andrassy K, Csernok E, et al for the EC/BRC Project for ANCA Assay Standardization. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney Int* 1998; 53: 743-53.
10. Sinico RA, Radice A, Tonutti E, Villalta D, et al per il gruppo FIRMA. Proposta di linee guida per la determinazione degli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA). *Riv Med Lab-JLM* 2002; 3 (4): 20-24.
11. Savige J, Dimech W, Fritzler M, et al for the International Group for Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). Addendum to the International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies: quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 312-18.
12. Jennette JC,Wilkman AS, Falk RJ. Diagnostic predicting value of ANCA serology. *Kidney Int* 1998; 53: 796-8.
13. Schmitt WH, van der Woude FJ. Clinical Applications of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Testing. *Curr Opin Rheumatol* 2004 ; 16(1): 9-17.
14. Sinico RA, Radice A, Corace C, Di Toma L, Sabadini E. Value of a New Automated Fluorescence Immunoassay (ELIA) for PR3 and MPO-ANCA in Monitoring Disease Activity in ANCA-Associated Systemic Vasculitis. *Ann NY Acad Sci* 2005;1050: 185-92.
15. Mandl LA, Solomon DH, Smith EL, Lew RA, Katz JN, Shmerling RH. Using antineutrophil cytoplasmic antibody testing to diagnose vasculitis : can test-ordering guidelines improve diagnostic accuracy ? *Arch Inter Med* 2002; 162:1509-14.

16. Radice A, Sinico RA. La diagnosi clinica e di laboratorio delle malattie autoimmune sistemiche: le vasculiti. In: Il Laboratorio nelle Malattie Reumatiche Autoimmuni, R Tozzoli, N Bizzaro, D Villalta, E Tonutti, Ed. Aesculapio 2007.



TECHNOGENETICS S.r.l.
Viale Casiraghi 471
20099 – Sesto San Giovanni (MI) - Italia

ITALIA

Distribuito da

A. Menarini Diagnostics Srl
Via Lungo L'Ema 7 – 50012 Bagno a Ripoli - Firenze
Tel. 055 56 80 422 - Fax 055 56 80 905
www.menarinidiagnostics.com