

# CHORUS

Prodotto da/  
Manufactured by/  
Fabricado por:

## MPO

**REF** 86068



**REF** 86068/12

DIESSSE Diagnostica Senese  
S.p.A.  
Via delle Rose, 10  
53035 Monteriggioni (Siena)  
Italy

	Capitolo Section Capítulo
Modifiche introdotte nella revisione corrente Changes introduced in the current revision Cambios introducidos en la revisión actual Alterações introduzidas na revisão atual	<b>REF</b> - 5 - 9





## CHORUS MPO

### Per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi anti-MPO

**Solo per uso diagnostico *in vitro***

#### 1. UTILIZZAZIONE

**Metodo immunoenzimatico per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi anti-mieloperossidasi (MPO) nel siero umano con dispositivo monouso applicato agli strumenti Chorus e Chorus TRIO.**

#### 2. INTRODUZIONE

Gli anticorpi anti-MPO appartengono al gruppo degli anticorpi citoplasmatici anti-neutrofili (ANCA) diretti verso componenti citoplasmatici dei granulociti e monociti neutrofilici. La tecnica dell' immunofluorescenza indiretta su neutrofili fissati con etanolo, è stato il metodo comunemente usato per la determinazione degli ANCA. Successivamente diventò chiaro che alcuni ANCA creano un quadro fluorescente citoplasmatico (chiamato cANCA) mentre altri creano un quadro perinucleare (pANCA). Poiché entrambi i quadri possono essere riferiti a numerosi antigeni, l'immunofluorescenza non è idonea per una soddisfacente diagnosi differenziale della vasculite; quindi ogni IFT deve essere verificato con dei test ELISA specifici.

Mentre la proteinasi 3 è l'antigene principale specifico per il cANCA, l'antigene principale per il pANCA è stato identificato nell' MPO ma altri componenti cellulari (e.g. lactoferrina, catepsina G, elastasi) possono causare una colorazione perinucleare.

L'MPO è un enzima dai granuli primari dei neutrofili con un peso molecolare di circa 140 kDa. La sua carica fortemente negativa può essere significativa per la localizzazione di strutture a carica positiva quali la membrana nucleare ed il DNA, responsabile quindi del quadro di colorazione perinucleare degli anticorpi anti-MPO nel siero di pazienti in IFT usando dei neutrofili fissati con l'etanolo.

Gli ANCA sono dei marker importanti nella diagnosi differenziale della vasculite autoimmune. Gli anticorpi anti-MPO sono correlati con la vasculite idiopatica associata alla glomerulonefrite crescentica necrotizzante e si trovano frequentemente nel 70% dei pazienti con poliangeite microscopica e nel 5-50% dei pazienti con la sindrome di Churg-Strauss.

#### 3. PRINCIPIO DEL METODO

Il dispositivo MPO è pronto all'uso per la determinazione degli anticorpi anti-MPO negli strumenti CHORUS. Il test si basa sul principio ELISA. L'antigene, altamente purificato, viene legato

alla fase solida. Le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene in seguito ad incubazione con siero umano diluito.

Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali, altamente specifici per le anti-immunoglobuline umane coniugate con perossidasi di rafano. Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi. Il colore blu che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame.

I dispositivi monouso contengono tutti i reagenti per eseguire il test quando applicati agli strumenti Chorus.

Il kit Chorus MPO viene calibrato in riferimento a sieri forniti dal CDC Atlanta. I risultati sono espressi in Unità Arbitrarie (AU/ml).

#### 4. PRECAUZIONI

##### SOLO PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

**Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HBsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.**

**Smaltimento dei residui: i campioni di siero, i calibratori e le strip usate devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di leggi vigenti.**

##### Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca.
2. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni.
3. Lavare accuratamente le mani una volta inseriti i dispositivi nello strumento Chorus.
4. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
  - a) Il coniugato contiene fenolo
  - b) Il substrato è acido
 Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere decontaminata, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per decontaminare eventuali versamenti accidentali, compresi

guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

### **Avvertenze analitiche**

Prima dell'uso, portare i dispositivi da utilizzare a temperatura ambiente (18-30°C) ed impiegare entro 60 minuti.

1. **Scartare i device con substrato (pozzetto 4) colorato di blu.**
2. Nell'aggiungere il campione al pozzetto verificare che sia perfettamente distribuito sul fondo.
3. Controllare l'effettiva presenza dei reagenti nel dispositivo e la integrità del dispositivo stesso, non utilizzare dispositivi che al controllo visivo presentano mancanza di qualche reagente.
4. I dispositivi devono essere utilizzati insieme allo strumento Chorus, seguendo rigorosamente le Istruzioni per l'Uso e il Manuale Utente dello strumento.
5. Controllare che lo strumento Chorus sia impostato correttamente (vedi Manuale Utente).
6. Non alterare il codice a barre posto sulla impugnatura del device al fine di permetterne la corretta lettura da parte dello strumento.
7. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni.
8. Codici a barre difettosi possono essere inseriti manualmente nello strumento.
9. Non esporre i dispositivi a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e l'uso.
10. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, o campioni che presentano inquinamento microbico.
11. Prima di inserire il dispositivo sullo strumento Chorus accertarsi che il pozzetto di reazione non contenga corpi estranei.
12. Pipettare il siero in esame (50 µl) nel pozzetto 1 del dispositivo (vedi figura).
13. Non utilizzare il dispositivo dopo la data di scadenza
14. **Controllare che lo strumento abbia la connessione con la Washing Buffer Autoimmunity (Ref. 86004)**

### **5. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI**

Il kit è sufficiente per 36 determinazioni (REF 86068).

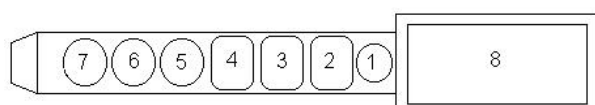
Il kit è sufficiente per 12 determinazioni (REF 86068/12).

#### **DD** DISPOSITIVI

6 confezioni da 6 dispositivi ciascuna (REF 86068).

2 confezioni da 6 dispositivi ciascuna (REF 86068/12).

#### Descrizione:



**Posizione 8:** Spazio disponibile per etichetta con codice a barre

**Posizione 7:** Vuota

**Posizione 6:** POZZETTO DI MICROPIASTRA

Sensibilizzato con mieloperossidasi (MPO) altamente purificata.

**Posizione 5:** POZZETTO DI MICROPIASTRA

Non sensibilizzato.

**Posizione 4:** SUBSTRATO TMB

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL ed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01% stabilizzati in tampone citrato 0.05 mol/L (pH 3.8)

**Posizione 3:** DILUENTE PER I CAMPIONI

Contenuto: Soluzione proteica, contenente Tween-20 0.2% e Proclin 0.1%.

**Posizione 2:** CONIUGATO

Contenuto: anticorpi monoclonali anti-IgG umane marcati con perossidasi, in soluzione tampone fosfato contenente fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%.

**Posizione 1:** POZZETTO VUOTO

Dove l'utilizzatore deve dispensare il siero non diluito.

**Uso: equilibrare una busta a temperatura ambiente**, aprire la busta, prelevare i dispositivi occorrenti; riporre gli altri nella busta contenente il gel di silice, far uscire l'aria e **sigillare** premendo sulla chiusura. Conservare a 2/8°C.

**CALIBRATOR** CALIBRATORE 1 x 0.175 ml

Contenuto: Siero umano diluito contenente anticorpi IgG anti-MPO e conservante. Liquido, pronto all'uso.

**CONTROL +** CONTROLLO POSITIVO 1 x 0.425 ml

Contenuto: Siero umano diluito contenente anticorpi IgG anti-MPO e conservante. Liquido, pronto all'uso.

### **ALTRO MATERIALE RICHiesto, MA NON FORNITO**

- WASHING BUFFER AUTOIMMUNITY (REF) 86004
- CLEANING SOLUTION 2000 (REF) 83609
- SANITIZING SOLUTION (REF) 83604 - 83608
- CHORU NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT (REF) 83607
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente volumi di 50-200 µl.
- Guanti monouso
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti

### **6. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI**

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C. Nel caso di una errata temperatura di conservazione deve essere ripetuta la calibrazione e controllata la correttezza del risultato tramite il siero di controllo (vedi capitolo 9: Validazione del test).

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

## I reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

DISPOSITIVI	8 settimane a 2/8°C
CALIBRATORE	8 settimane a 2/8°C
CONTROLLO POSITIVO	8 settimane a 2/8°C

## 7. TIPO DI CAMPIONI E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C; per periodi di conservazione maggiori, congelare a -20°C. Il campione può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. I Dopo scongelamento agitare con cura il campione prima del dosaggio. L'inattivazione al calore può fornire risultati erronei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erronei.

Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non possono essere utilizzati.

Il test non è applicabile a plasma umano

## 8. PROCEDIMENTO

1. Aprire la busta (lato contenente la chiusura a pressione), prelevare il numero di dispositivi necessario per eseguire gli esami e conservare gli altri richiudendo la busta dopo aver fatto uscire l'aria.
2. Controllare visivamente lo stato del dispositivo secondo le indicazioni riportate nel capitolo 4 Avvertenze Analitiche.
3. Dispensare nel pozzetto n°1 di ciascun dispositivo 50 µl di siero non diluito da analizzare, ad ogni cambio di lotto utilizzare un dispositivo per il calibratore.
4. Introdurre i dispositivi sullo strumento Chorus. Eseguire la calibrazione (se richiesto) ed il test come riportato nel Manuale Utente dello strumento.

## 9. VALIDAZIONE DEL TEST

Utilizzare il siero di controllo positivo per verificare la correttezza del risultato ottenuto, processandolo come indicato nel manuale d'uso dello strumento. Se lo strumento segnala che il siero di controllo ha un valore fuori dal limite di accettabilità occorre effettuare nuovamente la calibrazione. I risultati precedenti verranno corretti automaticamente.

Se il risultato del siero di controllo continua ad essere fuori dall'intervallo di accettabilità, contattare il Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554  
 Fax: 0039 0577 366605  
 email: scientificsupport@diesse.it

## 10. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Lo strumento Chorus fornisce un risultato in unità arbitrarie (AU/ml) calcolate in base ad un grafico lotto-dipendente memorizzato nello strumento.

Il test sul siero in esame può essere interpretato come segue:

POSITIVO quando il risultato è > 18.0 AU/ml

NEGATIVO quando il risultato è < 12.0 AU/ml  
 DUBBIO/EQUIVOCO quando il risultato è compreso fra 12.0 e 18.0 AU/ml

In caso di risultato dubbio ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio, ripetere il prelievo.

## 11. LIMITAZIONI DEL TEST

Tutti i risultati positivi necessitano di una attenta interpretazione.

Il test non può essere utilizzato da solo per una diagnosi clinica. Un risultato negativo non preclude la eventualità di malattia.

Il risultato del test deve essere valutato insieme a dati provenienti dall'anamnesi del paziente e/o da altre indagini diagnostiche.

## 12. RANGE DI CALIBRAZIONE

Range di calibrazione 3.0-100.0 AU/ml.

Per campioni >100.0 AU/ml ripetere il test prediluendo il campione in Negative Control/Sample Diluent (PF83607- non fornito con il kit).

## 13. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

I valori attesi nella popolazione normale, determinati esaminando 120 sieri di donatori sani, erano compresi fra 3.0 e 11.4 AU/ml.

## 14. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 5 campioni (1 Negativo, 1 a Cut-Off e 3 Positivi) ai quali sono stati aggiunti i seguenti interferenti:

Fattore Reumatoide (44 – 220 UI/ml)  
 Bilirubina (4.5 mg/dl – 45 mg/dl)  
 Trigliceridi (10 mg/dl – 250 mg/dl)  
 Emoglobina (5 mg/ml – 30 mg/ml)

La presenza nel siero in esame di sostanze interferenti sopra riportate non altera il risultato del test.

## 15. CROSS-REATTIVI

Campioni, positivi a PR-3, Cardiolipin, Gliadin, AMA-M2, Transglutaminase, SS-A, SS-B, Sm, Scl-70, Cenp-B, Jo-1, U1-70, snRNP, dsDNA IgG e ASCA sono stati testati. Non sono state rilevate reazioni crociate significative.

## 16. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione sono stati analizzati 118 campioni con kit Diesse e con altro kit del commercio.

Di seguito sono schematizzati i dati della sperimentazione:

		Riferimento		
		+	-	Totale
Diesse	+	10	0	10
	-	1	107	108
	Totale	11	107	118

Percent Positive Agreement (~Sensibilità Diagnostica):  
 90.9% CI<sub>95%</sub>: 62.0- 98.3

Percent Negative Agreement: (~Specificità Diagnostica):  
100.0% CI<sub>95%</sub>: 96.5- 100.0

#### 17. PRECISIONE

Campione	All'interno della seduta		Tra sedute	
	Media (AU/ml)	CV%	Media (AU/ml)	CV%
1	7.8	4.9	8.1	7.4
2	13.8	3.6	15.4	9.1
3	14.3	6.5	15.6	7.9
4	14.6	6.1	15.7	8.8
5	16.9	5.4	17.1	5.1
6	18.8	3.4	19.6	4.1
7	24.8	4.5	24.1	3.9
8	28.5	9.3	25.7	5.8

Campione	Tra lotti		Tra strumenti	
	Media (AU/ml)	CV%	Media (AU/ml)	CV%
1	8.4	4.3	8.4	3.1
2	16.0	5.3	16.0	3.4
3	15.3	4.1	15.3	4.3
4	15.3	6.3	15.3	2.7
5	16.4	5.5	16.4	4.3
6	19.2	3.8	19.2	2.4
7	24.0	6.0	24.0	0.4
8	26.6	1.5	26.6	2.1

#### 18. BIBLIOGRAFIA

1. Falk R.J. et al. (1988); N Engl, J Med 318: 1651-1657.
2. Lüdemann J. et al. (1990); J Exp Med 171: 375-362.
3. Goldschemeding R. et al. (1989); J Clin Invest 84: 1577-1587.
4. Gross W.L. Et al. (1993); 5<sup>th</sup> International ANCA Workshop, Cambridge, Clin Exp Immunol 93 (Suppl. 1).

Prodotto da  
**DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.**  
Via delle Rose 10  
53035 Monteriggioni (Siena)  
Italy

