

 SØRLANDET SYKEHUS		Medisinsk serviceklinikk		Prosedyre	
Manuell ANCA (benyttes som reserve for automatisert metode). Enhet for immunologi, ImTra SSK.				Side 1 av 6	
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.3.1-5		Godkjent dato: 11.04.2025	Gyldig til: 11.04.2027	Dato endret: 11.04.2025	Revisjon: 7.00

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/Manuelle analyser

DISTRIBUSJONSliste: EK,

ENDRINGER FRA FORRIGE VERSJON: Lagt inn kommenteringsmåte som skal utføres dersom det er ringt inn forespørsel om ELISA som supplerende metode.

HENSIKT/BAKGRUNN
Benyttes som reserveanalysemetode dersom automatisert metode er nede. Metode for påvisning av antistoff rettet mot PR3-ANCA (serine protease) og/eller MPO-ANCA (myeloperoksidase). PR3-ANCA påvises først og fremst ved granulomatøs polyangiitt (Wegeners granulomatose), MPO-ANCA først og fremst ved andre vaskulitter og glomerulonefritter (ofte alvorlige «med halvmåner»). Det er av diagnostisk og behandlingsmessig stor betydning å kunne påvise ANCA. Analysen kan derfor bestilles som hasteanalyse.

OMFANG
Bioingeniører ved Enhet for immunologi.

AKKREDITERT ANALYSE	TATT I BRUK
Nei	Dato: Analysene har vært utført her siden før 2007.

ANALYSEPRINSIPP
Enzyme ImmunoAssay (EIA). Kvantitativ metode.

LIS (lab-data system)
LIS prosedyre: Unilab 700. Enhet for immunologi. ImTra SSK. Det finnes ingen analysekode i Unilab for back up metoden.

METODENS YTELSE	
Måleområde	Ingen satte grenser, da metoden beregnes ut fra en referanseverdi, og ikke en kalibreringskurve med en nedre og en øvre verdi.
Interferens/ kryssreaksjoner og andre feilkilder	Unngå bruk av sera som er ikteriske, lipemiske eller hemolyserte.
Usikkerhets- vurdering	Ufullstendig eller dårlig vask og utilstrekkelig fjerning av væske kan medføre dårlig presisjon og eller høy bakgrunn. Mange faktorer ved analyseringen kan gi usikkert svar: Starttemperatur til analyse kit og pasientprøver, nøyaktighet og reproduserbarhet av pipetteringsteknikk, vasking og fjerning av væske fra brønner, inkubasjonstid under utførelse og kvaliteten på fotometer. Ufullstendig forsegling av Zip- lokk til mikrobrønner posen kan føre til uttørking, degradering av antigen i brønner og dårlig presisjon. Kontaminasjon av HRP konjugat kan forårsake degradering.

PRØVEMATERIALE	
Prøvemateriale	Avpipettert serum.
Prøvemengde	5 µL til en 1:101 fortykning.
Prøvebehandling	Oppbevares ved 2-8 °C i opptil 7 dager. Kan fryses i -20 °C fryser om prøvene vil bli eldre enn 7 dager før analysering.

Dokumentet skal verifiseres av medisinsk ansvarlig overlege.

DokumentID: D08092

Utarbeidet av: Kristine T. Berget Enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget Enhetsleder	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Verifisert av: 28.03.2025 - Avd. overlege Christine T. Steinsvåg, 19.03.2025 - Kvalitetskoordinator Kari - Ann Nedal
--	---	--	--

 SØRLANDET SYKEHUS	Manuell ANCA (benyttes som reserve for automatisert metode). Enhet for immunologi, ImTra SSK.				Side: 2 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.3.1-5	Utarbeidet av: Kristine T. Berget Enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget Enhetsleder	Godkjent dato: 11.04.2025	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 7.00

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/Manuelle analyser

	Serum som har vært frosset og tint mer enn en gang, kan ikke benyttes til analysing. Referanse: <i>Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004. Ed. A Milford Ward, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14</i>
--	---

REAGENSER	
Leverandør	EIA kit QUANTA LITE – PR3 og MPO er produsert av Inova og leveres av Mediq. Se oversikt over reagenser: O:\Medisinsk serviceklinikk\Avdeling for IMM-TRA SSK\ImTra\A immunologi\Innkjøp av reagens\Plan for innkjøp av reagens fordelt på leverandører.xlsx
Reagenser	Mikrotiterplatebrønner dekket med rensset PR3- eller MPO-antigen. Vaskebuffer: må fortynnes. Fortynningsbuffer: Sample diluent-klar til bruk. Konjugat: HRP conjugate (Horse Raddish Peroxide), anti-human IgG fra geit. Klar til bruk. Substrat: TMB-Chromogen, klar til bruk. Stoppløsning: 0,344 M H ₂ SO ₄ , klar til bruk. Kalibrator: Lav positiv kontroll med verdi 25 enh. Brukes til kalibrator. Klar til bruk. Kontroller: Høy (high) positiv og negativ. Klare til bruk i kitet.
Mottak av reagens	Følg enhetens rutiner Bestilling og mottak av reagenser, engangsutstyr og kritiske materialer, ImTra SSK.
Pakningsvedlegg	Ved ny lot skal papirversjon av pakningsvedlegget som følger med i kitet sammenliknes med tidligere versjon som står i perm på stillerommet. Ved ny versjon gis beskjed til enhetsleder/fagbioingeniør for videre oppfølging. Det kontrolleres ellers en gang i året at vi følger siste versjon av pakningsvedlegg. Loggføring av versjoner på pakningsvedlegg i bruk. Enhet for Immunologi. ImTra SSK.
Oppbevaring	Oppbevares på kjølerom 2017AN (2-8 °C) Enhet for immunologi.
Tillaging (med holdbarhet)	Vaskebuffer: Konsentrat i kitet, må fortynnes 1:40 før bruk. Ca. 2,0 mL konsentrat + 78 mL dest.vann til 16 brønner. Fortynnet vaskeløsning er holdbar i en uke ved 2-8 °C. Brukes også til A-M2 og A-f-aktin oppsettet.
Forholdsregler	Alle prøver, biologiske reagenser og materialer som brukes i analysen må betraktes som mulig smittefarlige stoffer. Bruk hansker. Unngå kontakt med hud, øyne eller slimhinner. Noen reagenser i dette kitet inneholder natriumazid. Natriumazid kan reagere med bly- eller kopperrør og danne svært eksplosive metallazider. Ved nedskylling må det skylles godt med med for å forebygge oppbygging av azid. HRP konjugat inneholder kjemikalier som kan forårsake brannskader. Unngå kontakt med hud og øye. TMP kromogen inneholder irriterende stoff som kan være skadelig ved inhalasjon, svelging og kontakt med hud og øye. HRP stoppløsning inneholder fortynnet svovelsyre og kan reagere med base, metall og andre komponenter. Den er etsende og giftig. Unngå kontakt med hud og øye for å hindre kjemisk brannskade. Bruk hansker når du jobber med reagensene.

UTSTYR OG KALIBRERING	
	Hamilton diluter benyttes for fortynning av prøver. Denne kalibreres iht. prosedyre Kontroll av Hamilton diluter, Enhet for immunologi, ImTra SSK. Presisjonspipetter som følger gjeldende kalibreringsprosedyrer.

 SØRLANDET SYKEHUS		Manuell ANCA (benyttes som reserve for automatisert metode). Enhet for immunologi, ImTra SSK.			Side: 3 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.3.1-5	Utarbeidet av: Kristine T. Berget Enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget Enhetsleder	Godkjent dato: 11.04.2025	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 7.00

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/Manuelle analyser

	Plate og lokk til mikrotiterplate, fortynningsrør, veieskip, engangshansker, cellostøff, mikroplateavleser med filter, 405/620 nm.
Rutine ved lotskifte	Kontroll fra kit benyttes til å vurdere ev. nivåendring. Dersom det er utført vurderinger er dette beskrevet i Excel-dokument (se avsnittet «vurdering av kontroller»).

KVALITETSKONTROLL	
Kontrollmateriale	Positiv og negativ kontroll som hører med kittet, benyttes. Positive NEQAS prøver, en for MPO og en for PR3, med «fasitsvar» fra rapport benyttes som internkontroll og som oppfølging med SLP. Kontrollene settes opp og vurderes ved hvert oppsett.
Rutine ved lotskifte	Positiv og negativ kontroll fra siste lot som var i bruk, settes opp med ny lot. Endringer i nivå vurderes ut ifra erfart CV % og 2,5 SD.

FORBEREDELSE	
	Alle reagenser skal ha romtemperatur før bruk. La reagensene stå framme på benk i 20-30 minutter.
Lag arbeidsliste:	Fyll ut en manuell arbeidsliste .
Fortynn pasientprøver:	Lag utgangsfortynning av pasientserum 1: 101 med Sample Diluent. Bruk Hamilton diluter, Program 1:101 INOVA. Hamilton Diluter. Enhet for immunologi, ImTra SSK.

UTFØRELSE	
1. Regn ut hvor mange brønner som trengs for oppsettet. Sett brønnene klare i et mikrotiterplate-brett. Ubrukte brønner må ikke bli utsatt for fuktighet. Sett dem tilbake i posen så fort som mulig. 2. Tilsett 100 µL kontroller og fortynnet pasientserum til brønnene. Lav positiv kontroll i duplikat, 1A og 1B. Høy positiv 1C, negativ kontroll 1D og pasientprøve fra 1E osv. Sett en intern kontrollprøve (tidligere kjent SLP) i den siste posisjonen i oppsettet. 3. Dekk platen med lokk og la den inkubere i romtemperatur i 30 min. 4. Tøm brønnene ved å gripe fast i kanten av brettet, snu platen over vasken og hell ut væske. Vask brønnene 3 ganger med 200-300 µL fortynnet vaskebuffer. Bruk multikanalpipette. Etter siste vask, snu platen opp ned på absorbent papir for å fjerne resterende vaskebuffer fra brønnene. 5. Tilsett straks 100 µL konjugat til brønnene. Det er viktig at brønnene ikke rekker å tørke. Dekk med lokk og inkuber 30 min. i romtemperatur. 6. Tøm og vask som før. 7. Tilsett straks 100 µL substrat til brønnene. Det er viktig at brønnene ikke rekker å tørke. Dekk med lokk og inkuber mørkt (i skuff) 30 min. i romtemperatur. 8. Tilsett 100 µL stoppløsning til hver brønn. 9. Bank forsiktig i kantene av platen for å blande innholdet i brønnene. Fjern eventuelle luftbobler. Avles OD verdier på spektrofotometeret innen 1 time. Det skal ligge et eget program for INOVA-analyser der utregninger blir utført.	

VURDERING AV ANALYSERESULTATER	
Vurdering av kontroller	Kontroller kurveutskriften: OD høy positiv kontroll må være > OD lav positiv kontroll > negativ kontroll. OD høy positiv kontroll må være > 1,0 OD negativ kontroll må være < 0,2

 SØRLANDET SYKEHUS	Manuell ANCA (benyttes som reserve for automatisert metode). Enhet for immunologi, ImTra SSK.				Side: 4 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.3.1-5	Utarbeidet av: Kristine T. Berget Enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget Enhetsleder	Godkjent dato: 11.04.2025	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 7.00

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/Manuelle analyser

	OD lav positiv kontroll må enten være > 2 x OD negativ kontroll, eller ha en verdi > 0,25. Kontroller loggføres i Excel: O:\Medisinsk serviceklinikk\Avdeling for IMM-TRA SSK\ImTra\A immunologi\Kontrollovervåking\EIA\ANCA EIA\loggark for ktr. overvåking.xlsx All kontrollvirksomhet kontrolleres ved hvert oppsett før frigivning av prøvesvar. Ved avvik: Kontakt leder/fagbioingeniør og overlever utfylt skjema. Skjema for oppfølging av kvalitetskontroller. Enhet for immunologi, ImTra SSK.
Vurdering av prøvesvar	Svarene beregnes automatisk og finnes på utskriften sammen med OD verdien. Beregning av svar: Resultat pasientprøve (enh.) = $\frac{\text{Prøve OD} \times 25 \text{ (enh.)}}{\text{Lav pos. OD}}$ lav positiv).
Spesielle vurderinger	Prøver funnet positive på både PR3- og MPO-ANCA må vurderes sendt til henvisningslaboratorium (OUS) for kontroll av resultatene, i alle fall om vi ikke får utført analysene med vår automatiserte metode. Vurdering i samråd med lege. Det er < 10 % av pasienter som har både PR3- og MPO-ANCA. Rutiner for sending av prøver til henvisningslaboratorium står beskrevet i prosedyren: Behandling av prøver etter analysering: Arkivering, videresending og innlegging av svarkopier. Enhet for immunologi, ImTra SSK. Skriv inn i intern kommentarfeltet i Unilab at prøven er sendt til OUS.

SVARRAPPORTERING	
Referanseområde	0 - 20 enh. negativ 21-30 enh. svakt positiv > 30 enh. moderat/sterkt positiv.
Benevning	Enhet
Antall desimaler	0
Registrering	Resultater registreres i Unilab som kommentar til ANCA analysene på Bioplex. PR3 og MPO: Velg «se bemerkning» i svarfeltet. Eks. på kommentar: «Foreløpig svar: Negativ (2 enh., referanseområde: <21 enh.) Reserveløsning med Elisa metode (ikke akkreditert) er benyttet, da instrument for rutinemetode for øyeblikket er ute av drift. Oppdatert svar følger. Telefon svar gitt dato kl....» Enkeltilfeller der det er ringt inn forespørsel om PR3 og MPO på supplerende metode: Velg «se bemerkning» i svarfeltet. Eks. på kommentar: «Oppdatert kommentar xx.xx.xx (Trenges ikke om rekvisisjonene ikke er arkivert): Prøven er satt opp med alternativ (ikke-akkreditert) ELISA-metode med følgende resultat: Negativ (2 enh., referanseområde: <21 enh.) GBM (når IIF er benyttet som backup): Se Antistoff mot anti-GBM, IIF metode (benyttes til å bekrefte positive funn og som reserve for automatisert metode). Enhet for immunologi, ImTra SSK. ImTra SSK. Negative resultater kan frigis av bioingeniør, med en beskjed til lege om at backup-analyse er benyttet og svart ut. Konferer lege ved positive resultater før teknisk validering. Skriv ut arbeidslisten til Bioplex og lag en oversikt over prøver som det er lagt inn kommentar om manuelt utført analyse på.

 SØRLANDET SYKEHUS	Manuell ANCA (benyttes som reserve for automatisert metode). Enhet for immunologi, ImTra SSK.				Side: 5 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.3.1-5	Utarbeidet av: Kristine T. Berget Enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget Enhetsleder	Godkjent dato: 11.04.2025	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 7.00

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/Manuelle analyser

	Når Bioplex er i gang igjen, må «se bemerkning/ikke utført» slettes, og oppdatert svar må gis ut. Se prosedyre: Korrigerings av resultater og kommentarer i Unilab LV SSHF. Dette blir ikke egentlig et korrigerert resultat, men en oppdatering. Følgende kommentar benyttes (istedenfor RETTERES): «Oppdatert svar, erstatter foreløpig svar med reservemetode sendt (dato).» Oppdatert svar på negative resultater kan frigis av bioingeniør. Konferer lege ved positive resultater og ved eventuell diskrepans mellom metodene før oppdatert svar sendes ut. ANCA bestilt som hasteanalyse skal det ringes svar på med en gang det foreligger, om ikke annet er avtalt. Gi da beskjed om at dette er midlertidig svar i påvente av at automatisert metode kommer i drift. Loggfør i Unilab når svar ble gitt på telefon, hvem som tok imot beskjeden og signatur. Ringe- og varslingsgrenser, ImTra SSHF
Teknisk validering	Sjekk om dagens prøvesvar er plausible sammenliknet med tidligere resultat, der det finnes. Vurder tidsrommet mellom resultatene og om det kan være plausible forklaringer på nivåendringen (kliniske opplysninger?) Ved tvil konsulter enhetsleder/ fagbioingeniør/ lege. Gå igjennom kommentarene i samråd med lege før teknisk frigjøring. Arbeidsark og spektrofotometer-utskrift arkiveres i ringperm på stillerommet.
Medisinsk validering	Alle kommentarer til analysesvar skal valideres av lege ved ImTra før de frigis til rekvirentene. Ved fravær av lege kan spesielt opplærte bioingeniører ved Enhet for immunologi frigi resultatene i påvente av medisinsk validering. Rutiner er beskrevet i Medisinsk validering og frigivning av immunologi-resultater i Unilab. ImTra SSK.

OPPBEVARING AV PRØVEMATERIALE ETTER ANALYSERING

Alle prøver skal arkiveres i kjølerom i en uke.

Pasientprøver med positivt utslag skal arkiveres i fryser i -20 °C på Enhet for immunologi.

AVFALLSHÅNDTERING

Forbruksmateriell som har lite blodsøl/en dråpe, kastes i vanlig søppel. Prøverør med ID kastes i gul dunk. Glass/plast med kroppsvæsker skal kastes som risikoavfall. All plast skal kastes i plastavfall. Blå plastbeholder til alt papir som inneholder pasientdata, ellers alt annet papir i grønn beholder. Ved behandling av prøver og reagenser som er i kontakt med prøver, skal hansker benyttes for å unngå ev. smitte. Ved behov; se Stoffkartoteket.

Vedlegg:

Kryssreferanser:

[II.MSK.FEL.LAB
FEL.LAB DATA.4-4](#)

[II.MSK.FEL.LAB
FEL.IMTRA FEL-10
II.MSK.ImTra.2.a.3-1](#)

[II.MSK.ImTra.2.g.3.1-4](#)

[II.MSK.ImTra.2.g.3.3-2](#)

[II.MSK.ImTra.2.g.3.3-3](#)

[Korrigerings av resultater og kommentarer i Unilab LV SSHF](#)

[Ringe- og varslingsgrenser, ImTra SSHF](#)

[Bestilling og mottak av reagenser, engangsutstyr og kritiske materialer, ImTra SSK.](#)

[Antistoff mot anti-GBM, IIF metode \(benyttes til å bekrefte positive funn og som reserve for automatisert metode\). Enhet for immunologi, ImTra SSK.](#)

[Hamilton Diluter. Enhet for immunologi, ImTra SSK.](#)

[Kontroll av Hamilton diluter, Enhet for immunologi, ImTra SSK.](#)

 SØRLANDET SYKEHUS	Manuell ANCA (benyttes som reserve for automatisert metode). Enhet for immunologi, ImTra SSK.				Side: 6 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.3.1-5	Utarbeidet av: Kristine T. Berget Enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget Enhetsleder	Godkjent dato: 11.04.2025	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 7.00

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/Manuelle analyser

[II.MSK.ImTra.2.g.4-1](#)

[Behandling av prøver etter analysering: Arkivering, videresending og innlegging av svarkopier. Enhet for immunologi, ImTra SSK.](#)

[II.MSK.ImTra.2.g.4-4](#)

[Medisinsk validering og frigivning av immunologi-resultater i Unilab. ImTra SSK.](#)

[II.MSK.ImTra.2.g.4-5](#)

[LIS prosedyre: Unilab 700. Enhet for immunologi, ImTra SSK.](#)

[II.MSK.ImTra.2.g.4-](#)

[Loggføring av versjoner på pakningsvedlegg i bruk. Enhet for Immunologi, ImTra SSK.](#)

[13](#)

[II.MSK.ImTra.2.g.5.6-](#)

[Verifisering av BioPlex 2200 og tilhørende analyser. Enhet for Immunologi, ImTra SSK.](#)

[2](#)

[II.MSK.ImTra.2.g.7.1-](#)

[Tillaging av interne kontroller, Enhet for immunologi, ImTra SSK.](#)

[3](#)

[II.MSK.ImTra.2.g.7.1-](#)

[Skjema for oppfølging av kvalitetskontroller. Enhet for immunologi, ImTra SSK.](#)

[5](#)

Eksterne referanser:

Pakningsvedlegg i kitet