

ANTI-NEUTROPHIL CYTOPLASMIC ANTIBODY (ANCA) TEST SYSTEM

[IVD] for In Vitro Diagnostic Use

PRODUCT INSERT

[REF] 1116 ANCA Kit (ethanol) 24 Determinations

[REF] 1140 ANCA Kit (ethanol) 48 Determinations

[REF] 1140-2 ANCA Kit (ethanol) 96 Determinations

[REF] 1140-240 ANCA Kit (ethanol) 240 determinations

[REF] 1141 ANCA Kit (formalin) 48 determinations

[REF] 1142 ANCA Kit (ethanol+formalin) 48 determinations

An indirect immunofluorescence antibody test for the detection and semi-quantitation of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in human serum. ANCA are found in the sera of patients with necrotizing vasculitides and hence, serve as an aid to the clinical and other laboratory findings in the diagnosis of these disorders.

SUMMARY AND EXPLANATION

ANCA occur in patients with Wegener's granulomatosis, microscopic polyarteritis, necrotizing or crescentic glomerulonephritis, other vasculitides and inflammatory bowel disorders (primarily ulcerative colitis)¹⁻¹¹. Indirect immunofluorescence staining of ethanol fixed neutrophils may exhibit different types of fluorescent staining patterns. These include:

1. Autoantibodies against cytoplasmic antigens of neutrophils giving a diffuse cytoplasmic staining (cANCA).
2. Autoantibodies against neutrophil antigens giving a perinuclear reaction pattern (pANCA).
3. Common antibodies against nuclear antigens (ANA).

The significance of these two types of ANCA differs¹². cANCA are found primarily in patients with Wegener's granulomatosis and microscopic polyarteritis, whereas pANCA occurs in various vasculitic disorders, ulcerative colitis (UC) and primary sclerosing cholangitis (PSC). Eighty percent of patients in whom pANCA are found have histologic evidence of vasculitis, UC or PSC. ANCA occur in more than 90% of patients with active generalized Wegener's granulomatosis and in 67% of patients with active limited disease. The incidence of ANCA varies in patients with clinical remission. Patients with active Wegener's granulomatosis may occasionally be ANCA negative.

However, in such cases, repeat testing should yield positive ANCA reactions¹. The indirect immunofluorescence microscope method is considered to be the gold standard for detecting ANCA. Antigen fixation of PMN is usually performed in ethanol. When fixed in ethanol, two types of ANCA staining reaction patterns have been identified: cytoplasmic (cANCA) and perinuclear (pANCA). The pANCA reactions can be confirmed by repeat testing on formalin fixed slides where pANCA reactions convert to cANCA whereas ANA reactions either remain nuclear or become negative on formalin fixation.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

In the indirect immunofluorescence method used in this kit, patients' sera are incubated on optimized preparations of human neutrophils to allow binding of antibodies to the substrate. Any antibodies not bound are removed by rinsing the slide. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled, anti-human IgG conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of ANCA is demonstrated by an apple green fluorescence either of the cytoplasm with a diffuse granular cytoplasmic staining (cANCA) or a perinuclear staining (pANCA). The titer (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) is then determined by testing serial dilutions¹³.

PRODUCT INFORMATION

Storage and preparation

Store all reagents at 2-8°C. Reagents are ready for use after equilibration to room temperature.

Materials provided

[REF]	1116	ANCA Kit (ethanol) 24 Determinations
[REF]	1140	ANCA Kit (ethanol) 48 Determinations
[REF]	1140-2	ANCA Kit (ethanol) 96 Determinations
[REF]	1140-240	ANCA Kit (ethanol) 240 Determinations
[REF]	1141	ANCA Kit (formalin) 48 Determinations
[REF]	1142	ANCA Kit (ethanol+formalin) 48 Determinations


4 x	[SORB][SLD][6]	6-well Human Neutrophil Substrate Slides [ethanol fixed] ([REF] 1116), 8 slides ([REF] 1140), 16 slides ([REF] 1140-2)
20 x	[SORB][SLD][12]	12-well Human Neutrophil Substrate Slides [ethanol fixed] ([REF] 1140-240)


EN		
8 x	[SORB SLD 6]	6-well Human Neutrophil Substrate Slides [formalin fixed], ([REF]1141)
8 x	[SORB SLD 6+6]	12-well Human Neutrophil Substrate Slides [6 ethanol/6 formalin] ([REF]1142)
1 x 0.5 ml	[CONTROL + ANCA]	cANCA Positive Control, contains human serum ([REF] 1140, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240, 1141)
1 x 0.5 ml	[CONTROL + pANCA]	pANCA Positive Control, contains human serum ([REF] 1141, 1142)
1 x 0.5 ml	[CONTROL -]	Negative Control, contains human serum ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240)
1 x 5.0 ml	[IgG-CONJ FITC EB]	Anti-human IgG FITC Conjugate with Evan's Blue. Protect from light ([REF] 1116, 1140, 1141, 1142) 2 vials ([REF] 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 60 ml	[BUF]*	Buffered Diluent, contains BSA (1116, 1140-2, 1140, 1141, 1142) 2 vials (1140-240)
2 vials	[BUF WASH]	Phosphate Buffered Saline (PBS), Dissolve each vial to 1 liter. ([REF] 1116, 1140-2, 1140, 1141, 1142) 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 5.0 ml	[MOUNTING MEDIUM]	Mounting Medium. Do not freeze ([REF] 1116, 1140, 1141, 1142) 2 vials ([REF] 1140-2) 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 12	[COVER SLD]	Coverslips ([REF] 1116, 1140, 1141, 1142) 2x12 ([REF] 1140-2) 3x12 ([REF] 1140-240)

Optional materials available from Immco

	[REF]
6 well Human Neutrophil Substrate Slide (ethanol fixed)	2162
6 well Human Neutrophil Substrate Slide (formalin fixed)	2186
6 + 6 well Ethanol+Formalin Human Neutrophil Substrate Slide (ethanol & formalin fixed)	2189
12 well Human Neutrophil Substrate Slide (ethanol fixed)	2162-12
1 x 0.5 ml cANCA Positive Control, contains human serum with BSA	2252
1 x 0.5 ml pANCA Positive Control, contains human serum with BSA	2240
1 x 5.0 ml Anti-human IgG FITC Conjugate, contains BSA.	2100X
1 x 1.0 ml Evan's Blue Counterstain	2510*

Symbols used on labels:

[LOT]	Lot number
[REF]	Catalog number
[IVD]	In vitro diagnostic use
e	Use by
t	Storage temperature
I	Consult instructions for use
S	Number of tests
M	Manufacturer
	Date of Manufacture

 *Danger. May cause cancer. Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection. Store locked up. Dispose of contents/container to comply with local, state and federal regulations.

Material required but not provided

- Fluorescence microscope
- Micropipette or Pasteur pipette
- Serological pipettes
- Staining dish (e.g. Coplin jar)
- Small test tubes (e.g. 13 x 75 mm) and test tube rack

EN

- Distilled or deionized water 1 liter container
- Wash bottle
- Paper towels
- Incubation chamber

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* Diagnostic Use. 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. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁴.

WARNING – Sodium azide (NaN₃) 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 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. Do not use beyond expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Test Method

A. Screening

1. Dilute each patient serum 1:20 with the Buffered Diluent provided (50 µl serum + 1.0 ml Diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for 10-15 minutes. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Invert dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl) of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of Positive Control to well #2. Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur Pipette, apply 1 drop of patient's diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 30 minutes at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately 10 ml PBS using a pipette, or rinse slide in beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash 10 minutes. Repeat process with all remaining slides.
8. Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the Conjugate dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl) to each well.
9. Repeat steps **7 and 8** for each slide.
10. Replace the lid on the incubation chamber. Incubate 30 minutes at room temperature.
11. Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for 10 minutes. If desired, 2-3 drops of Evan's Blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
12. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.**
13. Mount the coverslip by applying **1 drop** of Mounting Medium gently onto each well and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.
14. Repeat steps 12 and 13 for each slide.
15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.

Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed for up to 48 hours. Slides should be stored in the dark at 2-8°C.

B. End point Determination (titration)

A serum positive in the screening test may be further tested following steps 5 through 13 to determine the titer. Each test run should include the Positive and Negative Controls. Make serial two-fold dilutions starting at 1:20. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

Preparation of Serial Dilutions

Number four tubes 1 through 4. Add 1.0 ml of Buffered Diluent to tube 1 and 0.2 ml to tubes 2 through 4. Pipette 0.05 ml of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer 0.2 ml from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring 0.2 ml from one tube to the next after mixing to yield the dilutions depicted in the following table:

Tubes	1	2	3	4
Serum	0.05 ml			
	+			
Buffered Diluent	1.0 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		⇌	⇌	⇌
Transfer	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	
Final Dilution	1:20	1:40	1:80	1:160 etc.

QUALITY CONTROL

Both a Positive and Negative Control should be included with each test run. The Negative Control should show no specific fluorescence of the neutrophil, whereas the Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of the cytoplasm of the neutrophil with cANCA positive control and perinuclear with pANCA positive control on ethanol fixed slides. On formalin fixed slides, the cANCA Positive Control remains cytoplasmic whereas pANCA reaction will become cytoplasmic.

If expected results are not obtained, the run should be repeated. If inadequate results continue to occur with the controls, these may be due to:

- Turbidity. Discard and use another control
- Problems with the optical system of the fluorescence microscope. These may include: improper alignment, bulb beyond useful life expectancy, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.

INTERPRETATION OF RESULTS

The results of the tests for ANCA should be reported as negative (<20), positive greater or equal to 160, or preferably, positive with titer and pattern. Read for specific diffuse, granular cytoplasmic staining (cANCA) or perinuclear staining (pANCA). Other detectable antibodies include antinuclear antibodies (ANA), which sometimes may mimic pANCA reactions. ANCA patterns on ethanol and formalin fixed slides are presented at the end of the document.

LIMITATION OF THE PROCEDURE

In some cases, sera positive for ANCA may either be very weak or negative at the initial screening dilution (prozone phenomenon).

In such doubtful cases the sera should be screened at higher dilutions and, if positive, antibody titers determined.

In some cases the presence of two or more antibodies in a serum which are reactive with the same substrate may cause an interference in their detection by immunofluorescence. This interference may cause either failure to detect ANCA or suppression of its titer if the interfering antibody has a higher titer than ANCA. The most common cause of the interference phenomenon in ANCA tests is the coexistence of ANA.

In some patients with Wegener's granulomatosis, ANCA tests may be negative. In such cases repeat testing may yield positive results. Patients with Wegener's granulomatosis on treatment invariably are negative for ANCA. ANA reactions may sometimes be confused with or mimic pANCA staining. To confirm pANCA reactivity, sera providing pANCA reactions should be retested either on formalin fixed slides or for ANA on HEP-2 slides. pANCA specimens on formalin fixed ANCA substrate should give cANCA reactivity, whereas reactions to ANA should be either negative or remain nuclear. Anti-cytokeratin antibodies may result in false positive cANCA reaction¹⁵.

In such cases, indirect IF tests on HEP-2 cells may help in distinguishing pseudo-ANCA from true cANCA reaction.

The antibody titers do not necessarily associate with disease activity. The results of the ANCA test should be evaluated in light of clinical findings as the presence or absence of ANCA may not be directly associated with a vasculitis disorder.

The positive ANCA results obtained by immunofluorescence should be confirmed by ELISA. ANCA of certain antigen specificities are more indicative of a specific vasculitic disorder. Also, ANCA have been associated with immunological disturbances other than vasculitis disorders such as ulcerative colitis^{7, 8}.

EXPECTED VALUES

Sixty-four (64) normal samples were tested for ANCA. All samples were negative for ANCA at 1:20 dilution.

A positive ANCA in the appropriate clinical setting is useful in the diagnosis of systemic vasculitides and inflammatory bowel disorders⁷⁻¹¹. cANCA staining occurs most commonly in Wegener's granulomatosis and pANCA staining in microscopic polyangitis,

EN

pauci-immune crescentic glomerulonephritis and ulcerative colitis⁷⁻¹¹. In other vasculitides (polyarteritis nodosa, takayasu disease, giant cell arteritis, Behcet's disease) ANCA are rare or absent. The incidence of ANCA in Wegener's granulomatosis and other vasculitides as abstracted from literature is summarized in Table 1, at the end of the document. In the European ANCA collaborative assay standardization project, Hagan and his collaborators¹⁶ evaluated the usefulness of the indirect IF test towards the diagnosis of idiopathic system vasculitides. In this study, ANCA was found to be present in 85% of patients with Wegener's granulomatosis, of these, 64% were positive for cANCA and 21% for pANCA. The pANCA was more prevalent than cANCA in microscoping polyangitis (58% vs 23%) with sensitivity of 81% for microscoping polyangitis and 82% for idiopathic rapidly progressive glomerulonephritis.

Of the disease and healthy controls, ANCA was present in 19% and 6% respectively, thus providing a specificity of 76% in disease controls and 94% in healthy individuals. (Table 2, at the end of the document). However, the positive predictive value of the ANCA tests is much better and more significant if evaluated in conjunction with clinical signs and symptoms. In an editorial, Jennette Wilmant and Falk¹⁷ reported a positive predictive value of 92% in a patient with serum creatinine >3 mg/dl. Similarly, in patients in which the initial positive predictive value is low, a positive ANCA result increases the likelihood of a disease to a level that may warrant further evaluation. The authors conclude that ANCA testing in patients with strong clinical evidence for pauci-immune crescentic glomerulonephritis is most useful for substantiating the diagnosis whereas ANCA testing in patients with weak clinical evidence is most useful for ruling out the diagnosis.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody (ANCA) Test was compared with another indirect immunofluorescence ANCA test. The comparison included a total of 129 serum samples obtained from a diagnostic reference laboratory specializing in the detection of autoimmune diseases. These samples were tested according to the procedures recommended by the manufacturers. The results are as follows:

		Immco™		Total
		Positive	Negative	
Other	Positive	49	0	49
	Negative	7	73	80
	Total	56	73	129

Relative Specificity: 91 %
Relative Sensitivity: 100%
Relative Agreement: 95%

Seven discrepant samples observed by indirect immunofluorescence method above were tested by ELISA for antibodies to myeloperoxidase (MPO) or proteinase 3 (PR3) antigens, the two major antigens associated with ANCA. Of the seven positives on ELISA and negative on the other test kit, all but one tested positive by ELISA, suggesting thereby, the true positivity of these samples.

Cross Reactivity:

Antinuclear antibodies (ANA) may exhibit positive reactions on neutrophils. To determine reactivities on neutrophils of ANA, which may be confused for ANCA reactivity, we tested a total of 25 ANA positive samples of varying antibody specificities on ethanol, formalin and COMVI slides. All ANA positive sera with the exception of SS-A (Ro) and SS-B (La) antibody specificities, showed nuclear reactions. These ANA reactions either remain nuclear or become negative on formalin fixed slides.

Reproducibility

Studies were performed to demonstrate intra and inter-assay variability. Four ANCA positive (two each of c and p ANCA) and one ANCA negative sera were tested starting at a 1:20 dilution to endpoint. They were tested on 3 different lots each of ethanol, formalin and COMVI slides for four days to determine intra as well as inter-reproducibility. Negative samples remained negative and positive samples provided the expected titer.

ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ (ANCA)

[IVD] Για in vitro διαγνωστική χρήση

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

[REF]	1116 Kit ANCA (αιθανόλη) 24 Προσδιορισμοί
[REF]	1140 Kit ANCA (αιθανόλη) 48 Προσδιορισμοί
[REF]	1140-2 Kit ANCA (αιθανόλη) 96 Προσδιορισμοί
[REF]	1140-240 Kit ANCA (αιθανόλη) 250 Προσδιορισμοί
[REF]	1141 Kit ANCA (φορμόλη) 48 Προσδιορισμοί
[REF]	1142 Kit ANCA (αιθανόλη + φορμόλη) 48 Προσδιορισμοί

Ανάλυση αντισωμάτων έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων κατά του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων (ANCA) σε ορό ανθρώπου. Τα ANCA εμφανίζονται στον ορό ασθενών με νεκρωτική αγγειίτιδα και επομένως, υποβοηθούν σε συνδυασμό με τα κλινικά και άλλα εργαστηριακά ευρήματα στη διάγνωση αυτών των διαταραχών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα ANCA εμφανίζονται σε ασθενείς με κοκκιωμάτωση Wegener, μικροσκοπική πολυαρθρίτιδα, με νεκρωτική ή ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα, με άλλες αγγειίτιδες και φλεγμονώδεις νόσους του έντερου (κυρίως με ελκώδη κολίτιδα)¹⁻¹¹. Η χρώση έμμεσου ανοσοφθορισμού των ουδετερόφιλων που έχουν μονιμοποιηθεί με αιθανόλη ενδέχεται να εμφανίσει διαφορετικούς τύπους προτύπων χρώσης φθορισμού. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται:

1. Αυτοαντισώματα κατά των κυτταροπλασματικών αντιγόνων των ουδετερόφιλων που εμφανίζουν μια διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση (cANCA).
2. Αυτοαντισώματα κατά αντιγόνων των ουδετερόφιλων που εμφανίζουν ένα πρότυπο περιπυρηνικής χρώσης (pANCA).
3. Κοινά αντισώματα κατά πυρηνικών αντιγόνων (ANA).

Η σημασία αυτών των δύο τύπων ANCA είναι διαφορετική¹². Τα cANCA εμφανίζονται κυρίως σε ασθενείς με κοκκιωμάτωση Wegener και μικροσκοπική πολυαρθρίτιδα, ενώ τα pANCA εμφανίζονται σε διάφορες αγγειακές διαταραχές, στην ελκώδη κολίτιδα (ΕΚ) και στην πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ). Ογδόντα τοις εκατό των ασθενών στους οποίους ανευρίσκονται pANCA εμφανίζουν ιστολογικές ενδείξεις αγγειίτιδας, ΕΚ ή ΠΣΧ. Τα ANCA εμφανίζονται σε ποσοστό άνω του 90% των ασθενών με ενεργό γενικευμένη κοκκιωμάτωση Wegener και στο 67% των ασθενών με ενεργό περιορισμένη νόσο. Η συχνότητα εμφάνισης ANCA σε ασθενείς με κλινική ύφεση ποικίλει. Ασθενείς με ενεργό κοκκιωμάτωση Wegener ενδέχεται περιστασιακά να βρεθούν αρνητικοί για αντισώματα ANCA.

Ωστόσο, σε αυτές τις περιπτώσεις, η επανάληψη της εξέτασης θα πρέπει να δώσει θετικές αντιδράσεις για αντισώματα ANCA¹. Η μέθοδος μικροσκόπησης έμμεσου ανοσοφθορισμού θεωρείται ως η καλύτερη μέθοδος ανίχνευσης αντισωμάτων ANCA. Η μονιμοποίηση του αντιγόνου στο πολυμορφοπύρρηνο λευκοκύτταρο (PMN) συνήθως πραγματοποιείται σε διάλυμα αιθανόλης. Κατά τη μονιμοποίηση με διάλυμα αιθανόλης, έχουν αναγνωριστεί δύο τύποι προτύπων αντιδράσεων χρώσης των ANCA: η κυτταροπλασματική (cANCA) και η περιπυρηνική (pANCA). Οι αντιδράσεις pANCA μπορούν να επιβεβαιωθούν με την επανάληψη της ανάλυσης σε αντικειμενοφόρους που έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη, οπότε οι αντιδράσεις pANCA μεταπίπτουν σε cANCA, ενώ οι αντιδράσεις ANA είτε παραμένουν πυρηνικές είτε γίνονται αρνητικές με τη μονιμοποίηση σε φορμόλη.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Στη μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού που χρησιμοποιείται σε αυτό το kit, οι οροί των ασθενών επωάζονται σε βελτιστοποιημένα παρασκευάσματα ουδετερόφιλων ανθρώπου, προκειμένου να επιτευχθεί δέσμευση των αντισωμάτων στο υπόστρωμα. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύονται απομακρύνονται με έκπλυση της αντικειμενοφόρου. Τα αντισώματα τάξης IgG που έχουν δεσμευθεί ανιχνεύονται με την επώαση του υποστρώματος με συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης Λ Όσημασμένομεφλουορεσκείνη. Οι αντιδράσεις παρακολουθούνται με μικροσκόπιο φθορισμού που διαθέτει τα κατάλληλα φίλτρα. Η παρουσία ANCA διαπιστώνεται με την παρουσία φθορισμού έντονου πράσινου χρώματος είτε του κυτταροπλάσματος, με διάχυτη κοκκιώδη κυτταροπλασματική χρώση (cANCA), είτε με περιπυρηνική χρώση (pANCA). Στη συνέχεια, καθορίζεται ο τίτλος (το αντίστροφο της υψηλότερης αραιώσης που έδωσε θετική αντίδραση) με ανάλυση διαδοχικών αραιώσεων¹³.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια φυλάσσονται στους 2-8°C. Τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση, αφού φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Υλικά που παρέχονται

[REF]	1116	Kit ANCA (αιθανόλη) 24 προσδιορισμοί
[REF]	1140	Kit ANCA (αιθανόλη) 48 προσδιορισμοί
[REF]	1140-2	Kit ANCA (αιθανόλη) 96 προσδιορισμοί
[REF]	1140-240	Kit ANCA (αιθανόλη) 250 προσδιορισμοί

EL



[REF]	1141	ΚΙΤ ANCA (φορμόλη) 48 προσδιορισμοί
[REF]	1142	ΚΙΤ ANCA (αιθανόλη + φορμόλη) 48 προσδιορισμοί

4 x	[SORB SLD 6]	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος ουδετερόφιλων ανθρώπου με 6 αντικειμενοφόρους [μονιμοποιημένες με αιθανόλη] ([REF] 1116) 8 slides ([REF] 1140) 16 slides ([REF] 1140-2)
20 x	[SORB SLD 12]	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος ουδετερόφιλων ανθρώπου με 12 αντικειμενοφόρους [μονιμοποιημένες με φορμόλη] ([REF] 1140-240)
8 x	[SORB SLD 6]	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος ουδετερόφιλων ανθρώπου με 6 αντικειμενοφόρους [μονιμοποιημένες με φορμόλη] ([REF] 1141)
8 x	[SORB SLD 6+6]	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος ουδετερόφιλων ανθρώπου με 12 αντικειμενοφόρους [6 με αιθανόλη/6 με φορμόλη] ([REF] 1142)
1 x 0,5 ml	[CONTROL + ANCA]	Διάλυμα θετικού ελέγχου cANCA που περιέχει ορό ανθρώπου με BSA ([REF] 1140, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240, 1141)
1 x 0,5 ml	[CONTROL + pANCA]	Διάλυμα θετικού ελέγχου pANCA που περιέχει ορό ανθρώπου με BSA ([REF] 1141, 1142)
1 x 0,5 ml	[CONTROL -]	Διάλυμα αρνητικού ελέγχου που περιέχει ορό ανθρώπου με BSA ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240)
1 x 5,0 ml	[IgG-CONJ FITC EB]	Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης IgG με χρωστική Evans Blue. Να προστατεύεται από το φως. ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116) 2 vials ([REF] 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 60 ml	[BUF]	Ρυθμιστικό διάλυμα BSA ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2), 2 vials ([REF] 1140-240)
2 φιαλίδια	[BUF WASH]	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Διαλύστε κάθε φιαλίδιο έως όγκο 1 λίτρου. ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2) 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 5,0 ml	[MOUNTING MEDIUM]	Μέσο επικάλυψης. Να μην καταψύχεται ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116) 2 vials ([REF] 1140-2) 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 12	[COVER SLD]	Καλυπτρίδες ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2x12 ([REF] 1140-2) 3x12 ([REF] 1140-240)

Προαιρετικά υλικά που διατίθενται από την Immco

Αντικειμενοφόρος υποστρώματος ουδετερόφιλων ανθρώπου με 6 κυψελίδες (μονιμοποιημένη με αιθανόλη)	[REF]	2162
Αντικειμενοφόρος υποστρώματος ουδετερόφιλων ανθρώπου με 6 κυψελίδες (μονιμοποιημένη με φορμόλη)		2186
Αντικειμενοφόρος υποστρώματος ουδετερόφιλων ανθρώπου με 6 + 6 κυψελίδες με αιθανόλη και φορμόλη (μονιμοποιημένη με αιθανόλη και φορμόλη)		2189
Αντικειμενοφόρος υποστρώματος ουδετερόφιλων ανθρώπου με 10 κυψελίδες (μονιμοποιημένη με αιθανόλη)		2162-12
1 x 0,5 ml Διάλυμα θετικού ελέγχου cANCA που περιέχει ορό ανθρώπου με BSA		2252
1 x 0,5 ml Διάλυμα θετικού ελέγχου pANCA που περιέχει ορό ανθρώπου με BSA		2240
1 x 5,0 ml Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης IgG.		2100X
1 x 1,0 ml Επίχρωση Evans Blue.		2510*

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

[LOT]	Αριθμός Παρτίδας
[REF]	Αριθμός καταλόγου
[IVD]	Διαγνωστική χρήση in vitro
e	Χρήση έως
t	Θερμοκρασία αποθήκευσης
i	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
s	Αριθμός δοκιμών
	Κατασκευαστής
	Ημερομηνία κατασκευής



* Κίνδυνος. Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο. Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση. Μην το χρησιμοποιήσετε πριν διαβάσετε και κατανοήσετε τις οδηγίες προφύλαξης. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: Συμβουλευθείτε /

Επισκεφθείτε γιατρό. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια / πρόσωπο. Φυλάσσεται κλειδωμένο. Φυλάσσεται κλειδωμένο. Διάθεση του περιεχομένου/περιέκτη στο εγκεκριμένο διάθεση/ αποβλήτων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Μικροσκόπιο φθορισμού
- Μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur
- Ορολογικές πιπέτες
- Τρυβλίο χρώσης (π.χ. δοχείο Corlin)
- Μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 13 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Περιέκτης ενός λίτρου
- Φιάλη έκπλυσης
- Απορροφητικά χαρτιά
- Θάλαμος επώασης

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. 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). Όλα τα δείγματα ανθρώπινου ορού και τα προϊόντα ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα, ανεξάρτητα από την προέλευση τους. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹⁴.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) 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. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του kit με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Μην το χρησιμοποιείτε μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση αυτής της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2-8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, ο ορός θα πρέπει να καταψυχθεί στους -20°C. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μέθοδος ανάλυσης

A. Ανάλυση διαλογής

1. Αραιώστε τον ορό κάθε ασθενούς σε αναλογία 1:20 με το Ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται (50 μl ορού + 1,0 ml διάλυμα αραιώσης). Μην αραιώνετε τα διαλύματα θετικού ή αρνητικού ελέγχου. Φυλάξτε τους αδιάλυτους ορούς για να καθορίσετε τους τίτλους αντισωμάτων, εάν οι αναλύσεις διαλογής βρεθούν θετικές.
2. Αφήστε τις θήκες που περιέχουν τις αντικειμενοφόρους του υποστρώματος επί 10-15 λεπτά, προκειμένου να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρέστε προσεκτικά τις αντικειμενοφόρους χωρίς να αγγίξετε το υπόστρωμα.
3. Σημάνετε τις αντικειμενοφόρους και τοποθετήστε τις σε ένα θάλαμο επώασης που έχετε καλύψει με απορροφητικό χαρτί διαβρεγμένο με νερό για να αποτρέψετε τυχόν αποξηράνση.
4. Αναστρέψτε το σταγονόμετρο και πιέστε το ελαφρά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl) του διαλύματος αρνητικού ελέγχου στην κυψελίδα υπ' αριθμό 1. Με τον ίδιο τρόπο, προσθέστε 1 σταγόνα διαλύματος θετικού ελέγχου ANA στην κυψελίδα υπ' αριθμό 2. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
5. Χρησιμοποιώντας μια μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur, προσθέστε 1 σταγόνα από τον αραιωμένο ορό του ασθενούς (περίπου 50 μl) στις υπόλοιπες κυψελίδες. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
6. Τοποθετήστε το καπάκι στο θάλαμο επώασης και επώαστε τις αντικειμενοφόρους επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εκπλύνετε με περίπου 10 ml PBS χρησιμοποιώντας μια πιπέτα ή εκπλύνετε την αντικειμενοφόρο σε κύπελλο που περιέχει

ΕΛ

PBS. Μη χρησιμοποιείτε φιάλη έκπλυσης. Μεταφέρετε την αντικειμενοφόρο αμέσως στο δοχείο Corlin και εκπλύνετε επί 10 λεπτά. Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους.

8. Αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους από το δοχείο Corlin. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. Τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο σε θάλαμο επώασης. Αναστρέψτε αμέσως το σταγονόμετρο του συζευκτικού αντισώματος και πιέστε το μαλακά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl) σε κάθε κυψελίδα.
9. Επαναλάβετε τα βήματα **7 και 8** για κάθε αντικειμενοφόρο.
10. Τοποθετήστε εκ νέου το καπάκι στο θάλαμο επώασης. Επώαστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εμβάπτιστε την σε ένα κύπελλο με PBS για να αφαιρέσετε την περίσσεια συζευκτικού αντισώματος. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε ένα δίσκο χρώσης που περιέχει PBS επί 10 λεπτά. 2-3 σταγόνες επίχρωσης Evans blue στην τελική έκπλυση. Επαναλάβετε για τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τυχόν ακατάλληλη έκπλυση ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένο φθορισμό υποβάθρου.
12. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το δίσκο χρώσης. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. **Για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση της αντικειμενοφόρου, προχωρήστε αμέσως στο επόμενο βήμα, ενόσω η αντικειμενοφόρος είναι ακόμη υγρή.**
13. Εφαρμόστε την καλυπτρίδα προσθέτοντας **1 σταγόνα** μέσου επικάλυψης ομοιόμορφα επάνω στην καλυπτρίδα και τοποθετήστε την πάνω στην αντικειμενοφόρο. Αποφύγετε την εφαρμογή άσκοπτης πίεσης και αποτρέψτε την πλευρική πίεση της καλυπτρίδας.
14. Επαναλάβετε τα βήματα **12 και 13** για κάθε αντικειμενοφόρο.
15. Εξετάστε για ειδικό φθορισμό με μικροσκόπιο φθορισμού σε μεγέθυνση 200x ή μεγαλύτερη.

Οι αντικειμενοφόροι μπορούν να διαβαστούν μόλις προετοιμαστούν. Ωστόσο, εξαιτίας της παρουσίας παράγοντα προστασίας φθορισμού στο μέσο καθήλωσης, δεν εμφανίζεται σημαντική απώλεια της έντασης της χρώσης, εάν η ανάγνωση καθυστερήσει έως και 48 ώρες. Οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να φυλάσσονται σε σκοτεινό χώρο, σε θερμοκρασία 2-8°C.

B. Καθορισμός τελικού σημείου (τιτλοδότηση)

Ένα ορός που θα βρεθεί θετικός στην ανάλυση διαλογής μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω, ακολουθώντας τα βήματα 5 έως 13 για να καθοριστεί ο τίτλος του. Κάθε σειρά ανάλυσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τα διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου. Εκτελέστε διαδοχικές διπλές αραιώσεις ξεκινώντας από την αναλογία 1:20. Ο τίτλος είναι το αντίστροφο της υψηλότερης αραιώσης που έδωσε θετική αντίδραση.

Προετοιμασία των διαδοχικών αραιώσεων

Αριθμήστε τέσσερα σωληνάρια από το 1 έως το 4. Προσθέστε 1,0 ml διαλύματος αραιώσης δειγμάτων στο σωληνάριο 1 και 0,2 ml στα σωληνάρια 2 έως 4. Μεταφέρετε με πιπέτα 0,05 ml μη αραιωμένου ορού στο σωληνάριο 1 και αναμίξτε επιμελώς. Μεταφέρετε 0,2 ml από το σωληνάριο 1 στο σωληνάριο 2 και αναμίξτε επιμελώς. Συνεχίστε τη μεταφορά 0,2 ml από το ένα σωληνάριο στο επόμενο μετά από ανάμιξη, προκειμένου να επιτύχετε τις αραιώσεις που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Σωληνάριο	1	2	3	4
Ορός	0,05 ml			
	+			
Αραιωτικό ρυθμιστικό	1,0 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻
Μεταφορά	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Τελική αραιώση	1:20	1:40	1:80	1:160 κλπ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κάθε σειρά ανάλυσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τόσο το διάλυμα θετικού όσο και το διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου θα πρέπει να μην παρουσιάζει ειδικό φθορισμό του ουδετερόφιλου, ενώ το διάλυμα θετικού ελέγχου θα πρέπει να παρουσιάζει ένταση φθορισμού του κυτταροπλάσματος του ουδετερόφιλου 2+ ή μεγαλύτερη με διάλυμα θετικού ελέγχου cANCA και περιπυρηνική με διάλυμα θετικού ελέγχου pANCA σε αντικειμενοφόρους που έχουν μονιμοποιηθεί με αιθανόλη. Σε αντικειμενοφόρους που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμόλη, ο φθορισμός του διαλύματος θετικού ελέγχου cANCA παραμένει κυτταροπλασματικός, ενώ η αντίδραση pANCA θα γίνει κυτταροπλασματική.

Εάν δεν λάβετε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, θα πρέπει να επαναλάβετε την ανάλυση. Εάν συνεχίζουν να εμφανίζονται ανεπαρκή αποτελέσματα με τα διαλύματα ελέγχου, αυτά ενδέχεται να οφείλονται σε:

- Θολερότητα. Απορρίψτε το και χρησιμοποιήστε ένα άλλο διάλυμα ελέγχου.
- Προβλήματα με το οπτικό σύστημα του μικροσκοπίου φθορισμού. Σε αυτά ενδέχεται να συμπεριλαμβάνονται: ακατάλληλη ευθυγράμμιση, παρέλευση της ωφέλιμης διάρκειας ζωής της λυχνίας, κλπ.
- Αποξήρανση της αντικειμενοφόρου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων για ANCA θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικά (<20), θετικά (μεγαλύτερα ή ίσα με 160) ή κατά προτίμηση, θετικά με τίτλο και πρότυπο. Εξετάστε για ειδική διάχυτη κοκκιώδη κυτταροπλασματική χρώση (cANCA) ή για περιπυρηνική χρώση (pANCA). Στα υπόλοιπα αντισώματα που μπορούν να ανιχνευθούν περιλαμβάνονται τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA), τα οποία μερικές φορές μιμούνται τις αντιδράσεις pANCA. Τα πρότυπα των ANCA που έχουν μονιμοποιηθεί σε αντικειμενοφόρους με αιθανόλη και φορμόλη παρουσιάζονται στο τέλος αυτού του εντύπου.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οροί θετικοί για ANCA ενδέχεται να εμφανιστούν πολύ ασθενείς ή αρνητικοί στην αρχική αραίωση διαλογής (φαινόμενο προζώνης).

Σε τέτοιες αμφίβολες περιπτώσεις, οι οροί θα πρέπει να εξετάζονται σε υψηλότερες αραιώσεις, και εάν βρεθούν θετικοί, να καθορίζονται οι τίτλοι των αντισωμάτων.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η παρουσία δύο ή περισσότερων αντισωμάτων σε έναν ορό, τα οποία αντιδρούν με το ίδιο υπόστρωμα, ενδέχεται να επηρεάζει την ανίχνευσή τους με ανοσοφθορισμό. Αυτή η επίδραση ενδέχεται να προκαλέσει είτε αδυναμία ανίχνευσης ANCA είτε μείωση του τίτλου, εάν το αντίσωμα που επιδρά έχει μεγαλύτερο τίτλο από το ANCA. Η πιο συνηθισμένη αιτία του φαινομένου παρεμβολής σε αναλύσεις ANCA είναι η συνύπαρξη ANA.

Σε ορισμένους ασθενείς με κοκκιωμάτωση Wegener, οι αναλύσεις ANCA ενδέχεται να είναι αρνητικές. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η επανάληψη της εξέτασης ενδέχεται να δώσει θετικά αποτελέσματα. Οι ασθενείς με κοκκιωμάτωση Wegener υπό αγωγή είναι μόνιμα αρνητικοί για ANCA. Οι αντιδράσεις ANA ενδέχεται ορισμένες φορές να εκληφθούν εσφαλμένα ως χρώση ANCA ή να μιμούνται τη χρώση ANCA. Για να επιβεβαιωθεί η αντιδραστικότητα της pANCA, οι οροί που εμφανίζουν αντιδράσεις pANCA θα πρέπει να επανεξετάζονται είτε σε αντικειμενοφόρους που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμόλη είτε για αντισώματα ANA σε αντικειμενοφόρους με κύτταρα HEp-2. Τα δείγματα pANCA που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμόλη σε υπόστρωμα ANCA θα πρέπει να εμφανίσουν αντιδραστικότητα cANCA, ενώ οι αντιδράσεις για τα ANA θα πρέπει να είναι είτε αρνητικές είτε να παραμείνουν πυρηνικές. Τα αντισώματα κατά της κυτοκερατίνης ενδέχεται να δημιουργήσουν ψευδώς θετική αντίδραση για cANCA¹⁵.

Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι αναλύσεις έμμεσου ανοσοφθορισμού σε κύτταρα HEp-2 ενδέχεται να συμβάλλουν στη διάκριση της «ψευδο-ANCA» από την αληθή αντίδραση cANCA.

Οι τίτλοι των αντισωμάτων δε σχετίζονται απαραίτητα με τη δραστηριότητα της νόσου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ANCA θα πρέπει να αξιολογούνται υπό το πρίσμα των κλινικών ευρημάτων, καθώς η παρουσία ή η απουσία ANCA ενδέχεται να μη σχετίζεται άμεσα με μία διαταραχή τύπου αγγειίτιδας.

Τα θετικά αποτελέσματα ANCA που λαμβάνονται με ανοσοφθορισμό θα πρέπει να επιβεβαιώνονται με ELISA. Τα αντισώματα ANCA με συγκεκριμένες αντιγονικές ειδικότητες είναι περισσότερο ενδεικτικά μιας συγκεκριμένης διαταραχής τύπου αγγειίτιδας. Επίσης, τα ANCA έχουν σχετιστεί με ανοσολογικές διαταραχές πέραν της αγγειίτιδας, όπως η ελκώδης κολίτιδα^{7,8}.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Εξήντα τέσσερα (64) φυσιολογικά δείγματα αναλύθηκαν για ANCA. Όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά για ANCA σε αραίωση 1:20.

Μια θετική ANCA, υπό τις κατάλληλες κλινικές συνθήκες, είναι χρήσιμη για τη διάγνωση συστηματικών αγγειίτιδων και φλεγμονωδών νόσων του εντέρου⁷⁻¹¹. Η χρώση cANCA εμφανίζεται συχνότερα στην κοκκιωμάτωση Wegener και η χρώση pANCA στη μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα, στην ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα χωρίς ανοσοσυμπλέγματα και στην ελκώδη κολίτιδα⁷⁻¹¹. Σε άλλες αγγειίτιδες (οζώδης πολυαρτηρίτιδας, νόσος Takayasu, γιγαντοκυτταρική αρτηρίτιδα, νόσος Behcet) τα αντισώματα ANCA είναι σπάνια ή απουσιάζουν. Η συχνότητα εμφάνισης ANCA στην κοκκιωμάτωση Wegener και στις υπόλοιπες αγγειίτιδες, όπως συνάγεται από τη βιβλιογραφία, συνοψίζεται στον πίνακα 1, στο τέλος του εντύπου. Στην Ευρωπαϊκή μελέτη συνεργασίας για το σχέδιο τυποποίησης των ANCA, οι Hagan et al.¹⁶ αξιολόγησαν τη χρησιμότητα της ανάλυσης έμμεσου ανοσοφθορισμού σχετικά με τη διάγνωση ιδιοπαθών συστηματικών αγγειίτιδων. Σε αυτή τη μελέτη, η παρουσία ANCA εμφανίστηκε στο 85% των ασθενών με κοκκιωμάτωση Wegener, εκ των οποίων, το 64% ήταν θετικοί για cANCA και το 21% για pANCA. Η χρώση pANCA ήταν συχνότερη από τη cANCA στη μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα (58% έναντι 23%), με ευαισθησία 81% για τη μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα και 82% για την ιδιοπαθή ταχέως εξελισσόμενη προοδευτική σπειραματονεφρίτιδα.

Στους μάρτυρες της νόσου και στους υγιείς μάρτυρες, τα ANCA ήταν παρόντα στο 19% και στο 6% αντίστοιχα, προσφέροντας συνεπώς ειδικότητα 76% για τους μάρτυρες της νόσου και 94% για τα υγιή άτομα. (Πίνακας 2, στο τέλος του εντύπου).

Ωστόσο, η θετική προγνωστική αξία των αναλύσεων ANCA είναι καλύτερη και πιο σημαντική, εάν αξιολογηθεί σε συνδυασμό με τα κλινικά σημεία και συμπτώματα. Σε ένα κύριο άρθρο, οι Jennette Wilmant και Falk¹⁷ ανέφεραν θετική προγνωστική αξία 92% σε έναν ασθενή με κρεατινίνη ορού >3 mg/dl. Παρομοίως, σε ασθενείς των οποίων η αρχική θετική προγνωστική αξία ήταν χαμηλή, ένα θετικό αποτέλεσμα ANCA αυξάνει την πιθανότητα νόσου σε επίπεδο τέτοιο που ενδέχεται να δικαιολογεί περαιτέρω αξιολόγηση. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι η ανάλυση ANCA σε ασθενείς με ισχυρές κλινικές ενδείξεις ταχέως εξελισσόμενης σπειραματονεφρίτιδας χωρίς ανοσοσυμπλέγματα είναι πολύ χρήσιμη για την απόδειξη της διάγνωσης, ενώ η ανάλυση ANCA σε ασθενείς με ασθενείς κλινικές ενδείξεις είναι πιο χρήσιμη για τον αποκλεισμό της διάγνωσης.

ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η ανάλυση αντισωμάτων κατά του κυτταροπλάσματος των ουδετερόφιλων (ANCA) συγκρίθηκε με μία άλλη ανάλυση έμμεσου ανοσοφθορισμού ANCA. Η σύγκριση συμπεριέλαβε συνολικά 129 δείγματα ορού που ελήφθησαν από ένα διαγνωστικό εργαστήριο αναφοράς, ειδικευμένο στην ανίχνευση αυτοάνοσων παθήσεων. Αυτά τα δείγματα αναλύθηκαν σύμφωνα με τις διαδικασίες που προτείνονται από τον κατασκευαστή. Τα αποτελέσματα είχαν ως εξής:

		Immco™		
		Θετική	Αρνητική	Σύνολο
Άλλη	Θετική	49	0	49
	Αρνητική	7	73	80
	Σύνολο	56	73	129

Σχετική ειδικότητα: 91%
 Σχετική ειδικότητα: 100%
 Σχετική συμφωνία: 95%

Εφτά αμφίβολα δείγματα που ελέγχθηκαν με την παραπάνω μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού αναλύθηκαν με τη μέθοδο ELISA για αντισώματα κατά των αντιγόνων μυελούπεροξειδάσης (MPO) ή πρωτεΐνάσης 3 (PR3), των δύο σημαντικότερων αντιγόνων που σχετίζονται με τα αντισώματα ANCA. Από τα επτά θετικά δείγματα με τη μέθοδο ELISA και αρνητικά με το άλλο κιτ ανάλυσης, όλα εκτός από ένα βρέθηκαν θετικά με τη μέθοδο ELISA, υποδεικνύοντας συνεπώς, πως τα δείγματα αυτά ήταν αληθώς θετικά.

Διασταυρούμενη αντίδραση:

Τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) ενδέχεται να εμφανίσουν θετικές αντιδράσεις στα ουδετερόφιλα. Για να προσδιοριστεί η διασταυρούμενη αντίδραση των ANA στα ουδετερόφιλα, η οποία μπορεί να εκληφθεί εσφαλμένα ως αντίδραση ANCA, εξετάστηκαν συνολικά 25 δείγματα θετικά για αντισώματα ANA με διάφορες αντιγονικές ειδικότητες σε αντικειμενοφόρους με αιθανόλη, φορμόλη και COMVI. Όλοι οι θετικοί για ANA οροί, εκτός από αυτούς με αντιγονικές ειδικότητες SS-A (Ro) και SS-B (La), εμφάνισαν πυρηνικές αντιδράσεις. Αυτές οι αντιδράσεις ANA είτε παραμένουν πυρηνικές είτε γίνονται αρνητικές σε αντικειμενοφόρους που μονιμοποιούνται με φορμόλη.

Επαναληψιμότητα

Διενεργήθηκαν μελέτες για να καταδειχθεί η ποικιλότητα εντός σειράς και μεταξύ σειρών. Αναλύθηκαν τέσσερις οροί θετικοί για ANCA (δύο για c και δύο για p ANCA) και ένας ορός αρνητικός για ANCA με αρχική αραίωση 1:20 μέχρι το τελικό σημείο. Ο κάθε ορός αναλύθηκε σε 3 διαφορετικές παρτίδες, σε αντικειμενοφόρο με αιθανόλη, φορμόλη και COMVI για τέσσερις ημέρες για να προσδιοριστεί η επαναληψιμότητα αναπαραγωγιμότητα εντός σειράς και μεταξύ σειρών. Τα αρνητικά δείγματα παρέμειναν αρνητικά και τα θετικά δείγματα έδωσαν τον αναμενόμενο τίτλο.

ENSAYO PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-CITOPLASMA DE NEUTRÓFILO (ANCA)

[IVD] Para uso diagnóstico in vitro

PROSPECTO

- [REF] 1116 ANCA Kit (etanol) 24 análisis
 [REF] 1140 ANCA Kit (etanol) 48 análisis
 [REF] 1140-2 ANCA Kit (etanol) 96 análisis
 [REF] 1140-240 ANCA Kit (etanol) 240 análisis
 [REF] 1141 ANCA Kit (formalina) 48 análisis
 [REF] 1142 ANCA Kit (etanol+formalina) 48 análisis

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta para la detección y semi cuantificación de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA) en suero humano. Los anticuerpos ANCA se encuentran en el suero de pacientes con vasculitis necrotizante y su detección es una herramienta para diagnosticar esta patología en combinación con otros análisis de laboratorio y observaciones clínicas.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos ANCA se presentan en pacientes con granulomatosis de Wegener, poliarteritis microscópica, glomerulonefritis necrotizante o proliferativa, otras vasculitis y patologías inflamatorias del intestino (sobre todo colitis ulcerosa)¹⁻¹¹. La tinción mediante inmunofluorescencia indirecta de neutrófilos fijados con etanol puede mostrar diferentes patrones de tinción fluorescente, que incluyen:

1. Autoanticuerpos contra antígenos citoplasmáticos de neutrófilos que dan una tinción citoplasmática difusa (cANCA).
2. Autoanticuerpos contra antígenos neutrófilos que dan un patrón de reacción perinuclear (pANCA).
3. Anticuerpos comunes contra antígenos nucleares (ANA).

Estos dos tipos de ANCA tienen diferente importancia¹². Los cANCA se presentan sobre todo en pacientes con granulomatosis de Wegener y poliarteritis microscópica; en cambio, los pANCA aparecen en diferentes trastornos vasculares, colitis ulcerosa (CU) y colangitis esclerosante primaria (CEP). El ochenta por ciento de pacientes en que se detectaron pANCA presenta evidencias histológicas de vasculitis, CU o CEP. Los ANCA están presentes en más del 90% de pacientes con granulomatosis de Wegener generalizada y activa y en el 67% de pacientes con la misma patología activa limitante. La incidencia de ANCA varía en pacientes con remisión clínica. Ocasionalmente, los pacientes con granulomatosis de Wegener activa pueden resultar negativos a ANCA.

Sin embargo, en estos casos la repetición del análisis podría producir reacciones ANCA positivas¹. El método mediante microscopio de inmunofluorescencia indirecta se considera el mejor patrón de referencia para la detección de ANCA. La fijación de los antígenos de PMN se efectúa normalmente en etanol. En este caso, se identificaron dos tipos de patrones de reacción de tinción ANCA: citoplasmática (cANCA) y perinuclear (pANCA). Las reacciones pANCA se confirman repitiendo el análisis en portaobjetos fijados con formalina, donde las reacciones pANCA se convierten en cANCA; mientras que las reacciones ANA permanecen nucleares o devienen negativas en la fijación con formalina.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

En el método de inmunofluorescencia indirecta utilizado en este kit, el suero del paciente se incubaba en preparaciones optimizadas de neutrófilos humanos para permitir que los anticuerpos se unan al sustrato. Los anticuerpos no unidos se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos de clase IgG se detectan incubando el sustrato con conjugado de IgG antihumana marcado con fluoresceína. Las reacciones se observan en microscopio de fluorescencia con filtros adecuados. La presencia de ANCA es revelada por una fluorescencia de color verde manzana en el citoplasma con tinción granular citoplasmática difusa (cANCA), o bien por una tinción perinuclear (pANCA). El título (el recíproco de la mayor dilución que provocó una reacción positiva) se determina analizando las diluciones seriadas¹³.

DATOS DEL PRODUCTO

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. Los reactivos están listos para su uso tan pronto como alcanzan la temperatura ambiente.

- [REF] 1116 **ANCA Kit** (etanol) 24 análisis
 [REF] 1140 **ANCA Kit** (etanol) 48 análisis
 [REF] 1140-2 **ANCA Kit** (etanol) 96 análisis
 [REF] 1140-240 **ANCA Kit** (etanol) 250 análisis
 [REF] 1141 **ANCA Kit** (formalina) 48 análisis
 [REF] 1142 **ANCA Kit** (etanol+formalina) 48 análisis

- 4 x** [SORB][SLD][6] Portas de sustrato de neutrófilos humanos con 6 pocillos [fijado con etanol] ([REF] 1116), 8 slides ([REF] 1140), 16 slides ([REF] 1140-2)
- 20 x** [SORB][SLD][12] Portas de sustrato de neutrófilos humanos con 12 pocillos [fijado con etanol] ([REF]

ES

1140-240)



8 x	[SORB SLD 6]	Portas de substrato de neutrófilos humanos con 6 pocillos [fijado con formalina], ([REF] 1141)
8 x	[SORB SLD 6+6]	Portas de substrato de neutrófilos humanos con 12 pocillos [6 etanol/6 formalina] ([REF] 1142)
1 x 0,5 ml	[CONTROL + ANCA]	Control positivo para cANCA, contiene suero humano con BSA ([REF] 1140, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240, 1141)
1 x 0,5 ml	[CONTROL + pANCA]	Control positivo para pANCA, contiene suero humano con BSA ([REF] 1141, 1142)
1 x 0,5 ml	[CONTROL -]	Control negativo, contiene suero humano con BSA ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240)
1 x 5,0 ml	[IgG-CONJ FITC EB]	Conjugado de IgG antihumana FITC, contiene BSA. Contiene Evans Blue, Protéjase de la luz. ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2), 2 vials ([REF] 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 60 ml	[BUF]	Diluyente tamponado contiene BSA ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2), 2 vials ([REF] 1140-240)
2 viales	[BUF WASH]	Tampón fosfato salino (PBS). Disolver cada vial hasta 1 litro. ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 5,0 ml	[MOUNTING MEDIUM]	Medio de montaje. No congelar. ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2 vials ([REF] 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 12	[COVER SLD]	Cubreobjetos ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2x12 ([REF] 1140-2), 3x12 ([REF] 1140-240)

Materiales opcionales disponibles en Immco

[REF]

Portas de substrato de neutrófilos humanos con 6 pocillos (fijado con etanol)	2162
Portas de substrato de neutrófilos humanos con 6 pocillos (fijado con formalina)	2186
Portas de substrato de neutrófilos humanos con 6 + 6 pocillos etanol + formalina (fijado con etanol y formalina)	2189
Portas substrato neutrófilo humano (fijado en etanol) 10 pocillos	2162-12
1 x 0,5 ml control positivo* para cANCA, contiene suero humano con BSA	2252
1 x 0,5 ml control positivo* para pANCA, contiene suero humano con BSA	2240
1 X 5,0 ml Conjugado de IgG antihumana FITC, contiene BSA.	2100X
1 x 1,0 ml Contraste azul de Evans	2510*

Símbolos empleados en las etiquetas:

[LOT]	Número de lote
[REF]	Número de catálogo
[IVD]	Utilización diagnóstica in vitro
e	Utilizar antes de
t	Temperatura de almacenamiento
l	Consulte las instrucciones de uso
s	Número de análisis
	Fabricante
	Fecha de fabricación



*Peligro. Puede provocar cáncer. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Pedir instrucciones especiales antes del uso. No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Guardar bajo llave. Eliminar el contenido/el recipiente de residuos.

Material necesario no incluido

- Microscopio de fluorescencia
- Micropipetas o pipetas Pasteur
- Pipetas serológicas

ES

- Cubeta de tinción (p.ej. cubeta de Coplin)
- Tubos de ensayo pequeños (p.e. 13 x 75 mm) y gradilla para tubos
- Agua destilada o desionizada
- Recipiente de 1 litro
- Frasco lavador
- Toallas de papel
- Cámara de incubación

ADVERTENCIAS

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo material de origen humano usado en la preparación de este producto se ha examinado con métodos aprobados por la FDA, y resultó negativo a anticuerpos contra HIV, HbsAg y HCV. Las muestras de suero humano y los productos de origen humana deben considerarse potencialmente peligrosos independientemente de su origen. Respétense las buenas prácticas de laboratorio al conservar, dispensar y eliminar tales materiales¹⁴.

ATENCIÓN: la azida de sodio (NaN_3) puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías y formar azidas metálicas altamente explosivas. Después de dispensar líquidos, se recomienda lavar con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas. La azida de sodio puede ser tóxica por ingestión; en caso de ingestión accidental, informe inmediatamente del hecho al director del laboratorio o a un centro de control de envenenamientos.

Siga estrictamente las instrucciones tal como se presentan en este prospecto para garantizar resultados válidos. No cambie los componentes del kit con otros de otras fuentes o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc. No los utilice después de la fecha de caducidad.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Este procedimiento requiere suero como muestra. No deben utilizarse muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas con microbios. Conserve las muestras a 2-8°C por no más de una semana. Para una conservación más prolongada, congele el suero a -20°C. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO

Metodología del análisis

A. Control

1. Diluya el suero del paciente en proporción 1:20 con el diluyente tamponado del kit (50 μl serum + 1,0 ml de diluyente). No diluya los controles positivo o negativo. Conserve el suero no diluido para determinar la titulación de anticuerpos si los análisis resultaran positivos.
2. Espere a que las bolsas con los portas de substrato se estabilicen a la temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraiga los portas cuidadosamente sin tocar el substrato.
3. Etiquete los portas y colóquelos en la cámara de incubación acondicionada con toallas de papel humedecidas para mantener las condiciones de humedad adecuadas.
4. Invierta el frasco gotero y aplique suavemente 1 gota (aproximadamente 50 μl) de control negativo en el pocilio #1. Del mismo modo, aplique 1 gota de control positivo en el pocilio #2. No llene demasiado los pocillos
5. Con una micropipeta o pipeta Pasteur, coloque 1 gota de suero diluido del paciente (aproximadamente 50 μl) en los restantes pocillos. No llene demasiado los pocillos.
6. Coloque la tapa de la cámara de incubación; incube los portas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Retire un porta de la cámara de incubación. Sosteniéndolo por un extremo, lávelo delicadamente con una pipeta y aproximadamente 10 ml de PBS, o bien en un recipiente lleno de PBS. No utilice frasco de lavado. Transfiera de inmediato el porta a una cubeta de Coplin y lávelo durante 10 minutos. Repita el procedimiento con los restantes portas.
8. Retire los portas de la cubeta de Coplin. Seque el borde de los portas con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Ponga los portas en la cámara de incubación. Acto seguido, con el frasco gotero de conjugado aplique 1 gota (aproximadamente 50 μl) a cada pocilio.
9. Repita los pasos **7 y 8** para cada porta.
10. Coloque la tapa en la cámara de incubación. Incube 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraiga una lámina un porta de la incubadora del incubador. Sosteniéndola Sosteniéndolo por un extremo, sumérrjala sumérrjalo en un recipiente con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Ponga las láminas los portas en una cubeta de coloración llena de PBS durante 10 minutos. 2-3 gotas de contrastante contraste azul de Evans al lavado final. Repita el procedimiento en las láminas los portas restantes. **NOTA:** un lavado inadecuado podría producir fluorescencia de fondo.
12. Retire un porta de la cubeta de coloración. Seque el borde con una toalla para eliminar el exceso de PBS. **Para evitar que el porta se seque, pase de inmediato a la fase sucesiva mientras el porta todavía está húmedo.**
13. Monte el cubre aplicando delicadamente 1 gota de medio de montaje en cada pocilio; ponga el cubre sobre el porta sin presionar demasiado y evitando que el cubre se desplace lateralmente.

ES

14. Repita los pasos 12 y 13 para cada porta.

15. Examine la fluorescencia específica con microscopio de fluorescencia con aumento de 200x o más.

Los portas se han de leer tan pronto como estén listos. Sin embargo, gracias a la presencia de un agente antidecoloración en el medio de montaje, no se produce una disminución significativa en la intensidad de coloración aunque la lectura se postergue por 48 horas. Los portas deben conservarse en la oscuridad a una temperatura entre 2 y 8°C.

B. Determinación de punto final (titulación)

Un suero que resulte positivo en la fase de control puede ser analizado nuevamente siguiendo los pasos de 5 a 13 para determinar el título. Cada ciclo de análisis incluirá los controles positivo y negativo. Prepare diluciones senadas y por duplicado a partir de 1:20. El recíproco de la mayor dilución que provoca una reacción positiva es la titulación.

Preparación de diluciones seriadas

Numere cuatro tubos de 1 a 4. Ponga 1,0 ml de diluyente tamponado en el número 1 y 0,2 ml en los tubos de 2 a 4. Pipetee 0,05 ml de suero sin diluir en el tubo 1 y mezcle bien. Transfiera 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezcle bien. Siga transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente después de mezclar hasta producir las diluciones indicadas en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4
Suero	0,05 ml			
	+			
Diluyente tamponado	1,0 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
	↻	↻	↻	
Transferir	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Dilución final	1:20	1:40	1:80	1:160 etc.

CONTROL DE CALIDAD

En cada ciclo de análisis se deben incluir un control positivo y un control negativo. El control negativo no debe evidenciar una fluorescencia específica del neutrófilo. El control positivo debe tener una intensidad de coloración 2+ o superior del citoplasma del neutrófilo con control positivo cANCA, y perinuclear con control positivo pANCA en portas fijados con etanol. En portas fijados con formalina, el control positivo cANCA permanece citoplasmático, mientras que la reacción pANCA se convertirá en citoplasmática.

Si no se obtienen los resultados esperados, hay que repetir el análisis. Si se siguen obteniendo resultados inadecuados con los controles, puede deberse a:

- Turbidez. Descarte el control y utilice otro.
- Problemas en el sistema óptico del microscopio de fluorescencia tales como alineación incorrecta, lámpara que debe ser cambiada, etc.
- El porta se secó durante el proceso.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de los análisis de ANCA deben considerarse negativos (<20), positivos (igual o superior a 160), o preferiblemente, positivos con título y patrón. Lea la coloración granular citoplasmática difusa (cANCA) o bien perinuclear (pANCA). Otros anticuerpos detectables incluyen los anticuerpos antinucleares (ANA), que a veces podrían confundirse con las reacciones pANCA. Los patrones ANCA en portas fijados con etanol y formalina se presentan al final de este documento.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En algunos casos, un suero positivo a ANCA puede resultar muy débil o negativo en el control inicial de dilución (fenómeno prozona). En estos casos dudosos, el suero debe ser sometido a control en diluciones más altas; si resultara positivo, se determinarán los títulos del anticuerpo.

En algunos casos, la presencia de un suero de dos o más anticuerpos que reaccionan con el mismo sustrato puede provocar interferencias en la detección mediante inmunofluorescencia. Esta interferencia podría impedir la detección de los ANCA o la supresión de su título si el anticuerpo interferente tiene un título superior al de ANCA. La causa más frecuente de fenómenos de interferencia en ensayos ANCA es la coexistencia de ANA.

En algunos pacientes con granulomatosis de Wegener, los análisis ANCA podrían ser negativos. En este caso, la repetición del análisis puede dar resultados positivos. Los pacientes con granulomatosis de Wegener en tratamiento son invariablemente negativos a ANCA. A veces, las reacciones ANA pueden confundirse o pasar por tinción de pANCA; para confirmar esta última reactividad, se analizará nuevamente el suero con reacciones pANCA en portas fijados con formalina o ANA en portas HEP-2. Las muestras pANCA en sustrato ANCA fijadas con formalina deben dar reactividad de cANCA, puesto que las reacciones a ANA deben ser negativas o permanecer nucleares. Los anticuerpos anti-citoqueratina pueden dar una reacción cANCA falsamente positiva¹⁵.

En estos casos, ensayos de IF indirecta en células HEP-2 pueden ayudar a distinguir la pseudo reacción ANCA de la verdadera reacción cANCA.

ES

Los títulos de los anticuerpos no se asocian necesariamente a una actividad patológica. Los resultados del análisis ANCA se han de evaluar a la luz de las observaciones clínicas, porque la presencia o ausencia de ANCA podría no estar asociada directamente con una vasculitis.

Los resultados ANCA positivos se han de confirmar mediante un ensayo ELISA. Los ANCA de algunas especificidades de antígenos son más indicativos de una patología vasculítica específica. Además, los ANCA se han asociado a trastornos inmunológicos diferentes de la vasculitis, por ejemplo la colitis ulcerosa^{7,8}.

VALORES ESPERADOS

Sesenta y cuatro (64) muestras de pacientes normales fueron sometidas al análisis de detección de ANCA, y resultaron negativas en su totalidad con una dilución de 1:20.

Un ANCA positivo en el cuadro de estudios clínicos es útil en el diagnóstico de la vasculitis sistémica y trastornos inflamatorios del intestino⁷⁻¹¹. La tinción cANCA es más frecuente en la granulomatosis de Wegener, mientras que la tinción pANCA se presenta en la poliangeitis microscópica, en la glomerulonefritis proliferativa paucimune y la colitis ulcerosa⁷⁻¹¹. En otras vasculitis (poliarteritis nodosa, enfermedad de Takayasu, arteritis gigante de la célula, enfermedad de Behcet), los ANCA son raros o ausentes. La incidencia de ANCA en la granulomatosis de Wegener y otras vasculitis como se indica en la literatura está resumida en la Tabla 1 al final del documento. En el proyecto de estandarización de los ensayos colaboradores ANCA europeos, Hagan y colaboradores¹⁶ evaluaron la utilidad del análisis de IF en el diagnóstico de vasculitis sistémicas idiopáticas. En ese estudio se descubrió que los ANCA estaban presentes en el 85% de pacientes con granulomatosis de Wegener, de los cuales el 64% eran positivos a cANCA y el 21% a pANCA. Los pANCA prevalecían sobre los cANCA en la poliangeitis microscópica (58% contra 23%) con sensibilidad del 81% en la poliangeitis microscópica y del 82% en la glomerulonefritis rápidamente progresiva idiopática.

En los controles de pacientes enfermos y sanos, los ANCA estaban presentes en el 19% y el 6% respectivamente, evidenciando una especificidad del 76% en los controles de enfermedad y del 94% en individuos sanos. (Tabla 2 al final de este documento).

Sin embargo, el valor predictivo positivo de los ensayos ANCA es mucho mejor y más significativo si se evalúa a la luz de la historia clínica del paciente. En una publicación, Jennette Wilmant and Falk¹⁷ informan de un valor de predicción positivo del 92% en un paciente con creatinina sérica >3 mg/dl. Del mismo modo, en pacientes en los cuales el valor predictivo positivo inicial es bajo, un resultado ANCA positivo aumenta la posibilidad de una patología a un nivel que justificaría profundizar los exámenes. Los autores concluyen que los ensayos ANCA en pacientes con gran evidencia clínica de glomerulonefritis proliferativa paucimune son más útiles para probar el diagnóstico, mientras que los ensayos ANCA en pacientes con evidencia clínica débil son más útiles para descartar la dolencia.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El ensayo de detección de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) se comparó con otro análisis de inmunofluorescencia indirecta ANCA. Para la comparación se utilizó un total de 129 muestras de suero obtenidas de un laboratorio diagnóstico de referencia, especializado en la detección de enfermedades autoinmunes. Las muestras se analizaron siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. Los resultados obtenidos se comparan a continuación:

		Immco™		
		Positivo	Negativo	Total
Otro	Positivo	49	0	49
	Negativo	7	73	80
	Total	56	73	129

Especificidad relativa: 91%

Sensibilidad relativa: 100%

Correspondencia relativa: 95%

Siete muestras discrepantes observadas con el método de inmunofluorescencia indirecta indicado arriba se analizaron con el método ELISA para detectar anticuerpos anti-mieloperoxidasa (MPO) o antígenos de la proteinasa 3 (PR3), los dos antígenos principales asociados a ANCA. De estas siete muestras positivas en ELISA, todas menos una resultaron positivas con ELISA, sugiriendo de tal modo la real positividad de dichas muestras.

Reactividad cruzada:

Los anticuerpos antinucleares (ANA) pueden mostrar reacciones positivas en neutrófilos. Para determinar la reactividad en neutrófilos de ANA, que podría ser confundida con una reacción ANCA, se analizaron un total de 25 muestras positivas a ANA con diferentes especificidades de anticuerpos en portas con etanol, formalina y COMVI. Todos los sueros positivos a ANA, excepto las especificidades de anticuerpos SS-A (Ro) y SS-B (La), mostraron reacciones nucleares. Estas reacciones ANA permanecen nucleares o se vuelven negativas en portas fijados con formalina.

Reproducibilidad

Se efectuaron estudios para demostrar la variabilidad intra y entre ensayo. Cuatro sueros positivos ANCA (dos cANCA y dos pANCA) y uno negativo se analizaron con dilución de 1:20 hasta un punto final. Se analizaron en tres lotes diferentes portas con etanol, formalina y COMVI durante cuatro días, para determinar la reproducibilidad intra y entre ensayo. Las muestras negativas permanecieron negativas y las positivas dieron el título previsto.

ANTINEUTROPHILE-ZYTOPLASMATISCHE- ANTIKÖRPER-TESTSYSTEM (ANCA)

[IVD] Für in -vitro-Diagnostik

BEIPACKTEXT

- [REF] 1116 ANCA-Kit (Äthanol) 24 Bestimmungen
[REF] 1140 ANCA-Kit (Äthanol) 48 Bestimmungen
[REF] 1140-2 ANCA-Kit (Äthanol) 96 Bestimmungen
[REF] 1140- 240 ANCA-Kit (Äthanol) 240 Bestimmungen
[REF] 1141 ANCA-Kit (Formalin) 48 Bestimmungen
[REF] 1142 ANCA-Kit (Äthanol+Formalin) 48 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Ein indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest für den Nachweis und die quantitative Bestimmung von antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) in Humanserum. ANCA werden in den Seren von Patienten mit nekrotisierenden Vaskulitiden nachgewiesen und dienen daher zur Unterstützung der klinischen Befunde und der übrigen Laborbefunde bei der Diagnose dieser Erkrankungen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

ANCA treten bei Patienten mit Wegener-Granulomatose, mikroskopischer Polyarteriitis, nekrotisierender oder rapid-progressiver Glomerulonephritis, anderen Vaskulitiden und entzündlichen Darmerkrankungen (hauptsächlich Colitis ulcerosa) auf¹⁻¹¹. Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von äthanolfixierten neutrophilen Granulozyten kann verschiedenartige Fluoreszenzmuster zeigen. Zu diesen zählen:

1. Autoantikörper gegen zytoplasmatische Antigene von neutrophilen Granulozyten, die eine diffuse zytoplasmatische Färbung zeigen (cANCA).
2. Autoantikörper gegen Neutrophilen-Antigene, die ein perinukleäres Reaktionsmuster zeigen (pANCA).
3. Gewöhnliche Antikörper gegen nukleäre Antigene (ANA).

Diese beiden Arten von ANCA haben unterschiedliche Bedeutungen¹². cANCA sind überwiegend bei Patienten mit Wegener-Granulomatose und mikroskopischer Polyarteriitis zu finden, während pANCA bei verschiedenen Gefäßerkrankungen, Colitis ulcerosa (CU) und primär sklerosierender Cholangitis (PSC) auftreten. Bei achtzig Prozent der Patienten, bei denen pANCA nachgewiesen werden, liegen histologische Anzeichen für Vaskulitis, CU oder PSC vor. ANCA treten bei über 90% der Patienten mit aktiver generalisierter Wegener-Granulomatose und bei 67% der Patienten mit aktiver limitierter Erkrankung auf. Bei Patienten mit klinischer Remission schwankt die Häufigkeit von ANCA. Patienten mit aktiver Wegener-Granulomatose können gelegentlich ANCA-negativ sein.

In solchen Fällen sollten wiederholte Tests jedoch zu ANCA-positiven Reaktionen führen¹. Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopmethode gilt als der Goldstandard für den Nachweis von ANCA. Die Antigenfixierung von PMN wird normalerweise in Äthanol durchgeführt. Mit der Fixierung in Äthanol wurden zwei Arten von ANCA-Färbereaktionen identifiziert: zytoplasmatische (cANCA) und perinukleäre (pANCA). pANCA-Reaktionen können durch erneutes Testen auf formal infixierten Objektträgern bestätigt werden; dabei werden pANCA-Reaktionen in cANCA-Reaktionen umgewandelt, während ANCA-Reaktionen mit Formalinfixierung entweder nukleär bleiben oder negativ werden.

TESTPRINZIP

Bei der in diesem Kit verwendeten indirekten Immunfluoreszenzmethode werden Patientenserum auf optimierten Präparaten aus humanen neutrophilen Granulozyten inkubiert, um die Bindung der Antikörper an das Substrat zu ermöglichen. Nicht gebundene Antikörper werden durch Spülen des Objektträgers entfernt. Gebundene Antikörper der Klasse IgG werden durch Inkubieren des Substrats mit Fluorescein-markiertem Anti-human-IgG-Konjugat nachgewiesen. Die Reaktionen werden unter einem mit den passenden Filtern versehenen Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Das Vorhandensein von ANCA wird durch eine apfelgrüne Fluoreszenz entweder des Zytoplasmas mit einer diffusen granulären zytoplasmatischen Färbung (cANCA) oder einer perinukleären Färbung (pANCA) angezeigt. Der Titer (Gegenwert der höchsten Verdünnung, die zu einer positiven Reaktion führt) wird anschließend durch die Untersuchung von Verdünnungsreihen bestimmt¹³.

PRODUKTINFORMATION

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig, nachdem sie Raumtemperatur erreicht haben.

Mitgelieferte Materialien



- [REF] 1116 ANCA-Kit (Äthanol) 24 Bestimmungen
[REF] 1140 ANCA-Kit (Äthanol) 48 Bestimmungen
[REF] 1140-2 ANCA-Kit (Äthanol) 96 Bestimmungen
[REF] 1140-240 ANCA-Kit (Äthanol) 240 Bestimmungen

DE		
[REF]	1141	ANCA-Kit (Formalin) 48 Bestimmungen
[REF]	1142	1ANCA-Kit (Äthanol+Formalin) 48 Bestimmungen
4 x	[SORB SLD 6]	Objektträger mit 6 Vertiefungen mit humanen neutrophilen Granulozyten als Substrat [äthanolfixiert] ([REF] 1116), 8 slides ([REF] 1140), 16 slides ([REF] 1140-2)
20 x	[SORB SLD 12]	Objektträger mit 12 Vertiefungen mit humanen neutrophilen Granulozyten als Substrat [äthanolfixiert] ([REF] 1140-240)
8 x	[SORB SLD 6]	Objektträger mit 6 Vertiefungen mit humanen neutrophilen Granulozyten als Substrat [formalinfixiert] ([REF] 1141)
8 x	[SORB SLD 6+6]	Objektträger mit 12 Vertiefungen mit humanen neutrophilen Granulozyten als Substrat [6 Äthanol/6 Formalin] ([REF] 1142)
1 x 0,5 ml	[CONTROL + ANCA]	cANCA-positives Kontrollserum, enthält Humanserum mit BSA ([REF] 1140, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240, 1141)
1 x 0,5 ml	[CONTROL + pANCA]	pANCA-positives Kontrollserum, enthält Humanserum mit BSA ([REF] 11141, 1142)
1 x 0,5 ml	[CONTROL -]	Negatives Kontrollserum, enthält Humanserum mit BSA ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240)
1 x 5,0 ml	[IgG-CONJ FITC EB]	Anti-human-IgG-FITC-Konjugat, enthält BSA. Enthält Evans BlueVor Licht schützen ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2 vials ([REF] 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 60 ml	[BUF]	Diluyente a tampone enthält BSA ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2), 2 vials ([REF] 1140-240)
2 Fläschchen	[BUF WASH]	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). Jedes Fläschchen auf 1 Liter auffüllen. ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 5,0 ml	[MOUNTING MEDIUM]	Eindeckmittel. Nicht einfrieren ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2 vials ([REF] 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 12	[COVER SLD]	Deckgläschen ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2x12 ([REF] 1140-2), 3x12 ([REF] 1140-240)

Optionale Materialien, von Immco erhältlich

	[REF]
Objektträger mit 6 Vertiefungen mit humanen neutrophilen Granulozyten als Substrat (äthanolfixiert)	2162
Objektträger mit 6 Vertiefungen mit humanen neutrophilen Granulozyten als Substrat (formalinfixiert)	2186
Objektträger mit 6 + 6 Vertiefungen mit humanen neutrophilen Granulozyten als Substrat (äthanol- und formalinfixiert)	2189
Substrat-Objektträger mit humanen Neutrophilen (äthanolfixiert) mit 10 Vertiefungen	2162-12
1 x 0,5 ml cANCA-positives Kontrollserum*, enthält Humanserum mit BSA	2252
1 x 0,5 ml pANCA-positives Kontrollserum*, enthält Humanserum mit BSA	2240
1 X 5,0 ml Anti-human-IgG-FITC-Konjugat, enthält BSA.	2100X
1 x 1,0 ml Evans-Blau-Gegenfärbung	2510*

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

[LOT]	Chargennummer
[REF]	Katalognummer
[IVD]	In vitro diagnostischer Gebrauch
e	Verwenden bis
t	Lagertemperatur
I	Finden Sie Anweisungen für die Verwendung
S	Anzahl an Tests
	Hersteller
	Herstellungsdatum



*Gefahr. Kann Krebs erzeugen. Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Unter Verschluss aufbewahren. Unter Verschluss aufbewahren. Inhalt/Behälter im genehmigten Abfallbeseitigung entsorgen GH-Einstufung.

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Fluoreszenzmikroskop
- Mikropipette oder Pasteurpipette
- Serologische Pipetten
- Färbekasten (z.B. Coplin-Färbetrog)
- Kleine Probenröhrchen (z.B. 13 x 75 mm) und Röhrchenhalter
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- 1-Liter-Behälter
- Waschflasche
- Papiertücher
- Inkubationskammer

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum. 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. Alle menschlichen Serumproben und Produkte menschlichen Ursprungs sollten unabhängig von ihrer Herkunft als potentiell gefährlich behandelt werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹⁴.

WARNUNG – Natriumazid (NaN_3) 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 diesem Beipacktext 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. Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

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 bei -20 °C eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

VERFAHREN

Testmethode

A. Suchtest

1. Verdünnen Sie jedes Patientenserum 1:20 mit dem mitgelieferten diluente a tampone (50 µl Serum + 1,0 ml Verdüner). Verdünnen Sie nicht die positiven und negativen Kontrollseren. Bewahren Sie die unverdünnten Seren auf, um die Antikörpertiter zu bestimmen, falls Suchtests positiv ausfallen.
2. Lassen Sie die Beutel mit den Substratobjektträgern 10-15 Minuten lang bei Raumtemperatur liegen. Entfernen Sie vorsichtig die Objektträger, ohne das Substrat zu berühren.
3. Kennzeichnen Sie die Objektträger und legen Sie sie in eine Inkubationskammer, die mit mit Wasser befeuchteten Papiertüchern ausgelegt ist, um das Austrocknen zu verhindern.
4. Drehen Sie das Tropffläschchen um und drücken Sie es vorsichtig, um 1 Tropfen (etwa 50 µl) negatives Kontrollserum in Vertiefung 1 zu geben. Geben Sie auf gleiche Art 1 Tropfen positives Kontrollserum in Vertiefung 2. Vermeiden Sie das Überfüllen der Vertiefungen.
5. Verwenden Sie eine Mikropipette oder Pasteurpipette, um jeweils 1 Tropfen (etwa 50 µl) des verdünnten Patientensersums in die übrigen Vertiefungen zu geben. Vermeiden Sie das Überfüllen der Vertiefungen.
6. Verschließen Sie die Inkubationskammer und inkubieren Sie die Objektträger 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
7. Entfernen Sie einen Objektträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objektträger am Ende mit dem Etikett an und spülen Sie ihn vorsichtig mit einer Pipette mit etwa 10 ml PBS ab, oder spülen Sie den Objektträger in einem mit PBS gefüllten Becher. Verwenden Sie keine Waschflaschen. Geben Sie den Objektträger sofort in einen Coplin-Trog und waschen Sie ihn 10 Minuten lang. Wiederholen Sie diesen Vorgang mit allen anderen Objektträgern.

DE

- Entfernen Sie den/die Objektträger aus dem Coplin-Trog. Betupfen Sie den Rand des Objektträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. Legen Sie den Objektträger in die Inkubationskammer. Drehen Sie sofort das Tropffläschchen mit dem Konjugat um und drücken Sie es vorsichtig, um 1 Tropfen (etwa 50 µl) in jede Vertiefung zu geben.
- Wiederholen Sie Schritte **7 und 8** für jeden Objektträger.
- Verschließen Sie die Inkubationskammer wieder. Inkubieren Sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
- Entfernen Sie einen Objektträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objektträger am Ende mit dem Etikett an und tauchen Sie ihn in einen Becher mit PBS, um das überschüssige Konjugat zu entfernen. Belassen Sie den/die Objektträger 10 Minuten lang in einem mit PBS gefüllten Färbekasten. 2-3 Tropfen Evans-Blau-Gegenfärbung hinzufügen. Wiederholen Sie den Vorgang mit den übrigen Objektträgern. ANMERKUNG: Unsachgemäßes Waschen kann zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führen.
- Entfernen Sie einen Objektträger aus dem Färbekasten. Betupfen Sie den Rand des Objektträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. **Fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt fort, während der Objektträger noch nass ist, um dessen Austrocknen zu verhindern.**
- Bringen Sie das Deckgläschen an, indem Sie vorsichtig **1 Tropfen** Eindeckmittel auf jede Vertiefung geben und das Deckgläschen auf den Objektträger legen. Üben Sie keinen übermäßigen Druck aus und verhindern Sie eine seitliche Bewegung des Deckgläschens.
- Wiederholen Sie Schritte 12 und 13 für jeden Objektträger.
- Untersuchen Sie die Objektträger auf eine spezifische Fluoreszenz hin unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200-facher Vergrößerung.

Die Objektträger können sofort nach ihrer Vorbereitung abgelesen werden. Da das Eindeckmittel jedoch ein Mittel gegen das Verbleichen enthält, tritt kein signifikanter Verlust der Farbtintensität ein, wenn das Ablesen um bis zu 48 Stunden verzögert wird. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8 °C gelagert werden.

Endpunkt-Bestimmung (Titration)

Sie können ein im Suchtest positives Serum weiter testen, indem Sie Schritte 5 bis 13 befolgen, um den Titer zu bestimmen. Bei jedem Testlauf sollten die positiven und negativen Kontrollseren mitverwendet werden. Stellen Sie beginnend mit 1:20 eine verdoppelnde Verdünnungsreihe her. Der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion hervorruft, entspricht dem Titer.

Vorbereitung der Verdünnungsreihen

Nummerieren Sie vier Röhrchen von 1 bis 4. Geben Sie 1,0 ml diluente a tampone in Röhrchen 1 und je 0,2 ml in Röhrchen 2 bis 4. Pipettieren Sie 0,05 ml unverdünntes Serum in Röhrchen 1 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie 0,2 ml von Röhrchen 1 in Röhrchen 2 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie nach dem Mischen weiterhin jeweils 0,2 ml von einem Röhrchen ins nächste, um die in der nachfolgenden Tabelle angezeigten Verdünnungen zu erhalten:

Röhrchen	1	2	3	4
Serum	0,05 ml			
	+			
Gepufferter Verdüner	1,0 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻
Übertragung	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Endverdünnung	1:20	1:40	1:80	1:160 usw.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl das positive als auch das negative Kontrollserum mitverwendet werden. Das negative Kontrollserum sollte keine spezifische Fluoreszenz der neutrophilen Granulozyten zeigen. Das positive Kontrollserum hingegen sollte auf ethanolfixierten Objektträgern für cANCA eine Farbtintensität von 2+ oder höher für das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten und für pANCA eine perinukleäre Farbtintensität von 2+ oder höher aufweisen. Auf formalinfixierten Objektträgern bleibt das cANCA-positive Kontrollserum zytoplasmatisch, während die pANCA-positive Reaktion zytoplasmatisch wird.

Falls die erwarteten Ergebnisse nicht erhalten werden, sollte der Testlauf wiederholt werden. Falls mit den Kontrollseren weiterhin unzureichende Ergebnisse erzielt werden, kann dies folgende Ursachen haben:

- Trübung. Verwerfen Sie das Kontrollserum und verwenden Sie ein neues.
- Probleme mit dem optischen System des Fluoreszenzmikroskops. Dazu können zählen: falsche Ausrichtung, die Lampe hat ihre Nutzungsdauer überschritten, usw.
- Der Objektträger ist während des Verfahrens ausgetrocknet.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Tests auf ANCA sollten als negativ (<20), positiv (größer oder gleich 160) oder, vorzugsweise, als positiv mit Titer und Muster angegeben werden. Kontrollieren Sie auf eine spezifische diffuse, granuläre zytoplasmatische Färbung (cANCA) oder eine perinukleäre Färbung (pANCA) hin. Zu den weiteren nachweisbaren Antikörpern zählen antinukleäre Antikörper (ANA),

DE

die manchmal pANCA-Reaktionen imitieren können. ANCA-Muster auf ethanol- und formalinfixierten Objektträgern sind am Ende dieses Dokuments dargestellt.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

In einigen Fällen können ANCA-positive Seren bei der ersten Suchtestverdünnung entweder sehr schwach oder negativ sein (Prozonenphänomen).

In solchen Zweifelsfällen sollten die Seren mit einer höheren Verdünnung getestet werden, und im Fall eines positiven Ergebnisses sollte der Antikörpertiter bestimmt werden.

In einigen Fällen kann das Vorhandensein von zwei oder mehr Antikörpern in einem Serum, die mit demselben Substrat reagieren, deren Nachweis mittels Immunfluoreszenz beeinträchtigen. Diese Beeinträchtigung kann entweder dazu führen, dass die ANCA nicht nachgewiesen werden, oder dass ihr Titer unterdrückt wird, falls der Titer der interferierenden Antikörper höher als der Titer der ANCA ist. Die häufigste Ursache für eine Beeinträchtigung bei ANCA-Tests ist das gleichzeitige Vorhandensein von ANA.

Bei einigen Patienten mit Wegener-Granulomatose können ANCA-Tests negativ ausfallen. In diesen Fällen können wiederholte Tests zu positiven Ergebnissen führen. Patienten mit Wegener-Granulomatose, die sich in Behandlung befinden, sind stets ANCA-negativ. ANA-Reaktionen können manchmal mit pANCA-Färbungen verwechselt werden oder diese imitieren. Um die pANCA-Reaktivität zu bestätigen, sollten Seren mit pANCA-Reaktionen entweder auf formalinfixierten Objektträgern oder auf ANA hin auf HEp-2-Objektträgern erneut getestet werden. pANCA-Proben sollten auf formalinfixiertem ANCA-Substrat zu cANCA-Reaktionen führen, während Reaktionen gegen ANA entweder negativ sein oder nuklear bleiben sollten. Anti-Zytokeratin-Antikörper können zu falschen positiven cANCA-Reaktionen führen¹⁵.

In solchen Fällen können indirekte IF-Tests auf HEp-2-Zellen dabei helfen, „Pseudo-ANCA-Reaktionen“ von echten cANCA-Reaktionen zu unterscheiden.

Die Antikörpertiter stehen nicht unbedingt mit der Krankheitsaktivität in Verbindung. Die Ergebnisse des ANCA-Tests sollten unter Berücksichtigung der klinischen Befunde bewertet werden, da das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von ANCA möglicherweise nicht direkt mit einer Gefäßerkrankung verbunden ist.

Mittels Immunfluoreszenz erhaltene positive ANCA-Ergebnisse sollten mit ELISA bestätigt werden. ANCA mit bestimmten Antigenspezifitäten weisen eher auf eine spezifische Gefäßerkrankung hin. ANCA wurden außerdem neben Gefäßerkrankungen auch mit anderen Immunstörungen in Verbindung gebracht, darunter Colitis ulcerosa^{7,8}.

ERWARTETE WERTE

Vierundsechzig (64) normale Proben wurden auf ANCA getestet. Alle Proben waren bei einer Verdünnung von 1:20 ANCA-negativ.

Im angemessenen klinischen Umfeld ist ein positiver ANCA-Test hilfreich bei der Diagnose von systemischen Vaskulitiden und entzündlichen Darmerkrankungen⁷⁻¹¹. Eine cANCA-Färbung tritt am häufigsten bei Wegener-Granulomatose auf, eine pANCA-Färbung bei mikroskopischer Polyangiitis, pauci-immuner rapid-progressiver Glomerulonephritis und Colitis ulcerosa⁷⁻¹¹. Mit anderen Vaskulitiden (Polyarteriitis nodosa, Takayasu-Arteriitis, Riesenzellarteriitis, Morbus Behcet) sind ANCA selten oder überhaupt nicht vorhanden. Die der Literatur entnommenen Häufigkeiten von ANCA bei Wegener-Granulomatose und anderen Vaskulitiden sind in Tabelle 1 am Ende dieses Dokuments zusammengefasst. In dem gemeinschaftlichen Europäischen Projekt für die Standardisierung von ANCA-Tests haben Hagan und seine Mitarbeiter¹⁶ die Nützlichkeit des indirekten IF-Tests für die Diagnose von idiopathischen Systemvaskulitiden bewertet. In dieser Studie wurden ANCA bei 85% der Patienten mit Wegener-Granulomatose gefunden; von diesen waren 64% cANCA-positiv und 21% pANCA-positiv. Bei mikroskopischer Polyangiitis traten pANCA häufiger auf als cANCA (58% bzw. 23%), mit einer Sensitivität von 81% für mikroskopische Polyangiitis und 82% für rapid-progressive Glomerulonephritis.

Bei den krankhaften und gesunden Kontrollseren waren ANCA in 19% bzw. 6% der Fälle vorhanden; dies stellt eine Spezifität von 76% bei krankhaften Kontrollseren und 94% bei gesunden Probanden dar (Tabelle 2 am Ende des Dokuments).

Der positive Vorhersagewert des ANCA-Tests ist jedoch besser und bedeutsamer, wenn die Ergebnisse im Zusammenhang mit klinischen Anzeichen und Symptomen beurteilt werden. In einem Leitartikel berichteten Jennette Wilmant und Falk¹⁷ über einen positiven Vorhersagewert von 92% bei einem Patienten mit Serumkreatinin >3 mg/dl. Bei Patienten, bei denen der anfängliche positive Vorhersagewert niedrig ist, erhöht ein positives ANCA-Ergebnis in ähnlicher Weise die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung dermaßen, dass weitere Untersuchungen gerechtfertigt sein können. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass bei Patienten mit starken klinischen Anzeichen für pauci-immune rapid-progressive Glomerulonephritis ein ANCA-Test besonders nützlich ist, um die Diagnose zu bestätigen, während ein ANCA-Test bei Patienten mit schwachen klinischen Anzeichen besonders nützlich ist, um die Diagnose auszuschließen.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Der Test auf antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) wurde mit einem anderen indirekten Immunfluoreszenztest für ANCA verglichen. Der Vergleich umfasste insgesamt 129 Serumproben, die von einem auf den Nachweis von Autoimmunerkrankheiten spezialisierten diagnostischen Referenzlabor bezogen wurden. Diese Proben wurden gemäß den von den Herstellern empfohlenen Verfahren getestet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

		Immco™		
		Positiv	Negativ	Gesamt
ANDERER	Positiv	49	0	49
	Negativ	7	73	80
	Gesamt	56	73	129

Relative Spezifität: 91%
 Relative Sensitivität: 100%
 Relative Übereinstimmung: 95%

Sieben Proben mit nicht übereinstimmenden Ergebnissen bei der oben genannten indirekten Immunfluoreszenzmethode wurden mit ELISA auf Antikörper gegen Myeloperoxiadase-Antigene (MPO) oder Proteinase-3-Antigene (PR3) getestet; dies sind die beiden wichtigsten mit ANCA verbundenen Antigene. Von den sieben Proben, die mit ELISA positiv und mit dem anderen Kit negativ waren, ergaben 6 ein positives Ergebnis mit ELISA; dies deutet darauf hin, dass diese Proben tatsächlich positiv waren.

Kreuzreaktivität:

Antinukleäre Antikörper (ANA) können auf neutrophilen Granulozyten positiv reagieren. Um die Reaktivität von ANA auf neutrophilen Granulozyten, die mit der ANCA-Reaktivität verwechselt werden kann, zu bestimmen, haben wir insgesamt 25 AN A-positive Proben mit unterschiedlichen Antikörperspezifitäten auf Äthanol-, Formalin- und COMVI-Objektträgern getestet. Alle ANA-positiven Seren, mit Ausnahme der Antikörperspezifitäten SS-A/Ro und SS-B/La, zeigten nukleäre Reaktionen. Auf formalinfixierten Objektträgern bleiben diese ANA-Reaktionen entweder nukleär oder sie werden negativ.

Wiederholbarkeit

Es wurden Studien zum Nachweis der intraseriellen und interseriellen Variabilität durchgeführt. Vier ANCA-positive Seren (zwei auf cANCA und zwei auf pANCA) und ein ANCA-negatives Serum wurden beginnend mit einer 1:20 Verdünnung bis zum Endpunkt getestet. Sie wurden über vier Tage hinweg auf je 3 verschiedenen Chargen von Äthanol-, Formalin- und COMVI-Objektträgern getestet, um die intraserielle und interserielle Wiederholbarkeit zu bestimmen. Die negativen Proben blieben negativ und die positiven Proben erbrachten die erwarteten Titer.

TEST ANTICORPS ANTI-NEUTROPHILES CYTOPLASMIQUES (ANCA)

[IVD] Pour diagnostic in vitro

ENCART DU PRODUIT

[REF] 1116 ANCA Kit (éthanol) 24 Tests

[REF] 1140 ANCA Kit (éthanol) 48 Tests

[REF] 1140-2 ANCA Kit (éthanol) 96 Tests

[REF] 1140- 240 ANCA Kit (éthanol) 240 Tests

[REF] 1141 ANCA Kit (formol) 48 Tests

[REF] 1142 ANCA Kit (éthanol+formol) 48 Tests

Test par immunofluorescence indirecte pour la recherche et la détermination semi- quantitative des anticorps des anti-neutrophiles cytoplasmiques (ANCA) dans le sérum humain. Les ANCA sont mis en évidence dans le sérum de patients atteints d'angéite nécrosante, et donc, associés aux signes cliniques et à d'autres examens biologiques, ils se révèlent d'une grande aide pour le diagnostic de ces maladies.

GENERALITES

Les ANCA sont présents dans le sérum de patients atteints de granulomatose de Wegener, de polyarthrites microscopiques, de néphrite glomérulaire nécrosante ou en croissant, ainsi que d'autres angéites et troubles inflammatoires intestinaux (colite ulcéreuse primaire). L'image par immunofluorescence indirecte des neutrophiles fixés à l'éthanol peut se présenter sous différentes formes parmi lesquelles on retrouve:

1. Les anticorps dirigés contre les antigènes cytoplasmiques de neutrophiles donnant une coloration cytoplasmique diffuse (c-ANCA).
2. Les anticorps dirigés contre les antigènes des neutrophiles donnant une fluorescence périmoléculaire (p-ANCA).
3. Les anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires (ANA).

Ces deux types d'ANCA ont une signification différente¹². Les c-ANCA sont principalement retrouvés chez les patients atteints de granulomatose de Wegener et de polyarthrite microscopique, tandis que les p-ANCA sont associés à divers troubles angéitiques comme la recto-colite hémorragique (CU), et l'angiocolite scléreuse (CPS). Chez 80% des patients où l'on retrouve les p-ANCA, sont présents des signes histologiques d'angéite, de CU ou de CPS. Les ANCA sont présents chez plus de 90% des patients atteints de maladie de Wegener active et généralisée, et chez 67% d'entre eux dans sa forme active et limitée. La fréquence des ANCA fluctue avec la rémission de la maladie. Les patients atteints de maladie de Wegener en phase active peuvent exceptionnellement avoir un test ANCA négatif.

Dans ce cas cependant, un contrôle ultérieur devrait montrer une réactivité positive¹. La méthode d'immunofluorescence indirecte avec microscope est considérée comme la technique de référence pour la détection des ANCA. La fixation des antigènes PMN est habituellement réalisée avec de l'éthanol. En se fixant sur l'éthanol, 2 types de fluorescence ANCA ont été identifiées: cytoplasmique (c-ANCA) et périmoléculaire (p-ANCA). Les réactions de type p-ANCA sont confirmées en renouvelant le test sur des lames fixées au formol. Dans ce cas, les réactions p-ANCA deviennent c-ANCA là où les réactions ANA restent nucléaires ou deviennent négatives en se fixant sur le formol.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce kit, les sérums des patients sont incubés sur des préparations optimisées de neutrophiles humains, ce qui permet la fixation des anticorps avec le substrat tissu. Un rinçage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué anti-IgG humaines, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps de classe IgG fixés. Les réactions sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert pomme du cytoplasme montre la présence d'ANCA, coloration diffuse granulaire cytoplasmique (c-ANCA) ou coloration périmoléculaire. Le titre du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) est alors déterminé par dilutions successives¹³.

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs entre 2° et 8°C. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Avant utilisation, attendre que les réactifs atteignent l'équilibre à la température ambiante du laboratoire.

Matériel fourni

[REF] 1116 ANCA Kit (éthanol) 24 Tests

[REF] 1140 ANCA Kit (éthanol) 48 Tests

[REF] 1140-2 ANCA Kit (éthanol) 96 Tests

[REF] 1140-240 ANCA Kit (éthanol) 240 Tests

[REF] 1141 ANCA Kit (formol) 48 Tests

[REF] 1142 ANCA Kit (éthanol+formol) 48 Tests



FR

4 x	[SORB SLD 6]	Lames 6 puits avec substrat de neutrophiles humains (fixés à l'éthanol) ([REF] 1116), 8 slides ([REF] 1140), 16 slides ([REF] 1140-2)
20 x	[SORB SLD 12]	Lames 12 puits avec substrat de neutrophiles humains (fixés à l'éthanol) ([REF] 1140-240)
8 x	[SORB SLD 6]	Lames 6 puits de neutrophiles humains (fixés au formol) ([REF] 1141)
8 x	[SORB SLD 6+6]	Lames 12 puits de neutrophiles humains [6 éthanol/6 formol] ([REF] 1142)
1 x 0,5 ml	[CONTROL + ANCA]	Contrôle positif cANCA, contient du sérum humain avec BSA ([REF] 1140, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240, 1141)
1 x 0,5 ml	[CONTROL + pANCA]	Contrôle positif pANCA, contient du sérum humain avec BSA ([REF] 1141, 1142)
1 x 0,5 ml	[CONTROL -]	Contrôle négatif, contient du sérum humain avec BSA ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240)
1 x 5,0 ml	[IgG-CONJ FITC EB]	Conjugué FITC anti-IgG humaines contient du BSA. Contient bleu d'Evan. Maintenir à l'abri de la lumière ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2 vials ([REF] 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 60 ml	[BUF]	Diluant tamponné contient du BSA ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2) 2 vials ([REF] 1140-240)
2 flacons	[BUF WASH]	Tampon Phosphate Salin (PBS), Dissoudre chaque flacon dans 1 litre ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 5,0 ml	[MOUNTING MEDIUM]	Milieu de montage. Ne pas congeler ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2 vials ([REF] 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 12	[COVER SLD]	Lamelles couvre-lames ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2x12 ([REF] 1140-2), 3x12 ([REF] 1140-240)

Autres réactifs disponibles chez Immco

Lame 6 puits de neutrophiles humains (fixés à l'éthanol)	[REF] 2162
Lame 6 puits de neutrophiles humains (fixés au formol)	2186
Lame 6+6 puits de neutrophiles humains Ethanol + Formol	
Lame Substrat (fixé à l'éthanol et au formol)	2189
Lamelle 10 puits Substrat Neutrophiles Humains (fixés à l'éthanol)	2162-12
1 x 0,5 ml Contrôle Positif cANCA, contient du sérum humain avec BSA	2252
1 x 0,5 ml Contrôle Positif pANCA, contient du sérum humain avec BSA	2240
1 x 5,0 ml Conjugué FITC anti-IgG humaines contient du BSA.	2100X
1 x 1,0 ml Contre-coloration d'Evans	2510*

Symboles utilisés sur les étiquettes:

[LOT]	Numéro de Lot
[REF]	Numéro catalogue
[IVD]	Utilisation à diagnostic in vitro
e	A utiliser avant
t	Température de stockage
l	Consulter les instructions d'emploi
S	Nombre de tests
	Fabricant
	Date de fabrication



*Danger. Peut provoquer le cancer. Se procurer les instructions avant utilisation. Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/ aerosols. EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage. Garder sous clef. Éliminer le contenu/récipient dans l'élimination des déchets approuvée

Matériel nécessaire mais non fourni

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Bac à coloration pour le lavage des lames (type Coplin)
- Petits tubes (ex : 13 x 75 mm) et porte tubes
- Eau distillée ou déionisée Eprovette graduée 1l
- Flacon pour solution de lavage
- Serviettes en papier
- Chambre d'incubation

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*. 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'usage¹⁴.

ATTENTION – Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (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 à 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.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

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. Éviter les congélations/décongélations successives des sérums.

MODE OPÉRATOIRE

A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:20 dans le diluant tamponné fourni (50 µl de sérum + 1,0 ml de diluant). Ne pas diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum non dilué pour déterminer le titre des anticorps dans le cas où le dépistage serait positif.
2. Laisser les lames prendre la température du laboratoire pendant 10-15 minutes dans le sachet scellé. Sortir les lames avec précaution sans toucher le substrat.
3. Numéroter les lames et les placer dans la chambre humidifiée avec des serviettes en papier mouillées pour éviter le dessèchement.
4. Retourner le flacon doseur et appuyer doucement pour déposer 1 goutte (environ 50µl) de Contrôle Négatif sur le puits n°1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif sur le puits n°2. Éviter de déborder des puits.
5. A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Éviter de déborder des puits.
6. Replacer le couvercle sur la chambre et incuber les lames 30 minutes à température ambiante.
7. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette contenant environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un becher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter les opérations avec toutes les lames.
8. Retirer une (les) lame(s) du bac de coloration. Éliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. Déposer la lame dans la chambre d'incubation. Retourner les flacons doseurs de conjugué et déposer immédiatement 1 goutte (environ 50µl) dans chaque puits.

FR

9. Répéter les étapes **7 et 8** avec chaque lame.
10. Replacer le couvercle sur la chambre d'incubation et incuber 30 minutes à température ambiante.
11. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, plonger la lame dans un bœcher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration rempli de PBS pendant 10 minutes. 2-3 gouttes de contre-coloration bleue d'Evans peuvent être ajoutée au lavage final. Répéter les opérations avec toutes les lames. **REMARQUE** : Un lavage incorrect peut altérer la morphologie des neutrophiles et augmenter le bruit de fond de fluorescence.
12. Retirer une lame du bac. Éliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. **Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est encore humide.**
13. Déposer doucement **1 goutte** de milieu de montage dans chaque puits et appliquer la lamelle couvre-lame. Ne pas appliquer de pression excessive et éviter les mouvements latéraux de la lamelle.
14. Répéter les étapes **12 et 13** avec chaque lame.
15. Observer la fluorescence spécifique à l'aide d'un microscope au grossissement X200 ou plus.

Les lames peuvent être lues immédiatement. Cependant, grâce à la présence d'un agent anti-fading dans le milieu de montage, la lecture peut être retardée jusqu'à 48 heures sans perte significative de l'intensité de fluorescence. Dans ce cas, les lames doivent être conservées à l'obscurité et entre 2 et 8°C.

B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

Un sérum trouvé positif au test de dépistage peut être retesté en suivant les étapes 5 à 13 afin de déterminer son titre. Inclure dans chaque nouvelle série un contrôle positif et négatif. Les dilutions en série de 2 en 2 sont réalisées à partir du 1:20. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

Préparation des dilutions en série.

Numéroter quatre tubes de 1 à 4. Ajouter 1,0 ml de diluant tamponné dans le tube 1 et 0,2 ml dans les tubes 2 à 4. Pipeter 50 µl de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0,2 ml du tube 1 dans le tube suivant et agiter soigneusement. Continuer à transférer 0,2 ml d'un tube à l'autre en mélangeant bien chaque tube pour arriver aux dilutions suivantes :

Tubes	1	2	3	4
Sérum	0,05 ml			
	+			
Diluant	1,0 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Echantillon				
		↗	↗	↗
Transfert		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilution finale	1:20	1:40	1:80	1:160 etc.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne doit pas donner d'image fluorescente sur les neutrophiles, tandis qu'avec le contrôle positif on obtient, sur les lames fixées à l'éthanol, une fluorescence 2+ ou supérieure du cytoplasme des neutrophiles, dans le cas d'un contrôle c-ANCA et périmoléculaire dans le cas d'un contrôle p-ANCA. Sur lames fixées au formol, le contrôle positif c-ANCA reste cytoplasmique tandis que celui du p-ANCA deviendra cytoplasmique.

Dans le cas où les contrôles ne donnent pas les résultats attendus, il est recommandé de refaire le test. Si le problème persiste, cela peut être lié à :

- La turbidité. Éliminer le contrôle et en utiliser un nouveau.
- Au système optique du microscope. Par exemple: mauvais alignement, lampe ayant dépassé sa durée de vie, etc.
- A un assèchement des lames pendant la manipulation.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des tests ANCA sont à considérer négatifs (<20), ou positifs (> ou = 160), ou de préférence, positifs avec le titre et le type de fluorescence. Préciser s'il s'agit d'une fluorescence spécifique, cytoplasmique (c-ANCA) ou périmoléculaire (p-ANCA). Certains autres anticorps, comme les anticorps antinucléaires (ANA), donnent parfois des réactions similaires aux p-ANCA. Différentes images d'ANCA sur lames éthanol et formol sont présentées à la fin du document.

LIMITES D'UTILISATION

Parfois un sérum ANCA positif peut donner un résultat faiblement positif ou négatif à la dilution de dépistage (effet de zone).

Dans ces cas douteux, les sérums devront être testés à des dilutions supérieures et, si le résultat est positif, déterminer le titre des anticorps.

Parfois la présence de deux ou plus anticorps différents dans le sérum ayant une réactivité vis à vis du même substrat peut créer des interférences pour la détection en immunofluorescence. Cela peut masquer la détection de l'ANCA ou cacher le titre si

FR

l'anticorps qui interfère a un titre plus élevé que celui des ANCA. Le cas le plus fréquemment rencontré dans le test des ANCA est une interférence avec les ANA.

Chez certains patients atteints de maladie de Wegener, le test des ANCA pourra être négatif. Un contrôle réalisé ultérieurement peut montrer une positivité du sérum. Les sérums de patients atteints de la maladie de Wegener qui suivent un traitement sont toujours négatifs sur le test ANCA. Certaines réactions d'ANA peuvent parfois gêner ou mimer une image p-ANCA. Pour confirmer la réactivité p-ANCA, les sérums doivent être retestés sur lames fixées au formol ou sur lames HEp2 pour les ANA. Les échantillons p-ANCA sur lames fixées au formol donnent une image c-ANCA, tandis que les réactions des ANA sur ces mêmes lames donnent une image négative ou nucléaire. Les anticorps anti-cytokératine peuvent résulter en fausse réaction positive c-ANCA¹⁵.

Le test sur cellules HEp2 permet alors de distinguer les réactions « pseudo-ANCA » des vraies réactions c-ANCA.

Le titre de l'anticorps n'est pas toujours corrélé à l'activité de la maladie. Les résultats ANCA doivent être interprétés avec les signes cliniques et la présence ou l'absence d'ANCA ne peut pas directement indiquer la présence d'une angéite.

Les résultats ANCA positifs en immunofluorescence doivent être confirmés par une technique ELISA. Certaines spécificités antigéniques sont préférentiellement associées à un type d'angéite. Par ailleurs des ANCA sont retrouvés dans le sérum de patients atteints de désordres immunologiques autres que les angéites, comme la rectocolite hémorragique^{7, 8}.

VALEURS ATTENDUES

Soixante quatre (64) échantillons extraits d'une population normale ont été testés en ANCA. Tous les échantillons ont donné un résultat négatif à la dilution 1:20.

Un résultat ANCA positif est utile pour le diagnostic des angéites et maladies inflammatoires intestinales⁷⁻¹¹. La conformation c-ANCA est fréquemment associée à la maladie de Wegener et la conformation p-ANCA à la micropolyangéite, à la néphrite glomérulaire idiopathique à croissant et à la rectocolite hémorragique⁷⁻¹¹. Dans d'autres angéites (périartérite noueuse, maladie de Takayasu, maladie de Behcet) les ANCA sont rares ou absents. La prévalence des ANCA dans la maladie de Wegener et autres vascularites, extraite des données de la littérature est présentée dans le tableau 1, à la fin du document. Dans le projet européen d'étude de standardisation des ANCA, Hagan et ses collaborateurs¹⁶ ont montré l'importance de l'immunofluorescence indirecte pour le diagnostic des vascularites systémiques idiopathiques. Dans cette étude, les ANCA sont présents dans 85% des sérums de patients atteints de maladie de Wegener, et parmi ceux-ci, 64% sont positifs c-ANCA et 21% positifs p-ANCA. Les p-ANCA sont plus fréquents que les c-ANCA dans la polyangéite microscopique (58% contre 23%) avec une sensibilité de 81% dans la polyangéite microscopique et de 82% dans la néphrite glomérulaire idiopathique à croissant.

Lors de bilan de santé ou de maladie, l'ANCA était présente dans respectivement 19% et 6 % des cas, présentant donc une spécificité de 76% dans le groupe contrôle de malades et de 94% dans la population normale (Tableau 2 à la fin du document).

Cependant la valeur prédictive positive des ANCA est bien meilleure et plus significative lorsque le résultat est interprété avec dossier clinique. Dans leur éditorial, Jennette Wilmant et Falk¹⁷, ont montré que la valeur prédictive positive est de 92% chez les patients ayant un dosage de Créatinine >3mg/dl. De même, chez les patients ayant une valeur prédictive positive initiale faible, un résultat ANCA positif augmente la probabilité de déclencher la maladie. Les auteurs concluent que la recherche d'ANCA chez les patients ayant des signes cliniques évidents de glomérulonéphrite extra-capillaire est utile pour confirmer le diagnostic, alors que chez les patients ayant des signes cliniques diffus, cette même recherche permet d'éliminer le diagnostic d'angéites.

PERFORMANCES

Le test ANCA, Anticorps Anti-Neutrophiles Cytoplasmiques, de Immco™ a été utilisé en parallèle avec un autre test ANCA d'immunofluorescence indirecte. 129 sérums provenant d'un laboratoire spécialisé dans la détection des anticorps ont été inclus dans l'étude comparative. Ces échantillons ont été testés en respectant le mode opératoire recommandé par chaque fabricant. Les résultats sont les suivants:

		Immco™		
		Positifs	Négatifs	Total
Autre	Positifs	49	0	49
	Négatifs	7	73	80
	Total	56	73	129

Spécificité Relative: 91%
Sensibilité Relative: 100%
Concordance: 95%

Les sept sérums discordants entre les deux tests d'immunofluorescence ont été retestés en ELISA pour la recherche des anticorps dirigés contre les deux principales cibles antigéniques, la myéloperoxydase (MPO) et la Protéinase 3 (PR3).

Sur les sept sérums positifs avec ELISA et négatifs avec l'autre test, tous sauf un ont été trouvés positifs en ELISA, ce qui montre que ces échantillons sont plus vraisemblablement de vrais positifs.

Réactivité croisée:

Les anticorps antinucléaires (ANA) peuvent donner une réaction positive sur les neutrophiles. Pour définir la réactivité des ANA sur les neutrophiles, que l'on peut confondre avec la réactivité des ANCA, 25 sérums ANA positifs de spécificités différentes ont été testés sur des lames fixées à l'éthanol, au formol et des lames COMVI. Avec tous les sérums, à l'exception des spécificités

FR

SS-A (Ro) et SS-B (La), on observe une image de conformation nucléaire. Cette image est conservée ou disparaît sur les lames fixées au formol.

Reproductibilité:

Des études ont été réalisées pour définir la répétitivité intra-essai et la reproductibilité inter-essai. Quatre sérums ANCA positifs (deux c-ANCA et deux p-ANCA) et un sérum ANCA négatif ont été testés à partir de la dilution 1:20 jusqu'à la dilution du titre. 3 lots différents ont été utilisés pour chaque type de lames, éthanol, formol et COMVI pendant quatre jours pour déterminer l'intra et l'inter-reproductibilité. Dans tous les cas, le sérum négatif et les sérums positifs ont donné les résultats attendus.

SISTEMA PER L'ANALISI DI ANTICORPI ANTI-NEUTROFILICI CITOPLASMATICI (ANCA)

[IVD] Per uso diagnostico in vitro

INSERTO DEL PRODOTTO

- [REF] 1116 Kit ANCA (etanolo) 24 Determinazioni
- [REF] 1140 Kit ANCA (etanolo) 48 Determinazioni
- [REF] 1140-2 Kit ANCA (etanolo) 96 Determinazioni
- [REF] 1140-240 Kit ANCA (etanolo) 240 Determinazioni
- [REF] 1141 Kit ANCA (etanolo) 48 Determinazioni
- [REF] 1142 Kit ANCA (etanolo + formalina) 48 Determinazioni

Test di immunofluorescenza indiretta (IF) per la rilevazione e la quantificazione di anticorpi anti-neutrofili citoplasmatici (ANCA) nel siero umano. Gli ANCA si riscontrano nei sieri di pazienti con vasculite necrotizzante e sono quindi di utilità nella diagnosi di queste patologie in congiunzione con le evidenze cliniche e altri risultati di laboratorio.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Gli ANCA sono presenti in pazienti con granulomatosi di Wegener, poliartrite microscopica, glomerulonefrite necrotizzante o a semilune e in altre vasculiti e malattie infiammatorie intestinali (principalmente la colite ulcerosa)¹⁻¹¹. La colorazione per immunofluorescenza indiretta dei neutrofili fissati in etanolo può manifestarsi con diverse tipologie di pattern includendo:

1. Autoanticorpi anti-antigeni citoplasmatici dei neutrofili che producono una colorazione citoplasmatica diffusa (cANCA).
2. Autoanticorpi anti-antigeni neutrofili che generano un pattern di reazione perinucleare (pANCA).
3. Anticorpi comuni anti-antigeni nucleari (ANA).

La significatività di queste due forme di ANCA differisce¹². I cANCA sono presenti prevalentemente in pazienti con granulomatosi di Wegener e poliartrite microscopica, mentre i pANCA si riscontrano in una serie di malattie vasculitiche, nella colite ulcerosa (CU) e nella colangite sclerosante primitiva (CSP). Nell'80% dei pazienti nei quali sono presenti i pANCA si hanno evidenze istologiche di vasculite, CU o CSP. Gli ANCA si riscontrano in più del 90% dei pazienti con granulomatosi di Wegener attiva generalizzata e nel 67% dei pazienti con malattia attiva limitata. L'incidenza degli ANCA varia nei pazienti in remissione clinica. I pazienti con granulomatosi di Wegener attiva possono occasionalmente risultare negativi agli ANCA. Tuttavia, in questi casi, una ripetizione dei test dovrebbe produrre reazioni positive agli ANCA¹. Il metodo della microscopia in immunofluorescenza indiretta viene ritenuto lo standard privilegiato per l'individuazione degli ANCA. La fissazione degli antigeni di PMN viene normalmente eseguita in etanolo. Con la fissazione in etanolo, sono stati identificati due tipi di pattern di colorazione come risultato della reazione: citoplasmatico (cANCA) e perinucleare (pANCA). Le reazioni pANCA possono essere confermate da analisi ripetute su vetrini fissati in formalina, dove le reazioni pANCA danno luogo alla conversione in cANCA, mentre le reazioni ANA rimangono di tipo nucleare o possono diventare negative su fissazioni in formalina.

PRINCIPI DELLA METODICA

Il metodo di immunofluorescenza indiretta adottato in questo kit prevede che i sieri dei pazienti siano incubati su preparazioni ottimizzate di neutrofili umani per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Gli anticorpi non legati sono rimossi mediante lavaggio e quelli legati, di classe IgG sono individuati per incubazione del substrato con coniugato anti-IgG umane marcato con fluoresceina. Le reazioni si osservano per microscopia in fluorescenza usando filtri idonei. La presenza degli ANCA si manifesta con una fluorescenza verde mela del citoplasma con colorazione citoplasmatica granulare diffusa (cANCA) o colorazione perinucleare (pANCA). I titoli (il valore reciproco della diluizione maggiore che produce una reazione positiva) sono poi determinati analizzando le diluizioni seriali¹³.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. E' necessario, prima dell'uso, portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.

Materiali forniti

- [REF] 1116 Kit ANCA (etanolo) 24 Determinazioni
- [REF] 1140 Kit ANCA (etanolo) 48 Determinazioni
- [REF] 1140-2 Kit ANCA (etanolo) 96 Determinazioni
- [REF] 1140-240 Kit ANCA (etanolo) 240 Determinazioni
- [REF] 1141 Kit ANCA (formalina) 48 Determinazioni
- [REF] 1142 Kit ANCA (etanolo + formalina) 48 Determinazioni

4 x [SORB|SLD|6] Vetrini da 6 pozzetti, substrato neutrofili umani [fissati in etanolo]
([REF] 1116), 8 slides ([REF] 1140), 16 slides ([REF] 1140-2)

IT		
20 x	[SORB SLD 12]	Vetrini da 12 pozzetti, substrato neutrofili umani [fissati in etanolo] ([REF] 1140-240)
8 x	[SORB SLD 6]	Vetrini da 6 pozzetti, substrato neutrofili umani [fissati in etanolo] ([REF] 1141)
8 x	[SORB SLD 6+6]	Vetrini da 12 pozzetti, substrato neutrofili umani (6 etanolo/ 6 formalina)
1 x 0,5 ml	[CONTROL + ANCA]	Controllo Positivo cANCA, contiene siero umano con BSA ([REF] 1140, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240, 1141)
1 x 0,5 ml	[CONTROL + pANCA]	Controllo Positivo pANCA, contiene siero umano con BSA ([REF] 1141, 1142)
1 x 0,5 ml	[CONTROL -]	Controllo Negativo, contiene siero umano con BSA ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240)
1 x 5,0 ml	[IgG-CONJ FITC]	Coniugato FITC anti-IgG umane, contiene BSA. Proteggere dalla luce ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2 vials ([REF] 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 5,0 ml	[IgG-CONJ FITC EB]	Coniugato FITC anti-IgG umane, contiene BSA. Contiene blu di Evan. Proteggere dalla luce ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2 vials ([REF] 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 60 ml	[BUF]	Diluyente a tampone contiene BSA ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2), 2 vials ([REF] 1140-240)
2 fiale	[BUF WASH]	Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), da ricostituire a 1 litro. ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2) 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 5,0 ml	[MOUNTING MEDIUM]	Liquido di montaggio. Non congelare ([REF] 1116, 1140, 1141, 1142), 2 vials ([REF] 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 12	[COVER SLD]	Vetrini coprioggetto ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2x12 ([REF] 1140-2), 3X12 ([REF] 1140-240)



Materiali opzionali disponibili presso Immco

[REF]

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Vetrini da 6 pozzetti, substrato neutrofili umani [fissati in etanolo]	2162
Vetrini da 6 pozzetti, substrato neutrofili umani [fissati in formalina]	2186
Vetrini da 12 pozzetti, substrato neutrofili umani etanolo+formalina (fissati in etanolo e formalina)	2189
Vetrino Substrato Neutrofili Umani (fissati in etanolo) 10 pozzetti	2162-12
1 x 0,5 ml Controllo Positivo cANCA*, contiene siero umano con BSA	2252
1 x 0,5 ml Controllo Positivo pANCA*, contiene siero umano con BSA	2240
1 x 5,0 ml Coniugato FITC anti-IgG umane, contiene BSA.	2100X
1 x 1,0 ml Colorante di contrasto Blu di Evans	2510*

Simboli utilizzati sulle etichette

[LOT]	Codice del lotto
[REF]	Numero di catalogo
[IVD]	Per uso diagnostico <i>in vitro</i>
e	Utilizzare entro
t	Temperatura di conservazione
I	Consultare le istruzioni per l'uso
s	Numero di test
	Fabbricante
	Data di fabbricazione



*Pericolo. Può provocare il cancro. Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. Conservare sotto chiave. Smaltire il prodotto/recipiente nello smaltimento dei rifiuti approvato.

Materiali necessari ma non forniti

- Microscopio a fluorescenza
- Micropipetta o pipetta Pasteur

IT

- Pipette sierologiche
- Vaschetta per colorazione (ad es. vaschetta Coplin)
- Provette piccole per test (ad es. 13 x 75 mm) e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Contenitore da 1 litro.
- Flacone di lavaggio
- Salviette di carta
- Camera umida per l'incubazione

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. 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 dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali¹⁴.

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN_3) può 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 può 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. Non usare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questa procedura usare unicamente campioni di siero. I 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 a -20°C. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

PROCEDURA

Metodo del test

A. Screening

1. Diluire il siero del paziente 1:20 con il Diluente a tampone fornito (50 µl di siero + 1,0 ml di diluente). Non diluire i Controlli Positivi o Negativi. Conservare il siero non diluito per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che le buste contenenti i vetrini raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti. Rimuovere con attenzione il vetrino senza venire in contatto con il substrato.
3. Contrassegnare i vetrini e disporli nella camera umida sul cui piano interno saranno state poste delle salviette di carta inumidite con acqua per prevenire l'essiccazione.
4. Applicare 1 goccia (circa 50 µl) di Controllo Negativo nel pozzetto #1. Allo stesso modo applicare 1 goccia di Controllo Positivo nel pozzetto #2. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Usando una micropipetta o pipetta Pasteur, applicare 1 goccia di siero diluito del paziente (circa 50 µl) negli altri pozzetti. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
6. Posizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
7. Rimuovere il vetrino dalla vaschetta Coplin, reggerlo per l'estremità e irrorare delicatamente con circa 10 ml di PBS usando una pipetta, oppure sciacquare il vetrino in un recipiente contenente PBS. Non usare flaconi di lavaggio. Trasferire immediatamente il vetrino in una vaschetta Coplin di lavaggio e attendere per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
8. Rimuovere il/i vetrino/i dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. Posizionare il vetrino nella camera umida. Applicare immediatamente 1 goccia (circa 50 µl) di Coniugato in ciascun pozzetto.
9. Ripetere le fasi 7 e 8 per ciascun vetrino.
10. Riposizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
11. Rimuovere il vetrino dalla camera umida, reggerlo per l'estremità e immergerlo in un recipiente contenente PBS per rimuovere il coniugato in eccesso. Lasciare il/i vetrino/i per 10 minuti in una vaschetta Coplin riempita con PBS. 2-3 gocce di Blu di Evans nel lavaggio finale. Ripetere la procedura per i restanti vetrini. NOTA: Un lavaggio inadeguato può causare un aumento nella fluorescenza di fondo.

IT

12. Rimuovere il vetrino dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. **Per prevenire l'essiccazione, procedere immediatamente alla fase successiva mentre il vetrino è ancora umido.**
13. Montare il vetrino coprioggetto applicando **1 goccia** di liquido di montaggio uniformemente sul coprioggetto e posizionarlo sopra il vetrino. Evitare di esercitare una pressione eccessiva e gli spostamenti laterali del vetrino coprioggetto.
14. Ripetere le fasi 12 e 13 per ciascun vetrino.
15. Osservare la fluorescenza specifica mediante microscopia a fluorescenza con ingrandimento 200x o superiore.

I vetrini possono essere letti appena montati. Tuttavia, per la presenza di un agente antiscolorimento nel liquido di montaggio, non si verificano perdite significative di intensità di colorazione e la lettura può essere effettuata nelle 48 ore successive alla preparazione. I vetrini devono essere conservati in assenza di luce a 2-8°C.

B. Determinazione Endpoint (titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere analizzato ulteriormente ripetendo le fasi da 5 a 13 per determinare il titolo anticorpale. Ogni serie di test deve includere Controlli Positivi e Negativi. Preparare diluizioni seriali a partire da 1:20. Il reciproco del valore della più alta diluizione a cui il campione mostra positività è il valore del titolo.

Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare 4 provette da 1 a 4. Aggiungere 1,0 ml di Diluente a tampone nella provetta 1 e 0,2 ml nelle provette da 2 a 4. Pipettare 0,05 ml di siero non diluito nella provetta 1 e mescolare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e mescolare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta alla successiva, dopo la miscelazione, per ottenere le diluizioni indicate nella tabella seguente:

Provette	1	2	3	4
Siero	0,05 ml			
	+			
Diluente tamponato	1,0 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
	↻	↻	↻	
Trasferimento	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Diluizione finale	1:20	1:40	1:80	1:160 etc.

CONTROLLO DI QUALITÀ

In ogni serie di test dovrebbero essere inclusi un Controllo Positivo e un Controllo Negativo. Il Controllo Negativo non dovrebbe evidenziare fluorescenza specifica dei neutrofili, mentre il Controllo positivo dovrebbe produrre una colorazione del citoplasma dei neutrofili con intensità di 2+ o maggiore nel caso di controllo positivo cANCA e perinucleare con controllo positivo pANCA su vetrini fissati in etanolo. Su vetrini fissati in formalina, il Controllo Positivo cANCA rimane citoplasmatico, mentre la reazione pANCA diventeranno citoplasmatiche.

Se non si ottengono i risultati attesi, la procedura dovrebbe essere ripetuta. Se i controlli continuano a produrre risultati discordanti, ciò può essere dovuto a:

- Torbidità. Smaltire e usare un nuovo controllo.
- Problemi legati al sistema ottico del microscopio a fluorescenza: allineamento non idoneo, lampada oltre la durata utile prevista, ecc.
- Aver lasciato asciugare il vetrino durante la procedura.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dei test per gli anticorpi ANCA dovrebbero essere riportati come negativi con titolo inferiore a 20, positivi con titolo superiore o uguale a 160 o, preferibilmente, positivi con titolo e pattern. Effettuare la lettura per colorazione diffusa, granulare citoplasmatica (cANCA) o perinucleare (pANCA). Altri anticorpi rilevabili possono includere gli anticorpi antinucleari (ANA) che in certi casi possono mimare le reazioni pANCA. I pattern ANCA su vetrini fissati in etanolo o formalina sono illustrati alla fine del foglietto.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

In alcuni casi, i sieri positivi per gli ANCA possono essere o molto deboli o negativi alla diluizione iniziale di screening (fenomeno prozona).

In questi casi incerti, i sieri dovrebbero essere analizzati a diluizioni maggiori e, se positivi, dovranno essere determinati i titoli anticorpali.

Nel caso in cui in un siero siano presenti due o più anticorpi reattivi con lo stesso substrato, può verificarsi un'interferenza nella rilevazione per immunofluorescenza. L'interferenza può risultare in mancata rilevazione degli ANCA o in soppressione del titolo se l'anticorpo interferente ha un titolo più alto di quello degli ANCA. La causa più comune del fenomeno di interferenza nei test ANCA è la coesistenza degli ANA.

IT

In alcuni dei pazienti affetti da granulomatosi di Wegener, i test per gli ANCA possono risultare negativi. In tali casi una serie ripetuta di analisi può produrre risultati positivi. I pazienti con granulomatosi di Wegener in trattamento mostrano invariabilmente risultati negativi per gli ANCA. Le reazioni ANA possono, in alcuni casi, mimare o essere equivocate con la colorazione dei pANCA. Per confermare la reattività pANCA, i sieri che producono reazioni pANCA dovrebbero essere successivamente testati su vetrini fissati in formalina o analizzati per la presenza di ANA su vetrini con cellule epiteliali HEP-2. I campioni pANCA su substrato ANCA fissato in formalina dovrebbero mostrare reattività cANCA, mentre le reazioni agli ANA dovrebbero essere negative oppure rimanere di tipo nucleare. Gli anticorpi anti-citocheratina possono risultare in reazioni cANCA falsamente positive¹⁵.

In questi casi, i test di immunofluorescenza indiretta su cellule epiteliali HEP-2 possono essere di utilità nella distinzione tra reazioni "pseudo ANCA" e vere reazioni cANCA.

I titoli anticorpali non sono necessariamente associati con l'attività della malattia. I risultati dei test ANCA dovrebbero essere valutati alla luce delle condizioni cliniche, in quanto la presenza o l'assenza degli ANCA può non essere direttamente associata con una malattia vasculitica.

Risultati positivi agli ANCA ottenuti per immunofluorescenza dovrebbero essere confermati con test ELISA. Gli ANCA di determinate specificità antigeniche sono maggiormente indicativi della presenza di una specifica malattia vasculitica. Inoltre, gli ANCA sono stati associati con disturbi immunologici diversi dalla vasculite quali la colite ulcerosa^{7, 8}.

VALORI ATTESI

Sono stati testati per gli ANCA sessantaquattro (64) campioni. Tutti i campioni sono risultati negativi agli ANCA a diluizioni 1:20.

Un risultato ANCA positivo in un contesto clinico appropriato è utile nella diagnosi della vasculite sistemica e delle malattie infiammatorie intestinali⁷⁻¹¹. La colorazione cANCA si verifica più comunemente nella granulomatosi di Wegener e la colorazione pANCA nella poliangite microscopica, nella glomerulonefrite proliferativa extracapillare pauci immune e nella colite ulcerosa⁷⁻¹¹. In altre vasculiti (poliartrite nodosa, malattia di Takayasu, artrite a cellule giganti, malattia di Behçet) gli ANCA sono rari o assenti. L'incidenza degli ANCA nella granulomatosi di Wegener e nelle altre vasculiti, estrapolata dalla letteratura, è riepilogata nella Tabella 1 riportata alla fine di questo foglio. Nel progetto collaborativo europeo di standardizzazione delle metodologie per gli ANCA, Hagan e collaboratori¹⁶ hanno valutato l'utilità dei test di immunofluorescenza indiretta per la diagnosi della vasculite sistemica idiopatica. In questo studio, la presenza degli ANCA è stata riscontrata nell'85% dei pazienti con granulomatosi di Wegener, di questi, il 64% sono risultati positivi per i cANCA e il 21% per i pANCA. I pANCA prevalevano rispetto ai cANCA nella poliangite microscopica (58% contro 23%) con sensibilità dell'81% per la poliangite microscopica e dell'82% per la glomerulonefrite rapidamente progressiva idiopatica.

Nei controlli patologici e in quelli sani, gli ANCA erano presenti rispettivamente nel 19% e nel 6% dei campioni, fornendo pertanto un dato di specificità del 76% nei controlli patologici e del 94% negli individui sani. (Tabella 2, alla fine di questo foglietto).

Tuttavia, il valore predittivo positivo dei test ANCA è migliore e maggiormente significativo se valutato in congiunzione con i segni clinici e i sintomi. In un editoriale, Jennette Wiltman e Falk¹⁷ hanno riportato un valore predittivo positivo del 92% in un paziente con livelli di creatinina nel siero >3 mg/dl. Similmente, in pazienti nei quali si ha un valore predittivo positivo iniziale basso, un risultato ANCA positivo aumenta la possibilità di una patologia a un livello che può giustificare una valutazione ulteriore. Gli autori concludono che i test per gli ANCA, in pazienti con marcata evidenza clinica per la glomerulonefrite proliferativa extracapillare pauci immune, sono maggiormente utili per sostanziare la diagnosi, mentre gli stessi test in pazienti con debole evidenza clinica sono utili per escludere la diagnosi.

PERFORMANCE DEL TEST

Il Test di Rivelazione degli Anticorpi Anti-neutrofili Citoplasmatici (ANCA) è stato confrontato con un test analogo in fluorescenza per gli ANCA. La comparazione ha incluso un totale di 129 sieri ottenuti da un laboratorio diagnostico di riferimento specializzato nell'individuazione di patologie autoimmuni. Questi sieri sono stati testati secondo la procedura raccomandata dai produttori. I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono:

		Immco™		
		Positivo	Negativo	Totale
Altro	Positivo	49	0	49
	Negativo	7	73	80
	Totale	56	73	129

Specificità: 91%
Sensibilità: 100%
Concordanza: 95%

Sette campioni discrepanti osservati utilizzando il metodo di Immunofluorescenza indiretta specificato sopra sono stati ulteriormente analizzati con il metodo ELISA per gli anticorpi agli antigeni anti-mieloperossidasi (MPO) o anti-proteinasi 3 (PR3), i due principali antigeni associati agli ANCA. Dei sette campioni positivi mediante ELISA e negativi con l'altro kit di analisi, tutti ad eccezione di uno sono risultati positivi con il metodo ELISA, indicando pertanto, la reale positività di questi campioni.

Reattività incrociata:

Gli anticorpi anti-nucleari (ANA) possono mostrare reazioni positive su neutrofili. Per determinare le reattività degli ANA sui neutrofili, che possono essere confuse con reattività ANCA, sono stati analizzati complessivamente 25 campioni positivi agli ANA, con specificità anticorpali variabili, su vetrini in etanolo, formalina e COMVI. Tutti i sieri positivi agli ANA, ad eccezione delle specificità anticorpali SS-A (Ro) e SS-B (La), mostravano reazioni nucleari. Tali reazioni ANA rimangono nucleari o divengono negative su vetrini fissati in formalina.

IT

Riproducibilità

Gli studi sono stati eseguiti per dimostrare la variabilità all'interno di un saggio e tra un saggio e l'altro. Quattro sieri ANCA positivi (due di ciascun tipo c e p ANCA) e un siero ANCA negativo, sono stati testati in diluizioni a partire da 1:20 fino all'endpoint. L'analisi è stata effettuata su 3 diversi lotti, ciascuno su vetrini in etanolo, formalina e COMVI, per quattro giorni per determinare la riproducibilità tra le analisi e tra le serie di analisi. I campioni negativi sono rimasti negativi e i campioni positivi hanno prodotto il titolo atteso.

SISTEMA DE TESTE DE ANTICORPOS ANTI-CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS (ANCA)

[IVD] Para diagnóstico in vitro

FOLHETO DO PRODUTO

[REF] 1116 Kit ANCA (etanol) 24 Determinações
[REF] 1140 Kit ANCA (etanol) 48 Determinações
[REF] 1140-2 Kit ANCA (etanol) 96 Determinações
[REF] 1140-240 Kit ANCA (etanol) 240 Determinações
[REF] 1141 Kit ANCA (formalina) 48 Determinações
[REF] 1142 Kit ANCA (etanol + formalina) 48 Determinações

É um teste de anticorpos de imunofluorescência indirecta para a detecção e semiquantificação de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) em soro humano. Os ANCA são detectados no soro de doentes com vasculite necrosante e assim, serve de auxílio nos exames clínicos e laboratoriais para o diagnóstico destas doenças.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os ANCA apresentam-se em doentes com Granulomatose de Wegener, poliarterite microscópica, glomerulonefrite necrosante ou crescente, outras vasculites e patologias inflamatórias dos intestinos (principalmente colite ulcerosa)¹⁻¹¹. A coloração por imunofluorescência indirecta de neutrófilos fixados com etanol pode exibir tipos diferentes de padrões de coloração fluorescente. Esses incluem:

1. Auto-anticorpos contra antígenos citoplasmáticos de neutrófilos que provocam uma coloração citoplasmática difusa (cANCA).
2. Auto-anticorpos a antígenos neutrófilos que provocam um padrão de reacção perinuclear (pANCA).
3. Anticorpos comuns a antígenos nucleares (ANA).

A importância destes dois tipos de ANCA diferem¹². Os cANCA apresentam-se principalmente em doentes com Granulomatose de Wegener e poliarterite microscópica, enquanto os pANCA se apresentam em diversas patologias vasculíticas, colite ulcerosa (CU) e colangite esclerosante primária (CEP). Oitenta por cento dos doentes nos quais se apresentam pANCA têm uma evidência histológica de vasculite, CU ou CEP. Os ANCA apresentam-se em mais de 90% dos doentes com Granulomatose de Wegener generalizada e activa e em 67% dos doentes com doença limitadamente activa. A incidência de ANCA varia nos doentes com remissão clínica. Os doentes com Granulomatose de Wegener podem ser ocasionalmente negativos a ANCA.

Todavia, nesses casos, a repetição dos testes poderá dar reacções ANCA positivas¹. O método por microscópio a imunofluorescência indirecta é considerado como o melhor método padrão para a detecção de ANCA. A fixação de antígenos de PMN é normalmente efectuada em etanol. Quando fixados em etanol, foram identificados dois tipos de padrões de coloração da reacção ANCA: citoplasmática (cANCA) e perinuclear (pANCA). As reacções pANCA podem ser confirmadas repetindo o teste em lâminas fixadas com formalina onde as reacções pANCA se convertem em cANCA visto que as reacções ANA permanecem nucleares ou tornam-se negativas na fixação com formalina,

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

No método de imunofluorescência indirecto usado neste kit, o soro dos doentes é incubado em preparações optimizadas de neutrófilos humanos para permitir a ligação de anticorpos ao substrato. Quaisquer anticorpos que não se tenham ligado são eliminados pela lavagem da lâmina. Os anticorpos que aderiram, da classe IgG, são detectados através da incubação do substrato com conjugado de IgG anti-humana marcado com fluoresceína. As reacções são observadas com um microscópio de fluorescência equipado com filtros apropriados. A presença de ANCA é demonstrada por uma fluorescência verde-maçã do citoplasma com uma coloração citoplasmática granular difusa (cANCA) ou uma coloração perinuclear (pANCA). O título (o recíproco da maior diluição que provocou uma reacção positiva) é então determinado testando diluições em série¹³.

INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

Conservação e preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. Os reagentes estão prontos a usar depois de se terem estabilizado à temperatura ambiente.

Materiais fornecidos



[REF] 1116 Kit ANCA (etanol) 24 Determinações
[REF] 1140 Kit ANCA (etanol) 48 Determinações
[REF] 1140-2 Kit ANCA (etanol) 96 Determinações
[REF] 1140-240 Kit ANCA (etanol) 240 Determinações
[REF] 1141 Kit ANCA (formalina) 48 Determinações
[REF] 1142 Kit ANCA (etanol + formalina) 48 Determinações

PT		
4 x	[SORB SLD 6]	Lâminas de substrato de neutrófilos humanos com 6 poços [fixadas com etanol] ([REF] 1116), 8 slides ([REF] 1140), 16 slides ([REF] 1140-2)
20 x	[SORB SLD 12]	Lâminas de substrato de neutrófilos humanos com 10 poços [fixadas com etanol] ([REF] 1140-240)
8 x	[SORB SLD 6]	Lâminas de substrato de neutrófilos humanos com 6 poços [fixadas com formalina] ([REF] 1141)
8 x	[SORB SLD 6+6]	Lâminas de substrato de neutrófilos humanos com 12 poços [6 com etanol/6 com formalina] ([REF] 1142)
1 x 0,5 ml	[CONTROL + ANCA]	Controlo positivo para cANCA, contém soro humano com BSA ([REF] 1140, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240, 1141)
1 x 0,5 ml	[CONTROL + pANCA]	Controlo positivo para pANCA, contém soro humano com BSA ([REF] 1141, 1142)
1 x 0,5 ml	[CONTROL -]	Controlo negativo, contém soro humano com BSA ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2, 1140-240)
1 x 5,0 ml	[IgG-CONJ FITC EB]	Conjugado de IgG anti-humana com FITC. Contém BSA. Contém azul de Evans Proteger da luz ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2 vials ([REF] 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 60 ml	[BUF]	Diluyente tamponado contém BSA ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2), 2 vials ([REF] 1140-240)
2 frascos	[BUF WASH]	Tampão fosfato salino (PBS). Dissolver cada frasco em 1 l. ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116, 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 5,0 ml	[MOUNTING MEDIUM]	Meio de montagem. Não congelar ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2 vials ([REF] 1140-2), 3 vials ([REF] 1140-240)
1 x 12	[COVER SLD]	Lamelas ([REF] 1140, 1141, 1142, 1116), 2x12 ([REF] 1140-2), 3x12 ([REF] 1140-240)

Materiais opcionais disponibilizados pela Immco

	[REF]
Lâmina de substrato de neutrófilos humanos com 6 poços (fixada com etanol)	2162
Lâmina de substrato de neutrófilos humanos com 16 poços (fixada com etanol)	2162-16
Lâmina de substrato de neutrófilos humanos com 6 poços (fixada com formalina)	2186
Lâmina de substrato de neutrófilos humanos com 6 + 6 poços etanol + formalina (fixada com etanol e formalina)	2189
Lâmina de 10 poços de Substrato Neutrófilo Humano (fixado com etanol)	2162-12
1 x 0,5 ml Controlo positivo* para cANCA, contém soro humano com BSA	2252
1 x 0,5 ml Controlo positivo* para pANCA, contém soro humano com BSA	2240
1 x 5,0 ml Conjugado de IgG anti-humana com FITC. Contém BSA.	2100X
1 x 1,0 ml Contrastante azul de Evans	2510

Símbolos utilizados nos rótulos:

[LOT]	Número de lote
[REF]	Número de catálogo
[IVD]	Utilização diagnóstica <i>in vitro</i>
e	Utilização por
t	Temperatura de armazenamento
I	Consulte as instruções de utilização
S	Número de testes
	Fabricante
	Data de fabricação



*Perigo. Pode provocar cancro. Pedir instruções específicas antes da utilização. Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico. Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. Armazenar em local fechado à chave. Armazenar em local fechado à chave. Eliminar o conteúdo/recipiente em eliminação de resíduos aprovada.

PT

Material necessário mas não fornecido

- Microscópio de fluorescência
- Micropipeta ou pipeta de Pasteur
- Pipetas serológicas
- Recipiente de coloração (ex: Coplin)
- Tubos de ensaio pequenos 13 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Água destilada ou desionizada
- Recipiente de 1 litro
- Frasco de lavagem
- Toalhetes de papel
- Câmara de incubação

AVISOS E PRECAUÇÕES

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados para HbsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e deram resultado negativo nos testes requeridos pela FDA. Todas as amostras de soro humano e produtos de origem humana devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente da sua origem. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais¹⁴.

AVISO: Aazida de sódio (NaN_3) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar 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 à risca de forma a assegurar resultados válidos. Não trocar componentes dos kits com outros de outras origens diferentes do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Não utilizar se estiverem fora do prazo de validade.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Nestas operações só devem ser usadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios podem interferir no rendimento deste teste e não devem ser usadas. Conservar entre 2 e 8 °C por não mais de uma semana. Para uma conservação mais prolongada devem ser congeladas a -20 °C. Evitar repetidas congelações e descongelações.

PROCEDIMENTO

Método do teste

A. Despiste

1. Dilua cada soro do doente a 1:20 com Diluente tamponado fornecido (50 µl soro + 1,0 ml Diluente). Não dilua os Controlos Negativo e Positivo. Conserve o soro não diluído para determinar o título de anticorpos, se os testes de controlo forem positivos.
2. Deixe que as bolsas com as lâminas de substrato estabilizem à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. Retire as lâminas com atenção sem tocar no substrato.
3. Rotule as lâminas e coloque-as na câmara de incubação revestida com toalhetes de papel humedecidos com água para evitar a secagem.
4. Inverta o frasco conta-gotas e aperte ligeiramente para aplicar 1 gota (cerca de 50 µl) de Controlo Negativo no poço n.º 1. Do mesmo modo, deite 1 gota de Controlo Positivo no poço n.º 2. Não encha demasiado.
5. Com uma micropipeta ou pipeta de Pasteur, deite 1 gota do soro diluído do doente (cerca de 50 µl) nos outros poços. Evite encher demasiado os poços.
6. Coloque a tampa na câmara de incubação e incube as lâminas 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Retire a lâmina da câmara de incubação. Segure na lâmina pela extremidade e lave com cerca de 10 ml de PBS usando uma pipeta, ou lave a lâmina numa proveta com PBS. Não use o frasco de lavagem. Transfira imediatamente a lâmina para o recipiente de Coplin e lave 10 minutos. Repita a operação em todas as lâminas restantes.
8. Retire a(s) lâmina(s) do recipiente de Coplin. Passe o bordo da lâmina num toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS. Coloque a lâmina na câmara de incubação. Inverta imediatamente o frasco conta-gotas do Conjugado e aperte ligeiramente para deitar 1 gota (aproximadamente 50 µl) em cada poço.
9. Repita os passos 7 e 8 em cada lâmina.
10. Coloque a tampa na câmara de incubação. Incube por 30 minutos à temperatura ambiente.

PT

11. Retire uma lâmina da câmara de incubação. Segure na lâmina numa ponta e mergulhe-a num recipiente com PBS para eliminar o excesso de conjugado. Coloque a(s) lâmina(s) num recipiente de coloração com PBS durante 10 minutos. 2 a 3 gotas de contrastante azul de Evans à lavagem final. Repita a operação nas lâminas restantes. NOTA: Uma lavagem incorrecta pode levar a um aumento da fluorescência de fundo.
12. Retire a lâmina do prato de coloração. Passe o bordo da lâmina num toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS. **Para evitar que a lâmina seque, salte imediatamente ao passo seguinte enquanto a lâmina ainda está húmida.**
13. Monte a lamela aplicando **1 gota** de Meio de Montagem uniformemente em cada poço e coloque-a sobre a lâmina. Não faça muita pressão e evite o deslizamento lateral da lamela.
14. Repita os passos 12 e 13 em cada lâmina.
15. Examine a fluorescência específica com microscópio de fluorescência com aumento de 200x ou mais.

As lâminas devem ser lidas assim que estiverem prontas. Contudo, devido à presença de um agente antidescoloração no meio de suporte, não há perdas significativas de intensidade de coloração, se a leitura for adiada até 48 horas. As lâminas devem ser conservadas às escuras entre 2 e 8 °C.

B. Determinação final (titulação)

Um soro positivo no teste de controlo pode ainda ser mais testado seguindo os passos 5 ao 13 para determinar a titulação. Cada teste deve incluir os Controlos Positivo e Negativo. Efectue diversas diluições duplicadas começando por 1:20. O recíproco da diluição mais elevada a produzir uma reacção positiva é o título.

Preparação de diluições em série

Numere quatro tubos de 1 a 4. Deite 1,0 ml de Diluente tamponado no tubo 1 e 0,2 ml nos tubos 2 a 4. Pipete 0,05 ml de soro não diluído para o tubo 1 e mexa bem. Transfira 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e mexa bem. Continue a transferir 0,2 ml de um tubo para o outro após mexer para produzir as diluições descritas na tabela seguinte.

Tubos	1	2	3	4
Soro	0,05 ml			
	+			
Diluente tamponado	1,0 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
	↻	↻	↻	
Transferir	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Diluição final	1:20	1:40	1:80	1:160 etc.

CONTROLO DE QUALIDADE

Os Controlos Positivo e Negativo devem ser incluídos em cada teste. O Controlo Negativo não deverá mostrar uma fluorescência específica do neutrófilo, visto que o Controlo Positivo deverá ter uma intensidade de coloração 2+ ou superior do citoplasma do neutrófilo com controlo positivo cANCA e perinuclear com controlo positivo pANCA em lâminas fixadas com etanol. Em lâminas fixadas com formalina, O Controlo Positivo cANCA permanece citoplasmático visto que a reacção pANCA se tornará citoplasmática.

Se não se obtiverem os resultados esperados, o teste deve ser repetido. Se resultados inadequados continuarem a ocorrer com os controlos, pode tratar-se de:

- Turvação. Elimine e use outro controlo.
- Problemas no sistema óptico do microscópio de fluorescência: Estes incluem: alinhamento incorrecto, lâmpada a precisar de ser substituída, etc.
- A lâmina ficou seca durante o processo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos testes para ANCA devem ser registados como negativos (< 20), positivo, (maior ou igual a 160) ou alternadamente positivo com título e padrão. Leia a coloração granular, difusa específica (cANCA) ou coloração perinuclear (pANCA). Outros anticorpos detectáveis incluem anticorpos anti-nucleares (ANA), que por vezes podem imitar reacções pANCA. Os padrões ANCA em lâminas fixadas com etanol e formalina estão apresentados no fim do documento.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Nalguns casos, o soro positivo a ANCA poderá também ser muito fraco ou negativo na diluição de despiste inicial (fenómeno pró-zona).

Nesses casos duvidosos o soro deve ser controlado em diluições mais elevadas e, se positivo, determinada a titulação dos anticorpos.

Nalguns casos, a presença de dois ou mais anticorpos num soro os quais sejam reactivos com o mesmo substrato, pode provocar uma interferência na sua detecção por imunofluorescência. Esta interferência pode provocar a falta de detecção de ANCA ou a

PT

supressão do título se o anticorpo de interferência tiver um título superior a ANCA. A causa mais comum do fenómeno de interferência nos testes ANCA é a coexistência de ANA.

Nalguns doentes com Granulomatose de Wegener, os testes ANCA podem ser negativos. Nesses casos, repetir o teste poderá dar resultado positivo. Os doentes com Granulomatose de Wegener em tratamento são invariavelmente negativos a ANCA. Por vezes, as reacções ANA podem ser confundidas com, ou passar por, coloração pANCA. Para confirmar a reactividade pANCA, o soro com reacções pANCA deve ser novamente testado em lâminas fixadas com formalina ou ANA em lâminas HEp-2. As amostras pANCA em substrato ANCA fixadas com formalina devem dar reactividade cANCA, visto que as reacções a ANA devem ser negativas ou permanecer nucleares. Os anticorpos anti-citoqueratina podem dar uma reacção cANCA positiva falsa¹⁵.

Nesses casos, os testes IF indirectos em células HEp-2 podem auxiliar a distinguir uma reacção "pseudo-ANCA" de uma reacção cANCA real.

Os títulos de anticorpos não estão associados necessariamente à actividade da doença. Os resultados do teste ANCA devem ser avaliados de acordo com exames clínicos porque a presença ou ausência de ANCA poderá não estar directamente associada a uma patologia vasculítica.

Os resultados ANCA positivos obtidos por imunofluorescência devem ser confirmados por ELISA. Os ANCA de algumas especificidades de antígenos são mais indicativos de uma patologia vasculítica específica. Para além disso, o ANCA foi associado a problemas imunológicos diferentes de problemas vasculíticos tais como a colite ulcerosa^{7, 8}.

VALORES PREVISTOS

Foram testadas para ANCA sessenta e quatro (64) amostras normais. Todas as amostras foram negativas a ANCA a 1:20 de diluição.

Um ANCA positivo num exame clínico apropriado é útil no diagnóstico de vasculites sistémicas e patologias intestinais inflamatórias⁷⁻¹¹. A coloração cANCA é mais comum na Granulomatose de Wegener e a coloração pANCA em poliangeite microscópica, glomerulonefrite proliferativa pauci-imune e colite ulcerosa⁷⁻¹¹. Noutras vasculites (poliarterite nodosa, doença de Takayasu, arterite das células gigantes, doença de Behcet) os ANCA são raros ou ausentes. A incidência de ANCA na Granulomatose de Wegener e noutras vasculites como indicado pela literatura está resumida na Tabela 1, no fim do documento. No projecto de standardização dos testes colaborativos ANCA europeus, Hagan e os seus colaboradores¹⁶ avaliaram a utilidade do teste de IF indirecta para o diagnóstico de vasculites sistémicas idiopáticas. Neste estudo, descobriu-se que os ANCA estavam presentes em 85% dos doentes com Granulomatose de Wegener, dos quais, 64% eram positivos a cANCA e 21% a pANCA. Os pANCA eram mais prevalentes que os cANCA em poliangeite microscópica (58% contra 23%) com sensibilidade de 81% para a poliangeite microscópica e 82% para a glomerulonefrite rapidamente progressiva idiopática.

Nos controlos de saudáveis e com doença, os ANCA estavam presentes em 19% e 6% respectivamente, evidenciando assim uma especificidade de 76% nos controlos com doença e em 94% de indivíduos saudáveis. (Tabela 2, no fim do documento).

Todavia, o valor preditivo positivo dos testes ANCA é muito melhor e mais significativo se avaliado em combinação com sinais e sintomas clínicos. Num editorial, Jennette Wilmant e Falk¹⁷ registaram um valor preditivo positivo de 92% num doente com creatinina no soro >3 mg/dl. De modo semelhante, em doentes nos quais o valor preditivo positivo é baixo, um resultado ANCA positivo aumenta a probabilidade de uma doença a um nível que poderá justificar uma nova avaliação. Os autores concluem que os testes ANCA em doentes com grande evidência clínica de glomerulonefrite proliferativa pauci-imune é muito útil para substanciar o diagnóstico visto que o teste ANCA, em doentes com reduzidas evidências clínicas, é muito útil para efectuar o diagnóstico.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

O teste de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) foi comparado com outro teste a imunofluorescência indirecta ANCA. A comparação incluiu um total de 129 amostras de soro obtidas de um laboratório de diagnóstico de referência especializado na detecção de doenças auto-imunes. Essas amostras foram testadas de acordo com os métodos aconselhados pelos fabricantes. Os resultados foram os seguintes:

		Immco™		
		Positivo	Negativo	Total
Outro	Positivo	49	0	49
	Negativo	7	73	80
	Total	56	73	129

Especificidade Relativa: 91%

Sensibilidade Relativa: 100%

Concordância Relativa: 95%

Sete amostras discrepantes observadas pelo método de imunofluorescência indirecta acima foram testadas por ELISA para anticorpos a mieloperoxidase (MPO) ou antígenos a proteinase 3 (PR3), os dois antígenos principais associados a ANCA. Destes sete positivos em ELISA e negativos no outro kit de teste, todos, menos um, foram testados positivos por ELISA, sugerindo assim a real positividade destas amostras.

Reactividade cruzada:

Os anticorpos anti-nucleares (ANA) podem exibir reacções positivas em neutrófilos. Para determinar a reactividade em neutrófilos de ANA, a qual pode ser confundida como reactividade ANCA, testámos um total de 25 amostras positivas ANA com especificidades de anticorpos variadas em lâminas com etanol, formalina e COMVI. Todos os soros positivos a ANA com a

PT

excepção das especificidades de anticorpos de SS-A (Ro) e SS-B (La), mostraram reacções nucleares. Estas reacções ANA permanecem nucleares ou tornam-se negativas em lâminas fixadas com formalina.

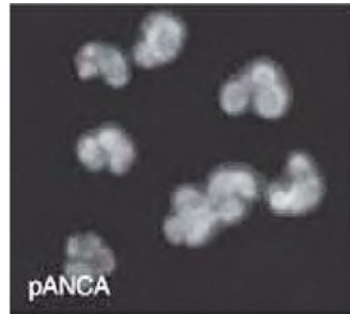
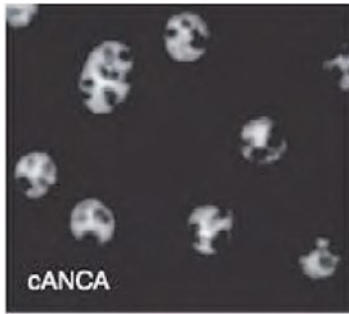
Reprodutibilidade

Foram efectuados alguns estudos para demonstrar a variabilidade intra- e inter-teste. Foram testados quatro soros positivos a ANCA (dois de cada de c e pANCA) e um negativo a ANCA partindo de uma diluição de 1:20 até a um ponto final. Foram testadas em lotes 3 diferentes cada de lâminas de etanol, formalina e COMVI durante quatro dias para determinar intra- e inter-reprodutibilidade. As amostras negativas permaneceram negativas e as amostras positivas deram a titulação prevista.

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Nölle B, Specks U, Luderman J, Rohrbach M, DeRemee RA and Gross WL. Anticytoplasmic antibodies: Their immunodiagnostic value in Wegener's granulomatosis. *Ann Int Med* 111: 28-40, 1989.
2. Venning MC, Quinn A, Broomhead V and Bird AG. Antibodies directed against neutrophils (cANCA and pANCA) are of distinct diagnostic value in systemic vasculitis. *Quart J Med* 77: 1287-1 296, 1990.
3. Van der Woude FJ, Daha MR and Van Es LA. The current status of neutrophil cytoplasmic antibodies. *Clin Exp Immunol* 78: 143-1 48, 1989.
4. Specks U, Wheatley CL, McDonald TJ, Rohbrach MS and DeRemee RA. Anticytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and follow up of Wegener's granulomatosis. *Mayo Clin Proc* 64: 28-36, 1989.
5. Tervert JWC, van der Woude FJ, Fauci AS an Ambrus JL. Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Arch Int Med* 149: 2461-2465, 1989.
6. Cross CE and Lillington GA. Serodiagnosis of Wegener's granulomatosis: Pathobiologic and clinical implications. *Mayo Clin Proc* 64: 119-1 22, 1989.
7. Seibold F, Slametschka D, Gregor X and Weber P. Neutrophil Autoantibodies: A genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterol* 107:532-536, 1994.
8. Claise C, Johanet C, Bouhnik Y et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in autoimmune liver and inflammatory bowel diseases. *Liver* 16:28-34, 1996.
9. Gigase P, DeClerck LS, Van Cotthem KA et al. Anti-Neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease with special attention for IgA-class antibodies. *Dig Dis and Sci* 42:2171 -2174, 1997.
10. Shanahan F. Neutrophil autoantibodies in inflammatory bowel disease: Are they important? *Gastroenterol* 107:586-589, 1994.
11. Shanahan F and Bernstein CN. ANCAs aweigh in colitis. *Gastroenterol* 105:946-947, 1993.
12. Lüdemann J, Utecht B and Gross WL. Laboratory methods for detection of antineutrophil cytoplasm antibodies. *Clin Immunol Newsletter* 10:159-166, 1990.
13. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 3-40, 1987.
14. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Center for Disease Control, National Institute for Health, HHS Pub. No {CDC} 93-8395) 1999.
15. Streicher J, Fabian B, Herkner K et al. Anti-cytokeratins are a potential source of false positive indirect immunofluorescence assays for cANCA. *J Clin Lab Analysis*. 12:54-59, 1998.
16. Hagen CF, Daha MR, Hermand J et al. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney Int* 53:743-753, 1998.
17. Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Diagnostic predictive value of ANCA serology. *Kidney Int* 53:796-798, 1998.

ANCA Reactions on Ethanol Fixed Slides



ANCA Reactions on Formalin Fixed Slides

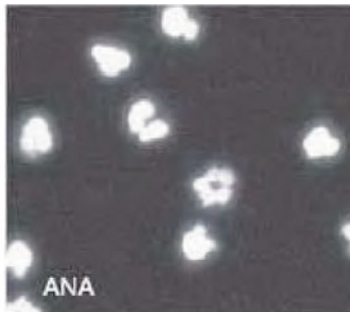
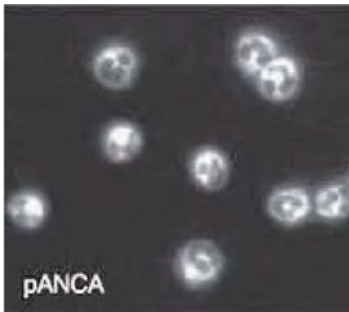


Table 1: Prevalence of ANCA¹

Clinical Condition	% Positive
Wegener's granulomatosis	
Generalized	
Active	96
Partial remission	71
Full remission	41
Local recurrence	80
Localized	
Active	67
Partial remission	54
Full remission	32
Inflammatory Bowel Disorders	
Ulcerative colitis	70
Primary sclerosing cholangitis	82
Crohn's disease*	27
Disease Controls	
Blood Donors	0
Connective tissue	
Autoimmune disorders**	5
Misc. medical conditions	0
Granulomatosis disease	0
Primary renal disease	1

* ANCA titers are usually low ** ANCA Reactivity is pANCA

Table 2: Sensitivity and Specificity of the IF Test in Patients with Systemic Vasculitides (Adapted from Reference 16)

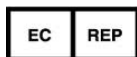
	N	Sensitivity %		
		cANCA	pANCA c or pANCA	
Patients				
Wegener's granulomatosis	97	64	21	85
Microscopic polyangitis	44	23	58	81
Idiopathic RPGN	12	36	45	81
Classical polyarteritis nodosa	10	10	30	40
Churg-Strauss syndrome	6	33	33	66
Specificity %				
Controls				
Disease Controls	184	95	81	76
Healthy controls	740	98	96	94

For technical assistance please contact:



 **IMMCO Diagnostics, Inc.**
10 Earhart Drive
Buffalo, NY 14221-7078 USA
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EMERGO Europe.
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands