



ImmuGlo™ ANTI-NEUTROPHIL CYTOPLASMIC ANTIBODY (ANCA) TEST SYSTEM

For *in vitro* diagnostic use **IVD**

REF	Code: 1116	ANCA Kit (ethanol)	24 Determinations
REF	Code: 1140	ANCA Kit (ethanol)	48 Determinations
REF	Code: 1140-2	ANCA Kit (ethanol)	96 Determinations
REF	Code: 1141	ANCA Kit (formalin)	48 Determinations
REF	Code: 1142	COMVI-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	Code: 1116	ANCA Kit (ethanol)	24 Determinations
REF	Code: 1140	ANCA Kit (ethanol)	48 Determinations
REF	Code: 1140-2	ANCA Kit (ethanol)	96 Determinations
REF	Code: 1141	ANCA Kit (formalin)	48 Determinations
REF	Code: 1142	COMVI-ANCA Kit (ethanol+formalin)	48 Determinations
4 x	SORB SLD 6	6-well Human Neutrophil Substrate Slides [ethanol fixed] (1116), 8 slides (1140), 16 slides (1140-2)	
8 x	SORB SLD 6	6-well Human Neutrophil Substrate Slides [formalin fixed], (1141)	
8 x	SORB SLD 6+6	12-well Human Neutrophil Substrate Slides [6 ethanol/6 formalin] (1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL + ANCA	cANCA Positive Control*, contains human serum with BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL + pANCA	pANCA Positive Control*, contains human serum with BSA (1141, 1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL -	Negative Control*, contains human serum with BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 5.0 ml	IgG-CONJ FITC	Anti-human IgG FITC Conjugate*, contains BSA. Protect from light (1116, 1140, 1141, 1142), 2 vials (1140-2)	
1 x 60 ml	BUF	Sample Diluent*, contains BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
2 vials	BUF WASH	Phosphate Buffered Saline (PBS), Dissolve each vial to 1liter. (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM	Mounting Medium*. Do not freeze (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 12	COVER SLD	Cover slips (1116, 1140, 1141, 1142) 2 x 12 (1140-2)	

Optional materials available from IMMCO

	Cat. N°
6 well Human Neutrophil Substrate Slide (ethanol fixed)	2162
16 well Human Neutrophil Substrate Slide (ethanol fixed)	2162-16
6 well Human Neutrophil Substrate Slide (formalin fixed)	2186
6 + 6 well COMVI Human Neutrophil Substrate Slide (ethanol & formalin fixed)	2189
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

*Caution: contains <0.1% NaN₃

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

- 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. 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 Sample 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 Evans blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may impact the morphology of the neutrophils and 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. Endpoint 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 Sample 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, 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		
		Positive	Negative	Total
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.



ImmuGlo™

DETECTION DES ANTICORPS ANTI CYTOPLASME DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES (ANCA)

IVD

REF	Code: 1116	ANCA Kit (éthanol)	24 Déterminations
REF	Code: 1140	ANCA Kit (éthanol)	48 Déterminations
REF	Code: 1140-2	ANCA Kit (éthanol)	96 Déterminations
REF	Code: 1141	ANCA Kit (formol)	48 Déterminations
REF	Code: 1142	COMVI-ANCA Kit (éthanol+formol)	48 Déterminations

Test par immunofluorescence indirecte pour la recherche et la détermination semi-quantitative des anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) dans le sérum humain. Les ANCA sont mis en évidence dans le sérum de patients atteints de vascularites nécrosantes. En association avec les signes cliniques et 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 polyartérite microscopique, de glomérulonéphrite nécrosante ou à croissants, ainsi que d'autres vascularites ou troubles inflammatoires intestinaux (colite ulcéreuse primaire)¹⁻¹¹. L'image par immunofluorescence indirecte de neutrophiles fixés à l'éthanol montre différents aspects de fluorescence. Parmi ceux-ci on trouve les aspects suivants :

1. L'aspect c-ANCA qui montre une fluorescence cytoplasmique diffuse, caractéristique des autoanticorps dirigés contre les antigènes cytoplasmiques des neutrophiles.
2. L'aspect p-ANCA qui montre une fluorescence périmoléculaire caractéristique des autoanticorps dirigés contre les antigènes neutrophiles
3. Les anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires (ANA) peuvent également montrer une image fluorescente des neutrophiles.

Ces deux types d'ANCA ont une signification différente¹². Les cANCA sont principalement trouvés chez les patients atteints de granulomatose de Wegener et de polyartérite microscopique, tandis que les pANCA sont associés à divers troubles vasculaires comme la colite ulcéreuse (CU), et la cholangite primaire sclérosante (CPS). 80% des patients avec pANCA ont des signes histologiques de vascularites, 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 du test 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 neutrophiles est habituellement réalisée avec de l'éthanol. Avec la fixation à l'éthanol, 2 types d'aspects ont été identifiés: un aspect cytoplasmique (c-ANCA) et un aspect périmoléculaire (p-ANCA). Les réactions de type p-ANCA sont confirmées en renouvelant le test sur des lames fixées au formol. Dans ce cas l'aspect p-ANCA devient c-ANCA tandis que les aspects liés aux ANA restent nucléaires ou deviennent négatifs avec la fixation au formol.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce coffret, le sérum du patient est incubé sur des préparations optimisées de neutrophiles humains, ce qui permet la fixation des autoanticorps avec le substrat. Un lavage 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 fixés de classe IgG. Les réactivités sont

observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert-pomme du cytoplasme avec une image granulaire diffuse (c-ANCA) ou un marquage périnucléaire (p-ANCA) montre la présence d'ANCA. Le titre du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) est alors déterminé par dilutions sériques 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 s'équilibrent à la température ambiante du laboratoire.

Matériel fourni

REF	Code: 1116	ANCA Kit (éthanol)	24 déterminations
REF	Code: 1140	ANCA Kit (éthanol)	48 déterminations
REF	Code: 1140-2	ANCA Kit (éthanol)	96 déterminations
REF	Code: 1141	ANCA Kit (formol)	48 déterminations
REF	Code: 1142	COMVI-ANCA Kit (éthanol+formol)	48 déterminations
4 x	SORB SLD 6	Lames 6 puits de polynucléaires humains fixés à l'éthanol (1116), 8 lames (1140), 16 lames (1140-2)	
8 x	SORB SLD 6	Lames 6 puits de polynucléaires humains fixés au formol, (1141)	
8 x	SORB SLD 6+6	Lames 12 puits de polynucléaires humains fixés à l'éthanol et au formol [6 éthanol/6 formol] (1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL + ANCA	*Contrôle positif cANCA, sérum humain avec de la BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL + pANCA	pANCA Positive Control*, contains human serum with BSA (1141, 1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL -	*Contrôle négatif, sérum humain avec de la BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 5.0 ml	IgG-CONJ FITC	*Conjugué FITC anti-IgG humaines avec de la BSA. Maintenir à l'abri de la lumière (1116, 1140, 1141, 1142), 2 fioles (1140-2)	
1 x 60 ml	BUF	*Diluant sérum, avec de la BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
2 vials	BUF WASH	Tampon phosphate salin (PBS). Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre. (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM	*Milieu de montage. Ne pas congeler (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 12	COVER SLD	Lamelles couvre-lames (1116, 1140, 1141, 1142) 2 x 12 (1140-2)	

Autres réactifs disponibles chez IMMCO

	REF
Lame de polynucléaires humains fixés à l'éthanol 6 puits	2162
Lame de polynucléaires humains fixés à l'éthanol 16 puits	2162-16
Lame de polynucléaires humains fixés au formol 6 puits	2186
Lame COMVI de polynucléaires humains avec une rangée de puits fixés à l'éthanol et une rangée de puits fixés au formol 6+6 puits	2189
Contrôle positif cANCA* 0.5ml, sérum humain avec de la BSA	2252
Contrôle positif pANCA* 0.5ml, sérum humain avec de la BSA	2240

*<0.1% NaN₃

Matériel nécessaire mais non fourni

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipette sérologique
- Bac à coloration pour le lavage des lames
- Petits tubes (ex 13X75 mm) et portoir
- Eau distillée ou déionisée
- Eprouvette 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 trouvé non réactif en antigène 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.

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium. Ce composé peut former avec des canalisations de plomb ou de cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, lors de l'élimination de ces réactifs dans un évier, rincer l'évier à grande eau.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du coffret composants par d'autres provenant d'autres fabricants.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Seuls les sérums peuvent être utilisés dans ce test. Il est recommandé de ne pas les utiliser les sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne pouvant provoquer des interférences avec les performances du test. Conserver les sérums à 2-8°C pendant une semaine au maximum. 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 échantillon fourni (50µl de sérum + 1.0ml de diluant). Ne pas diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des autoanticorps dans le cas où le dépistage sera trouvé positif.
2. Laisser revenir les lames à 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 en chambre humide avec des serviettes papier mouillées pour éviter l'assèchement.
4. Appuyer doucement sur le flacon pour déposer 1 goutte (environ 50µl) de Contrôle Négatif sur le puits #1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif sur les puits #2. Éviter de déborder des puits.
5. Avec une micropipette ou une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Éviter de déborder les puits.
6. Recouvrir la chambre humide et incuber les lames 30 minutes à température ambiante.

7. Sortir une lame de la chambre humide. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette et environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un bécher 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 lame du bac. Eliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Déposer la lame dans la chambre humide. Déposer immédiatement 1 goutte de conjugué dans chaque puits.
 9. Répéter les étapes 7 et 8 avec chaque lame.
 10. Recouvrir la chambre humide et incuber 30 minutes à température ambiante.
 11. Sortir une lame de la chambre humide. Plonger la lame dans un bécher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Si une contre-coloration est souhaitée, ajouter 2-3 gouttes de Bleu d'Evans dans le dernier bain de lavage. Répéter les opérations avec toutes les lames.
- REM: Un lavage incorrect peut altérer la morphologie des neutrophiles et provoquer un bruit de fond de fluorescence.
12. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est 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 à 2-8°C.

B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

Un sérum trouvé positif au test de dépistage doit être retesté en suivant les étapes 5 à 13 afin de définir 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 1ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0.2 ml dans les tubes 2 à 4. Pipetter 50 µl de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0.2 ml du tube 1 dans le tube suivant et après agitation répéter la même opération pour les tubes suivants comme indiqué dans le tableau ci-dessous:

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

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne donne pas d'image fluorescente sur les neutrophiles, tandis qu'avec le contrôle positif on obtient, sur lames fixées à l'éthanol, une fluorescence 2+ ou supérieure du cytoplasme des neutrophiles, dans le cas d'un contrôle cANCA et périmoléculaire dans le cas d'un contrôle pANCA. Sur lames fixées au formol, l'aspect du contrôle cANCA reste cytoplasmique tandis que celui du pANCA se modifie en aspect 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 rendus négatifs (<20), ou positifs avec le titre et l'aspect de fluorescence.

Préciser s'il s'agit d'une fluorescence spécifique, cytoplasmique (cANCA) ou périnucléaire (pANCA).

Certains autres autoanticorps, comme les anticorps antinucléaires (ANA), donnent parfois des réactions similaires aux pANCA.

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 ce cas, préparer les dilutions en série de l'échantillon et déterminer le titre de l'anticorps.

Parfois la présence de deux ou plus autoanticorps différents dans le sérum peut créer des interférences en immunofluorescence. Cela peut masquer la détection de l'ANCA ou cacher le titre si 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 peut être trouvé négatif. Un contrôle réalisé ultérieurement, peut montrer une positivité du sérum. Les sérums de patients atteints de 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 pANCA. Pour confirmer la réactivité pANCA, les sérums doivent être retestés sur lames fixées au formol ou sur lames HEp2 pour les ANA. Les échantillons pANCA sur lames fixées au formol donnent une image cANCA, tandis que les ANA sur ces mêmes lames donnent une image négative ou nucléaire. Les anticorps anti-cytokératine peuvent donner une réaction type cANCA¹⁵. Le test sur cellules HEp2 permet alors de distinguer les réactions «pseudo-ANCA» des vrais cANCA.

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 vascularite.

Les résultats ANCA positifs en immunofluorescence doivent être confirmés par une technique ELISA. Certaines spécificités antigéniques sont préférentiellement associées à un type de vascularites. Par ailleurs des ANCA sont retrouvés dans le sérum de patients atteints de désordres immunologiques autres que les vascularites, 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 au 1:20.

Un résultat ANCA positif est utile pour le diagnostic des vascularites et maladies inflammatoires intestinales^{7,11}. L'aspect cANCA est fréquemment associé à la maladie de Wegener et l'aspect pANCA à la micropolyangéite, à la glomérulonéphrite idiopathique à croissant et à la rectocolite hémorragique^{7,11}. Dans d'autres vascularites (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 cANCA et 21% pANCA. Les pANCA sont plus fréquents que les cANCA dans la polyangéite microscopique (58% et 23%) avec une sensibilité de 81% dans la polyangéite microscopique et de 82% dans la glomérulonéphrite idiopathique à croissant.

La spécificité des ANCA est de 76% dans le groupe contrôle de malades et de 94% dans la population normale (Table 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 de vascularites.

PERFORMANCES

Le test ANCA, Anticorps Anti-Cytoplasme des polynucléaires Neutrophiles, 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 autoanticorps 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:

AUTRE METHODE	IMMCO		Total
	Positifs	Négatifs	
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 myélopéroxydase (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 avec différentes spécificités ont été testés sur les lames fixées à l'éthanol, au formol et les lames COMVI. Avec tous les sérums, à l'exception des spécificités SS-A(Ro) et SS-B (La), on observe une image nucléaire. Cette image est conservée ou disparaît sur les lames fixées au formol.

Reproductibilité:

Des études ont été réalisées pour définir la répétabilité intra-essai et la reproductibilité inter-essai. Quatre sérums ANCA positifs (deux cANCA et deux pANCA) 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. Dans tous les cas, le sérum négatif et les sérums positifs ont donné les résultats attendus.



ImmuGlo™

TEST DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CITOPASMÁTICOS ANTINEUTRÓFILOS (ANCA)

IVD

REF	Code: 1116	ANCA Kit (etanol)	24 detecciones
REF	Code: 1140	ANCA Kit (etanol)	48 detecciones
REF	Code: 1140-2	ANCA Kit (etanol)	96 detecciones
REF	Code: 1141	ANCA Kit (formalina)	48 detecciones
REF	Code: 1142	COMVI-ANCA Kit (etanol+formalina)	48 detecciones

Test de detección de inmunofluorescencia indirecta para la detección y semicuantificación de los anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA) en el suero humano. Se detectan ANCA en el suero de pacientes con vasculitis necrotizantes y, por tanto, este ensayo ayuda a diagnosticar, en COMVINACIÓN con los hallazgos clínicos y otros datos de laboratorio, dichos trastornos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los ANCA se producen en pacientes con granulomatosis de Wegener, poliarteritis microscópica, glomerulonefritis semilunar necrotizante, otras vasculitis y trastornos inflamatorios del intestino (fundamentalmente colitis ulcerosa)^{1,11}. La tinción de inmunofluorescencia indirecta de los neutrófilos fijados con etanol puede mostrar diferentes tipos de patrones de tinción fluorescente. Estos patrones son:

1. Anticuerpos frente a los antígenos citoplasmáticos de los neutrófilos que originan una tinción citoplasmática difusa (cANCA).
2. Anticuerpos frente a los antígenos de los neutrófilos que producen un patrón de reacción perinuclear (pANCA)
3. Anticuerpos habituales frente a los antígenos nucleares (ANA)

La significación de esos dos tipos de ANCA es diferente¹². Los anticuerpos cANCA se encuentran fundamentalmente en pacientes con granulomatosis de Wegener y la poliarteritis microscópica, mientras que pANCA se produce en diferentes trastornos vasculíticos, la colitis ulcerosa (CU) y la colangitis esclerosante primaria (CEP). El 80% de los pacientes con pANCA tienen hallazgos histológicos de vasculitis, CU o CEP. Se detectan anticuerpos ANCA en más del 90% de los pacientes con una granulomatosis de Wegener generalizada y en el 67% de los pacientes con una enfermedad activa limitada.

La incidencia de ANCA varía en pacientes con una remisión clínica. Los pacientes con una granulomatosis de Wegener activa pueden ser ocasionalmente ANCA negativos. Sin embargo, en dichos casos, la repetición de los ensayo produce reacciones positivas de ANCA¹. El método de microscopia de inmunofluorescencia indirecta es el método de referencia para la detección de ANCA. La fijación del antígeno de los neutrófilos se efectúa habitualmente con etanol. Con la fijación en etanol se identifican dos tipos de patrones de la reacción de tinción de ANCA: patrón citoplasmático (cANCA) y perinuclear (pANCA). Las reacciones pANCA pueden confirmarse mediante ensayos repetidos en portaobjetos fijados con formalina, en los que las reacciones de pANCA se convierten en cANCA; por el contrario, con la fijación con formalina las reacciones ANA siguen siendo nucleares o se negativizan.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Para la realización del método de inmunofluorescencia indirecta de este equipo tiene que incubarse el suero de los pacientes en preparaciones óptimas de neutrófilos humanos y, de este modo, permitir que los anticuerpos puedan unirse al sustrato. Cualquier anticuerpo no unido se elimina mediante lavado del portaobjetos. Los anticuerpos unidos de la clase IgG se detectan mediante incubación del sustrato con un conjugado de IgG antihumano marcado con fluoresceína. Las

reacciones se visualizan en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados. La presencia de ANCA se demuestra mediante la presencia de fluorescencia de color verde manzana en el citoplasma, con una tinción granular citoplasmática difusa (cANCA) o una tinción perinuclear (pANCA). Posteriormente se determina el título (valor recíproco de la mayor dilución que origina una reacción positiva) mediante diluciones seriadas¹³.

INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

Almacenamiento y preparación

Almacenar todos los reactivos a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos pueden emplearse después de haber sido equilibrados a temperatura ambiente.

Materiales suministrados

REF	Code: 1116	ANCA Kit (etanol)	24 detecciones
REF	Code: 1140	ANCA Kit (etanol)	48 detecciones
REF	Code: 1140-2	ANCA Kit (etanol)	96 detecciones
REF	Code: 1141	ANCA Kit (formalina)	48 detecciones
REF	Code: 1142	COMVI-ANCA Kit (etanol+formalina)	48 detecciones
4 x	SORB SLD 6	Portaobjetos de 6 pocillos con sustrato de neutrófilos humanos (fijados con etanol) (1116), 8 portaobjetos (1140), 16 portaobjetos (1140-2)	
8 x	SORB SLD 6	Portaobjetos de 6 pocillos con sustrato de neutrófilos humanos (fijados con formalina), (1141)	
8 x	SORB SLD 6+6	Portaobjetos de 12 pocillos con sustrato de neutrófilos humanos (fijados con etanol/formalina) [6 etanol/6 formalina] (1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL + ANCA	Control positivo de cANCA*, suero humano con BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL + pANCA	Control positivo de pANCA*, suero humano con BSA (1141, 1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL -	Control negativo*, suero humano con BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 5.0 ml	IgG-CONJ FITC	AConjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC)- IgG anti humana* con BSA. Proteger de la luz (1116, 1140, 1141, 1142), 2 frascos (1140-2)	
1 x 60 ml	BUF	Diluyente de la muestra* con BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
2 vials	BUF WASH	Fosfato salino tamponado (PBS). Disolver cada vial en 1 litro (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM	Medio de preparación*. No congelar (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 12	COVER SLD	Cubreobjetos (1116, 1140, 1141, 1142) 2 x 12 (1140-2)	

Materias opcionales comercializados por IMMCO

		REF
6 pocillos	Portaobjetos con sustrato de neutrófilos humanos (fijados en etanol)	2162
16 pocillos	Portaobjetos con sustrato de neutrófilos humanos (fijados en etanol)	2162-16
6 pocillos	Portaobjetos con sustrato de neutrófilos humanos (fijados en formalina)	2186
1 x 0,5 ml	Control positivo de cANCA*, suero humano con BSA	2252
1 x 0,5 ml	Control positivo de pANCA*, suero humano con BSA	2240
6+6 pocillos	Portaobjetos con sustrato de neutrófilos humanos COMVI (fijados en etanol y formalina)	2189

* Precaución: contiene < 0,1% de NaN₃

Material necesario, pero no suministrado

Microscopio de fluorescencia

Micropipetas o pipeta Pasteur

Pipetas serológicas

Placa de tinción (por ejemplo, frasco de Coplin)

Tubos de ensayo pequeños (por ejemplo, 13 x 75 mm) y gradilla de tubos de ensayo

Agua destilada o desionizada

Envase de 1 litro

Frasco de lavado

Toallas de papel

Cámara de incubación

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*. Todos los componentes de derivados sanguíneos humanos han sido ensayados respecto a la presencia de HbsAg, VHC, VIH-1 y 2 y el virus linfotropo de células T humanas (VLTH-I), siendo negativos en los ensayos necesarios según la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos). Todas las muestras de suero y los derivados sanguíneos humanos deben tratarse como un material potencialmente peligroso, independientemente de su origen. En consecuencia, deben seguirse unas prácticas de laboratorio adecuadas durante el almacenamiento, dispensación y eliminación de dicho material¹⁴.

PRECAUCIÓN - La azida sódica (NaN_3) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas muy explosivas. Después y desechar los líquidos, es necesario lavar con un volumen grande de agua para evitar la acumulación de azida. La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere. En caso de ingestión, notificarlo inmediatamente al director del laboratorio o al centro toxicológico.

Para poder garantizar la obtención de resultados válidos, deben seguirse de forma exacta las instrucciones indicadas en este prospecto. No intercambiar componentes del equipo por otros diferentes que no tengan el mismo número de catálogo de IMMCO. No utilizar este equipo después de la fecha de caducidad.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para la realización de esta determinación sólo debe utilizarse suero. Las muestras con hemólisis macroscópica, lipémicas o contaminadas por microorganismos pueden interferir en el funcionamiento del ensayo y, por tanto, no deben ser utilizadas. Almacenar las muestras a una temperatura de 2-8°C durante un período no superior a una semana. Cuando se desee un almacenamiento más prolongado, el suero debe congelarse a una temperatura de -20°C. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

PROCEDIMIENTO

Método de ensayo

A. Detección sistemática

1. Diluir 1:20 el suero de cada paciente con el diluyente de la muestra suministrado (50 µl de suero + 1,0 ml del diluyente). No diluir los Controles Positivo o Negativo. Guardar el suero no diluido para la determinación del título de anticuerpos si los resultados son positivos.
2. Permitir que los pocillos de los portaobjetos que contienen el substrato se equilibren a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraer con cuidado los portaobjetos sin tocar el substrato.
3. Etiquetar los portaobjetos y colocarlos en una cámara de incubación cubierta con toallas de papel humedecidas con agua para evitar la desecación.

4. Invertir el vial cuentagotas y presionar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 μ l) del Control Negativo en el pocillo nº 1. De forma similar, aplicar una gota del Control Positivo en el pocillo nº 2. Evitar llenar demasiado los pocillos.
5. Con el empleo de una micropipeta o una pipeta Pasteur, colocar 1 gota del suero diluido del paciente (aproximadamente 50 μ l) en los restantes pocillos. Evitar llenar demasiado los pocillos.
6. Tapar la cámara de incubación e incubar los portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Quitar la tapa de la cámara de incubación. Coger el portaobjetos por el extremo y lavar suavemente con 10 ml de PBS mediante el empleo de una pipeta o lavar el portaobjetos en un vaso de precipitado lleno de PBS. No emplear un frasco de lavado. Transferir inmediatamente el portaobjetos al frasco de Coplin y dejarlo durante 10 minutos. Repetir el proceso con todos los portaobjetos restantes.
8. Extraer el portaobjetos del frasco de Coplin. Secar el extremo del portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Colocar el portaobjetos en la cámara de incubación, Invertir inmediatamente el vial cuentagotas del Conjugado y apretar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 μ l) en cada pocillo.
9. Repetir las etapas 7 y 8 con cada portaobjetos.
10. Tapar la cámara de incubación. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraer el portaobjetos del incubador. Sumergir el portaobjetos en un vaso de precipitado con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Colocar el portaobjetos en una cubeta de tinción llena con PBS durante 10 minutos. Al final del lavado puede añadirse, si se desea, 2-3 gotas de colorante de contraste azul de Evans. Repetir el proceso con los portaobjetos restantes. NOTA: un lavado inadecuado puede repercutir en la morfología de los neutrófilos y puede originar un incremento de la fluorescencia de fondo.
12. Extraer el portaobjetos de la cubeta de tinción. Secar el portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Para evitar que se seque el portaobjetos, realizar inmediatamente, mientras el portaobjetos todavía está húmedo, el proceso descrito en el apartado 13.
13. Añadir 1 gota del Medio de Preparación en cada pocillo y colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos. Evitar la aplicación de una presión excesiva y el movimiento lateral del cubreobjetos
14. Repetir las etapas 12 y 13 con cada portaobjetos.
15. Examinar el desarrollo de fluorescencia específica en un microscopio de fluorescencia a 200x o más aumentos.

Los portaobjetos pueden leerse al terminar su preparación. Sin embargo, debido a que el medio de preparación contiene un agente antidestefimiento, puede retrasarse la lectura durante un período de hasta 48 horas sin que se produzca una pérdida significativa de la intensidad de la tinción. Los portaobjetos deben almacenarse en la oscuridad a una temperatura de 2-8°C.

B. Determinación del punto de valoración (titulación)

Los sueros positivos durante el ensayo pueden valorarse de forma adicional, etapas 6 - 15, para determinar su titulación. Cada ensayo debe incluir un control positivo y negativo. Realizar diluciones seriadas dobles a partir de 1:20. El título es el valor recíproco de la dilución más elevada que produzca una reacción positiva.

Preparación de las diluciones seriadas

Numerar cuatro tubos del 1 al 4. Añadir 1,0 ml del diluyente de la muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 4. Pipetear 0,05 ml del suero no diluido en el tubo 1 y mezclar

minuciosamente. Transferir 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezclar meticulosamente. Continuar transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente tras la mezcla y, de este modo, conseguir las diluciones ilustradas 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
		↘	↘	↘
Transferencia		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 serie de ensayos debe incluirse un control positivo y negativo. El control negativo no debe mostrar fluorescencia específica de los neutrófilos; por el contrario, el control positivo de los portaobjetos fijados con etanol debe tener una intensidad de tinción igual o superior a 2+ del citoplasma de los neutrófilos con el control positivo de cANCA y la zona perinuclear con el control positivo de pANCA.

En los portaobjetos fijados con formalina, el control positivo de cANCA sigue siendo citoplasmático, mientras que la reacción pANCA pasará a ser citoplasmática. Cuando no se obtienen los resultados esperados, debe repetirse el ensayo. Los resultados anómalos con los controles pueden producirse por:

- Turbidez. Desechar y utilizar otro control.
- Problemas del sistema óptico del microscopio de fluorescencia. Estos problemas pueden incluir un alineamiento inadecuado, una lámpara con fecha posterior a la esperanza de vida útil, etc.
- Secado del portaobjetos durante el procedimiento.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de los ensayos de determinación de ANCA deben documentarse como negativos (< 20) o positivos con título y patrón

Efectuar una lectura de la tinción citoplasmática granular, difusa y específica (cANCA) o una tinción perinuclear (pANCA).

Es posible detectar también anticuerpos antinucleares (ANA), que en algunas ocasiones pueden simular reacciones similares a las de pANCA. En el extremo del documento se muestran los patrones de ANCA en portaobjetos fijados con etanol y formalina.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En algunos casos, el suero positivo de ANCA puede ser muy débil o negativo en la dilución inicial del ensayo (fenómeno prozona). En dichos casos dudosos, debe efectuarse el ensayo con diluciones superiores, y en los casos positivos, debe determinarse el título.

En algunos casos, la presencia de dos o más anticuerpos en el suero que reaccionan con el mismo sustrato puede originar una interferencia de su detección mediante inmunofluorescencia. Esta interferencia puede impedir la detección de ANCA u originar una supresión si el título del anticuerpo de interferencia tiene un título superior al de ANCA. La causa más habitual del fenómeno de interferencia en los ensayos ANCA es la coexistencia de ANA.

En algunos pacientes con una granulomatosis de Wegener, los ensayos ANCA pueden ser negativos. En dichos casos, la repetición de los ensayos puede producir resultados positivos. Los pacientes con granulomatosis de Wegener que reciben tratamiento son siempre negativos respecto a ANCA.

Las reacciones ANA pueden, en algunas ocasiones, confundirse o simular una tinción pANCA. Para confirmar la reactividad pANCA, los sueros de las reacciones pANCA deben ensayarse de nuevo en portaobjetos fijados con formalina, o para la valoración de ANA en portaobjetos HEP-2.

Las muestras de pANCA en formalina con un sustrato ANCA fijado deben producir una reactividad cANCA, mientras que las reacciones a ANA deben ser negativas o seguir siendo nucleares. Los anticuerpos anticitocqueratina pueden dar lugar a una reacción falsa positiva de cANCA¹⁶. En dichos casos, los ensayos de IF indirecta en células HEP-2 puede permitir distinguir entre un resultado "pseudo-ANCA" y una reacción cANCA verdadera. Los títulos de anticuerpos no se asocian necesariamente con actividad de la enfermedad. Los resultados de los ensayos ANCA deben ser valorados en conjunción con los hallazgos clínicos, debido a que la presencia o ausencia de ANCA puede no asociarse directamente con un trastorno de vasculitis.

Los resultados positivos de ANCA obtenidos mediante inmunofluorescencia deben ser confirmados mediante la técnica ELISA. Los ANCA de ciertas especificidades antigénicas son más indicativos de un trastorno vasculítico específico. Asimismo, la presencia de ANCA se ha asociado con alteraciones inmunológicas diferentes a los trastornos de vasculitis, como una colitis ulcerosa^{7,8}.

VALORES ESPERADOS

Se han ensayado sesenta y cuatro (64) muestras normales respecto a ANCA. Todas las muestras originaron resultados negativos de ANCA a una dilución 1:20.

La existencia de valores positivos de ANCA, dentro de un marco clínico adecuado, es una valoración útil para el diagnóstico de vasculitis sistémicas y trastornos inflamatorios del intestino⁷⁻¹¹. La tinción cANCA se produce más habitualmente en la granulomatosis de Wegener y la tinción pANCA en la poliangitis microscópica, glomerulonefritis semilunar con depresión inmunológica y la colitis ulcerosa⁷⁻¹¹. En otras vasculitis (poliarteritis nodosa, enfermedad de Takayasu, arteritis de células gigantes, enfermedad de Behcet), la presencia de ANCA es muy poco frecuente o nula. En la Tabla 1 (en el extremo del documento) se resume la incidencia de ANCA, según la literatura, en la granulomatosis de Wegener y otras vasculitis. En el proyecto europeo de estandarización del ensayo ANCA, Hagan y colaboradores¹⁰ valoraron la utilidad diagnóstica del ensayo de IF indirecta en la vasculitis idiopática sistémica. En este estudio se observó que ANCA estaba presente en el 85% de los pacientes con una granulomatosis de Wegener, de los que el 64% eran positivos para cANCA y el 21% para pANCA. La prevalencia de pANCA fue superior a la de cANCA en la poliangitis microscópica (58% versus 23%), con una sensibilidad del 81% para la poliangitis microscópica y el 82% de la glomerulonefritis idiopática rápidamente progresiva. La positividad de ANCA en controles de enfermedad y controles sanos fue del 10% y 6%, respectivamente, con una especificidad del 76% en el control de la enfermedad y un 94% en individuos sanos. (Tabla 2 en el extremo del documento). Sin embargo, el valor predictivo positivo de los ensayos de ANCA es mucho mejor y más significativo cuando los resultados se valoran en conjunción con los signos y síntomas clínicos. En un trabajo, Jennette Wilmant y Falk¹⁷ documentaron la existencia de un valor predictivo positivo del 92% en pacientes con niveles séricos de creatinina > 3 mg/dl. De forma similar, en pacientes en los que el valor predictivo positivo inicial es bajo, un resultado positivo de ANCA aumenta la probabilidad de presencia de la enfermedad hasta un nivel que justifica la realización de una valoración adicional. Los autores concluyen que la realización de ensayos de valoración de ANCA en pacientes con hallazgos clínicos importantes de glomerulonefritis semilunar con depresión inmunológica es más útil para confirmar el diagnóstico, mientras que los ensayos ANCA de pacientes con hallazgos clínicos débiles es más útil para descartar el diagnóstico.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL FUNCIONAMIENTO

El ensayo de anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA), se ha comparado con otro ensayo ANCA de inmunofluorescencia indirecta. La comparación se llevó a cabo en un

total de 129 muestras de suero obtenidas de laboratorios de referencia especializados en la detección de enfermedades autoinmunes. Estas muestras se ensayaron según los procedimientos recomendados por los fabricantes. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

		IMMCO		
		Positivo	Negativo	Total
otro método	Positivo	49	0	49
	Negativo	7	73	80
	Total	56	73	129

Especificidad relativa: 91%

Sensibilidad relativa: 100%

Concordancia relativa: 95%

Se produjeron resultados discrepantes en 7 muestras valoradas mediante el método de inmunofluorescencia indirecta previamente mencionado; estas muestras se ensayaron mediante el método ELISA para valorar la presencia de anticuerpos con el antígeno de mieloperoxidasa (MPO) o proteinasa 3 (PR3), los dos principales antígenos asociados con ANCA. De las siete muestras con resultados positivos con ELISA y negativos con los otros equipos de ensayo, todas, excepto una, produjeron positivos con ELISA; por tanto, estos datos sugieren la positividad real de dichas muestras.

Reactividad cruzada:

Los anticuerpos antinucleares (ANA) pueden mostrar reacciones positivas en los neutrófilos. Para determinar las reactividades sobre los neutrófilos de ANA, que pueden confundirse con la reactividad de ANCA, se han ensayado en portaobjetos fijados con etanol, formalina y COMVI un total de 25 muestras positivas para ANA con diferentes especificidades de anticuerpos. Todos los sueros positivos para ANA, con la excepción de las especificidades de los anticuerpos 88-A (Ro) y 88-B (La), mostraron reacciones nucleares. Estas reacciones ANA siguieron siendo nucleares o pasaron a ser negativas en los portaobjetos fijados con formalina.

Reproducibilidad:

Se han realizado estudios para demostrar la variabilidad intraensayo e interensayo. Se ensayaron cuatro sueros ANCA positivos (dos de cANCA y dos de pANCA) y un suero ANCA negativo desde una dilución inicial de 1:20 hasta el criterio de valoración. Para poder determinar la reproducibilidad intraensayo e interensayo, estas muestras se ensayaron con 3 lotes diferentes, cada una en portaobjetos fijados con etanol, formalina y COMVI, durante cuatro días. Las muestras negativas siguieron siendo negativas y las positivas originaron el título esperado.



ImmuGlo™ TESTSYSTEM FÜR ANTINEUTROPHILE ZYTOPLASMATISCHE AUTOANTIKÖRPER (ANCA)

IVD

REF	Bestellnummer 1116	ANCA Kit (<i>Ethanol</i>)	24 Determinations
REF	Bestellnummer 1140	ANCA Kit (<i>Ethanol</i>)	48 Determinations
REF	Bestellnummer 1140-2	ANCA Kit (<i>Ethanol</i>)	96 Determinations
REF	Bestellnummer 1141	ANCA Kit (<i>Formalin</i>)	48 Determinations
REF	Bestellnummer 1142	COMVI-ANCA Kit (<i>Ethanol+Formalin</i>)	48 Determinations

Für den Nachweis und die semiquantitative Bestimmung von antineutrophilen zytoplasmatischen Autoantikörpern (ANCA) mit der indirekten Immunfluoreszenz. ANCA kommen im Serum von Patienten mit nekrotisierenden Vaskulitiden vor und bieten folglich neben dem klinischen Befund und anderen Labordaten eine Hilfestellung bei der Diagnose dieser Krankheiten.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

ANCA kommen bei Patienten mit der Wegenerschen Granulomatose, mikroskopischen Polyangiitis, nekrotisierenden oder halbmondförmigen Glomerulonephritis, anderen Vaskulitiden and chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (vorrangig Colitis ulcerosa) vor^{1,11}. Mit der indirekten Immunfluoreszenz an ethanolfixierten humanen Granulozyten werden unterschiedliche Fluoreszenzmuster beobachtet:

1. Eine diffuse zytoplasmatische Fluoreszenz erzeugt durch Autoantikörper gegen Antigene im Zytoplasma neutrophiler Granulozyten (cANCA).
2. Eine perinukleäre Fluoreszenz erzeugt durch Autoantikörper gegen perinukleäre Antigene neutrophiler Granulozyten (pANCA).
3. Eine Fluoreszenz des Zellkerns erzeugt durch Autoantikörper gegen Antigene des Zellkerns (ANA)

Die zwei ANCA-Typen haben unterschiedliche Bedeutung¹². cANCA werden vor allem bei Patienten mit der Wegenerschen Granulomatose und der mikroskopischen Polyangiitis beobachtet, während pANCA bei verschiedenen Vaskulitiden, Colitis ulcerosa (CU) und der primären sklerosierenden Cholangitis (PSC) vorkommen. Achzig Prozent aller Patienten, bei denen pANCA nachweisbar sind, haben eine histologisch abgesicherte Vaskulitis, CU oder PSC. ANCA kommen bei mehr als 90% der Patienten mit aktiver generalisierter Wegenerscher Granulomatose und bei 67% der Patienten mit aktiver lokalisierter Erkrankung vor. Die Häufigkeit von ANCA schwankt bei Patienten in klinischer Remission. Hin und wieder können Patienten mit aktiver Wegenerscher Granulomatose ANCA-negativ sein. Bei wiederholter Untersuchung sollten diese Fälle jedoch eine positive ANCA-Reaktion zeigen. Die indirekte Immunfluoreszenz gilt als Goldstandard zum Nachweis von ANCA. Normalerweise wird das Antigensubstrat (die Granulozyten) in Ethanol fixiert. An ethanolfixierten Präparaten sind zwei ANCA-Fluoreszenzmuster erkennbar: zytoplasmatisch (cANCA) and perinukleär (pANCA). Die pANCA-Reaktion kann durch Nachuntersuchung an formalinfixierten Präparaten bestätigt werden, wobei sich anstelle der pANCA-Reaktion ein cANCA-Muster zeigt, während ANA-Reaktionen auch nach Formalinfixierung bestehen bleiben oder negativ werden.

TESTPRINZIP

Bei dem in diesem Test eingesetzten indirekten Immunfluoreszenzverfahren werden Patientenseren mit optimal präparierten humanen neutrophilen Granulozyten inkubiert, um die Bindung von in den Seren vorhandenen Autoantikörpern an die Zellen zu ermöglichen. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Gebundene Antikörper vom Typ IgG werden durch Inkubation der Zellen mit Fluorescein-markiertem anti-Human-IgG nachgewiesen. Das Reaktionsmuster wird unter einem Fluoreszenzmikroskop bewertet,

das mit den entsprechenden Filtern ausgerüstet ist. Das Vorhandensein von ANCA zeigt sich durch eine apfelgrüne entweder diffus im Zytoplasma verbreitete (cANCA) oder perinukleär angesiedelte (pANCA) Fluoreszenz. Anschließend kann der Titer (der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion zeigt) durch die Untersuchung einer Reihenverdünnung bestimmt werden¹³.

PRODUKTINFORMATION

Lagerung und Handhabung

Alle Reagenzien sind bei 2-8°C zu lagern. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig, nachdem sie auf Raumtemperatur gebracht wurden.

Geliefertes Material

REF	Code: 1116	ANCA Kit (ethanol)	24 Determinationen
REF	Code: 1140	ANCA Kit (ethanol)	48 Determinationen
REF	Code: 1140-2	ANCA Kit (ethanol)	96 Determinationen
REF	Code: 1141	ANCA Kit (formalin)	48 Determinationen
REF	Code: 1142	COMVI-ANCA Kit (ethanol+formalin)	48 Determinationen
4 x	SORB SLD 6	Objektträger zu 6 Auftragstellen beschichtet mit humanen neutrophilen Granulozyten (ethanolfixiert) (1116), 8 Objektträger (1140), 16 Objektträger (1140-2)	
8 x	SORB SLD 6	Objektträger zu 6 Auftragstellen beschichtet mit humanen neutrophilen Granulozyten (formalinfixiert), (1141)	
8 x	SORB SLD 6+6	Objektträger zu 6 Auftragstellen beschichtet mit humanen neutrophilen Granulozyten (ethanol/formalinfixiert) [6 ethanol/6 formalin] (1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL + ANCA	cANCA Positive Kontrolle*, Humanserum mit BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL + pANCA	pANCA Positive Kontrolle*, Humanserum mit BSA (1141, 1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL -	Negative Kontrolle*, Humanserum mit BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 5.0 ml	IgG-CONJ FITC	FITC-Konjugat, Anti-Human-IgG* mit BSA. Lichtgeschützt aufbewahren (1116, 1140, 1141, 1142), 2 Fläschchen (1140-2)	
1 x 60 ml	BUF	Probendiluent* mit BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
2 vials	BUF WASH	Phosphatgepuffertes Kochsalz (PBS). Inhalt eines Fläschchens in 1 Liter auflösen (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM	Eindeckmittel*. Nicht einfrieren (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 12	COVER SLD	Deckgläschen (1116, 1140, 1141, 1142) 2 x 12 (1140-2)	

Zusätzliche Materialien im Lieferprogramm von IMMCO

		REF
6 Auftragstellen	Objektträger mit humanen Granulozyten (ethanolfixiert)	2162
16 Auftragstellen	Objektträger mit humanen Granulozyten (ethanolfixiert)	2162-16
6 Auftragstellen	Objektträger mit humanen Granulozyten (formalinfixiert)	2186
1 x 0,5 ml	cANCA Positive Kontrolle*, Humanserum mit BSA	2252
1 x 0,5 ml	pANCA Positive Kontrolle*, Humanserum mit BSA	2240
6 + 6 Auftragstellen	COMVI-Objektträger mit humanen Granulozyten (ethanol/formalinfixiert)	2189

* Vorsicht : enthält <0.1% NaN₃

Zusätzlich benötigtes Material

- Fluoreszenzmikroskop
- Mikropipetten oder Pasteurpipetten
- Kolbenhubpipette
- Färbetrog (z.B. nach Coplin)
- Kleine Reagenzröhrchen (z.B. 12x75 mm) und dazu passende
- Gestelle
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- Behälter, 1 Liter
- Papierhandtücher
- Feuchte Kammer

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für In-vitro-Diagnostik. Alle Bestandteile menschlichen Ursprungs wurden auf das Vorhandensein von HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV-1/HIV-2 und Anti-HTLV-1 mit FDA-zugelassenen Tests untersucht und für negativ befunden. Alle Humanseren und Produkte menschlichen Ursprungs sollten ungeachtet ihrer Herkunft als potentiell gefährlich gehandhabt werden. Diese Materialien und ihre Behältnisse sind nach geltenden Vorschriften und Richtlinien zu lagern und zu beseitigen¹⁴.

ACHTUNG - Natriumazid (NaN_3) kann mit Kupfer und Blei in Leitungen und Lötstellen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren. Um eine Bildung solcher Metallazide zu vermeiden, müssen Ausgüsse nach dem Ausgießen azidhaltiger Lösungen mit reichlich Wasser gespült werden. Natriumazid kann beim Verschlucken giftig sein. Fälle von Verschlucken sofort dem Laborleiter oder der Giftzentrale melden.

Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, ist das Testprotokoll unbedingt einzuhalten. Falls Kitreagenzien ersetzt werden müssen, sollten nur Artikel von IMMCO der gleichen Artikelnummer verwendet werden. Keine verfallenen Reagenzien verwenden.

PROBENGEWINNUNG UND HANDHABUNG

Bei diesem Verfahren sollte nur Serum verwendet werden. Deutlich hämolytische, lipämische oder mikrobiell kontaminierte Proben können die Leistung dieses Tests beeinträchtigen und sollten daher nicht verwendet werden. Proben sollten nicht länger als eine Woche bei 2-8 °C gelagert werden. Bei längerer Lagerung sollten sie bei -20°C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Testmethode

A. Screening

1. Jedes Patientenserum mit dem Probendiluent aus dem Kit 1:20 (50 ml Serum + 1000 µl Diluent) verdünnen. Die positiven und negativen Kontrollen nicht verdünnen. Die unverdünnten Nativseren aufbewahren, um bei positivem Suchtestergebnis gegebenenfalls den Antikörpertiter bestimmen zu können.
2. Beutel mit den beschichteten Objektträgern auf Raumtemperatur bringen (10-15 Minuten). Objektträger vorsichtig entnehmen, ohne die Beschichtung zu berühren.
3. Objektträger beschriften und, um ein Austrocknen der Beschichtung zu verhindern, in eine feuchte Kammer legen.
4. Von den Tropffläschchen mit der Negativen und Positiven Kontrolle jeweils 1 Tropfen (etwa 50 µl) auf die Auftragstellen #1 bzw. #2 ausdrücken. Auftragstellen nicht überfüllen.
5. Mit einer Mikro- oder Pasteurpipette 1 Tropfen verdünntes Patientenserum (etwa 50 µl) auf die weiteren Auftragstellen geben. Auftragstellen nicht überfüllen.

6. Die Objektträger in der abgedeckten feuchten Kammer 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Jeweils einen Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und sorgfältig mit ca. 10 ml PBS aus einer Pipette spülen; alternativ Objektträger in einem Becher mit PBS spülen. Keine Spritzflasche verwenden. Objektträger sofort in einen Färbetrog mit PBS für 10 Minuten stellen. Mit den anderen Objektträgern ebenso verfahren.
8. Objektträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objektträgers gegen ein Papiertuch halten, um Überschuß an PBS zu entfernen. Objektträger in die feuchte Kammer legen und sofort vom Tropffläschchen mit Konjugat 1 Tropfen (ca. 50 µl) auf jede Auftragstelle ausdrücken.
9. Die Schritte 7 und 8 mit jedem Objektträger einzeln durchführen.
10. Feuchte Kammer abdecken und Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Jeweils einen Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und in einen Becher mit PBS eintauchen, um Überschuß an Konjugat zu entfernen. Objektträger 10 Minuten in einen Färbetrog mit PBS stellen. Falls Gegenfärbung gewünscht ist, können 2-3 Tropfen Evans Blau Färbemittel pro Trog hinzugefügt werden. Mit den anderen Objektträgern ebenso verfahren. HINWEIS: Unsachgemäßes Waschen kann die Morphologie der neutrophilen Zellen beeinträchtigen und eine erhöhte Hintergrundfluoreszenz bewirken.
12. Objektträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objektträgers gegen ein Papiertuch halten, um Überschuß an PBS zu entfernen. Um ein Austrocknen der Beschichtung zu vermeiden, sofort mit Schritt 13 fortfahren.
13. 1 Tropfen des Eindeckmittels sorgfältig auf jede Auftragstelle geben und ein Deckgläschen auflegen. **Leicht** andrücken **und seitliche** Bewegung des Deckgläschens vermeiden.
14. Die Schritte 12 und 13 mit jedem Objektträger einzeln durchführen.
15. Auf spezifische Fluoreszenz hin unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200facher Vergrößerung auswerten.

Die Objektträger können sofort nachdem sie angefertigt wurden ausgewertet werden. Weil das Eindeckmittel einen Stoff enthält, der einem Ausbleichen entgegenwirkt, können die Objektträger jedoch bis 48 Std. später ausgewertet werden, ohne daß die Intensität der Fluoreszenz signifikant abklingt. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8°C gelagert werden.

B. Titerbestimmung

Bei einem im Suchtest positiven Serum kann nach Durchführung der **Schritte 5 bis 13** der Titer bestimmt werden. Zu diesem Zweck ist ausgehend von einer 1:20-Verdünnung eine Reihenverdünnung zu erstellen.

Bei jedem Testlauf sollten die positive und negative Kontrolle mitgeführt werden. Der Titer ergibt sich aus dem reziproken Wert der höchsten Verdünnung, die ein positives Ergebnis zeigt.

Herstellung einer Reihenverdünnung

Vier Röhrcchen mit 1 bis 4 beschriften. Vom Probediluent 1000 µl in Röhrcchen 1 und jeweils 200 µl in Röhrcchen 2 bis 4 geben. 50 µl unverdünntes Serum in Röhrcchen 1 pipettieren und gründlich durchmischen. Aus Röhrcchen 1 200 µl ins Röhrcchen 2 überführen und gründlich durchmischen. Die Verdünnungsreihe wie in der folgenden Tabelle dargestellt fortführen, indem nach Durchmischen jeweils 200 µl von einem Röhrcchen in das nächste überführt werden.

Röhrchen	1	2	3	4
Serum	0,05 ml			
	+			
Probendiluent	1,0 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↗	↗	↗
Zu überführen		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Endverdünnung	1:20	1:40	1:80	1:160 etc.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl eine positive wie eine negative Kontrolle mitgeführt werden. Die negative Kontrolle sollte keine spezifische Fluoreszenz der neutrophilen Zellen zeigen. An ethanolfixierten Objektträgern sollte die cANCA-positive Kontrolle eine Fluoreszenzintensität von mindestens 2+ im Zytoplasma der neutrophilen Zellen, die pANCA-positive Kontrolle eine perinukleäre Fluoreszenzintensität von mindestens 2+ zeigen. An formalinfixierten Objektträgern bleibt bei der cANCA-positiven Kontrolle die zytoplasmatische Fluoreszenz erhalten, bei der pANCA-positiven Kontrolle ändert sich die perinukleäre Fluoreszenz in eine zytoplasmatische.

Werden die erwarteten Ergebnisse nicht erhalten, sollte der Testlauf wiederholt werden. Sind die Ergebnisse mit den Kontrollen auch dann nicht wie erwartet, kann dies folgende Ursachen haben:

- Trübungen. Kontrolle(n) verwerfen und eine neue verwenden.
- Probleme mit der Optik des Mikroskops, wie z.B.: unsachgemäße Ausrichtung, Lampe zu alt, usw.
- Objektträgerbeschichtung während Testdurchführung ausgetrocknet.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der ANCA-Untersuchung sollten als negativ (Titer <1:20) bzw. positiv einschließlich Titer und Muster angegeben werden. Die Präparate sollten hinsichtlich einer spezifischen diffusen, granulären zytoplasmatischen Fluoreszenz (cANCA) bzw. perinukleären Fluoreszenz (pANCA) ausgewertet werden.

Zu den weiteren nachweisbaren Antikörpern zählen antinukleäre Antikörper (ANA), die manchmal eine pANCA-Reaktion vortäuschen können. Am Ende des Dokumentes sind ANCA-Muster an ethanol- und formalinfixierten Objektträgern dargestellt.

GRENZEN DES VERFAHRENS

In seltenen Fällen können hochtitrige ANCA-Seren mit der ursprünglichen Suchtestverdünnung negativ bis schwach positiv reagieren (Prozonphänomen). Im Zweifelsfall sollten solche Seren mit einer höheren Verdünnung getestet und bei positivem Ergebnis titriert werden. Enthält ein Patientenserum zwei oder mehrere Antikörper, die mit dem selben Substrat reagieren, so kann ihr Nachweis mit der indirekten Immunfluoreszenz aufgrund von Interferenz erschwert sein. Diese Interferenz kann den Nachweis von ANCA entweder vereiteln oder einen zu niedrigen ANCA-Titer bewirken, falls der Titer des interferierenden Antikörpers höher ist. Die häufigste Ursache von Interferenz im ANCA-Test ist die Koexistenz von ANA. Einige Patienten mit der Wegenerschen Granulomatose können im ANCA-Test zunächst negativ sein. Solche Fälle können bei einer wiederholten Untersuchung ein positives Ergebnis zeigen. Antherapierte Patienten mit einer Wegenerschen Granulomatose sind ohne Ausnahme ANCA-negativ.

Eine ANA-Reaktion kann manchmal eine pANCA-Reaktion vortäuschen bzw. mit ihr verwechselt werden. Eine pANCA-Reaktion sollte daher an formalinfixierten ANCA-Objektträgern oder auf ANA an HEP-2-Objektträgern überprüft werden. An formalinfixierten Objektträgern sollten pANCA-positive Proben eine cANCA-Reaktion zeigen, während eine ANA-Reaktion entweder negativ oder nukleär, d.h. auf den Zellkern beschränkt, sein sollte. Zytokeratin-Antikörper können eine falsch positive cANCA-Reaktion vortäuschen¹⁵. In solchen Fällen kann eine Untersuchung an HEP-2-Zellen zur Unterscheidung zwischen «pseudo-

ANCA» und einer echten cANCA-Reaktion beitragen.

Antikörpertiter sind nicht zwingend mit der Krankheitsaktivität assoziiert. Das Ergebnis des ANCA-Tests sollte unter Berücksichtigung der klinischen Befunde ausgewertet werden, weil das Vorhandensein bzw. Fehlen von ANCA nicht immer mit einer Vaskulitis assoziiert ist.

Ein positives ANCA-Ergebnis mit der indirekten Immunfluoreszenz sollte in einem ELISA bestätigt werden. Die ANCA gewisser Antigenspezifitäten sind ein deutlicherer Hinweis auf eine Vaskulitis. ANCA wurden außerdem mit anderen immunologischen Anomalien als Vaskulitiden, wie beispielsweise Colitis ulcerosa, in Verbindung gebracht.

ERWARTETE WERTE

Vierundsechzig (64) Proben von normalen Probanden wurden auf ANCA untersucht. Alle Proben reagierten negativ bei einer 1:20-Verdünnung.

Ein positives ANCA-Ergebnis ist mit dem entsprechenden klinischen Hintergrund für die Diagnose systemischer Vaskulitiden und chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen hilfreich⁷⁻¹¹. Das cANCA-Muster kommt am häufigsten bei der Wegenerschen Granulomatose, das pANCA-Muster bei der mikroskopischen Polyangiitis, der pauci-immunen schnell fortschreitenden Glomerulonephritis und der Colitis ulcerosa⁷⁻¹¹ vor. Bei anderen Vaskulitiden (Polyarteriitis nodosa, Takayasu Arteriitis, Riesenzell-arteriitis, Morbus Behcet) sind ANCA selten oder fehlen ganz. Die aus der Literatur zitierte ANCA-Häufigkeit bei der Wegenerschen Granulomatose und anderen Vaskulitiden ist in der Tabelle 1 am Ende des Dokumentes zusammengefaßt.

Im Rahmen des Europäischen Gemeinschaftsprojektes über die Standardisierung von ANCA-Tests untersuchten Hagen und Mitarbeiter¹⁶ die Tauglichkeit des indirekten Immunfluoreszenztests hinsichtlich der Diagnose von idiopathischen systemischen Vaskulitiden. In dieser Untersuchung konnten ANCA bei 85% der Patienten mit einer Wegenerschen Granulomatose nachgewiesen werden, 64% waren cANCA-positiv und 21% pANCA-positiv. Patienten mit mikroskopischer Polyangiitis waren häufiger pANCA-positiv als cANCA-positiv (58% im Vergleich zu 23%) mit einer Sensitivität von 81% für die mikroskopische Polyangiitis und 82% für die idiopathische schnell fortschreitende Glomerulonephritis. ANCA konnte bei 19% der kranken und 6% der gesunden Kontrollkollektive nachgewiesen werden, was einer Spezifität von 76% gegenüber der kranken Kontrollgruppe und 94% gegenüber den gesunden Probanden entspricht (Tabelle 2, am Ende des Dokumentes).

Der positive prädiktive Wert eines ANCA-Tests ist jedoch viel höher und signifikanter wenn er zusammen mit klinischen Anzeichen und Symptomen ausgewertet wird. In einem Editorial nannten Jennette Wiltmann und Falk¹⁷ einen positiven prädiktiven Wert von 92% bei einem Patienten mit einem Serum-Kreatinin von >3 mg/dl. Bei Patienten mit einem zunächst niedrigen positiven prädiktiven Wert erhöht auf ähnliche Weise ein positives ANCA-Ergebnis die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung zu einem Grad, daß eine weiterführende Untersuchung angezeigt scheint. Die Verfasser folgern, daß bei Patienten mit starken klinischen Anzeichen einer pauci-immunen halbmondförmigen Glomerulonephritis die Untersuchung auf ANCA für die Absicherung der Diagnose am hilfreichsten ist, während die ANCA-Untersuchung bei Patienten mit schwachen klinischen Anzeichen zum Ausschluß der Diagnose am dienlichsten ist.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Der Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody (ANCA) Test wurde mit einem anderen indirekten Immunfluoreszenztest auf ANCA verglichen. Der Vergleich umfaßte 129 Serumproben, die von einem diagnostischen Referenzlabor erhalten wurden, das auf den Nachweis von Autoimmunerkrankungen spezialisiert ist. Die Proben wurden laut den Empfehlungen der Hersteller getestet. Die Ergebnisse waren wie folgt:

ANDERE METHODE		IMMCO		Total
		Positiv	Negativ	
	Positiv	49	0	49
	Negativ	7	73	80
	Total	56	73	129

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

Sieben Proben, die mit Quantafluor positiv und mit der oben erwähnten indirekten Immunfluoreszenzmethode negativ reagierten, wurden mit ELISA auf Antikörper gegen die beiden wichtigsten, mit ANCA assoziierten Antigene, Myeloperoxidase (MPO) und Proteinase 3 (PR3), untersucht. Von diesen sieben Proben waren im ELISA sechs positiv, was darauf hinweist, daß die Proben richtig positiv reagierten.

Kreuzreaktivität

Antinukleäre Antikörper (ANA) können an neutrophilen Granulozyten positiv reagieren und mit einer ANCA-Reaktion verwechselt werden. Wir untersuchten daher insgesamt 25 ANA-positive Proben unterschiedlicher Antikörperspezifitäten an ethanol- und formalinfixierten bzw. an COMVI-Objekträgern. Mit der Ausnahme von Anti-SS-A (Ro)- und Anti-SS-B (La) Antikörpern zeigten alle ANA-positiven Seren eine Reaktion mit dem Zellkern der ethanolfixierten Objekträger. Diese ANA-Reaktionen wurden an formalinfixierten Objekträgern entweder beibehalten oder sie wurden negativ.

Präzision

Die Präzision in der Serie und von Tag zu Tag wurde untersucht. Jeweils zwei cANCA- und pANCA-positive Seren und ein ANCA-negatives Serum wurden in der Ausgangsverdünnung 1:20 und nach Austitrierung untersucht. Sie wurden mit 3 verschiedenen Chargen von jeweils formalin- und ethanolfixierten bzw. COMVI-Objekträgern an 4 Tagen getestet. Die negative Probe verblieb negativ und die positiven Proben zeigten die erwarteten Titer.



Immulo™ ANTICORPI ANTI-NEUTROFILI CITOPLASMATICI (ANCA)

IVD

REF	Code: 1116	ANCA Kit (etanolo)	24 Determinations
REF	Code: 1140	ANCA Kit (etanolo)	48 Determinations
REF	Code: 1140-2	ANCA Kit (etanolo)	96 Determinations
REF	Code: 1141	ANCA Kit (formalina)	48 Determinations
REF	Code: 1142	COMVI-ANCA Kit (etanolo+formalina)	48 Determinations

Dosaggio in immunofluorescenza indiretta per l'individuazione e la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi anti-neutrofili citoplasmatici (ANCA) nel siero umano. Gli ANCA sono presenti nel siero dei pazienti affetti da vasculiti necrotizzanti e rappresenta pertanto uno strumento da affiancare ai risultati clinici e di laboratorio per la diagnosi di queste patologie.

CARATTERISTICHE GENERALI

Gli ANCA sono presenti nei pazienti affetti da granulomatosi di Wegener, poliartrite microscopica, glomerulonefrite semilunare necrotizzante, altre vasculiti ed affezioni infiammatorie dell'intestino (soprattutto colite ulcerosa)^{1,11}. La colorazione in immunofluorescenza indiretta dei neutrofili fissati con etanolo può mostrare vari tipi di pattern di fluorescenza, quali:

1. Autoanticorpi anti antigeni citoplasmatici di neutrofili che provocano una diffusa colorazione citoplasmatica (cANCA).
2. Autoanticorpi anti antigeni neutrofili che danno origine a un pattern di reazione perinucleare (pANCA).
3. Anticorpi comuni anti antigeni nucleari (ANA)

Questi due tipi di ANCA sono diversi l'uno dall'altro¹². I cANCA si riscontrano principalmente nei pazienti affetti da granulomatosi di Wegener e poliartrite microscopica, mentre i pANCA si osservano in varie patologie vascolitiche, nella colite ulcerosa (UC) e nella colangite sclerosante primaria (PSC). L'80% dei pazienti in cui si osservano i pANCA presentano riscontri istologici di vasculite, UC o PSC. Gli ANCA sono presenti in oltre il 90% dei pazienti affetti da granulomatosi di Wegener attiva generalizzata e nel 67% dei pazienti in cui la malattia è parzialmente attiva.

L'incidenza di ANCA varia nei pazienti con remissione clinica. I pazienti affetti da granulomatosi di Wegener attiva possono talvolta essere ANCA negativi, sebbene, in questi casi, la ripetizione del test dovrebbe dare risultati ANCA positivi¹. La metodica che utilizza il microscopio a immunofluorescenza indiretta è considerata lo strumento ideale per la determinazione degli ANCA. La fissazione antigenica dei neutrofili si effettua solitamente con etanolo. In seguito alla fissazione a etanolo, sono stati osservati due diversi pattern di colorazione ANCA: citoplasmatica (cANCA) e perinucleare (pANCA). Le reazioni pANCA possono essere confermate ripetendo il test su vetrini fissati con formalina in cui le reazioni pANCA si trasformano in cANCA, mentre le reazioni ANA rimangono nucleari o diventano negative.

PRINCIPIO DEL METODO

Nella metodica in immunofluorescenza indiretta utilizzata in questo kit, i sieri dei pazienti vengono incubati su preparati ottimali di neutrofili umani per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Tutti gli anticorpi non legati vengono eliminati sciacquando il vetrino, mentre gli anticorpi legati del tipo IgG vengono individuati mediante incubazione del substrato con coniugato anti IgG umana, marcato con fluoresceina. Per osservare le reazioni si utilizza un microscopio a fluorescenza dotato di filtri adatti. Una fluorescenza verde mela del citoplasma con una colorazione diffusa citoplasmatica granulare (cANCA) o con una colorazione perinucleare (pANCA) conferma la presenza di ANCA. Mediante l'analisi di diluizioni seriali¹³ si determina quindi il titolo (il reciproco della diluizione più elevata che causa una reazione positiva).

CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a una temperatura di 2-8°C. I reagenti sono pronti per l'uso dopo averli portati a temperatura ambiente.

Materiali forniti

REF	Code: 1116	ANCA Kit (etanolo)	24 Determinations
REF	Code: 1140	ANCA Kit (etanolo)	48 Determinations
REF	Code: 1140-2	ANCA Kit (etanolo)	96 Determinations
REF	Code: 1141	ANCA Kit (formalina)	48 Determinations
REF	Code: 1142	COMVI-ANCA Kit (etanolo+formalina)	48 Determinations
4 x	SORB SLD 6	Vetrini-substrato di neutrofili umani con 6 pozzetti (fissati con etanolo) (1116), 8 vetrini (1140), 16 vetrini (1140-2)	
8 x	SORB SLD 6	Vetrini-substrato di neutrofili umani con 6 pozzetti (fissati con formalina), (1141)	
8 x	SORB SLD 6+6	Vetrini-substrato di neutrofili umani con 6 pozzetti (fissati con etanolo/formalina) (1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL + ANCA	Controllo positivo cANCA*, siero umano con BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL + pANCA	Controllo positivo pANCA*, siero umano con BSA (1141, 1142)	
1 x 0.5 ml	CONTROL -	Controllo negativo*, siero umano con BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 5.0 ml	IgG-CONJ FITC	Coniugato FITC anti-IgG umana* con BSA. Tenere lontano dalla luce. (1116, 1140, 1141, 1142), 2 fiale (1140-2)	
1 x 60 ml	BUF	Diluyente per campioni* con BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
2 vials	BUF WASH	Tampone fosfato-salino (PBS). Ricostituire ciascun flaconcino con 1 litro d'acqua (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM	Mezzo Montante* Non congelare. (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)	
1 x 12	COVER SLD	Vetrini coprioggetto (1116, 1140, 1141, 1142) 2 x 12 (1140-2)	

Materiali facoltativi disponibili presso la IMMCO

Vetrino-Substrato di Neutrofili Umani (fissati con etanolo) a 6 pozzetti	REF	Code: 2162
Vetrino-Substrato di Neutrofili Umani (fissati con etanolo) a 16 pozzetti		Code: 2162-16
Vetrino-Substrato di Neutrofili Umani (fissati con formalina) a 6 pozzetti		Code: 2186
Controllo positivo cANCA* (0,5 ml) siero umano con BSA		Code: 2252
Controllo positivo pANCA* (0,5 ml) siero umano con BSA		Code: 2240
COMVI Vetrino-Substrato di Neutrofili Umani (fissati con etanolo e formalina) a 6+6 pozzetti		Code: 2189

* Attenzione: contiene < 0,1% NaN₃

Materiali necessari ma non forniti

- Microscopio a fluorescenza
- Micropipetta o pipetta Pasteur
- Pipette sierologiche
- Piastra di colorazione (ad esempio vaschetta di Coplin)
- Piccole provette (ad es. 13 x 75 mm) e porta provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Contenitore da 1 litro
- Bottiglia di lavaggio
- Carta assorbente
- Incubatore

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. Il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione dei reagenti è stato controllato ed è risultato negativo ai test richiesti dalla FDA per la presenza dell'HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I. Tuttavia, maneggiare tutti i campioni di siero umano e i prodotti di origine umana come fonte potenziale di infezione, indipendentemente dalla loro origine, seguendo le normali pratiche di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e l'eliminazione di questi materiali¹⁴. ATTENZIONE - La sodio azide (NaN₃) può dar luogo a reazioni chimiche pericolose. Per lo smaltimento dei residui delle analisi attenersi scrupolosamente alle norme CDC e alle norme di legge in materia. La sodio azide è tossica, se ingerita; in questo caso, informare immediatamente il responsabile del laboratorio o un centro per casi di avvelenamento.

Al fine di assicurare risultati validi, si raccomanda di attenersi alle istruzioni riportate in questo inserto. Non scambiare i componenti del kit se non con quelli aventi lo stesso numero di catalogo della IMMCO. Non utilizzare oltre la data di scadenza.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare soltanto campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o contaminati possono influenzare i risultati del test e vanno scartati. Conservare i campioni a una temperatura di 2-8°C per non oltre una settimana. Per periodi di conservazione più lunghi, congelare il siero a -20°C, evitando di congelare i campioni più volte.

PROCEDURA

Metodica d'analisi

A. Screening

1. Diluire ciascun siero di paziente 1:20 con il Diluente per Campioni fornito (50 µl di siero + 1,0 ml di Diluente). **Non diluire i Controlli Positivi o Negativi.** Conservare i sieri non diluiti per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che i sacchetti contenenti i vetrini-substrato raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti, quindi estrarre i vetrini facendo attenzione a non toccare il substrato.
3. Marcare i vetrini e porli in una camera umida.
4. Capovolgere il flaconcino contagocce e versare delicatamente 1 goccia (circa 50 µl) del Controllo Negativo nel pozzetto no. 1. Allo stesso modo versare 1 goccia del Controllo Positivo nel pozzetto no. 2, evitando di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Con una micropipetta o con la pipetta Pasteur, versare 1 goccia del siero diluito del paziente (circa 50 µl) negli altri pozzetti, evitando di riempirli eccessivamente.
6. Mettere il coperchio sulla camera umida ed incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.

7. Togliere un vetrino dalla camera umida. Tenendo il vetrino per l'estremità della linguetta, sciacquarlo delicatamente con circa 10 ml di PBS utilizzando una pipetta o sciacquarlo in un becher pieno di PBS. Non utilizzare la bottiglia di lavaggio. Trasferire il vetrino immediatamente nella vaschetta di Coplin e lavare per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
8. Togliere il/i vetrino/i dalla vaschetta di Coplin. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Porre il vetrino nella camera umida. Capovolgere immediatamente il flaconcino contagocce del Coniugato e versarne delicatamente 1 goccia (circa 50 µl) in ciascun pozzetto.
9. Ripetere i punti 7 e 8 per ciascun vetrino.
10. Riporre il coperchio sulla camera umida ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
11. Togliere un vetrino dalla camera umida e tenendolo per l'estremità della linguetta, immergerlo in un becher pieno di PBS per togliere il coniugato in eccesso. Porre il/i vetrino/i in una piastra di colorazione piena di PBS per 10 minuti. Se si desidera, si possono aggiungere 2-3 gocce di Blu di Evans al lavaggio finale. Ripetere per gli altri vetrini. NOTA: Un lavaggio scorretto può influenzare la morfologia dei neutrofili e causare una maggiore fluorescenza di fondo.
12. Togliere un vetrino dalla piastra di colorazione. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Per evitare che il vetrino si secchi, passare immediatamente al punto 13 mentre è ancora bagnato.
13. Montare il vetrino coprioggetto versando delicatamente **1 goccia** di Terreno di allestimento su ciascun pozzetto, quindi porre il coprioggetto sul vetrino. Non applicare eccessiva pressione ed evitare che il coprioggetto si sposti lateralmente.
14. Ripetere i punti 12 e 13 per ciascun vetrino.
15. Esaminare la fluorescenza specifica con un microscopio a fluorescenza a un ingrandimento di almeno 200x. I vetrini si possono leggere appena vengono preparati. Tuttavia, grazie a un agente anti evanescenza presente nel liquido di montaggio, non si verifica alcuna perdita significativa di intensità di colorazione, se la lettura viene posticipata fino a 48 ore. I vetrini devono essere conservati al buio a una temperatura di 2-8°C.

B. Determinazione dell'endpoint (Titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere ulteriormente analizzato seguendo i punti da 5 a 13 per determinarne il titolo. Ciascuna sessione analitica deve includere i Controlli Positivi e Negativi. Effettuare diluizioni seriali doppie partendo da 1:20. Il reciproco della diluizione più elevata che produce una reazione positiva è il titolo.

Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare quattro provette da 1 a 4. Aggiungere 1,0 ml di Diluente per Campioni alla provetta 1 e 0,2 ml alle 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 all'altra dopo aver mescolato 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 QUALITA'

Ciascuna sessione analitica deve comprendere sia un Controllo Positivo che uno Negativo. Il Controllo Negativo non deve mostrare alcuna fluorescenza specifica dei neutrofili, mentre il Controllo Positivo deve avere un'intensità di colorazione del citoplasma dei neutrofili di almeno 2+ con il controllo positivo cANCA e perinucleare con il controllo positivo pANCA su vetrini fissati ad etanolo. Su vetrini fissati a formalina, il Controllo Positivo cANCA rimane citoplasmatico, mentre la reazione pANCA diventa citoplasmatica.

Se non si ottengono i risultati attesi, bisognerà ripetere l'analisi. Se continuano a verificarsi risultati inadeguati con i controlli, le cause possono essere:

- Torbidità. Scartare e utilizzare un altro controllo.
- Problemi al sistema ottico del microscopio a fluorescenza, quali allineamento non corretto, bulbo scaduto, ecc.
- Essiccamento del vetrino durante la procedura.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dei test per l'individuazione degli ANCA devono essere riportati come negativi (<20), o positivi con titolo e pattern.

Verificare la presenza di una specifica colorazione citoplasmatica diffusa granulare (cANCA) o perinucleare (pANCA).

Altri anticorpi rilevabili includono gli anticorpi antinucleari (ANA) che a volte possono copiare le reazioni pANCA.

I pattern ANCA su vetrini fissati ad etanolo o formalina sono indicati all'estremità del documento.

LIMITI DELLA PROCEDURA

In alcuni casi, i sieri ANCA positivi possono essere o molto deboli o negativi alla diluizione iniziale di screening (fenomeno di prozona). Quando si verificano questi casi dubbi, i sieri dovranno essere esaminati a diluizioni maggiori e, se positivi, dovranno essere determinati i titoli anticorpali.

In alcuni casi la presenza in un siero di due o più anticorpi reattivi con lo stesso substrato può causare un'interferenza nella loro individuazione mediante immunofluorescenza. Tale interferenza può provocare il mancato rilevamento degli ANCA o la soppressione del loro titolo se gli anticorpi che interferiscono hanno un titolo maggiore degli ANCA.

La causa più comune del fenomeno d'interferenza nei test ANCA è la coesistenza degli ANA.

In alcuni pazienti affetti da granulomatosi di Wegener, i test ANCA possono risultare negativi. In tali casi la ripetizione del test può dare risultati positivi. Pazienti affetti da granulomatosi di Wegener in fase di trattamento sono invariabilmente ANCA negativi.

Le reazioni ANA possono talvolta essere confuse con la colorazione pANCA o imitarla. Per confermare una reattività pANCA, i sieri che provocano reazioni pANCA devono essere riesaminati su vetrini fissati a formalina o, nel caso degli ANA, su vetrini HEP-2. I campioni pANCA su substrato ANCA fissato a formalina devono presentare una reazione cANCA, mentre le reazioni agli ANA devono essere negative o rimanere nucleari. Anticorpi anti-citocheratina possono provocare una reazione cANCA falsamente positiva¹⁵. In tali casi, test IF indiretti su cellule HEP-2 sono utili per distinguere una reazione "pseudo-ANCA" da una vera reazione cANCA.

I titoli anticorpali non sono necessariamente associati alla presenza di una patologia. I risultati del test ANCA devono essere valutati alla luce dei risultati clinici, poiché la presenza o assenza di ANCA può non essere direttamente associata ad una vasculite.

I risultati ANCA positivi ottenuti mediante immunofluorescenza devono essere confermati con il test ELISA. Gli ANCA di determinate specificità antigeniche sono più indicativi di una determinata patologia vasculitica. Inoltre, gli ANCA sono stati associati a disturbi immunologici diversi da quelli vasculitici, quali la colite ulcerosa^{7,8}.

VALORI ATTESI

Sessanta quattro (64) campioni normali sono stati esaminati per verificare la presenza di ANCA. Tutti i campioni sono risultati ANCA negativi alla diluizione di 1:20.

Un risultato ANCA positivo nella corretta collocazione clinica è utile nella diagnosi di vasculiti sistemiche e affezioni infiammatorie dell'intestino⁷⁻¹¹. La colorazione cANCA si verifica soprattutto nella granulomatosi di Wegener, mentre la colorazione pANCA caratterizza la poliangeite microscopica, la glomerulonefrite falciforme pauci-immune e la colite ulcerosa⁷⁻¹¹. In altri tipi di vasculite (poliarterite nodosa, sindrome di Takayasu, arterite gigantocellulare, morbo di Behcet), gli ANCA sono rari o assenti. La Tabella 1 all'estremità del documento riporta estratti della letteratura specializzata sull'incidenza di ANCA nella granulomatosi di Wegener e altre vasculiti. Nell'ambito del programma collaborativo europeo di standardizzazione dei test per gli ANCA, Hagan e i suoi collaboratori¹⁶ hanno valutato l'utilità dei test IF indiretti nella diagnosi di vasculiti sistemiche idiopatiche.

In questo studio, gli ANCA sono risultati presenti nell'85% dei pazienti affetti da granulomatosi di Wegener, il 64% dei quali erano cANCA positivi e il 21% pANCA positivi. I pANCA erano prevalenti rispetto ai cANCA nella poliangeite microscopica (58% rispetto al 23%) con una sensibilità dell'81% per la poliangeite microscopica e dell'82% per la glomerulonefrite idiopatica rapidamente progressiva. Nell'ambito dei controlli patologici e sani, gli ANCA erano presenti nel 19% e 6%, rispettivamente, con una specificità, quindi, del 76% nei controlli patologici e del 94% negli individui sani (Tabella 2 all'estremità del documento).

Tuttavia, il valore pronostico positivo dei test ANCA è molto migliore e significativo se valutato congiuntamente ai segni e ai sintomi clinici. In un editoriale, Jennette Wilmant e Falck¹⁷ hanno riportato un valore pronostico positivo del 92% in un paziente con un livello di creatinina sierica superiore a 3 mg/dl. Parimenti, nei pazienti con un valore pronostico positivo iniziale basso, un risultato ANCA positivo aumenta la probabilità di una patologia a un livello che può richiedere ulteriori analisi. Gli autori concludono che in pazienti con marcata evidenza clinica di glomerulonefrite semilunare pauci-immune il test ANCA è fondamentale per convalidare la diagnosi, mentre nei pazienti con scarsa evidenza clinica il test ANCA serve per scartare tale diagnosi.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL METODO

Il kit d'analisi per Anticorpi Anti-Neutrofili Citoplasmatici (ANCA) è stato confrontato con un altro kit ANCA a immunofluorescenza indiretta. Il confronto comprendeva un totale di 129 campioni di siero provenienti da un laboratorio diagnostico di riferimento specializzato nell'individuazione di patologie autoimmuni. Questi campioni sono stati analizzati seguendo le procedure consigliate dai produttori e hanno dato i seguenti risultati:

		IMMCO		
		Positivo	Negativo	Totale
ALTRO	Positivo	49	0	49
	Negativo	7	73	80
	Totale	56	73	129

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

Sette campioni discrepanti rilevati con la suddetta metodica in immunofluorescenza indiretta sono stati analizzati mediante ELISA per verificare la presenza di anticorpi anti mieloperossidasi (MPO) o proteinasi 3 (PR3), i due principali antigeni associati agli ANCA. Dei sette positivi con ELISA e negativi con l'altro kit d'analisi, tutti tranne uno sono risultati positivi con ELISA,

suggerendo, pertanto, l'effettiva positività di questi campioni.

Reattività crociata

Gli anticorpi antinucleari (ANA) possono mostrare reazioni positive sui neutrofili. Per determinare la reattività sui neutrofili degli ANA, che può essere confusa per reattività ANCA, sono stati analizzati un totale di 25 campioni ANA positivi di varie specificità anticorpali su vetrini fissati con etanolo, formalina e COMVI. Tutti i sieri ANA positivi, ad eccezione delle specificità anticorpali SS-A (Ro) ed SS-B (La), hanno mostrato reazioni nucleari. Queste reazioni ANA o rimangono nucleari o diventano negative su vetrini fissati con formalina.

Riproducibilità

Sono stati effettuati degli studi per dimostrare la variabilità intra- e interanalisi. Quattro sieri ANCA positivi (due ciascuno di cANCA e pANCA) e uno ANCA negativo sono stati analizzati cominciando da una diluizione di 1:20 fino all'endpoint. I sieri sono stati testati su 3 diversi lotti ciascuno di vetrini fissati con etanolo, formalina e COMVI per 4 giorni al fine di determinare l'intra- e l'interriproducibilità. I campioni negativi sono rimasti negativi e i campioni positivi hanno mostrato il titolo atteso.



ImmuGlo™ TESTE (ANCA) DE ANTICORPOS ANTI-NEUTRÓFILOS CITOPLÁSMICOS

IVD

REF	Catálogo nº 1116	ANCA Kit (<i>etanol</i>)	24 Determinations
REF	Catálogo nº 1140	ANCA Kit (<i>etanol</i>)	48 Determinations
REF	Catálogo nº 1140-2	ANCA Kit (<i>etanol</i>)	96 Determinations
REF	Catálogo nº 1141	ANCA Kit (<i>formalin</i>)	48 Determinations
REF	Catálogo nº 1142	COMVI-ANCA Kit (<i>etanol+formalin</i>)	48 Determinations

Teste de anticorpos de imunofluorescência indirecta para a detecção e semi-quantificação de anticorpos anti-neutrófilos citoplasmáticos (ANCA) no soro humano. Os ANCA encontram-se no soro de pacientes com vascularidades necróticas e, conseqüentemente, ajudam a clínica e laboratorialmente no diagnóstico destes problemas.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os ANCA aparecem em pacientes com granulomatose Wegener, poliartrite microscópica, glomerulonefrite crescente necrótica, outras vascularidades e desordens do cólon inflamado (colite ulcerativa primária). A coloração imunofluorescente indirecta dos neutrófilos fixos em etanol pode exibir diferentes tipos de padrões de manchas fluorescentes. Este incluem:

1. Autoanticorpos contra os antígenos citoplasmáticos dos neutrófilos que originam uma mancha citoplasmática difusa (cANCA).
2. Autoanticorpos contra os antígenos neutrófilos que originam um padrão de reacção perinuclear (pANCA).
3. Anticorpos comuns contra os antígenos nucleares (ANA)

O significado destes dois tipos de ANCA difere¹². Os cANCA encontram-se em pacientes com granulomatose Wegener e poliartrite microscópica, enquanto que os pANCA ocorrem em várias complicações vasculares, colite ulcerativa (UC) e colangite esclerosante primária (CEP). 80% dos pacientes com pANCA têm vestígios histológicos de vasculite, UC ou CEP. Os ANCA ocorrem em mais de 90% dos pacientes com granulomatose Wegener activa generalizada, e em 67% dos pacientes com doença activa limitada. A incidência dos ANCA varia em pacientes com remissão clínica. Pacientes com granulomatose Wegener activa podem ser ocasionalmente ANCA negativos. Contudo, nestes casos, testes repetidos podem revelar reacções ANCA positivas¹. O método microscópico de imunofluorescência indirecta é considerado o melhor teste para a detecção dos ANCA. A fixação antigénica de neutrófilos é normalmente feita em etanol. Quando fixos em etanol, foram identificados dois padrões de reacção de mancha ANCA: citoplasmático (cANCA) e perinuclear (pANCA). As reacções pANCA podem ser confirmadas através da repetição do teste em lâminas de formalina, onde as reacções pANCA se convertem em cANCA, enquanto que as reacções ANA ou permanecem nucleares ou se tornam negativas na fixação de formalina.

PRINCÍPIOS DO MÉTODO

No método de imunofluorescência indirecto usado neste kit, o soro dos pacientes é incubado em preparações optimizadas de neutrófilos humanos para permitir a ligação de anticorpos ao substrato. Quaisquer anticorpos livres são removidos através da lavagem da lâmina. Os anticorpos ligados da classe IgG são detectados através da incubação do substrato com conjugado IgG anti-humano fluoresceínico. As reacções são observadas ao microscópio fluorescente equipado com filtros apropriados. A presença de ANCA é demonstrada por uma fluorescência verde maçã quer do citoplasma com uma mancha citoplasmática granular (cANCA) ou por uma mancha perinuclear (pANCA). A titulação (o recíproca da maior diluição com reacção positiva) é então determinado através da testagem de várias diluições¹³.

INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

Armazenamento e preparação

Guardar todos os reagentes a 2-8°C. Os reagentes estão prontos a usar após ficarem à temperatura ambiente.

Material fornecido

REF	Code: 1116	ANCA Kit (ethanol)	24 Determinations
REF	Code: 1140	ANCA Kit (ethanol)	48 Determinations
REF	Code: 1140-2	ANCA Kit (ethanol)	96 Determinations
REF	Code: 1141	ANCA Kit (formalin)	48 Determinations
REF	Code: 1142	COMVI-ANCA Kit (ethanol+formalin)	48 Determinations

4 x	SORB SLD 6	Lâminas de substrato neutrófilo humano de 6 poços (fixação com etanol) (1116), 8 lâminas (1140), 16 lâminas (1140-2)
8 x	SORB SLD 6	Lâminas de substrato neutrófilo humano de 6 poços (fixação com formalina), (1141)
8 x	SORB SLD 6+6	Lâminas de substrato neutrófilo humano de 6 poços (fixação com etanol/formalina) [6 ethanol/6 formalin] (1142)
1 x 0.5 ml	CONTROL + ANCA	Controlo positivo cANCA*, soro humano com BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)
1 x 0.5 ml	CONTROL + pANCA	Controlo positivo pANCA*, soro humano com BSA (1141, 1142)
1 x 0.5 ml	CONTROL -	Controlo negativo*, soro humano com BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)
1 x 5.0 ml	IgG-CONJ FITC	Conjugado ITCF IgG anti-humano* com BSA. Proteger da luz (1116, 1140, 1141, 1142), 2 frascos (1140-2)
1 x 60 ml	BUF	Diluyente de amostras* com BSA (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)
2 vials	BUF WASH	Tampão fosfato alcalino (PBS). Dissolver cada frasco num litro (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM	Meio de suporte* Não congelar (1116, 1140, 1140-2, 1141, 1142)
1 x 12	COVER SLD	Tampas (1116, 1140, 1141, 1142) 2 x 12 (1140-2)

Materiais opcionais disponíveis na IMMCO

		REF
6 poços	Lâmina de Substrato Neutrófilo Humano (fixação com etanol)	2162
16 poços	Lâmina de Substrato Neutrófilo Humano (fixação com etanol)	2162-16
6 poços	Lâmina de Substrato Neutrófilo Humano (fixação com formalina)	2186
1 x 0,5 ml	Controlo Positivo cANCA*, soro humano com BSA	2252
1 x 0,5 ml	Controlo Positivo pANCA*, soro humano com BSA	2240
6+6 poços	COMVI Lâmina de Substrato Neutrófilo Humano (fixação com etanol e formalina)	2189

*Aviso: contém <0,1% NaN₃

Material necessário mas não fornecido

- Microscópio de fluorescência
- Micropipeta ou pipeta Pasteur
- Pipetas serológicas
- Prato de coloração (ex: Coplin)
- Tubos pequenos (ex: 13 x 75 mm) e suportes de tubos
- Água destilada ou desionizada
- Contentor de 1 litro
- Garrafa de lavagem
- Toalhetes
- Câmara de incubação

AVISOS E PRECAUÇÕES

Para o diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes derivados dos humanos utilizados foram testados para HbsAg, VHC, HIV-1 e 2 e HTLV-I e deram negativos nos testes FDA. Todos os espécimens de soro humano e produtos derivados dos humanos devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente da sua origem. Devem-se respistar as boas práticas laboratoriais na armazenagem, distribuição e manuseamento destes materiais¹⁴.

AVISO: A azida sódica (NaN₃) 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 de tais azidas. A azida sódica pode ser tóxica se ingerida. Se ingerida, contacte imediatamente o director de laboratório ou um centro de envenenamento.

As instruções devem ser seguidas à risca de forma a assegurar resultados válidos. Não trocar componentes dos kits com outros de outras origens. Todos devem ser do mesmo nº da IMMCO. Não utilizar se estiverem fora do prazo.

RECOLHA DE AMOSTRAS E PREPARAÇÃO

Só os espécimens séricos devem ser utilizados para este teste. Os espécimens hemolizados, lipémicos ou contaminados microbianamente podem interferir com a performance do teste e não devem ser usados. Armazenar a 2-8°C durante apenas uma semana. Para armazenamento mais longo devem ser congelados a -20°C. Evitar repetidas congelações e descongelações.

MODO OPERATÓRIO

Método do teste

A. Despistagem

1. Diluir cada soro 1:20 com o Diluente de amostras fornecido (50 µl soro + 1,0 ml Diluente). Não diluir os Controlos Negativo e Positivo. Guardar o soro não diluído para determinar a titulação de anticorpos, se os testes de despistagem forem positivos.
2. Deixar as bolsas com as lâminas de substrato à temperatura ambiente 10-15 minutos. Retirar as lâminas sem tocar no substrato.
3. Etiquetar as lâminas e colocar na incubadora com toalhetes húmidos para não secarem.
4. Inverter o frasco conta-gotas e apertar para aplicar 1 gota (cerca de 50 µl) de Controlo negativo no poço #1. Coloque 1 gota de Controlo Positivo no poço #2. Não encher demais.
5. Com uma micropipeta ou pipeta Pasteur, colocar 1 gota do soro diluído do paciente (cerca de 50 µl) nos outros poços. Evite encher demais os poços.
6. Colocar a tampa na incubadora e incubar 30 minutos à temperatura ambiente.

7. Retirar a lâmina da incubadora. Segurar pela extremidade e lavar com 10 ml de PBS com uma pipeta, ou lavar com recipiente cheio de PBS. Não usar a garrafa de lavagem. Colocar a lâmina no recipiente Coplin e lavar 10 minutos. Repetir a operação para todas as lâminas.
8. Retirar a lâmina do recipiente Coplin. Limpar as extremidades da lâmina num toalhete para retirar o excesso do PBS. Colocar a lâmina na incubadora. Inverter imediatamente o frasco conta-gotas do Conjugado e deitar 1 gota (cerca de 50 µl) em cada poço.
9. Repetir passos 7 e 8 para cada lâmina.
10. Colocar a tampa da incubadora. Incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
11. Retirar uma lâmina da incubadora. Segurar na lâmina e mergulhá-la num recipiente com PBS para remover o excesso de conjugado. Colocar a lâmina num disco de coloração com PBS durante 10 minutos. Pode colocar 2-3 gotas de contracorante azul de Evans à lavagem final. NOTA: Uma lavagem deficiente pode alterar a morfologia dos neutrófilos e levar a um aumento da fluorescência.
12. Retirar a lâmina do prato de coloração. Limpar o excesso de PBS. Para evitar que a lâmina seque deve passar para o ponto 13 enquanto a lâmina ainda está molhada.
13. Colocar a tampa e aplicar 1 gota de Meio de Suporte em cada poço e colocar a tampa. Não faça muita pressão e evite deslizamento lateral da tampa.
14. Repetir passos 12 e 13
15. Examinar a fluorescência específica com microscópis fluorescente com aumento de 200x ou mais.

As lâminas devem ser lidas quando estão prontas. Contudo, devido à presença de um agente anti-desaparecimento no meio de suporte, não há perdas significativas de intensidade de coloração, se a leitura for adiada até 48 horas. As lâminas devem ser guardadas às escuras a 2-8°C.

B. Determinação (titulação)

Um soro positivo na despistagem pode ser ainda mais testado com os passos 5 ao 13. Para determinar a titulação. Cada teste deve incluir os Controlos Positivo e Negativo. Fazer duas diluições começando com 1:20. O recíproco da diluição mais elevada a produzir uma reacção positiva é a titulação.

Preparação de diluições em série

Numerar 4 tubos de 1 a 4. Juntar 1,0 ml de diluente ao tubo 1 e 0,2 ml aos tubos 2 a 4. Pipetar 0,05 ml de soro não diluído para o tubo 1 e mexer bem. Transferir 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e mexer bem. Continuar a transferir 0,2 ml de um tubo para o outro após mexer.

Tubos	1	2	3	4
Soro	0.05 ml			
	+			
Diluente tamponado	1.0 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Transferência		↗ 0.2 ml	↗ 0.2 ml	↗ 0.2 ml
Diluição final	1:20	1:40	1:80	1:160 etc.

CONTROLO DA QUALIDADE

O Controlo Positivo e o Negativo devem ser incluídos em cada teste. O Controlo Negativo não deve ter fluorescência específica do neutrófilo, enquanto que o Controlo Positivo deve ter 2+ ou maior intensidade de coloração do citoplasma do neutrófilo com controlo positivo cANCA e perinuclear com controlo positivo pANCA nas lâminas de fixação com etanol. Nas

lâminas de fixação com formalina, o Controlo Positivo cANCA permanece citoplasmático, enquanto que a reacção pANCA se torna citoplásmica. Se não se obtiverem os resultados esperados, o teste deve ser repetido. Se resultados inadequados continuarem a ocorrer com os controlos, pode deverse a:

- Turbos. Usar outro controlo.
- Problemas no sistema óptico do microscópio de fluorescência: alinhamento incorrecto, lâmpada a precisar de ser mudada, etc.
- Lâmina seca durante o processo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos testes ANCA devem ser negativos (<20), positivos com titulação e padrão.

Leitura de coloração citoplásmica granular difusa (cANCA) ou coloração perinuclear (pANCA). Outros anticorpos detectáveis incluem os anticorpos antinucleares (ANA), que por vezes podem imitar as reacções pANCA. Os padrões ANCA em etanol e lâminas com fixação de formalina estão na extremidade do original.

LIMITAÇÕES DO MODO OPERATÓRIO

Em alguns casos, o soro positivo para ANCA pode ser muito fraco ou negativo na diluição inicial da despistagem (fenómeno prozona). Em casos tão duvidosos, o soro deve ser despistado com diluições mais elevadas e, se positivo, a titulação dos anticorpos deve ser determinada.

Em certos casos a presença de dois ou mais anticorpos no soro que são reactivos com o mesmo substrato, podem causar interferência na detecção por imunofluorescência. A interferência pode causar erro na detecção de ANCA ou supressão do seu título, se o anticorpos tiver um título mais elevado que o ANCA. A causa mais comum do fenómeno de interferência nos testes ANCA é a co-existência de ANA.

Em alguns pacientes com granulomatose Wegener, os testes ANCA podem ser negativos. Em tais casos a repetição do teste pode causar resultados positivos. Pacientes com a granulomatose Wegener em tratamento, são negativos em ANCA invariavelmente.

As reacções ANA podem ser por vezes confundidas, ou imitarem a coloração ANA. Para confirmar a reactividade pANCA, o soro que dá as reacções pANCA deve ser retestado em lâminas de fixação de formalina ou ANA em Hep-2. Os espécimens pANCA em substrato ANCA fixado em formalina devem dar reactividade cANCA, enquanto que as reacções ao ANA devem ser negativas ou nucleares. Os anticorpos anti-citoqueratina podem resultar numa reacção cANCA falsa positiva¹⁵. Neste caso, testes IF indirectos nas células HEP-2 podem ajudar a distinguir «pseudo-ANCA» da verdadeira reacção cANCA.

A titulação de anticorpos não está necessariamente associada à actividade da doença. Os resultados do teste ANCA devem ser avaliados à luz dos achados clínicos, visto a presença ou ausência de ANCA pode não estar directamente associada a problemas de vascularização. Os resultados ANCA positivos obtidos por imunofluorescência devem ser confirmados pelo ELISA. Os ANCA de certas especificidades antigénicas são mais indicativos de um problema de vascularização^{7,8}. Também os ANCA têm sido associados com distúrbios imonológicos como a colite ulcerativa .

VALORES ESPERADOS

Sessenta e quatro (64) amostras normais testadas com ANCA. Todas as amostras deram negativas em ANCA com diluição 1:20.

Um teste ANCA positivo no cenário clínico apropriado é útil no diagnóstico de vascularidades sistémicas e problemas de cólen irritado 7-11. A coloração cANCA ocorre mais na granulomatose Wegener e a pANCA na poliangite microscópica, glomerulonefrite crescente pauci-imune e colite ulcerativa 7-11. Noutras vascularidades (poliartrite nodosa, doença

takayasu, artrite das células gigantes, doença Behcet) os ANCA são raros ou estão ausentes. A incidência de ANCA na granulomatose Wegener e outras vascularidades está resumida na tabela 1, na extremidade do original. No projecto de padronização do teste de colaboração europeu de ANCA, Hagan e colaboradores¹⁶ avaliaram a utilidade do teste IF indirecto no diagnóstico das vascularidades do sistema idiopático.

Neste estudo, os ANCA foram encontrados em 85% dos pacientes com granulomatose Wegener, dos quais 64% eram positivos em cANCA e 21% em pANCA. Os pANCA eram mais prevalentes que os cANCA na poliangeite microscópica (58% vs 23%) com sensibilidade de 81% para poliangeite microscópica e 82% para glomerulonefrite progressiva idiopática. Tirando a doença e dos controlos de saúde, os ANCA estavam presentes em 19% e 6% respectivamente, dando uma especificidade de 76% de controlos de doença e 94% de pessoas sãs (tabela 2 na extremidade do original).

Contudo, o valor previsível positivo de testes ANCA é muito melhor e mais significativo se avaliado com os sintomas clínicos. Jennette Wilman e Falk¹⁷ relataram um valor positivo de 92% num paciente com creatinina sérica >3 mg/dl. Nos pacientes com valor positivo inicial baixo, um resultado ANCA positivo aumenta a hipótese de uma doença de forma a garantir mais avaliação. Os autores concluíram que o teste ANCA em pacientes com grandes evidências clínicas de glomerulonefrite crescente pauci-imune é mais útil para substanciar o diagnóstico, enquanto o ANCA em pacientes com fraca evidência clínica é mais útil para desencadear o diagnóstico.

CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE ESPECÍFICA

O teste foi comparado a outro teste ANCA de imunofluorescência indirecta. A comparação incluiu 129 amostras séricas obtidas num laboratório de diagnóstico especializado na detecção de doenças autoimunes. Estas amostras foram testadas de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados:

		IMMCO		Total
		Positiva	Negativa	
OUTRA	Positiva	49	0	49
	Negativa	7	73	80
	Total	56	73	129
		Especificidade relativa: 91%		
		Sensibilidade relativa: 100%		
		Acordo relativo: 95%		

Sete amostras discrepantes observadas com o método de imunofluorescência indirecta foram testadas pelo ELISA em anticorpos à mieloperoxidase (MPO) ou antigénios proteinase 3 (PR3), os dois maiores antigénios ligados aos ANCA. Dos 7 positivos no ELISA e negativos no outro teste, só 1 deu positivo no ELISA, sugerindo a verdadeira positividade das amostras.

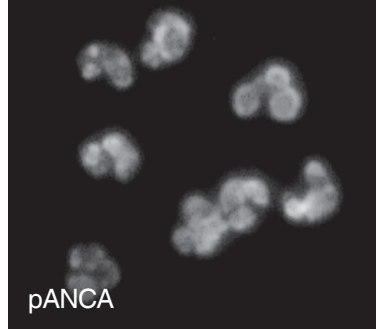
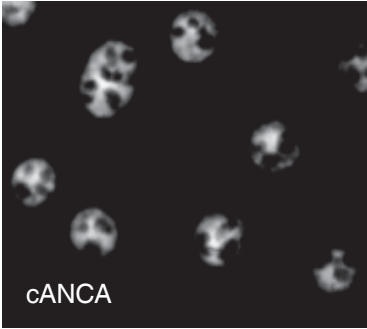
Reactividade cruzada:

Anticorpos antinucleares (ANA) podem ter reacções positivas nos neutrófilos. Para determinar as reactividades dos neutrófilos ANA, que se pode confundir com a reactividade ANCA, testámos 25 amostras ANA positivas em várias especificidades de anticorpos em etanol, formalina e lâminas COMVI. Todo o soro positivo ANA à excepção das especificidades de anticorpos SS-A (Ro) e SS-B (La), apresentaram reacções nucleares. Estas reacções ANA ou permanecem nucleares ou se tornam negativas em lâminas fixadas com formalina.

Reproductibilidade:

Estudos foram feitos para demonstrar a variabilidade intra e inter-teste. 4 soros positivos ANCA (2 c e 2 p ANCA) e 1 negativo foram testados com uma diluição 1:20. Foram testados em 3 lotes diferentes de etanol, formalina e COMVI durante 4 dias para determinar intra e inter reproductibilidade. Amostras negativas continuaram negativas e as positivas deram a titulação esperada.

ANCA Reactions on Ethanol Fixed Slides



ANCA Reactions on Formalin Fixed Slides

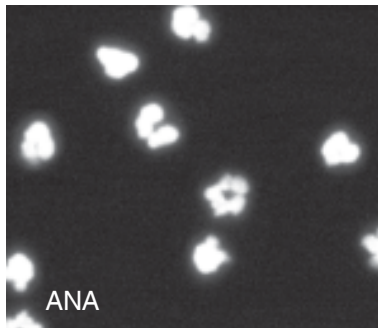
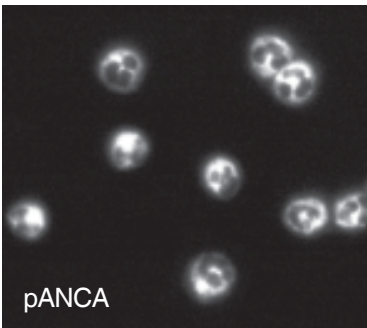


Table 1: Prevalence of ANCA¹

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: Sensivity and Specificity of the IF Test in Patients with Systemic Vasculitides (Adapted from reference 16)

Patients	N	cANCA	Sensitivity %	
			pANCA	c or pANCA
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

REFERENCES•REFERENCIAS•LITERATUR•RIFERIMENTI

1. Nölle B, Specks U, Lüderman 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: 1287-1296, 1990.
3. Van der Woude FJ, Daha MR and Van Es LA. The current status of neutrophil cytoplasmic antibodies. *Clin Exp Immunol* 78: 143-148, 1989.
4. Specks U, Wheatley CL, McDonald TJ, Rohrbach MS and DeRemee RA. Anticytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and follow up of Wegener's granulomatosis. *Mayo Clin Proc* 64: 28-36, 1989.
5. Tervet JWC, van der Woude FJ, Fauci AS and 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: 119-122, 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. ANCA's weigh 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) 1993.
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, Hermans 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.

NOTES:



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands
Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com

REV.SEP2004

Document No. PI4116 CE

For technical assistance please contact:



IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

IMMCO
DIAGNOSTICS

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immcodiagnostics.com

or your local product distributor