

**ANCA - ETHANOL**

Indirect Immunofluorescence HUMAN NEUTROPHILS

**A.MENARINI**  
diagnostics

COD 50053 10 x 6 tests

COD 50054 10 x 12 tests

Only for *in vitro* use in the clinical laboratory**INTENDED USE**

Reagents for the qualitative determination of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in human serum by indirect immunofluorescence.

**PRINCIPLE OF THE METHOD**

Serum anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) bind to the corresponding antigens present in human neutrophils. The resulting antigen-antibody complexes are detected by means of a fluorescein labeled anti-human immunoglobulin, and visualized with the aid of a fluorescence microscope<sup>1</sup>.

**CONTENTS**

|                  |                         | COD 50053    | COD 50054     |
|------------------|-------------------------|--------------|---------------|
| <b>SLIDE</b>     | Slides                  | 10 x 6 tests | 10 x 12 tests |
| <b>PBS</b>       | PBS (10x)               | 1 x 100 mL   | -             |
| <b>CONTROL +</b> | P-ANCA Positive Control | 1 x 1 mL     | -             |
| <b>CONTROL +</b> | C-ANCA Positive Control | 1 x 1 mL     | -             |
| <b>CONTROL -</b> | Negative Control        | 1 x 1 mL     | -             |
| <b>CONJUGATE</b> | IgG FITC/Evans          | 1 x 5 mL     | -             |
| <b>MOUNT</b>     | Mounting Medium         | 1 x 5 mL     | -             |
| <b>COVER SLD</b> | Coverslips              | 1 x 12       | -             |

**COMPOSITION**

**SLIDE** Ethanol-fixed human neutrophils immobilized on each well.

**PBS** Sodium phosphate 112.5 mmol/L, potassium phosphate 30 mmol/L, sodium chloride 1.15 mol/L, sodium azide 0.95 g/L, pH 7.2.

**CONTROL+** **P-ANCA:** Human serum containing anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) "perinuclear pattern", sodium azide 0.95 g/L.

**CONTROL+** **C-ANCA:** Human serum containing anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) "cytoplasmic pattern", sodium azide 0.95 g/L.

**CONTROL -** Human serum, sodium azide 0.95 g/L.

**CONJUGATE** Goat anti-human IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), Evans blue 0.01 g/L, sodium azide 0.95 g/L.

**MOUNT** Mowiol 1%, Glycerol 87%, Tris 20 mmol/L, sodium azide 0.95 g/L.

*Human sera used in the preparation of the positive and negative controls have been tested and found to be negative for the presence of antibodies anti-HIV and anti-HCV, as well as for HBs antigen. However, the controls should be handled cautiously as potentially infectious.*

**STORAGE**

Store at 2-8°C.

Reagents are stable until the expiry date shown on the label when stored tightly closed and if contamination is prevented during their use.

**Indications of deterioration:**

- Liquid components: Presence of particulate material, turbidity.
- Slides: rips in the sealing bag, macroscopic defects on the cell culture like scratches or monolayer peeling off.

**AUXILIARY REAGENTS**

**PBS** PBS (10x)

**CONJUGATE** IgG FITC/Evans

**MOUNT** Mounting Medium

**CONTROL + P-ANCA:** Human serum containing anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) "cytoplasmic pattern", sodium azide 0.95 g/L.

**CONTROL + C-ANCA:** Human serum containing antinuclear antibodies (ANA) speckled pattern, sodium azide 0.95 g/L.

**CONTROL –** Negative Control.

**REAGENT PREPARATION**

**PBS:** Dilute PBS 1/10 with distilled water. Stable 1 month at 2-8°C, if stored at the recommended temperature, well closed and care is taken to prevent contamination during its use.

All other reagents are provided ready to use.

**ADDITIONAL EQUIPMENT**

- Moist chamber
- Wash tray
- Fluorescence microscope equipped with a 495 nm excitation filter and a 525 nm emission filter for FITC visualization

**SAMPLES**

Serum or plasma collected by standard procedures. Stable 7 days at 2-8°C.

Dilute samples 1/20 in PBS (see Reagent Preparation) before the assay.

For titration of positive samples, make two-fold serial dilutions starting from 1/40 in PBS.

However, each laboratory should establish its own sample dilution based on the population characteristics.

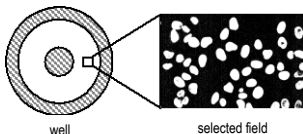
**PROCEDURE**

1. Bring the reagents and samples to room temperature.
2. Place 1 drop (25  $\mu$ L) of the diluted sample or Control on each slide well, making sure that it is completely covered (Note 1).
3. Incubate the slide for 30 minutes at room temperature (15-30°C) into a moist chamber.
4. Drain sample drops off by gently tapping the inclined slide. Avoid cross-contamination of the sera.
5. Rinse gently the slide with PBS (see Reagent Preparation). (Note 2).
6. Wash thoroughly the slide by immersing in a washing tray filled with PBS for 5 minutes. Change PBS and repeat wash.
7. Carefully dry off the slides by using the blotting paper provided. Keep the substrate moist along the procedure.
8. Place 1 drop of Conjugate on each well. Incubate the slide for 30 minutes at room temperature (15-30°C) into a moist chamber.
9. Wash (step 6) and dry (step 7).

10. Place several drops of Mounting Medium on the slide and cover with a coverslip avoiding the formation of air bubbles.

## READING

Examine the slide using the fluorescence microscope (250-400x). For best results, the slides should be read immediately. Select reading fields in the area indicated in the picture, between the center area and the edge area. Select fields with uniform spacing between cells and uniform nuclei brightness. Fluorescent intensity in the center and edge areas is not representative of the slide preparation.



Observation of specific fluorescent staining, described as follows at the recommended dilution, should be considered as a positive result.

There are two main staining patterns in **ethanol**-fixed neutrophils associated with autoimmune vasculitis: a diffuse granular cytoplasmic staining with higher interlobular intensity (C-ANCA), and a compact staining of the perinuclear zone of the cytoplasm (P-ANCA).

In some cases, the P-ANCA staining pattern observed on ethanol-fixed neutrophils may be due to antinuclear antibodies (ANA). This result should be confirmed by running the sample on **formalin**-fixed neutrophils.

There is only one staining pattern on formalin-fixed neutrophils associated with autoimmune vasculitis: C-ANCA

In addition to these staining patterns, other less frequent patterns, like X-ANCA (or atypical P-ANCA), can be identified, showing a broad non homogeneous perinuclear staining, eventually accompanied by a diffuse cytoplasmic pattern with no accentuation of the interlobular zone. For a proper observation of this pattern, the use of **methanol**-fixed neutrophils is recommended.

Positive sera may be tittered. The serum titer is defined as the highest dilution showing a positive result.

When none of the above specific stainings are observed, the result should be considered negative for these autoantibodies.

## QUALITY CONTROL

Positive Controls (CONTROL +) and Negative Control (CONTROL -) provided with kits cod 50053 should be tested together with the patients samples, in order to verify the assay performance.

Positive Controls (CONTROL +) should give the above described specific staining.

Negative Control (CONTROL -) should not give any specific staining.

Each laboratory should establish its own internal Quality Control scheme and procedures for corrective action if controls do not recover within the acceptable tolerances.

## ASSAY CHARACTERISTICS

The IgG FITC/Evans conjugate is calibrated versus the International Standard of the WHO for sheep anti-human immunoglobulins conjugated with FITC.

The specificity of the C-ANCA Positive Control has been verified against the PR3-ANCA Human Reference serum #16 from the CDC. The specificity of the P-ANCA Positive Control has been verified against the PR3-ANCA Human Reference serum #15 from the CDC.

The C-ANCA staining pattern on ethanol-fixed neutrophils is the result of the antibody binding mainly to the antigen proteinase 3. In formalin-fixed neutrophils, this staining pattern is due to the antibody binding to myeloperoxidase.

The P-ANCA staining pattern on ethanol-fixed neutrophils is the result of the antibody binding to myeloperoxidase.

### **DIAGNOSTIC CHARACTERISTICS**

There is a strong association between Wegener's granulomatosis and the presence of C-ANCA pattern associated with PR-3. This staining pattern is almost exclusively found in patients with this disease and its diagnostic specificity is higher than 90%. Sensitivity depends on the disease stage but can be found in average around 66%<sup>(2)</sup>. P-ANCA pattern associated with MPO can be found in necrotizing idiopathic vasculitis, like microscopic polyangiitis, idiopathic crescentic glomerulonephritis, Churg-Strauss syndrome, polyarteritis nodosa and Wegener's granulomatosis. Sensitivities of P-ANCA for microscopic polyangiitis and Churg-Strauss syndrome are 58% and 74.5%, respectively, whereas specificities are 81% and 95%<sup>(3,4)</sup>. X-ANCA pattern is associated with the diagnostic of inflammatory bowel diseases like ulcerative colitis (50-70%) and Crohn's disease (10-30%), as well as other nonvasculitic autoimmune diseases<sup>(5)</sup>.

Clinical diagnosis should not be made on the findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

### **NOTES**

1. Avoid touching the cells fixed into the wells along the procedure.
2. Use a squeeze bottle or a pipette to wash the slides, avoiding cross-contamination among the adjacent samples.

### **BIBLIOGRAPHY**

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, Allen NB, Landsman P, Feussner JR The Role of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (c-ANCA) Testing in the Diagnosis of Wegener Granulomatosis: A Literature Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med.* 1995;123(12):925-932.
3. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, Lesavre P, Lüdemann J, Rasmussen N, Sinico RA, Wiik A, van der Woude FJ. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. *Kidney Int.* 1998; 53 (3): 743-53
4. Sinico RA, Di Toma L, Maggiore U, Bottero P, Radice A, Tosoni C, Grasselli C, Pavone L, Gregorini G, Monti S, Frassi M, Vecchio F, Corace C, Venegoni E, Buzio C. Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):2589-93.
5. Savage J, Dimech W, Fritzier M, et al. Addendum to the international Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *Am J Clin Pathol* 2003;120:312-318.

**ANCA-Etanolo**Immunofluorescenza Indiretta **NEUTROFILI UMANI**

COD 50053 10 x 6 det.

COD 50054 10 x 12 det.

Solo per uso in vitro nel laboratorio clinico

**A.MENARINI**  
diagnostics**USO PREVISTO**

Reattivi per la determinazione qualitativa degli anticorpi anti-citoplasma utilizzati nei metodi di immunofluorescenza indiretta per la rilevazione di anticorpi nel siero umano.

**PRINCIPIO DEL METODO**

Gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) del siero si legano ai corrispondenti antigeni presenti nei neutrofili umani. Una volta uniti, gli anticorpi vengono evidenziati mediante l'incubazione con un anticorpo contro le immunoglobuline umane coniugato con fluoresceina e visualizzati mediante microscopia a fluorescenza<sup>1</sup>.

**CONTENUTO**

|                  |                      | COD 50053   | COD 50054    |
|------------------|----------------------|-------------|--------------|
| <b>SLIDE</b>     | Vetrini              | 10 x 6 det. | 10 x 12 det. |
| <b>PBS</b>       | PBS (10x)            | 1 x 100 mL  | -            |
| <b>CONTROL +</b> | Cont. Posit. P-ANCA  | 1 x 1 mL    | -            |
| <b>CONTROL +</b> | Cont. Posit. C-ANCA  | 1 x 1 mL    | -            |
| <b>CONTROL -</b> | Controllo Negativo   | 1 x 1 mL    | -            |
| <b>CONJUGATE</b> | IgG FITC/Evans       | 1 x 5 mL    | -            |
| <b>MOUNT</b>     | Mounting Medium      | 1 x 5 mL    | -            |
| <b>COVER SLD</b> | Vetrini coprioggetto | 1 x 12      | -            |

**COMPOSIZIONE****SLIDE** Neutrofili umani fissati in etanolo.**PBS** Fosfato di sodio 112,5 mmol/L, fosfato di potassio 30 mmol/L, cloruro sodico 1,15 mol/L, azide di sodio 0,95 g/L, pH 7,2.**CONTROL + P-ANCA:** Siero umano con anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) "pattern perinucleare", azide di sodio 0,95 g/L.**CONTROL + C-ANCA:** Siero umano con anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) "pattern citoplasmatico", azide di sodio 0,95 g/L.**CONTROL-** Siero umano, azide di sodio 0,95 g/L.**CONJUGATE** Anticorpi di capra anti-immunoglobuline IgG umane coniugati con isotiocianato di fluoresceina (FITC), blu di Evans 0,01 g/L, azide di sodio 0,95 g/L.**MOUNT** Mezzo di Montaggio: Mowiol 1%, Glicerolo 87%, Tris 20 mmol/L, azide di sodio 0,95 g/L.

*I sieri umani utilizzati nella preparazione del Controllo Positivo e Negativo, è negativo per l'antigene HBs e per gli anticorpi anti-HCV e anti-HIV. Tuttavia, i controlli vanno trattati con precauzione come potenzialmente infettivi.*

## CONSERVAZIONE

Conservare a 2-8°C.

I reattivi sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull' etichetta, purchè conservati ben chiusi ed evitandone la contaminazione durante l'uso.

### Indicazioni di deterioramento:

- Componenti liquidi: Presenza di particelle, torbidità.
- Portaoggetti: Rottura della busta contenente i vetrino, difetti macroscopici come distacco o alterzioni delle cellule.

## REATTIVI AUSILIARI

**PBS** PBS (10x).

**CONJUGATE** IgG FITC/Evans, coniugate con colorante di contrasto blu di Evans.

**MOUNT** Mezzo di Montaggio.

**CONTROL + P-ANCA:** Siero umano con anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) "pattern perinucleare", azide di sodio 0,95 g/L.

**CONTROL + C-ANCA:** Siero umano con anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) "pattern citoplasmatico", azide di sodio 0,95 g/L.

**CONTROL-** Controllo Negativo.

## PREPARAZIONE DEI REATTIVI

**PBS:** Effettuare una diluizione 1/10 del PBS con acqua distillata. Stabile 1 mese a 2-8°C, se mantenuto alla temperatura raccomandata, ben chiuso e se si presta attenzione a evitare la contaminazione durante l'uso.

Gli altri componenti sono pronti all'uso.

## MATERIALI AGGIUNTIVI

- Camera umida
- Vaschetta di lavaggio
- Microscopio in fluorescenza equipaggiato con filtri di eccitazione da 495 nm e di emissione da 525 nm per la visualizzazione del FITC.

## CAMPIONI

Siero o plasma raccolti mediante procedimenti standard. Stabile una settimana a 2-8°C.

Diluire i campioni 1/20 in PBS (vedere Preparazione dei Reattivi) prima del test.

Per la titolazione di un campione positivo, realizzare diluizioni doppie in PBS a partire da 1/40.

Tuttavia, ogni laboratorio dovrà predisporre un proprio esempio di diluizione sulla base delle caratteristiche della popolazione.

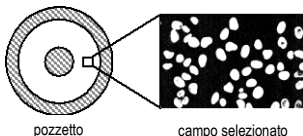
## PROCEDIMENTO

1. Portare i reattivi ed i campioni a temperatura ambiente.
2. Depositare una goccia (25 µL) di campione diluito o dei Controlli nei pozzetti del vetrino, procurando di coprirlo perfettamente (Nota 1).
3. Incubare il vetrino in camera umida per 30 minuti a temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminare le gocce dei campioni inclinando il vetrino e picchiettandolo leggermente. Evitare di mescolare i sieri.
5. Eliminare il siero rimanente nel vetrino lavandolo con PBS (vedere preparazione del Reattivo). (Nota 2).
6. Lavare il vetrino immergendolo in una vaschetta con PBS per 5 minuti. Cambiare il PBS e ripetere il lavaggio.
7. Asciugare con cura il vetrino utilizzando la carta bibula fornita. Il substrato deve restare sempre umido.

8. Depositare una goccia di Coniugate in ogni pozzetto. Collocare il vetrino in una camera umida e incubare a temperatura ambiente (15-30°C) per 30 minuti.
9. Lavare (vedere punto 6) ed asciugare (vedere punto 7).
10. Depositare alcune gocce di Mounting Medium sopra il vetrino e porre un coprioggetti evitando la formazione di bolle d'aria.

## LETTURA

Esaminare le cellule con un microscopio a fluorescenza (250-400x). Si raccomanda di eseguire la lettura immediatamente. Per eseguire la lettura, selezionare campi di osservazione della zona indicata nello schema, tra il centro e la periferia del pozzetto. Selezionare campi con distribuzione di cellule ed intensità di fluorescenza uniformi. L'intensità di fluorescenza alla periferia o al centro del pozzetto non è da tenere in considerazione.



L'osservazione del marcaggio fluorescente specifico descritto di seguito indica un risultato positivo alla diluizione raccomandata.

Esistono due pattern principali di marcatura in neutrofilii fissati con **etanolo** associati a vasculite autoimmuni: una marcatura granulare diffusa del citoplasma del neutrofilo con maggiore intensità interlobulare (C-ANCA) e una marcatura compattata della zona perinucleare del citoplasma (P-ANCA).

In alcuni casi, il pattern di marcatura P-ANCA rilevato nei neutrofilii fissati con etanolo può essere riconducibile ad anticorpi anti-nucleari (ANA). Tali esiti vanno confermati testando il campione in neutrofilii fissati con **formalina**.

Nei neutrofilii fissati con formalina si rileva soltanto un pattern di marcatura associato a vasculite autoimmune: C-ANCA.

Oltre a questi due pattern di marcatura, è possibile individuarne di altri meno frequenti come X-ANCA (o P-ANCA atipico), con estesa marcatura non omogenea perinucleare eventualmente associata a marcatura citoplasmatica diffusa senza accentuazione interlobulare. Ai fini di una corretta visualizzazione di tale pattern, si consiglia l'impiego di neutrofilii fissati con **metanolo**.

I campioni positivi possono essere titolati intendendo per titolo la diluizione maggiore con esito positivo.

In caso di mancato rilevamento delle marcature specifiche descritte, il risultato sarà negativo per gli anticorpi indicati.

## CONTROLLO DI QUALITA'

Il Controllo Positivo (CONTROL+) e il Controllo Negativo (CONTROL-) forniti con i kits cod 50053 debbono essere testati insieme ai campioni dei pazienti per verificare la funzionalità del procedimento.

Il Controllo Positivo (CONTROL+) deve presentare il pattern tipico, descritto sopra.

Il Controllo Negativo (CONTROL-) non deve dare luogo a nessun tipo di fluorescenza specifica.

Ogni laboratorio deve stabilire il proprio programma di Controllo di Qualità interno, così pure procedimenti di correzione nel caso che i controlli non rientrino nelle tolleranze accettabili.

## CARATTERISTICHE DEL TEST

I coniugati IgG FITC/Evans sono calibrati sulla base dello standard internazionale della OMS di anti-immunoglobuline umane di pecora coniugate con FITC.

La specificità del Controllo Positivo AMA è stata verificata contro un siero umano di riferimento PR3-ANCA #16 della CDC. La specificità del Controllo Positivo P-ANCA è stata verificata contro un siero umano di riferimento MPO-ANCA #15 della CDC.

Lo standard di colorazione di C-ANCA sui neutrofili fissati con etanolo è il risultato dell'unione degli anticorpi principalmente all'antigene proteinasi 3. Nel caso dei neutrofili fissati con formalina, tale standard di colorazione si deve all'unione degli anticorpi alla mieloperossidasi.

Lo standard di colorazione di P-ANCA sui neutrofili fissati con etanolo è il risultato dell'unione degli anticorpi alla mieloperossidasi.

Il pattern di marcatura X-ANCA, rilevato su vetrino fissato con metanolo, deriva dall'unione dell'anticorpo con molteplici specificità antigeniche quali catepsina G, lactoferrina ed elastasi.

## **CARATTERISTICHE DIAGNOSTICHE**

Si rileva un vincolo fortissimo tra la granulomatosi di Wegener e la comparsa della marcatura C-ANCA associata a PR3. Tale pattern di marcatura concerne in via esclusiva pazienti affetti da tale patologia, con specificità diagnostica superiore al 90%. Sebbene la sensibilità dipenda dallo stadio della malattia, si può attestare circa sul 66%<sup>(2)</sup>. Il pattern P-ANCA associato a MPO è rinvenibile nelle vasculiti idiopatiche necrotizzanti come la poliangite microscopica, la glomerulonefrite idiopatica a semilune, la sindrome di Churg-Strauss, la poliarterite nodosa e la granulomatosi di Wegener. Le sensibilità dei P-ANCA per la poliangite microscopica e per la sindrome di Churg-Strauss sono pari rispettivamente al 58% e al 74,5% mentre le specificità si attestano rispettivamente sull'81% e sul 95%<sup>(3,4)</sup>. Il pattern X-ANCA è associato alla diagnosi di malattie infiammatorie dell'intestino quali colite ulcerosa (50-70%) e la malattia di Crohn (10-30%) nonché ad altre malattie autoimmuni non vascolitiche<sup>(5)</sup>.

La diagnosi clinica non può essere effettuata esclusivamente tenendo conto del risultato del presente test, ma deve integrare i dati clinici e di laboratorio.

## **NOTE**

1. Evitare di toccare le cellule del pozzetto durante tutta la prova.
2. Utilizzare una spruzzetta o pipetta per questo lavaggio, evitando la possibile contaminazione con i campioni adiacenti.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, Allen NB, Landsman P, Feussner JR The Role of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (c-ANCA) Testing in the Diagnosis of Wegener Granulomatosis: A Literature Review and Meta-analysis. Ann Intern Med. 1995;123(12):925-932.
3. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, Lesavre P, Lüdemann J, Rasmussen N, Sinico RA, Wiik A, van der Woude FJ. Diagnostic value of standardized assays for antineutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. Kidney Int. 1998; 53 (3): 743-53
4. Sinico RA, Di Toma L, Maggiore U, Bottero P, Radice A, Tosoni C, Grasselli C, Pavone L, Gregorini G, Monti S, Frassi M, Vecchio F, Corace C, Venegoni E, Buzio C. Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. Arthritis Rheum. 2005;52(9):2589-93.
5. Savige J, Dimech W, Fritzler M, et al. Addendum to the international Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. Am J Clin Pathol 2003;120:312-318.



**ANCA - ETANOL**

Inmunofluorescencia Indirecta - NEUTRÓFILOS HUMANOS



COD 50053 10 x 6 det.

COD 50054 10 x 12 det.

Sólo para uso in vitro en el laboratorio clínico

**A.MENARINI**  
diagnostics**USO PREVISTO**

Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) en suero humano mediante inmunofluorescencia indirecta.

**FUNDAMENTO DEL MÉTODO**

Los anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) del suero se unen a sus correspondientes antígenos presentes en los neutrófilos humanos. Una vez unidos, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas humanas conjugado con fluoresceína y se visualizan por microscopía de fluorescencia<sup>1</sup>.

**CONTENIDO**

|                  |                     | COD 50053   | COD 50054    |
|------------------|---------------------|-------------|--------------|
| <b>SLIDE</b>     | Portaobjetos        | 10 x 6 det. | 10 x 12 det. |
| <b>PBS</b>       | PBS (10x)           | 1 x 100 mL  | -            |
| <b>CONTROL +</b> | Cont. Posit. P-ANCA | 1 x 1 mL    | -            |
| <b>CONTROL +</b> | Cont. Posit. C-ANCA | 1 x 1 mL    | -            |
| <b>CONTROL -</b> | Control Negativo    | 1 x 1 mL    | -            |
| <b>CONJUGATE</b> | IgG FITC/Evans      | 1 x 5 mL    | -            |
| <b>MOUNT</b>     | Mounting Medium     | 1 x 5 mL    | -            |
| <b>COVER SLD</b> | Cubreobjeto         | 1 x 12      | -            |

**COMPOSICIÓN**

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>SLIDE</b>     | Neutrófilos humanos fijados con etanol.  |
| <b>PBS</b>       | Fosfato de sodio 112,5 mmol/L, fosfato de potasio 30 mmol/L, cloruro sódico 1,15 mol/L, azida de sodio 0,95 g/L, pH 7,2.                                     |
| <b>CONTROL+</b>  | <b>P-ANCA:</b> Suero humano con anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) "patrón perinuclear", azida de sodio 0,95 g/L.                             |
| <b>CONTROL+</b>  | <b>C-ANCA:</b> Suero humano con anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) "patrón citoplasmático", azida de sodio 0,95 g/L.                          |
| <b>CONTROL-</b>  | Suero humano, azida de sodio 0,95 g/L.   |
| <b>CONJUGATE</b> | Anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas IgG humanas conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), azul de Evans 0,01 g/L, azida de sodio 0,95 g/L. |
| <b>MOUNT</b>     | Medio de Montaje: Mowiol 1%, Glicerol 87%, Tris 20 mmol/L, azida de sodio 0,95 g/L.  |

*Los sueros humanos utilizados en la preparación del control negativo y el control positivo eran negativos para el antígeno HBs y para los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Sin embargo, los controles deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.*

## CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

### Indicaciones de deterioro:

- Componentes líquidos: Presencia de partículas, turbidez.
- Portaobjetos: Roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras o despegues en el cultivo de células.

## REACTIVOS AUXILIARES

**PBS** PBS (10x).

**CONJUGATE** IgG FITC/Evans.

**MOUNT** Medio de Montaje.

**CONTROL+ P-ANCA:** Suero humano con anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) "patrón perinuclear", azida de sodio 0,95 g/L.

**CONTROL+ C-ANCA:** Suero humano con anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) "patrón citoplasmático", azida de sodio 0,95 g/L.

**CONTROL-** Control Negativo.

## PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

**PBS:** Efectuar una dilución 1/10 del PBS con agua destilada. Estable 1 mes a 2-8°C, si se conserva a la temperatura recomendada, bien cerrado y se tiene cuidado para evitar contaminaciones durante su uso.

Los demás componentes están listos para su uso.

## EQUIPO ADICIONAL

- Cámara húmeda
- Cubeta de lavado
- Microscopio de fluorescencia equipado con filtros de excitación de 495 nm y de emisión de 525 nm para la visualización del FITC.

## MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. Estable una semana a 2-8°C.

Diluir las muestras 1/20 en PBS (ver Preparación de los Reactivos) antes del ensayo.

Para la titulación de una muestra positiva, realizar diluciones dobles en PBS a partir de la 1/40.

Sin embargo, cada laboratorio debería establecer su propio ejemplo de dilución basado en las características de la población.

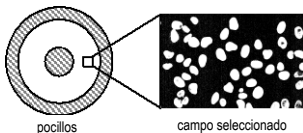
## PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
2. Depositar una gota (25  $\mu$ L) de la muestra diluida o de los Controles en los pocillos del portaobjetos, procurando cubrirlo perfectamente (Nota 1).
3. Incubar el portaobjetos en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminar las gotas de las muestras inclinando el portaobjetos y golpeándolo ligeramente. Evitar la mezcla de sueros.
5. Eliminar el suero remanente en el portaobjetos lavándolo con PBS (ver preparación del Reactivo). (Nota 2).
6. Lavar el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con PBS durante 5 minutos. Cambiar el PBS y repetir el lavado.
7. Secar cuidadosamente el portaobjetos utilizando el papel secante suministrado. El sustrato debe permanecer siempre húmedo.

8. Depositar una gota de Conjugate en cada pocillo. Colocar el portaobjetos en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.
9. Lavar (ver paso 6) y secar (ver paso 7).
10. Depositar varias gotas de Mounting Medium sobre el portaobjetos y colocar un cubreobjetos procurando evitar la formación de burbujas de aire.

## LECTURA

Examinar las células con un microscopio de fluorescencia (250-400x). Es recomendable realizar la lectura de inmediato. Para realizar la lectura, seleccionar campos de observación de la zona indicada en el esquema, entre el centro y la periferia del pocillo. Seleccionar campos con distribución de células e intensidad de fluorescencia uniformes. La intensidad de marcaje de la periferia o del centro del pocillo no es representativa de la preparación.



La observación de marcaje fluorescente específico descrito a continuación indica un resultado positivo a la dilución recomendada.

Existen dos patrones de marcaje principales en neutrófilos fijados con **etanol** asociados a vasculitis autoinmunes: un marcaje granular difuso del citoplasma del neutrófilo con mayor intensidad interlobular (C-ANCA), y un marcaje compactado de la zona perinuclear del citoplasma (P-ANCA).

En algunos casos, el patrón de marcaje P-ANCA observado en neutrófilos fijados con etanol puede deberse a anticuerpos anti-nucleares (ANA). Estos resultados deben ser confirmados ensayando la muestra en neutrófilos fijados con **formalina**.

En neutrófilos fijados con formalina, existe únicamente un patrón de marcaje asociado a vasculitis autoinmunes: C-ANCA.

Además de estos dos patrones de marcaje, es posible identificar otros menos frecuentes, como X-ANCA (o P-ANCA atípico), con marcaje extenso no homogéneo perinuclear. Puede ir acompañado de marcaje citoplasmático difuso sin acentuación interlobular. Para una adecuada visualización de este patrón, es recomendable utilizar neutrófilos fijados con **metanol**.

Las muestras positivas pueden titularse. Se define el título como la dilución mayor que da resultado positivo.

Cuando no se observa ninguno de los marcajes específicos descritos, el resultado es negativo para los autoanticuerpos indicados.

## CONTROL DE CALIDAD

Los Controles Positivos (CONTROL+) y el Control Negativo (CONTROL-) suministrados con los kits cod 50053 deben ser ensayados junto con las muestras de los pacientes para verificar la funcionalidad del procedimiento de ensayo.

Los Controles Positivos (CONTROL+) debe proporcionar el marcaje específico descrito en el apartado anterior.

El Control Negativo (CONTROL-) no debe proporcionar marcaje específico alguno.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

## **CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO**

- El conjugado IgG FITC/Evans está calibrado frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmunoglobulinas humanas de oveja conjugadas con FITC.
- La especificidad del Control Positivo C-ANCA está verificada frente al suero humano de referencia PR3-ANCA #16 de la CDC. La especificidad del Control Positivo P-ANCA está verificada frente al suero humano de referencia MPO-ANCA #15 de la CDC.
- El patrón de marcaje C-ANCA observado en portaobjetos fijados con etanol es el resultado de la unión del anticuerpo con la proteinasa 3.
- El patrón de marcaje P-ANCA, observado en portaobjetos fijados con etanol, es el resultado de la unión del anticuerpo con la mieloperoxidasa.

## **CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS**

Existe una muy fuerte asociación entre la granulomatosis de Wegener y la aparición de marcaje C-ANCA asociado a PR3. Este patrón de marcaje es prácticamente exclusivo de pacientes con esta enfermedad y su especificidad diagnóstica es superior al 90%. La sensibilidad depende del estadio de la enfermedad pero puede situarse en torno al 66%<sup>(2)</sup>. El patrón P-ANCA asociado a MPO, puede encontrarse en vasculitis idiopáticas necrosantes, como la poliangiitis microscópica, la glomerulonefritis creciente idiopática, el síndrome de Churg-Strauss, la poliarteritis nodosa y la granulomatosis de Wegener. Las sensibilidades de P-ANCA para poliangiitis microscópica y para el síndrome de Churg-Strauss son 58% y 74,5%, respectivamente, mientras que las especificidades son del 81% y del 95%<sup>(3,4)</sup>. El patrón X-ANCA está asociado al diagnóstico de enfermedades inflamatorias del intestino, como la colitis ulcerosa (50-70%) y la enfermedad de Crohn (10-30%), además de otras enfermedades autoinmunes no vasculíticas<sup>(5)</sup>.

El diagnóstico clínico no debe basarse exclusivamente en el resultado de este ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

## **NOTAS**

1. Evitar tocar las células del pocillo durante todo el procedimiento.
2. Utilizar un frasco lavador o pipeta para este lavado, evitando la posible contaminación con las muestras adyacentes.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, Allen NB, Landsman P, Feussner JR The Role of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (c-ANCA) Testing in the Diagnosis of Wegener Granulomatosis: A Literature Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med.* 1995;123(12):925-932.
3. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, Lesavre P, Lüdemann J, Rasmussen N, Sinico RA, Wiik A, van der Woude FJ. Diagnostic value of standardized assays for antineutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. *Kidney Int.* 1998; 53 (3): 743-53
4. Sinico RA, Di Toma L, Maggiore U, Bottero P, Radice A, Tosoni C, Grasselli C, Pavone L, Gregorini G, Monti S, Frassi M, Vecchio F, Corace C, Venegoni E, Buzio C. Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):2589-93.
5. Savige J, Dimech W, Fritzler M, et al. Addendum to the international Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *Am J Clin Pathol* 2003;120:312-318.

**ANCA-Éthanol**

Immunofluorescence Indirecte NEUTROPHILES HUMAINS



COD 50053 10 x 6 tests

COD 50054 10 x 12 tests

A utiliser uniquement in vitro dans les laboratoires cliniques

**A.MENARINI**  
diagnostics**USAGE PRÉVU**

Réactifs pour la détermination qualitative d'anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles (ANCA) dans le sérum humain par immunofluorescence indirecte.

**PRINCIPE DE LA METHODE**

Les anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles (ANCA) du sérum se lient aux antigènes correspondants présents dans les neutrophiles humains. Les complexes antigènes-anticorps résultants sont détectés au moyen d'un anticorps anti-immunoglobuline humaine marqué à la fluorescéine et visualisés à l'aide d'un microscope à fluorescence<sup>1</sup>.

**CONTENU**

|                  |                         | COD 50053    | COD 50054     |
|------------------|-------------------------|--------------|---------------|
| <b>SLIDE</b>     | Lames                   | 10 x 6 tests | 10 x 12 tests |
| <b>PBS</b>       | PBS (10x)               | 1 x 100 mL   | -             |
| <b>CONTROL +</b> | Contrôle Positif P-ANCA | 1 x 1 mL     | -             |
| <b>CONTROL +</b> | Contrôle Positif C-ANCA | 1 x 1 mL     | -             |
| <b>CONTROL -</b> | Contrôle Négatif        | 1 x 1 mL     | -             |
| <b>CONJUGATE</b> | IgG FITC/Evans          | 1 x 5 mL     | -             |
| <b>MOUNT</b>     | Mounting Medium         | 1 x 5 mL     | -             |
| <b>COVER SLD</b> | Couvre-lames            | 1 x 12       | -             |

**COMPOSITION**

**SLIDE** Neutrophiles humains fixés à l'éthanol dans chaque puits.

**PBS** Phosphate de sodium 112,5 mmol/L, phosphate de potassium 30 mmol/L, chlorure de sodium 1,15 mol/L, azide de sodium 0,95 g/L, pH 7,2.

**CONTROL + P-ANCA:** Sérum humain contenant des anticorps anticytoplasmes des neutrophiles (ANCA) « modèle périnucléaire », azide de sodium 0,95 g/L.

**CONTROL + C-ANCA:** Sérum humain contenant des anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles (ANCA) « modèle cytoplasmique », azide de sodium 0,95 g/L.

**CONTROL-** Sérum humain, azide de sodium 0,95 g/L.

**CONJUGATE** Anticorps de chèvre anti-IgG humaine conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), bleu Evans 0,01 g/L, azide de sodium 0,95 g/L.

**MOUNT** Milieu de Montage: Mowiol 1%, Glycérol 87%, Tris 20 mmol/L, azide de sodium 0,95 g/L.

*Les sérums humains utilisés pour la préparation des contrôles positif et négatif sont négatifs pour l'antigène HBs et pour les anticorps anti-HCV et anti-HIV. Cependant, les contrôles doivent être traités avec précaution comme potentiellement infectieux.*

## CONSERVATION

Conserver à 2-8°C.

Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite indiquée sur l'étiquette à condition d'être toujours conservés bien fermés et d'éviter toute contamination pendant leur utilisation.

### Indications de dégradation:

- Composants liquides: Présence de particules, turbidité.
- lames: ruptures de l'emballage, défauts macroscopiques des cultures cellulaires comme des éraflures ou des décollages de la monocouche.

## REACTIFS SUPPLEMENTAIRES

**PBS** PBS (10x).

**CONJUGATE** IgG FITC/Evans.

**MOUNT** Milieu de Montage.

**CONTROL+ P-ANCA:** Sérum humain contenant des anticorps anticytoplastes des neutrophiles (ANCA) « modèle périnucléaire », azide de sodium 0,95 g/L.

**CONTROL+ C-ANCA:** Sérum humain contenant des anticorps anti-cytoplaste des neutrophiles (ANCA) « modèle cytoplasmique », azide de sodium 0,95 g/L.

**CONTROL-** Contrôle négatif.

## PREPARATION DU REACTIF

**PBS:** Effectuer une dilution 1/10 du PBS avec de l'eau distillée. Stable 1 mois à 2-8°C, s'il est conservé à la température recommandée, bien fermé et si des précautions sont prises pour éviter les contaminations pendant son utilisation.

Les autres réactifs sont prêts à l'emploi.

## EQUIPEMENT SUPPLEMENTAIRE

- Chambre humide
- Boîte de lavage
- Microscope à fluorescence équipé d'un filtre à excitation 495 nm et d'un filtre à émission à 525 nm pour la visualisation FITC.

## ECHANTILLONS

Le sérum ou le plasma est collecté par des procédures standards. Stables 1 semaine à 2-8°C.

Diluer l'échantillon au 1/20 dans du PBS (voir Préparation des Réactifs) avant le test.

Pour titrer les échantillons positifs, faire des doubles dilutions en série à partir de celle au 1/40 dans du PBS.

Toutefois, chaque laboratoire devrait établir son propre exemple de dilution basé sur les caractéristiques de la population.

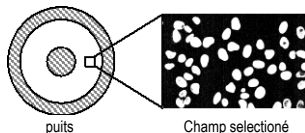
## PROCEDURE

1. Placer les réactifs et les échantillons à température ambiante.
2. Déposer une goutte (25 µL) de l'échantillon dilué ou du Contrôle dans chaque puits de la lame, faire attention qu'il soit complètement recouvert (Note 1).
3. Incuber la lame 30 minutes à température ambiante (15-30°C) dans une chambre humide.
4. Eliminer les gouttes d'échantillons en tapotant doucement la lame inclinée. Eviter des contaminations entre les sérums.
5. Rincer doucement la lame avec le PBS (voir Préparation des Réactifs) (Note 2).
6. Bien laver la lame en l'immergeant dans la boîte de lavage remplie de PBS pendant 5 minutes. Changer le PBS et répéter le lavage.
7. Sécher avec précaution les lames en utilisant le papier absorbant fourni. Garder la coupe de tissu humide pendant la procédure.

8. Déposer 1 goutte de Conjugate dans chaque puits. Incuber la lame 30 minutes à température ambiante (15-30°C) dans une chambre humide.
9. Laver (étape 6) et sécher (étape 7).
10. Déposer plusieurs gouttes de Mounting Medium sur la lame et la recouvrir avec un couvre-lame en évitant la formation de bulles d'air.

## LECTURE

Examiner la lame en utilisant un microscope à fluorescence (250-400x). Pour de meilleurs résultats, les lames doivent être lues immédiatement. Sélectionner les champs de lecture dans l'aire indiquée sur la figure, entre le centre de l'aire et le bord de l'aire. Sélectionner les champs avec un espace uniforme entre les cellules et une brillance des noyaux uniforme. L'intensité de la fluorescence au centre et au bord des régions n'est pas représentative de la préparation de la lame.



L'observation du marquage fluorescent spécifique décrit ci-dessous indique un résultat positif à la dilution recommandée.

Il existe deux aspects de marquage principaux dans les neutrophiles fixés avec de l'**éthanol** associés aux vasculites auto-immunes: un marquage granulaire diffus du cytoplasme du neutrophile avec une plus grande intensité interlobulaire (C-ANCA) et un marquage compacté de la zone périnucléaire du cytoplasme (P-ANCA).

Dans certains cas, le schéma de marquage de P-ANCA observé dans les neutrophiles fixés avec de l'**éthanol** peut être dû à des anticorps antinucléaires (ANA). Ces résultats devront être confirmés en analysant l'échantillon dans des neutrophiles fixés avec du **formol**.

Dans les neutrophiles fixés avec du formol, il n'existe qu'un aspect de marquage associé aux vasculites auto-immunes: C-ANCA.

Outre ces deux aspects de marquage, il est possible d'en identifier d'autres moins fréquents, comme X-ANCA (ou P-ANCA atypique), avec un marquage étendu non homogène périnucléaire. Il peut être accompagné d'un marquage cytoplasmique diffus sans accentuation interlobulaire. Pour une visualisation adéquate de cet aspect, il est recommandé d'utiliser des neutrophiles fixés avec du **méthanol**.

Les échantillons positifs peuvent être titrés. Le titre est défini comme la plus grande dilution qui donne un résultat positif.

Lorsque l'on n'observe aucun des marquages spécifiques décrits, le résultat est négatif pour les autoanticorps indiqués.

## CONTROLE DE QUALITE

Le Contrôle Positif (CONTROL+) et le Contrôle Négatif (CONTROL-) fournis avec les kits cod 50053 doivent être testés ensemble sur des échantillons de patients afin de vérifier la performance du test.

Le Contrôle Positif (CONTROL+) doit donner les marquages spécifiques décrits ci-dessus.

Le Contrôle Négatif (CONTROL-) ne doit donner aucun marquage spécifique.

Chaque laboratoire doit établir ses propres protocoles et méthodes de Contrôle de Qualité interne afin d'apporter les modifications nécessaires en cas de dépassement des tolérances.

## CARACTERISTIQUES DU TEST

Le conjugué IgG FITC/Evans est calibré par rapport à l'Étalon International de l'OMS d'anti-immunoglobulines humaines de brebis conjuguées avec FITC.

- La spécificité du contrôle positif C-ANCA est vérifiée par rapport au sérum humain de référence PR3-ANCA #16 de la CDC. La spécificité du contrôle positif P-ANCA est vérifiée par rapport au sérum humain de référence MPO-ANCA #15 de la CDC.
- Le schéma de coloration de C-ANCA chez les neutrophiles fixés avec de l'éthanol est le résultat de l'union des anticorps principalement à l'antigène protéinase 3. Chez les neutrophiles fixés avec du formol, ce schéma de coloration est dû à l'union des anticorps à la myéloperoxidase.
- Le schéma de coloration de P-ANCA chez les neutrophiles fixés avec de l'éthanol est le résultat de l'union des anticorps à la myéloperoxidase.

## CARACTERISTIQUES DIAGNOSTIQUES

Il existe une très forte association entre la granulomatose de Wegener et l'apparition du marquage C-ANCA associé à PR3. Cet aspect de marquage est pratiquement exclusif des patients atteints de cette maladie et sa spécificité diagnostique est supérieure à 90 %. La sensibilité dépend du stade de la maladie, mais peut se situer autour de 66 %<sup>(2)</sup>. L'aspect P-ANCA associé à MPO peut être observé en cas de vascularite idiopathique nécrosante, notamment en cas de polyangéite microscopique, de glomérulo-néphrite rapidement progressive idiopathique, de syndrome de Churg-Strauss, de périartérite noueuse et de granulomatose de Wegener. Les sensibilités de P-ANCA pour la polyangéite microscopique et le syndrome de Churg-Strauss sont de 58 % et de 74,5 %, respectivement, alors que les spécificités sont de 81 % et de 95 %<sup>(3,4)</sup>. L'aspect X-ANCA est associé au diagnostic de maladies inflammatoires de l'intestin, comme la colite ulcéreuse (50-70 %) et la maladie de Crohn (10-30 %), en plus d'autres maladies auto-immunes non vasculitiques<sup>(5)</sup>.

Le diagnostic clinique ne doit pas se baser exclusivement sur le résultat de ce test, mais doit intégrer les données cliniques et de laboratoire.

## NOTES

1. Éviter de toucher les cellules fixées dans les puits tout au long de la procédure.
2. Utiliser une pipette pour laver les lames, en évitant les contaminations entre les échantillons adjacents.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, Allen NB, Landsman P, Feussner JR. The Role of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (c-ANCA) Testing in the Diagnosis of Wegener Granulomatosis: A Literature Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med.* 1995;123(12):925-932.
3. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, Lesavre P, Lüdemann J, Rasmussen N, Sinico RA, Wiik A, van der Woude FJ. Diagnostic value of standardized assays for antineutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. *Kidney Int.* 1998; 53 (3): 743-53
4. Sinico RA, Di Toma L, Maggiore U, Bottero P, Radice A, Tosoni C, Grasselli C, Pavone L, Gregorini G, Monti S, Frassi M, Vecchio F, Corace C, Venegoni E, Buzio C. Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):2589-93.
5. Savige J, Dimech W, Fritzer M, et al. Addendum to the international Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *Am J Clin Pathol* 2003;120:312-318.



**ANCA-Etanol**

Imunofluorescência Indirecta NEUTRÓFILOS HUMANOS



COD 50053 10 x 6 det.

COD 50054 10 x 12 det.

Só para uso in vitro no laboratório clínico

**A.MENARINI**  
diagnostics**UTILIZAÇÃO PREVISTA**

Reagentes para a determinação qualitativa de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) em soro humano pelo método de imunofluorescência indirecta.

**FUNDAMENTO DO MÉTODO**

Os anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) do soro são unidos aos seus correspondentes antígenos presentes nos neutrófilos humanos. Uma vez unidos, os anticorpos manifestam-se por meio de incubação com um anticorpo contra as imunoglobulinas humanas conjugado com fluoresceína e são visualizados por microscopia de fluorescência<sup>1</sup>.

**CONTEÚDO**

|                  |                      | COD 50053   | COD 50054    |
|------------------|----------------------|-------------|--------------|
| <b>SLIDE</b>     | Lâminas              | 10 x 6 det. | 10 x 12 det. |
| <b>PBS</b>       | PBS (10x)            | 1 x 100 mL  | -            |
| <b>CONTROL +</b> | Contr. Posit. P-ANCA | 1 x 1 mL    | -            |
| <b>CONTROL +</b> | Contr. Posit. C-ANCA | 1 x 1 mL    | -            |
| <b>CONTROL -</b> | Controlo Negativo    | 1 x 1 mL    | -            |
| <b>CONJUGATE</b> | IgG FITC/Evans       | 1 x 5 mL    | -            |
| <b>MOUNT</b>     | Mounting Medium      | 1 x 5 mL    | -            |
| <b>COVER SLD</b> | Lamelas              | 1 x 12      | -            |

**COMPOSIÇÃO**

- SLIDE** Neutrófilos humanos fixados em etanol.
- PBS** Fosfato de sódio 112,5 mmol/L, fosfato de potássio 30 mmol/L, cloreto sódico 1,15 mol/L, azida de sódio 0,95 g/L, pH 7,2.
- CONTROL+.** **P-ANCA:** Soro humano com anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) "padrão perinuclear", azida de sódio 0,95 g/L.
- CONTROL+.** **C-ANCA:** Soro humano com anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) "padrão citoplasmático", azida de sódio 0,95 g/L.
- CONTROL-.** Soro humano, azida de sódio 0,95 g/L.
- CONJUGATE** Anticorpos de cabra anti-imunoglobulinas IgG humanas conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), azul de Evans 0,01 g/L, azida de sódio 0,95 g/L.
- MOUNT** Meio de Montagem: Mowiol 1%, Glicerol 87%, Tris 20 mmol/L, azida de sódio 0,95 g/L.

*Os soros humanos utilizados na preparação do controlo negativo e o controlo positivo eram negativos para o antígeno HBs e para os anticorpos anti-HCV e anti-HIV. Não obstante, os controlos devem ser tratados com precaução como potencialmente infecciosos.*

## CONSERVAÇÃO

Conservar a 2-8°C.

Os reagentes são estáveis até à data de caducidade indicada na etiqueta sempre que se conservem bem fechados e se evite a contaminação durante o seu uso.

### Indicações de deterioração:

- Componentes líquidos: Presença de partículas, turvação.
- Lâminas: Roturas no pacote contentor, defeitos macroscópicos como raladuras ou descolagens no cultivo das células.

## REAGENTES AUXILIARES

**PBS** PBS (10x).

**CONJUGATE** IgG FITC/Evans.

**MOUNT** Meio de Montagem.

**CONTROL+.** **P-ANCA:** Soro humano com anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) “padrão perinuclear”, azida de sódio 0,95 g/L.

**CONTROL+.** **C-ANCA:** Soro humano com anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) “padrão citoplasmático”, azida de sódio 0,95 g/L.

**CONTROL-.** Controlo Negativo.

## PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

**PBS:** Efetuar uma diluição a 1/10 do PBS com água destilada. Estável 1 mês a 2-8°C se for conservado à temperatura recomendada, bem fechado e tendo cuidado para evitar contaminações durante a sua utilização.

Os outros componentes estão prontos a utilizar.

## EQUIPAMENTO ADICIONAL

- Câmara húmida
- Cuvete de lavagem
- Microscópio de fluorescência equipado com filtros de excitação de 495 nm e de emissão de 525 nm para a visualização do FITC.

## AMOSTRAS

Soro ou plasma recolhidos através de procedimentos standard. Estável uma semana a 2-8°C.

Diluir as amostras 1/20 em PBS (ver Preparação dos Reagentes) antes do ensaio.

Para a titulação de uma amostra positiva, realizar diluições duplas em PBS a partir da 1/40.

No entanto, cada laboratório deverá estabelecer o seu próprio exemplo de diluição baseado nas características da população.

## PROCEDIMENTO

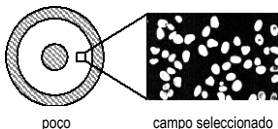
1. Temperar os reagentes e as amostras à temperatura ambiente.
2. Depositar uma gota (25 µL) da amostra diluída ou dos Controlos nos poços da lâmina, tentar cobrir perfeitamente (Nota 1).
3. Incubar a lâmina na câmara húmida durante 30 minutos à temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminar as gotas das amostras inclinando a lâmina e dar golpes suavemente. Evitar a mistura de soros.
5. Eliminar o soro restante na lâmina lavando-a com PBS (ver preparação do Reagente). (Nota 2).
6. Lavar a lâmina submergindo-a numa cuvette com PBS durante 5 minutos. Substituir o PBS e repetir a lavagem.
7. Secar cuidadosamente a lâmina utilizando o papel absorvente fornecido. El substrato deve permanecer sempre húmido.
8. Depositar uma gota do Conjugate em cada poço. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar à temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.

9. Lavar (ver passo 6) e secar (ver passo 7).

10. Depositar várias gotas do Mounting Medium sobre a lâmina e colocar uma lamela evitando a formação de bolhas de ar.

## LEITURA

Examinar as células com um microscópio de fluorescência (250-400x). É recomendável realizar a leitura imediatamente. Para realizar a leitura, seleccionar os campos de observação da zona indicada no esquema, entre o centro e a periferia do poço. Seleccionar os campos com distribuição de células e intensidade de fluorescência uniformes. A intensidade da marcação da periferia ou do centro do poço não é representativa da preparação.



A observação de marcação fluorescente específica descrita seguidamente indica um resultado positivo com a diluição recomendada.

Há dois padrões de marcação principais em neutrófilos fixados com **etanol** associados a vasculites autoimunes: uma marcação granular difusa do citoplasma do neutrófilo com maior intensidade interlobular (C-ANCA) e uma marcação compactada da zona perinuclear do citoplasma (P-ANCA).

Em alguns casos, o padrão de marcação P-ANCA observado em neutrófilos fixados com etanol pode ser devido a anticorpos antinucleares (ANA). Estes resultados devem ser confirmados ensaiando a amostra em neutrófilos fixados com **formalina**.

Em neutrófilos fixados com formalina, existe unicamente um padrão de marcação associado a vasculites autoimunes: C-ANCA.

Além destes dois padrões de marcação, é possível identificar outros menos frequentes como X-ANCA (ou P-ANCA atípico) com marcação extensa não homogénea perinuclear. Pode ser acompanhado de marcação citoplasmática difusa sem acentuação interlobular. Para uma visualização adequada deste padrão, recomenda-se utilizar neutrófilos fixados com **metanol**.

As amostras positivas podem ser tituladas. O título é definido como a diluição maior com resultado positivo.

Quando não for observada qualquer das marcações específicas descritas, o resultado é negativo para os autoanticorpos indicados.

## CONTROLO DE QUALIDADE

O Controlos Positivos (CONTROL+) e o Control Negativo (CONTROL-) fornecidos com os kits cod 50053 devem ser ensaiados junto com as amostras dos pacientes para verificar a funcionalidade do procedimento de ensaio.

O Controlos Positivos (CONTROL+) deve proporcionar a marcação específica descrita no item anterior.

O Control Negativo (CONTROL-) não deve proporcionar nenhuma marcação específica.

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio programa de Control de Qualidade interna, assim como os procedimentos de correção no caso em que os controlos não cumpram com as tolerâncias aceitáveis.

## CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO

Os conjugados IgG FITC/Evans estão calibrados face ao Padrão Internacional da OMS de anti-*immunoglobulinas* humanas de ovelha conjugadas com FITC.

A especificidade do Controlo Positivo C-ANCA está verificada em comparação com um soro humano de referência PR3-ANCA N.º 16 da CDC. A especificidade do Controlo Positivo P-ANCA está verificada em comparação com um soro humano de referência MPO-ANCA N.º 15 da CDC.

O padrão de coloração de C-ANCA em neutrófilos fixados em etanol é o resultado da união dos anticorpos, principalmente, ao antígeno proteinase 3. Nos neutrófilos fixados em formalina, este padrão de coloração deve-se à união dos anticorpos à mieloperoxidase.

O padrão de coloração de P-ANCA em neutrófilos fixados em etanol é o resultado da união dos anticorpos à mieloperoxidase.

## **CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS**

Há uma muito forte associação entre a granulomatose de Wegener e o aparecimento de marcação C-ANCA associado a PR3. Este padrão de marcação é praticamente exclusivo de pacientes com esta doença e a sua especificidade diagnóstica é superior a 90%. A sensibilidade depende do estágio da doença, mas pode situar-se em torno dos 66%<sup>(2)</sup>. O padrão P-ANCA associado a MPO pode ser encontrado em vasculites idiopáticas necrotizantes como a poliangite microscópica, a glomerulonefrite crescente idiopática, a síndrome de Churg-Strauss, a poliarterite nodosa e a granulomatose de Wegener. As sensibilidades de P-ANCA para poliangite microscópica e para a síndrome de Churg-Strauss são 58% e 74,5%, respetivamente, enquanto as especificidades são 81% e 95%<sup>(3,4)</sup>. O padrão X-ANCA está associado ao diagnóstico de doenças inflamatórias do intestino como a colite ulcerosa (50-70%) e a doença de Crohn (10-30%), além de outras doenças autoimunes não vasculíticas<sup>(5)</sup>.

O diagnóstico clínico não se deve basear exclusivamente no resultado deste ensaio, senão que deve integrar os dados clínicos e de laboratório.

## **NOTAS**

1. Evitar tocar as células do poço durante todo o procedimento.
2. Utilizar um frasco de lavagem ou uma pipeta para esta lavagem, evitando a possível contaminação com as amostras adjacentes.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, Allen NB, Landsman P, Feussner JR The Role of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (c-ANCA) Testing in the Diagnosis of Wegener Granulomatosis: A Literature Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med.* 1995;123(12):925-932.
3. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, Lesavre P, Lüdemann J, Rasmussen N, Sinico RA, Wiik A, van der Woude FJ. Diagnostic value of standardized assays for antineutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. *Kidney Int.* 1998; 53 (3): 743-53
4. Sinico RA, Di Toma L, Maggiore U, Bottero P, Radice A, Tosoni C, Grasselli C, Pavone L, Gregorini G, Monti S, Frassi M, Vecchio F, Corace C, Venegoni E, Buzio C. Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):2589-93.
5. Savige J, Dimech W, Fritzler M, et al. Addendum to the international Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *Am J Clin Pathol* 2003;120:312-318.

**ANCA- Αιθανόλη**

Εμμεσος Ανοσοφθορισμός ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ

**A.MENARINI**  
diagnostics

κωδ 50053 10 x 6 προσδιορισμοί

κωδ 50054 10 x 12 προσδιορισμοί

Μόνο για in vitro χρήση σε κλινικό εργαστήριο

**ΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ**

Τα αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων (ANCA) σε ανθρώπινο ορό με έμμεσο ανοσοφθορισμό.

**ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Τα αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων (ANCA) του ορού ενώνονται με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους, παρόντα στα ανθρώπινα ουδετερόφιλα. Μετά την ένωση, τα αντισώματα εκδηλώνονται με επίωση με ένα αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με φθορισκίνη και είναι ορατά δια μικροσκοπίας φθορισμού <sup>1</sup>.

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ**

|                  |                        | COD 50053   | COD 50054    |
|------------------|------------------------|-------------|--------------|
| <b>SLIDE</b>     | Πλακίδιο               | 10 x 6 προ. | 10 x 12 προ. |
| <b>PBS</b>       | PBS (10x)              | 1 x 100 mL  | -            |
| <b>CONTROL +</b> | Θετικός έλεγχος P-ANCA | 1 x 1 mL    | -            |
| <b>CONTROL +</b> | Θετικός έλεγχος C-ANCA | 1 x 1 mL    | -            |
| <b>CONTROL -</b> | Αρνητικός έλεγχος      | 1 x 1 mL    | -            |
| <b>CONJUGATE</b> | IgG FITC/Evans         | 1 x 5 mL    | -            |
| <b>MOUNT</b>     | Mounting Medium        | 1 x 5 mL    | -            |
| <b>COVER SLD</b> | Κάλυμα                 | 1 x 12      | -            |

**ΣΥΝΘΕΣΗ**

- SLIDE** Ανθρώπινα ουδετερόφιλα σταθεροποιημένα με αιθανόλη.
- PBS** Φωσφορικό νάτριο 112.5 mmol/L, φωσφορικό καλίου 30 mmol/L, χλωριούχο νάτριο 1.15 mol/L, αζίδιο νάτριο 0.95 g/L, pH 7.2.
- CONTROL+** **P-ANCA:** Ανθρώπινος ορός αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων (ANCA) "περιτυρητικό πρότυπο", αζίδιο νάτριο 0.95 g/L.
- CONTROL+** **C-ANCA:** Ανθρώπινος ορός αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων (ANCA) "κυτταροπλασματικό πρότυπο", αζίδιο νάτριο 0.95 g/L.
- CONTROL-** Ανθρώπινος ορός, αζίδιο νάτριο 0.95 g/L.
- CONJUGATE** Αντισώματα αιγός ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης IgG συζευγμένα με ισοθειοκυανική φθορισκίνης (FITC), κυανό του Evans 0.01 g/L, αζίδιο νάτριο 0.95 g/L
- MOUNT** Μέσο ζεύξης: Mowiol 1%, Γλυκερίνη 87%, Tris 20 mmol/L, αζίδιο νάτριο 0.95 g/L.

*Οι ανθρώπινοι οροί που χρησιμοποιήθηκαν στην προετοιμασία του αρνητικού και του θετικού ελέγχου ήταν αρνητικοί για το αντιγόνο HBs και για τα αντισώματα αντι-VCH και αντι-VIH. Παρόλα αυτά, οι έλεγχοι θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή προς αποφυγή ενδεχομένων μολύνσεων.*

**ΦΥΛΑΞΗ**

Φύλαξη στους 2-8°C.

Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την αναγραφόμενη στην ετικέτα ημερομηνία λήξης, όταν φυλάσσονται καλά κλεισμένα και δεν επιμολύνονται κατά τη διάρκεια της χρήσης τους.

#### **Ενδείξεις αλλοίωσης:**

- Υγρά συστατικά: Εμφάνιση μικροσωματιδιακού υλικού, θολερότητα.
- Πλακίδιο: Σχησμές στη συσκευασία, μακροσκοπικά ελαττώματα όπως χαράξεις ή αποκολλήσεις στην καλλιέργεια των κυττάρων.

#### **ΒΟΗΘΗΤΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

**PBS** PBS (10x).

**CONJUGATE** IgG FITC/Evans.

**MOUNT** Μέσο ζεύξης.

**CONTROL+ P-ANCA:** Ανθρώπινος ορός αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων (ANCA) "περιπυρηνικό πρότυπο", αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

**CONTROL+ C-ANCA:** Ανθρώπινος ορός αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων (ANCA) "κυτταροπλασματικό πρότυπο", αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

**CONTROL-** Αρνητικός έλεγχος.

#### **ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ**

**PBS:** Αραιώστε το PBS σε αναλογία 1/10 με απεσταγμένο νερό. Σταθερό για 1 μήνα σε θερμοκρασία 2-8°C, εφόσον φυλάσσεται στη συνιστώμενη θερμοκρασία, καλά κλειστό, και δοθεί η δέουσα προσοχή ώστε να αποτραπεί τυχόν μόλυνση κατά τη διάρκεια της χρήσης.

Τα υπόλοιπα συστατικά παρέχονται έτοιμα προς χρήση.

#### **ΠΡΟΣΘΕΤΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ**

- Υγρός θάλαμος
- Κυψελίδα πλύσης
- Μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρα διέγερσης των 495 nm και έκλυσης των 525 nm για την οπτική παρουσίαση του FITC.

#### **ΔΕΙΓΜΑΤΑ**

Ορός ή πλάσμα που συλλέγονται με τις συνήθεις διαδικασίες. Σταθερό μία εβδομάδα στους 2-8°C.

Αραιώστε τα δείγματα 1/20 σε PBS (βλ. Προετοιμασία Αντιδραστηρίων) πριν από την εξέταση.

Για την ηλιοποίηση ενός θετικού δείγματος, πραγματοποιήστε αραιώσεις διπλές σε PBS πάνω από 1/40.

Κάθε εργαστήριο όμως, θα πρέπει να ορίσει το δικό του παράδειγμα αραιώσης βασισμένο στα χαρακτηριστικά του πληθυσμού.

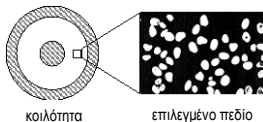
#### **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

1. Φέρτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Ρίξτε μία σταγόνα (25 µL) του αραιωμένου δείγματος ή των Ελέγχων στις κοιλότητες του πλακιδίου, σκεπάζοντάς το εντελώς (Παρατήρηση 1).
3. Επιδώστε το πλακίδιο σε υγρό θάλαμο για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C).
4. Απορρίψτε τις σταγόνες των δειγμάτων γέρνοντας το πλακίδιο και χτυπώντας το ελαφρά. Αποφύγετε την ανάμιξη ορών.
5. Απορρίψτε τα υπολείμματα ορού από το πλακίδιο ξεπλένοντάς το με PBS (βλ. προετοιμασία Αντιδραστηρίου). (Παρατήρηση 2).
6. Πλύνετε το πλακίδιο βυθίζοντάς το σε μία κυψελίδα με PBS για 5 λεπτά. Αλλάξτε το PBS και επαναλάβετε την πλύση.
7. Στεγνώστε προσεκτικά το πλακίδιο με το ειδικό απορροφητικό χαρτί. Το υπόστρωμα πρέπει να παραμένει πάντα υγρό.

8. Ρίξτε μια σταγόνα Conjugate σε κάθε κοιλότητα. Τοποθετήστε το πλακίδιο σε έναν υγρό θάλαμο και επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C) για 30 λεπτά.
9. Πλύνετε (βλ. βήμα 6) και στεγνώστε (βλ. βήμα 7).
10. Ρίξτε μερικές σταγόνες Mounting Medium πάνω στο πλακίδιο και τοποθετήστε ένα κάλυμμα προσέχοντας να μη σχηματιστούν φυσαλίδες.

## ΑΝΑΓΝΩΣΗ

Εξετάστε τα κύτταρα με ένα μικροσκόπιο φθορισμού (250-400x). Συνιστάται η ανάγνωση να πραγματοποιείται αμέσως. Για να πραγματοποιήσετε την ανάγνωση, επιλέξτε πεδία παρατήρησης της περιοχής που υποδεικνύεται στο σχήμα, μεταξύ του κέντρου και της περιφέρειας της κοιλότητας. Επιλέξτε πεδία με ομοιόμορφη κατανομή κυττάρων και ένταση φθορισμού. Η ένταση της χρώσης της περιφέρειας ή του κέντρου της κοιλότητας δεν είναι αντιπροσωπευτική της προετοιμασίας.



Η παρατήρηση της ειδικής χρώσης φθορισμού που περιγράφεται στη συνέχεια υποδεικνύει ένα θετικό αποτέλεσμα στο συνιστώμενο διάλυμα.

Υπάρχουν δύο κύριες εντάσεις χρώσης σε ουδετερόφιλα σταθεροποιημένα με **αιθανόλη** σχετιζόμενες με αυτοάνοσες αγγειίτιδες: μια διάχυτη κοκκώδης χρώση του κυτταροπλάσματος του ουδετερόφιλου με μεγαλύτερη μεσολόβια ένταση (C-ANCA), και μια συμπαγής ένταση της περιπυρρηνικής ζώνης του κυτταροπλάσματος (P-ANCA).

Σε κάποιες περιπτώσεις, η ένταση της χρώσης P-ANCA που παρατηρείται σε ουδετερόφιλα σταθεροποιημένα με αιθανόλη μπορεί να οφείλεται σε αντι-πυρρηνικά αντισώματα (ANA). Αυτά τα αποτελέσματα θα πρέπει να επιβεβαιωθούν δοκιμάζοντας το δείγμα σε ουδετερόφιλα σταθεροποιημένα με φορμόλη.

Σε ουδετερόφιλα σταθεροποιημένα με φορμόλη, υπάρχει μόνο μια ένταση χρώσης σχετιζόμενες με αυτοάνοσες αγγειίτιδες: C-ANCA.

Πέρα από αυτές τις δύο εντάσεις χρώσης, μπορούν επίσης να ταυτοποιηθούν και άλλες, λιγότερο συχνές, όπως X-ANCA (ή άτυπο P-ANCA), με εκτεταμένη μη ομοιογενή περιπυρρηνική χρώση. Μπορεί να συνοδεύεται από διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση χωρίς μεσολόβιο τονισμό. Για την κατάλληλη παρατήρηση αυτής της έντασης χρώσης σας συνιστούμε να χρησιμοποιήσετε ουδετερόφιλα σταθεροποιημένα με μεθανόλη.

Τα θετικά δείγματα μπορούν να πιλοποιηθούν. Ως τίτλος τίθεται η υψηλότερη αραιώση που δίνει θετικό αποτέλεσμα.

Όταν δεν παρατηρείται καμία από τις παραπάνω ειδικές χρώσεις, το αποτέλεσμα είναι αρνητικό για τα υποδεικνυόμενα αντισώματα.

## ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο Θετικός Έλεγχος (CONTROL+) και ο Αρνητικός Έλεγχος (CONTROL-) που παρέχονται μαζί με τα kit κωδ 50053 θα πρέπει να ελέγχονται παράλληλα με τα δείγματα των ασθενών για την επαλήθευση της εγκυρότητας της ανάλυσης.

Ο Θετικός Έλεγχος (CONTROL+) θα πρέπει να παρουσιάζει τη συγκεκριμένη χρώση που περιγράφεται ανωτέρω.

Ο Αρνητικός Έλεγχος (CONTROL-) δεν πρέπει να παρουσιάζει καμία συγκεκριμένη χρώση.

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του σχήμα εσωτερικού Ποιοτικού Ελέγχου, καθώς και επιδιορθωτικές διαδικασίες για την περίπτωση που οι έλεγχοι δεν βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων.

## ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Οι συζεύξεις IgG FITC/Evans είναι βαθμονομημένες σύμφωνα με το Διεθνές Πρότυπο του ΠΟΥ ανθρώπινων αντι-ανοσοσφαιρίνων προβάτου συζευγμένες με FITC.

Η ειδικότητα του Θετικού Ελέγχου C-ANCA επαληθεύεται έναντι ενός εσωτερικού ανθρώπινου ορού αναφοράς PR3-ANCA #16 της CDC. Η ειδικότητα του Θετικού Ελέγχου P-ANCA επαληθεύεται έναντι ενός εσωτερικού ανθρώπινου ορού αναφοράς MPO-ANCA #15 της CDC.

Η διάταξη χρώσης C-ANCA σε ουδετερόφιλα σταθεροποιημένα με αιθανόλη είναι το αποτέλεσμα της ένωσης των αντισωμάτων κυρίως με το αντιγόνο πρωτεΐνης 3. Στα ουδετερόφιλα σταθεροποιημένα με φορμαλίνη, αυτή η διάταξη χρώσης οφείλεται στην ένωση των αντισωμάτων με τη μυελοπεροξειδάση.

Η διάταξη χρώσης P-ANCA σε ουδετερόφιλα σταθεροποιημένα με αιθανόλη είναι το αποτέλεσμα της ένωσης των αντισωμάτων με τη μυελοπεροξειδάση.

## ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Υπάρχει ένας εξαιρετικά ισχυρός συσχετισμός μεταξύ της κοκκιωμάτωσης του Wegener και της εμφάνισης της χρώσης C-ANCA συσχετισμένης με το PR3. Αυτή η ένταση χρώσης είναι πρακτικά αποκλειστική των ασθενών αυτής της νόσου και η διαγνωστική της εξειδίκευση υπερβαίνει το 90%. Η ευαισθησία εξαρτάται από τη φάση της νόσου, μπορεί όμως να τοποθετηθεί περί το 66%<sup>(2)</sup>. Η ένταση P-ANCA συσχετισμένη με το MPO μπορεί να βρεθεί σε ιδιοπαθείς νεφρωτικές αγγειίτιδες, όπως η μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα, η αύξουσα ιδιοπαθής σπειραματονεφρίτιδα, το σύνδρομο Churg-Strauss, η οξεία πολυαρθρίτιδα και η κοκκοματώση του Wegener. Οι ευαισθησίες του P-ANCA για τη μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα και για το σύνδρομο Churg-Strauss είναι 58% και 74,5%, αντίστοιχα, ενώ οι εξειδικεύσεις είναι 81% και 95%<sup>(3,4)</sup>. Η ένταση X-ANCA συσχετίζεται με τη διάγνωση φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, όπως η ελκώδης κολίτιδα (50-70%) και η νόσος του Crohn (10-30%), πέρα από άλλες αυτοανόσους μη αγγειακές νόσους<sup>(5)</sup>.

Η κλινική διάγνωση δεν θα πρέπει να βασίζεται στο αποτέλεσμα μίας μόνο εξέτασης, αλλά να συνεκτιμά τόσο τα κλινικά όσο και τα εργαστηριακά δεδομένα.

## ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1. Μην αγγίζετε τα κύτταρα της κοιλότητας καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.
2. Χρησιμοποιείτε φιάλη πλύσης ή πιπέτα για αυτή την πλύση, αποφεύγοντας την πιθανή επιμόλυνση από τα παρακείμενα δείγματα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, Allen NB, Landsman P, Feussner JR The Role of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (c-ANCA) Testing in the Diagnosis of Wegener Granulomatosis: A Literature Review and Meta-analysis. Ann Intern Med. 1995;123(12):925-932.
3. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, Lesavre P, Lüdemann J, Rasmussen N, Sinico RA, Wiik A, van der Woude FJ. Diagnostic value of standardized assays for antineutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. Kidney Int. 1998; 53 (3): 743-53
4. Sinico RA, Di Toma L, Maggiore U, Bottero P, Radice A, Tosoni C, Grasselli C, Pavone L, Gregorini G, Monti S, Frassi M, Vecchio F, Corace C, Venegoni E, Buzio C. Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. Arthritis Rheum. 2005;52(9):2589-93.
5. Savige J, Dimech W, Fritzer M, et al. Addendum to the international Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. Am J Clin Pathol 2003;120:312-318.



**ANCA-Ethanol**

Indirekte Immunfluoreszenz HUMAN-NEUTROPHILE

**AMENARINI**  
diagnostics

COD 50053 10 x 6 Bestimmungen

COD 50054 10 x 12 Bestimmungen

In-vitro-Diagnostikum für das klinische Labor

**VERWENDUNGSZWECK**

Testreagenzien qualitativ zur Bestimmung von Anti-Neutrophilen-Zytoplasma-Antikörper (ANCA) in Humanserum mittels indirekter Immunfluoreszenz verwendet werden.

**METHODENPRINZIP**

Die Anti-Neutrophilen-Zytoplasma-Antikörper (ANCA) des Serums verbinden sich mit den entsprechenden Antigenen, die in den Human-Neutrophilen vorhanden sind. Nach der Verbindung werden die Antikörper durch die Inkubation mit gegen humanes Immunglobulin gerichteten Fluorescein-markierten Antikörpern nachgewiesen und mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.<sup>1</sup>

**INHALT**

|           |                         | COD 50053    | COD 50054     |
|-----------|-------------------------|--------------|---------------|
| SLIDE     | Objektträger            | 10 x 6 Best. | 10 x 12 Best. |
| PBS       | PBS (10x)               | 1 x 100 mL   | -             |
| CONTROL + | P-ANCA Posit. Kontrolle | 1 x 1 mL     | -             |
| CONTROL + | C-ANCA Posit. Kontrolle | 1 x 1 mL     | -             |
| CONTROL - | Negative Kontrolle      | 1 x 1 mL     | -             |
| CONJUGATE | IgG FITC/Evans          | 1 x 5 mL     | -             |
| MOUNT     | Mounting Medium         | 1 x 5 mL     | -             |
| COVER SLD | Deckgläschen            | 2 x 12       | -             |

**ZUSAMMENSETZUNG**

- SLIDE** Humane Ethanol-fixierte neutrophile Granulozyten.
- PBS** Natrium phosphate 112.5 mmol/L, potassium phosphate 30 mmol/L, sodium chloride 1.15 mol/L, sodium azide 0.95 g/L, pH 7.2.
- CONTROL+** **P-ANCA:** Humanserum mit Anti-Neutrophilen-Zytoplasma-Antikörpern (ANCA), „perinukleäres Muster“, Natriumazid 0.95 g/L.
- CONTROL+** **C-ANCA:** Humanserum mit Anti-Neutrophilen-Zytoplasma-Antikörpern (ANCA), „zytoplasmatisches Muster“, Natriumazid 0.95 g/L.
- CONTROL-** Humanes Serum, sodium azide 0.95 g/L.
- CONJUGADO** Ziege-Anti-humanes IgG Konjugat mit Fluorescein Isothiocyanate (FITC), Evans blue 0.01 g/L, sodium azide 0.95 g/L.
- MOUNT** Eindeckmedium: Mowiol 1%, Glycerol 87%, Tris 20 mmol/L, sodium azide 0.95 g/L.

Alle Seren humanen Ursprungs, die für die Herstellung von Negativ- oder Positivkontrollen benutzt wurden, sind auf Vorhandensein von HIV Antikörpern, HCV Antikörpern und HBs Antigen getestet worden und als negativ bewertet worden. Dennoch sollten alle Kontrollen als potentiell infektiös behandelt werden.

## LAGERUNG

Lagerung bei 2-8°C.

Die Reagenzien sind bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar, wenn sie gut verschlossen gelagert werden und keine Verunreinigung während des Gebrauchs auftritt.

### Hinweise zum Nichtgebrauch:

- Flüssige Bestandteile: Trübung oder Vorhandensein von Niederschlägen.
- Objektträger: Risse in der versiegelten Verpackung, makroskopisch sichtbare Defekte in der Zellkultur wie Kratzer oder Ablösen der Zellschicht.

## ZUSATZREAGENZIEN

**PBS** PBS (10x).

**CONJUGATE** IgG FITC/Evans.

**MOUNT** Eindeckmedium.

**CONTROL+ P-ANCA:** Humanserum mit Anti-Neutrophilen-Zytoplasma-Antikörpern (ANCA), „perinukleäres Muster“, Natriumazid 0.95 g/L.

**CONTROL+ C-ANCA:** Humanserum mit Anti-Neutrophilen-Zytoplasma-Antikörpern (ANCA), „zytoplasmatisches Muster“, Natriumazid 0.95 g/L.

**CONTROL-** Negative Kontrolle.

## REAGENZENVORBEREITUNG

**PBS:** Stellen Sie eine Verdünnung der PBS 1/10 mit destilliertem Wasser her. Diese ist 1 Monat lang stabil, falls sie immer bei 2-8°C gelagert, dicht verschlossen gehalten und wenn sorgfältig darauf geachtet wird, jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

## ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- Feuchte Kammern
- Wasch-Küvette
- Für das Sichtbarmachen der FITC Markierung wird ein Fluoreszenz Mikroskop mit einem Anregungsfilter von 495 nm und einem Emissionsfilter von 525 nm benötigt.

## PROBEN

Für den Test kann Serum oder Plasma eingesetzt werden. Diese sollten innerhalb einer Woche verwendet werden und bei 2-8°C gelagert werden.

Die Proben werden 1/20 in PBS (siehe Vorbereitung der Reagenzien) vorverdünnt bevor sie in den Test eingesetzt werden. Für die weitere Titration positiver Proben, diese in zweifachen Verdünnungsschritten, ausgehend von 1/40 in PBS weiterverdünnen.

Jedes Labor muss jedoch ein eigenes Verdünnungsverhältnis ermitteln, das die Besonderheiten der Bevölkerungsstruktur berücksichtigt.

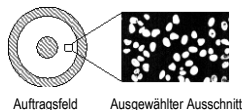
## VERFAHREN

1. Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen.
2. Von den verdünnten Proben oder Kontrollen je einen Tropfen (25 µL) auf ein Feld des Objektträgers tropfen. Es ist wichtig, dass das Feld vollständig bedeckt ist (Anmerkung 1).
3. 30 min in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubieren.
4. Überschüssige Tropfen vorsichtig abschütteln, dabei Kreuz-Kontamination der Seren vermeiden.
5. Den Objektträger vorsichtig mit PBS (siehe Vorbereitung der Reagenzien) abspülen (Anmerkung 2).
6. Den Objektträger in einer mit PBS gefüllten Wasch-Küvette 5 min waschen. Das PBS wechseln und das Waschen wiederholen.

- Den Objektträger mit Hilfe des mitgelieferten Blotting Papiers vorsichtig trocknen. Das Substrat darf nicht austrocknen
- Einen Tropfen von Conjugate auf jedes Feld auftragen. Den Objektträger dann für 30 min bei Raumtemperatur (15-30°C) in der Feuchtkammer inkubieren.
- Wiederum waschen (Punkt 6) und trocknen (Punkt 7).
- Einige Tropfen von Mounting Medium auf den Objektträger geben und mit einem Deckglas abdecken, dabei das Bilden von Luftblasen vermeiden.

## AUSWERTUNG

Den Objektträger mit einem Fluoreszenzmikroskop (250-400x) auswerten. Um optimale Ergebnisse zu erreichen sollte der Objektträger sofort abgelesen werden. Der Bereich, der zum Ablesen herangezogen werden sollte, ist in der Zeichnung verdeutlicht. Es sollte sich um einen Bereich zwischen Zentrum und Rand handeln. Die Fluoreszenz im Rand oder Zentrumsbereich gilt nicht als repräsentativ.



Die Beobachtung der in der folgenden beschriebenen spezifischen Fluoreszenzmarkierung zeigt ein positives Ergebnis mit der empfohlenen Verdünnung.

Es gibt zwei Hauptmarkierungsmuster bei ethanolfixierten Neutrophilen, die mit Autoimmunvaskulitiden assoziiert sind: eine diffuse körnige Markierung des Neutrophilen-Zytoplasma, mit höhere interlobuläre Intensität (C-ANCA) und eine verdichtete Markierung im perinukleären Raum des Zytoplasmas (P-ANCA).

In einigen Fällen, kann das in ethanolfixierte Neutrophile beobachtetes Markierungsmuster P-ANCA auf antinukleäre Antikörper (ANA) zurückzuführen sein. Diese Ergebnisse müssen durch eine Untersuchung des Musters auf **formalinfixierten** Neutrophile bestätigt werden.

Auf formalinfixierten Neutrophilen gibt es nur ein Autoimmunvaskulitiden assoziiertes Markierungsmuster: A-ANCA.

Neben diesen beiden Markierungsmuster, ist es möglich andere nicht so häufige Markierungsmuster zu identifizieren, wie X-ANCA (o atypische P-ANCA), mit weiteren und ungleichmäßigem perinukleären Markierungsmuster. Es kann mit diffuse zytoplasmatische Markierung, ohne interlobuläre Ausprägung begleitet werden. Um eine richtige Beobachtung dieses Musters zu vollziehen, ist es empfehlenswert **methanolfixierte** Neutrophile zu verwenden.

Die positiven Proben können titriert werden. Man beschreibt den Titer als die höchste Verdünnung mit einen positiven Ergebnis.

Wenn man keine von den spezifischen beschriebene Markierungen beobachtet, ist das Ergebnis positiv für die angezeigten Autoantikörper.

## QUALITÄTS KONTROLLE

Die im Testkit cod 50053 enthaltende positive (CONTROL+) und negative Kontrolle (CONTROL-) sollen zusammen mit den Patientenseren angesetzt werden, um die Durchführung als gültig zu bezeichnen.

Die positive Kontrolle (CONTROL+) sollte die oben beschriebene spezifische Fluoreszenz liefern.

In der negativen Kontrolle (CONTROL-) sollte keine spezifische Färbung zu sehen sein.

Jedes Labor sollte sein eigenes internes Labor Qualitätsschema für die korrekte Durchführung aufstellen, falls Kontrollen nicht in der angegebenen Zeit reagieren sollten.

## TEST CHARAKTERISIERUNG

Die FITC-markierten Reagenzien IgG FITC/Evans sind gegenüber dem internationalen Standard der WGO für FITC-markierte Human-Immunglobuline vom Schaf geeicht.

Die Spezifität der C-ANCA-Kontrolle positiv wurde gegenüber einem humanen Referenzserum PR3-ANCA#16 der CDC überprüft. Die Spezifität der P-ANCA-Kontrolle positiv wurde gegenüber einem humanen Referenzserum MPO-ANCA#15 der CDC überprüft.

Das C-ANCA Färbungsmuster, das sich in Granulozyten die mit Ethanol fixiert sind, ist das Ergebnis der Bindung von Antikörpern, vorwiegend mit den Antigenen Proteinase 3. In Granulozyten, die mit Formalin fixiert werden, ergibt sich dieses Färbungsmuster als Resultat der Bindung von Antikörpern mit der Myeloperoxidase.

Das P-ANCA Färbungsmuster, das in Granulozyten, die mit Ethanol fixiert wurden, hervorsieht ist das Ergebnis der Bindung der Antikörper an die Myeloperoxidase.

## DIAGNOSTISCHE EIGENSCHAFTEN

Es gibt eine feste Verbindung zwischen Wegeners Granulomatose und die Erscheinung von C-ANCA-Markierung verbindet mit PR-3. Diese Markierungsmuster findet man fast ausschliesslich bei Patienten mit dieser Krankheit und seine diagnostische Spezifität liegt über 90%. Die Sensibilität hängt von der Krankheitsphase ab, aber mit einem Mittelwert von 66%<sup>(2)</sup>. Man kann das mit MPO assoziierte P-ANCA Muster bei der nekrosierenden idiopathischen Vasculitis, wie im mikroskopische Polyangiitis, idiopatische sichelförmige glomerulonephritis, Churg-Strauss Syndrom, Polyarteritis nodosa und im Wegener's Granulomatose beobachten. Die Sensibilitäten von P-ANCA für mikroskopische Polyangiitis und Churg-Strauss Syndrom sind jeweils 58% und 74.5%, die Spezifitäten sind hingegen von 81% und 95%<sup>(3,4)</sup>. Das X-ANCA Muster ist mit der Diagnostik von inflammatorischen Erkrankungen des Darmes, wie Colitis ulcerosa (50-70%) und Crohn Krankheit (10-30%) verbindet, neben anderen nicht vaskulitischen Autoimmunerkrankungen<sup>(5)</sup>.

Die klinische Diagnose darf sich nicht allein auf das Ergebnis dieses Tests berufen, sondern muss alle klinischen und laboranalytischen Daten einbeziehen.

## ANMERKUNGEN

1. Die fixierten Zellen auf dem Objektträger während der Durchführung nicht berühren.
2. Beim Waschen der Objektträger eine Spritzflasche oder eine Pipette verwenden, um Kreuzreaktionen der benachbarten Felder zu vermeiden.

## LITERATUR

1. Melnicoff MJ. Immunfluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, Allen NB, Landsman P, Feussner JR The Role of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (c-ANCA) Testing in the Diagnosis of Wegener Granulomatosis: A Literature Review and Meta-analysis. Ann Intern Med. 1995;123(12):925-932.
3. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, Lesavre P, Lüdemann J, Rasmussen N, Sinico RA, Wiik A, van der Woude FJ. Diagnostic value of standardized assays for antineutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. Kidney Int. 1998; 53 (3): 743-53
4. Sinico RA, Di Toma L, Maggiore U, Bottero P, Radice A, Tosoni C, Grasselli C, Pavone L, Gregorini G, Monti S, Frassi M, Vecchio F, Corace C, Venegoni E, Buzio C. Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. Arthritis Rheum. 2005;52(9):2589-93.
5. Savige J, Dimech W, Fritzler M, et al. Addendum to the international Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. Am J Clin Pathol 2003;120:312-318.

**MANUFACTURER:** BioSystems S.A.  
**PRODUTTORE:** Costa Brava 30  
**FABRICANTE:** 08030 Barcelona (Spain)  
**FABRICANT:** Tel: +34 93 311 00 00  
**KATAKEYAZTHI:** Fax: +34 93 311 76 09  
**HERSTELLER:** Mail: Biosystems@biosystems.es

**DISTRIBUTOR:** A. Menarini Diagnostics SRL  
**DISTRIBUTORE:** Via Sette Santi 3  
**DISTRIBUIDOR:** 50131 Firenze  
**DISTRIBUTEUR:** Tel. 0039-055-56801  
**ΔΙΑΝΟΜΕΑΣ:** Fax 0039-055-5680-902  
**HÄNDLER:**