



## **SISTEMA DE DETECCIÓN DE ANCA**

**Para uso diagnóstico in vitro**  
**Para El Uso Profesional**

*USO PREVISTO: Se trata de una determinación indirecta por inmunofluorescencia para la detección semicuantitativa de autoanticuerpos citoplásmicos antineutrófilos (ANCA) en suero humano. Este sistema de análisis ha de emplearse como ayuda en la detección de anticuerpos asociados a las vasculitis autoinmunitarias.*

### **RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA**

Los autoanticuerpos citoplásmicos antineutrófilos (ANCA) son un grupo de anticuerpos que reaccionan con los antígenos citoplásmicos de los neutrófilos humanos. Aunque aparecieron por primera vez en un informe de 1964 (1), su primera vinculación con enfermedades apareció en 1982, cuando Davies y cols. informaron de su presencia en ocho pacientes con glomerulonefritis necrotizante segmentaria (2). En 1984, se informó de otros cuatro pacientes con vasculitis y glomerulonefritis. En 1985 van der Woude y cols. demostraron que los ANCA tenían una elevada asociación a la granulomatosis de Wegener, y que el título de anticuerpos se correlacionaba con la actividad de la enfermedad (3). En 1988, Falk y Jenette publicaron que los ANCA tenían más de una especificidad antigénica (4). En un informe ulterior se comunicó que la especificidad de los ANCA se correlacionaba con las características anatomopatológicas de las vasculitis (5).

En el análisis de ANCA por inmunofluorescencia se pueden observar varios patrones de tinción celular. Se han descrito dos principales; han sido bien caracterizados con neutrófilos fijados en etanol, y se emplean en la detección de ANCA por inmunofluorescencia. Los autoanticuerpos que muestran un patrón citoplásmico granular fino, denominados C-ANCA, suele ir dirigidos contra una serina proteasa, la proteinasa 3 (PR3). Se ha demostrado que estos autoanticuerpos presentan un elevado grado de asociación a la granulomatosis de Wegener. El otro patrón de tinción importante, el perinuclear o P-ANCA, que se suele deber a autoanticuerpos dirigidos con la mieloperoxidasa (MPO), se ha asociado a las vasculitis sistémicas y a la glomerulonefritis necrotizante idiopática y con semilunas (4). El patrón P-ANCA es un artefacto inducido por el uso de etanol como fijador (4). Si los neutrófilos se fijan con formol la mieloperoxidasa (el principal antígeno responsable del patrón P-ANCA en células fijadas con etanol) sigue asociado a los gránulos primarios (alfa), y muestra una distribución citoplásmica granular. La proteinasa 3 (PR3) sigue asociada a los gránulos primarios (alfa) tanto si se emplea etanol como fijador como si se emplea formol.

### **PRINCIPIO DE LA PRUEBA**

El análisis de autoanticuerpos citoplásmicos antineutrófilos (ANCA) de Immuno Concepts emplea la técnica indirecta de detección de anticuerpos por inmunofluorescencia (IFA) descrita por primera vez por Weller y Coons (6). Se incuban muestras de pacientes diluidas con neutrófilos humanos, que se fijan en portaobjetos de vidrio para permitir la unión específica de los ANCA. Si hay ANCA, los autoanticuerpos se unen a los antígenos de los neutrófilos. Tras el lavado para retirar los anticuerpos unidos de forma inespecífica, se incubaba el sustrato con IgG antihumana conjugada con fluoresceína. Si los resultados son positivos se forma un complejo estable con tres partes: el anticuerpo antihumano fluorescente unido al ANCA humano, unido a su vez al antígeno localizado en las células. Este complejo se puede visualizar con la ayuda de un microscopio de fluorescencia. Las muestras positivas para C-ANCA mostrarán una tinción citoplásmica granular de los neutrófilos característica, tanto en los portaobjetos fijados con etanol como en los fijados con formol.

En las muestras positivas para P-ANCA se observará un patrón de tinción difusa o periférica de los neutrófilos en las células fijadas con etanol, y una tinción granular del citoplasma en las fijadas con formol. Si la muestra es negativa para ANCA, los neutrófilos no se teñirán de forma específica.

## COMPONENTES DEL SISTEMA - MATERIALES SUMINISTRADOS

**Utilización:** Todos los componentes se entregan listos para su empleo, sin necesidad de fragmentarlos ni prepararlos (excepto el tampón PBS, que debe ser disuelto en agua desionizada o destilada antes de utilizarlo).

**Conservación:** Todos los componentes deben conservarse en refrigerador a 2-10°C. Una vez preparado, el tampón PBS debe conservarse en envases con tapón de rosca, en refrigerador a 2-10°C durante cuatro semanas como máximo, hasta que aparezcan signos de contaminación u otros cambios visibles.

**Estabilidad:** Todos los componentes son estables al menos durante 12 meses a partir de la fecha de fabricación. No utilice los componentes pasada la fecha de caducidad.

### REACTIVOS

**Portaobjetos con sustrato ANCA:** Portaobjetos con pocillos que contienen neutrófilos humanos estabilizados y fijados directamente en los pocillos de análisis. El exclusivo diseño de los fosos del portaobjetos reduce al mínimo la contaminación cruzada de los pocillos durante la prueba. La bolsa que contiene el portaobjetos se rellena con un gas inerte no tóxico que contribuye a la estabilidad de las células. Si la bolsa no está inflada al sacar el portaobjetos del kit, significa que la bolsa se ha estropeado y el portaobjetos no debe ser utilizado.

**Disolvente para muestras ANCA:** Número de catálogo 10100 (100 ml) Disolvente para muestras tamponado patentado, para disolver las muestras de los pacientes.

**Control positivo C-ANCA:** N° de catálogo 10021-12. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 1,0 ml de suero de control humano positivo C-ANCA. Este suero muestra una tinción granular del citoplasma entre los segmentos nucleares de los neutrófilos, tanto en los portaobjetos fijados con etanol como en los fijados con formol.

**Control positivo P-ANCA:** N° de catálogo 10021-11. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 1,0 ml de suero de control humano positivo P-ANCA. Este suero muestra una tinción nuclear difusa o periférica de los neutrófilos en los portaobjetos fijados con etanol, y una fluorescencia citoplásmica granular en los fijados con formol.

**Control tituable C-ANCA:** N° de catálogo 10026-12. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 0,25 ml de suero de control humano positivo C-ANCA estable líquido. Este control debe ser tratado como muestra de paciente no diluida. Véase la información sobre títulos medios en la ficha técnica.

**Control tituable P-ANCA:** N° de catálogo 10026-11. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 0,25 ml de suero de control humano positivo P-ANCA estable líquido. Este control debe ser tratado como muestra de paciente no diluida. Véase la información sobre títulos medios en la ficha técnica.

**Control negativo:** N° de catálogo 10031. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 1,0 ml de suero de control humano negativo ANCA. Este suero muestra una fluorescencia de color verde mate inespecífico de baja intensidad de los neutrófilos.

**Reactivo fluorescente para anticuerpos específico de la IgG:** Número de catálogo 10009 (9ml). IgG antihumana de cabra, conjugada con fluoresceína isotiocianato (FITC). Este reactivo contiene azul de Evans como contratinción. El reactivo se presenta en frascos con cuentagotas de precisión listos para usar.

### ELEMENTOS NO REACTIVOS

**Tampón PBS:** N° de catálogo 1011. Polvo tampón salino con fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contiene polvo tampón suficiente para formar 1 litro. (Los kits de análisis completos llevan una bolsa de polvo tampón por cada cinco portaobjetos).

**Preparación:** Disuelva una bolsa de polvo tampón en 1 litro de agua desionizada o destilada y consérvelo en refrigerador a 2-10°C durante 4 semanas como máximo, o hasta que aparezcan signos de contaminación u otros cambios visibles.

**Medio de montaje semipermanentes:** N° de catálogo 1111. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 5 ml de medio para preparaciones microscópicas a base de glicerol.

**Cubreobjetos:** Número de catálogo 1042. Cada envase contiene diez cubreobjetos de vidrio n° 1 de 24 x 64 mm.

## OTROS MATERIALES NECESARIOS - PERO QUE NO SE SUMINISTRAN

Pipetas volumétricas para dispensar volúmenes de 20-25 µl

Jarras Coplin o platillos de tinción

Frasco para exprimir o pipetas de Pasteur

Pipetas serológicas

Envases de un litro (para el tampón PBS)

Agua desionizada o destilada

Probetas para preparar series de diluciones opcionales

Papel secante o toallas de papel

Cámara de incubación

Guantes desechables

Cronómetro

Microscopio de fluorescencia equipado con un filtro excitador de 495 nm y un filtro de barrera de 515 nm

## PRECAUCIONES

1. Todos los materiales de procedencia humana utilizados en este producto han sido analizados en busca de anticuerpos con el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), el virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2), el virus de la hepatitis C (VHC) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAG) con métodos aprobados por la FDA, obteniendo resultados negativos (no reactivos en varias ocasiones) en todos los casos. Pero no existe ningún método de análisis que pueda garantizar por completo la ausencia de VIH-1, VIH-2, hepatitis C, hepatitis B u otros agentes infecciosos. Por eso, todos los sueros de control deben ser manipulados como si fueran infecciosos.
2. Todas las muestras de paciente deben ser manipuladas según el nivel 2 de bioseguridad, según se recomienda en el manual de los Centers for Disease Control/National Institutes of Health para toda muestra de suero o sangre humana potencialmente infecciosa: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La disolución de los componentes o su sustitución por otros distintos de los suministrados con el sistema puede arrojar resultados incoherentes.
4. Se emplea azida sódica (0,09%) como conservante. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o con las conducciones de cobre y formar sales de azidas metálicas explosivas. Al eliminar los reactivos, lavar con grandes volúmenes de agua del grifo para evitar que queden residuos en las tuberías. La azida sódica es venenosa y puede ser tóxica en caso de ingestión.
5. Este kit es para uso diagnóstico *in vitro*.
6. El suero de control titulable debe utilizarse para controlar la reproductibilidad entre lotes y entre ciclos. No está concebido para medir la sensibilidad o la especificidad generales del ensayo.
7. Esta prohibido fumar, comer o beber en las zonas de manipulación de las muestras o los reactivos del kit.
8. Evite salpicaduras y la generación de aerosoles en todo momento.
9. Si los tiempos de incubación y las temperaturas no son los especificados, los resultados pueden ser erróneos.
10. La contaminación cruzada de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos.
11. Los elementos de vidrio reutilizables deben ser lavados y enjuagados a fondo para eliminar los detergentes antes de su uso. Todos los elementos de vidrio deben estar limpios y secos antes de su uso.
12. Todos los reactivos, portaobjetos y muestras deben estar a temperatura ambiente (18-24°C) antes de su uso.
13. Para manipular las muestras y los reactivos debe utilizar guantes desechables, y cuando acabe deberá lavarse bien las manos.
14. La contaminación microbiana de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos.
15. No pipetee nunca con la boca y evite el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las mucosas. En caso de contacto, lávese con un jabón germicida y agua abundante.

# OBTENCIÓN DE MUESTRAS

**Obtención:** La muestra ideal es suero. Se obtendrán aproximadamente 5 ml de sangre por venipunción aséptica, con un tubo de vacío estéril u otro sistema de obtención adecuado. Deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (18-24°C). Se separará el suero del coágulo cuanto antes, para que no se produzca hemólisis.

**Sustancias que interfieren:** No se utilizarán sueros que muestren grados elevados de hemólisis, ictericia, lipemia o crecimiento microbiano, pues en todas esas circunstancias se pueden producir una reducción el título de anticuerpos en muestras positivas. Las muestras con niveles de lípidos muy elevados pueden presentar una película fluorescente inespecífica sobre el sustrato celular. Este problema se puede eliminar utilizando muestras tomadas en ayunas o aclarándolas por ultracentrifugado. Si la muestra presenta partículas visibles, éstas deben ser eliminadas por centrifugado antes de la prueba.

**Conservación:** Los sueros se pueden conservar a 2-10°C durante una semana como máximo. Si el análisis se posterga, los sueros deben conservarse congelados a una temperatura de -20°C o inferior. No se utilizarán refrigeradores ni congeladores con sistema "auto-frost" (eliminación automática de la escarcha).

**PRECAUCIÓN:** Si las muestras son sucesivamente congeladas y descongeladas, se pueden obtener resultados falsos positivos y negativos.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### CONTROL DE CALIDAD

Para el control de calidad se dispondrán los controles positivo, negativo y vacíos en los pocillos al efecto que se encuentran en todos los portaobjetos. El control positivo C-ANCA debe dar una tinción citoplásmica granular fluorescente de color verde manzana brillante entre los segmentos nucleares de los neutrófilos, tanto en los portaobjetos fijados con etanol como en los fijados con formol. El control positivo P-ANCA muestra una tinción nuclear difusa o periférica de color verde manzana brillante los neutrófilos en los portaobjetos fijados con etanol, y una fluorescencia citoplásmica granular en los fijados con formol. El control negativo no debe mostrar fluorescencia verde brillante. En el control negativo se puede observar una fluorescencia de color verde mate inespecífica y baja intensidad. El control vacío se emplea para observar la tinción inespecífica del reactivo de anticuerpos, y no debe dar fluorescencia verde. La contratinción que se facilita con el conjugado puede teñir las células de color rojo mate. Si los controles no se ven como se ha descrito, la prueba no es válida y debe repetirse.

### CONTROL TITULABLE OPCIONAL

Para interpretar los títulos, muchos laboratorio empiezan por el pocillo que contiene la muestra más diluida, y van "hacia atrás" hasta la dilución 1:20. El primer pocillo en el que se aprecie un patrón discernible de tinción del citoplasma corresponde al título que se considera como criterio de valoración. Recomendamos utilizar esta técnica para determinar los criterios de valoración de los títulos.

El título medio y el rango de títulos ( $\pm$  una dilución a cada lado de la media) determinados para cada número de lote han sido establecidos en nuestro laboratorio, y se consideran la norma. Este control se facilita para que cada laboratorio pueda evaluar la reproductibilidad (precisión) de sus análisis de ANCA. Como quiera que este control no ha sido diseñado como indicador de la exactitud de la titulación, cada laboratorio deberá establecer su propio criterio de valoración del título medio para cada muestra, utilizando esta información para evaluar la reproductibilidad (precisión) de unos ciclos a otros.

Mediante la reiterada evaluación de este control titulable utilizando el sistema de análisis de ANCA por inmunofluorescencia de Immuno Concepts, se ha establecido un título medio para cada número de lote. El número de lote, el título medio y el rango de títulos ( $\pm$  una dilución doble a cada lado de la media) figuran en la etiqueta del vial y deben servir como guía para el funcionamiento del sistema de análisis.

Puede que los valores obtenidos en nuestro laboratorio difieran de los suyos. He aquí algunos de los muchos factores que pueden afectar a sus resultados:

1. Tipo de fuente de luz: Las fuentes de luz de mercurio producen una energía de excitación a 495 nm mayor que las de cuarzo/halógenas. Las fuentes de luz de mercurio de 50, 100 y 200 vatios difieren poco en la energía de excitación a 495 nm. Las fuentes de luz de cuarzo/halógenas de 100 vatios producen una energía de excitación a 495 nm superior a la proporcionada por las de cuarzo/halógenas de 50 vatios.
2. El estado de la fuente de luz y su edad: Esto es especialmente cierto para las fuentes de luz de mercurio, que suelen experimentar una reducción gradual de la energía de excitación a 495 nm antes de agotarse. Esta gradual reducción de la energía de excitación puede producir una pérdida significativa de la sensibilidad en un

plazo de semanas. El problema se puede evitar con un registro cronológico. Para que los resultados sean óptimos, cambie las bombillas de mercurio de 500 vatios cada 100 horas, y las de 100 ó 200 vatios cada 200 horas. Por lo general, las fuentes de luz de cuarzo/halógenas no experimentan una reducción gradual de la energía de excitación antes de agotarse.

3. El tipo de filtro excitador utilizado: Los filtros excitadores por interferencia proporcionan mayor sensibilidad en una longitud de onda mucho menor que los filtros excitadores por absorción. Si desea más información, consulte el manual de su microscopio de fluorescencia, o con su delegado de ventas.
4. Correcta alineación del haz de luz del microscopio. Consulte las instrucciones del manual del microscopio de fluorescencia.
5. La apertura numérica del objetivo. Si se emplea fluorescencia por luz incidente (Epi), la fluorescencia aumenta exponencialmente con la apertura numérica (NA) del objetivo. Así, puede que un objetivo de 40X con una apertura de 0,65 interprete una o más diluciones como inferiores a las determinadas con un objetivo de 40X con una apertura numérica de 0,85. La apertura numérica va impresa a un lado del objetivo. La apertura numérica no afecta a la sensibilidad del microscopio de luz fluorescente transmitida.
6. Filtros de supresión. Los filtros de supresión reducen longitudes de onda de excitación concretas, y se pueden utilizar para reducir la sensibilidad. Si desea más información, consulte el manual de su microscopio de fluorescencia, o con su delegado de ventas.
7. Precisión y exactitud de la técnica de dilución, del equipo y de la realización de los procedimientos de análisis.

### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PACIENTE

Para ver los neutrófilos se recomienda un aumento total de 400X.

**Negativos:** Se considera que un suero es negativo para ANCA si a una dilución de 1:20 la tinción fluorescente verde de las células es igual o inferior a la del pocillo de control negativo. En los neutrófilos se puede observar una tinción de fondo inespecífica, debida a los anticuerpos heterófilos o a los autoanticuerpos.

**Positivos:** Se considera que un suero es positivo para ANCA si a una dilución de 1:20 las células de todos los campos muestran fluorescencia citoplásmica granular similar a la observada en el control C-ANCA, tanto en los portaobjetos fijados con etanol como en los fijados con formol. Por otro lado, se considera que un suero es positivo para ANCA si a una dilución de 1:20 las células muestran fluorescencia nuclear difusa o periférica similar a la observada en el control P-ANCA en los portaobjetos fijados con etanol.

## NOTIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS

**Selección:** Se indicará si el resultado es positivo o negativo a la dilución 1:20.

**Patrones de tinción:** Muchos autoanticuerpos puede teñir el citoplasma y/o el núcleo de los neutrófilos. Hay dos patrones principales de tinción específicos:

**C-ANCA (tinción clásica o citoplásmica):** La tinción de los gránulos alfa (primarios) del citoplasma muestra un patrón de tinción citoplásmica moteada homogénea, a menudo con una concentración de la tinción en los lóbulos del núcleo. El moteado citoplásmico se observa tanto en los neutrófilos fijados con etanol como en los fijados con formol.

**P-ANCA (tinción perinuclear):** Tinción lisa u homogénea de los núcleos multilobulados, a menudo con una notable tinción periférica de los lóbulos nucleares de los neutrófilos fijados con etanol. En los neutrófilos fijados con formol estos anticuerpos muestran una tinción citoplásmica granular.

Los anticuerpos antinucleares y otros autoanticuerpos pueden reaccionar con los neutrófilos, por lo que en todas las muestras positivas se practicará un análisis de ANA con sustrato de células HEp-2 antes de declarar la presencia de ANCA.

**Titulación opcional:** Los resultados se notificarán como la inversa de la dilución del último pocillo en el que se observa reacción positiva.

## LIMITACIONES DEL ANÁLISIS

1. No es posible hacer un diagnóstico basándose sólo en la detección de anticuerpos citoplásmicos antineutrófilos. El médico debe interpretar estos resultados en el contexto de la historia y los síntomas del paciente, los hallazgos físicos y otros procedimientos diagnósticos.
2. No se debe iniciar un tratamiento basándose exclusivamente en un resultado positivo del análisis de anticuerpos citoplásmicos antineutrófilos. Antes de iniciar un tratamiento hay que tener en cuenta las indicaciones clínicas, otros hallazgos de laboratorio y la impresión clínica del médico.

3. Los anticuerpos antinucleares presentes en las muestras de los pacientes pueden reaccionar con el sustrato celular. Si hay anticuerpos antinucleares, a menudo se pueden interpretar los resultados ANCA debido al diferente carácter de la tinción ANCA específica, a que los títulos son diferentes, y/o a la intensidad de las reacciones. Si la reacción fluorescente de los anticuerpos antinucleares es tan intensa que oscurece la tinción ANCA se declarará la prueba como “no interpretable” y se utilizará otro método para determinar el estado ANCA del paciente.
4. Como quiera que existen muchas opciones en los microscopios de fluorescencia, se recomienda estandarizar las fuentes de luz, los filtros y los medios ópticos para comparar los títulos de los pacientes obtenidos en diferentes laboratorios.
5. Los resultados de esta prueba, junto con la información obtenida de la evaluación clínica y otros procedimientos diagnósticos, servirán para determinar la situación clínica del paciente.

## VALORES ESPERADOS

El valor previsto en la población normal es negativo a la dilución 1:20 utilizada para la selección. En pacientes con enfermedades, se han notificado valores de hasta 1:640 (7).

## CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

### MUESTRAS NORMALES

Se analizaron en paralelo muestras de suero de 497 donantes de sangre (247 varones y 250 mujeres) con el kit ANCA de Immuno Concepts y otro kit comercializado. Todas las muestras que dieron positivo en portaobjetos fijados con etanol en esta población también fueron sometidas a la detección de anticuerpos antinucleares (ANA) mediante el sistema de análisis de ANA HEp-2 de Immuno Concepts.

Entre las muestras normales, 22 dieron positivo para ANA y fueron consideradas no interpretables para ANCA. Las demás muestras discrepantes fueron sometidas a la detección de anticuerpos anti MPO y PR3 mediante ELISA para determinar la situación real de los anticuerpos.

### SUEROS ANTERIORMENTE DETERMINADOS COMO POSITIVO PARA ANCA POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Las muestras de suero que fueron consideradas positivas para ANCA mediante prueba IFA locales se obtuvieron de laboratorios de referencia de los Estados Unidos, el Reino Unido y Australia. En esta parte del estudio se examinó un total de 383 suero, que esperábamos que dieran positivo para ANCA. Estas muestras fueron evaluadas en paralelo con el kit ANCA de Immuno Concepts y otro kit comercializado. Las muestras discrepantes fueron sometidas a la detección ANA con el sistema de análisis de ANA HEp2 de Immuno Concepts y de anticuerpos anti MPO y PR3 mediante ELISA.

Combinando los resultados de la población normal con los de la anómala, obtuvimos los siguientes datos en la comparación inicial para el sistema de análisis de ANCA de Immuno Concepts con neutrófilos humanos fijados con etanol (tabla 1):

		Método de comparación	
		Positivo	Negativo
Etanol IC ANCA	Positivo	324	94
	Negativo	124	316

Estos datos arrojan la siguiente estadística de comparación:

Sensibilidad relativa: 72,3%  
 Especificidad relativa: 77,1%  
 Concordancia general: 74,6%

En la comparación inicial para el sistema de análisis de ANCA de Immuno Concepts con neutrófilos humanos fijados con formol obtuvimos los siguientes datos (tabla 2):

		Método de comparación	
		Positivo	Negativo
Formol IC ANCA	Positivo	255	52
	Negativo	45	528

Estos datos arrojan la siguiente estadística de comparación:

Sensibilidad relativa: 85,0%  
 Especificidad relativa: 91,0%

Concordancia general: 89,0%

Muchos autoanticuerpos pueden reaccionar con los neutrófilos humanos, además de los asociados a las vasculitis autoinmunitarias (8). Para confirmar que los anticuerpos detectados por cualquier prueba de ANCA por inmunofluorescencia son clínicamente significativos, se recomienda encarecidamente realizar análisis de confirmación con ELISA para la MPO y la PR3 (9).

Todas las muestras discrepantes de las tablas anteriores fueron sometidas a análisis de anticuerpos antinucleares y de anticuerpos contra MPO y PR3. Teniendo en cuenta los resultados de estas pruebas, en la tabla 3 se recogen los resultados generales para el sistema de análisis de ANCA de Immuno Concepts con neutrófilos humanos fijados con etanol:

		Método de comparación	
		Positivo	Negativo
Etanol IC ANCA	Positivo	380	32
	Negativo	6	434

Estos datos arrojan la siguiente estadística de comparación:

Sensibilidad relativa: 98,4%  
Especificidad relativa: 93,1%  
Concordancia general: 95,5%

En la tabla 4 se recogen los resultados generales del sistema de análisis de ANCA de Immuno Concepts con neutrófilos humanos fijados con formol:

		Método de comparación	
		Positivo	Negativo
Formol IC ANCA	Positivo	292	13
	Negativo	5	548

Estos datos arrojan la siguiente estadística de comparación:

Sensibilidad relativa: 98,3%  
Especificidad relativa: 97,7%  
Concordancia general: 98,6%

#### MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES CON VASCULITIS CONOCIDA

Se analizaron muestras de 102 pacientes con vasculitis clínicamente caracterizadas utilizando el sistema de análisis de ANCA de Immuno Concepts con neutrófilos humanos fijados con etanol y el de neutrófilos fijados con formol. Los resultados de la comparación se recogen en la tabla 5:

Tabla 5

Diagnósticoclínico	Número	Positivo	Patrón de tinción (fijados con etanol)
Granulomatosis de Wegener	30	26 (86,7%)	todo C-ANCA
Poliarteritis nudosa	12	8 (66,7%)	todo P-ANCA
Poliarteritis microscópica	20	18 (90,0%)	todo P-ANCA
Síndrome de Churg-Strauss	3	2 (66,7%)	un P-ANCA; otro P-ANCA y C-ANCA
Glomerulonefritis por Inmunocomplejos con semilunas	15	10 (66,7%)	todo P-ANCA
Enfermedad inflamatoria intestinal	22	17 (77,3%)	todo P-ANCA atípicos

#### REACTIVIDAD CRUZADA

Se evaluaron sueros de 57 pacientes con diversos trastornos autoinmunitarios con el sistema de análisis de ANCA de Immuno Concepts con neutrófilos humanos fijados con etanol y con el sistema de análisis de ANCA de Immuno Concepts con neutrófilos humanos fijados con formol. Tres de las muestras dieron una tinción nuclear atípica, parecida a la P-ANCA, en los neutrófilos fijados con etanol. Las tres pertenecían a pacientes con LES, dieron positivo para anticuerpos anti-ADN y mostraron ANA positivo con patrón homogéneo. Otra muestra presentó un moteado citoplásmico en los neutrófilos fijados con etanol, pero dio negativo en los neutrófilos fijados con formol y en la prueba de ANA. Se consideró que en esta muestra se había producido una reacción inespecífica. Todos los demás sueros de esta población dieron negativo tanto con los neutrófilos fijados con etanol como con los fijados con formol. Como quiera que muchos autoanticuerpos pueden reaccionar de forma inespecífica con los neutrófilos

humanos (8), las pruebas de inmunofluorescencia positiva deben ser confirmadas siempre con otras específicas de los anticuerpos asociados a los ANCA.

## REPRODUCTIBILIDAD

Se realizaron estudios intra-ensayo, entre días y entre lotes para demostrar la reproductibilidad del sistema de análisis de ANCA de Immuno Concepts con neutrófilos humanos fijados con etanol y del sistema de análisis de ANCA de Immuno Concepts con neutrófilos humanos fijados con formol. Los sueros utilizados en este estudio incluyeron tres muestras positivas P-ANCA (una con tinción intensa, otra moderada y otra débil) y tres muestras positivas C-ANCA (una con tinción intensa, otra moderada y otra débil). También se utilizaron seis muestras negativas para ANCA. En el estudio intra-ensayo se evaluaron 12 sueros en seis pocillos por duplicado. Para la reproductibilidad entre días y entre lotes estos 12 sueros se analizaron con tres kits con números de lote diferentes y en tres ocasiones distintas. Las seis muestra negativas dieron negativo en todos los portaobjetos analizados, y las muestras positivas dieron positivo en todos, con intensidades similares de fluorescencia.

## BIBLIOGRAFICI

1. Faber, V., Elling, P., Norup, G., et al. An Antinuclear Factor Specific for Leucocytes. *Lancet* 2:344-345, 1964.
2. Davies, D.J., Moran, J.E., Niall, J.F., et al. Segmental Necrotising Glomerulonephritis with Antineutrophil Antibody: Possible Arbovirus Aetiology? *Br. Med. J.* 285:606, 1982.
3. van der Woude, F.J., Rasmussen, N., Lobatto, S., et al. Autoantibodies Against Neutrophils and Monocytes: Tool for Diagnosis and Marker of Disease Activity in Wegener's Granulomatosis. *Lancet* 1:425-429, 1985.
4. Falk, R.J., Jennette, J.C. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies with Specificity for Myeloperoxidase in Patients with Systemic Vasculitis and Idiopathic Necrotizing and Crescentic Glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med.* 318:1651-1657, 1988.
5. Jennette, J.C., Wilkman, A.S., Falk, R.J. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and vasculitis. *Am. J. Pathol.* 135:921-930, 1989.
6. Weller, T.H., Coons, A.H. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:789-794, 1954.
7. Nölle, B., Specks, U., Lüdemann, J., Rohrbach, M.S., DeRemee, R.A., and Gross, W.L. Anticytoplasmic Autoantibodies: Their Immunodiagnostic Value in Wegener Granulomatosis. *Ann. Int. Med.* 111:28-40, 1989.
8. Stroncek, D.F., et al. Neutrophil alloantibodies react with cytoplasmic antigens: A possible cause of false-positive indirect immunofluorescence assays for antibodies to neutrophil cytoplasmic antigens. *Am. J. Kidney Dis.* 21:368-373, 1993.
9. Proceedings of the ANCA & Vasculitis Symposium, Satellite Conference to the XIV International Congress of Nephrology, 30 May - 1 June 1997, Melbourne, Australia.

En caso de daños al envoltorio protector, póngase en contacto con Immuno Concepts antes de usar el producto.



Fabricante



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Limitación De la Temperatura



Contiene suficiente para <n> pruebas



Consulte las instrucciones de uso



Dispositivo Médico De diagnóstico In vitro



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827  
Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649  
Email: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

Cat 10070-11-I,

4.11.02.003.103-Es

Rev 2.0 © Copyright 2011

### IVD Directive (2001/59/EC) Danger Phrases



**REF** 1105: Azul de Evans

<b>R45</b>	Puede causar cáncer.
<b>S45</b>	En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstrese la etiqueta).
<b>S53</b>	Evítese la exposición – recábense instrucciones especiales antes del uso.

# PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE ANCA

- 1. PREPARACIÓN DEL TAMPÓN (PBS)**

Disuelva el contenido de una bolsa de tampón en un litro de agua desionizada o destilada. Tape y conserve en refrigerador a 2-10°C durante 4 semanas como máximo, o hasta que aparezcan signos de contaminación u otras alteraciones visibles.
- 2. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PACIENTE**

Selección: Disuelva las muestras de pacientes a 1:20 añadiendo 0,05 ml (50 µl) de suero a 0,95 ml (950 µl) de disolvente de muestras.  
Titulación semicuantitativa: Para preparar series de diluciones dobles de las muestras de selección (p. ej., 1:20, 1:40, 1:80...1:640), saque 0,5 ml de la dilución 1:20 y mézclelos con 0,5 ml de disolvente de muestras para obtener una dilución 1:40, y así para las sucesivas diluciones.
- 3. DILUCIÓN DEL CONTROL TITULABLE OPCIONAL**

Considere que el control titulable opcional es una muestra de paciente no diluida. Diluya el control a 1:20 añadiendo 0,05 ml (50 µl) del suero de control a 0,95 ml de disolvente de muestras. Prepare diluciones dobles del control titulable como se ha descrito.
- 4. PREPARACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS CON SUSTRATO (20-25 µl/pocillo)**

Saque los portaobjetos de las bolsas y disponga los sueros de control en los pocillos de control, como se indica: Invierta el frasco cuentagotas de control y apriete hasta que se vea una gota en la punta. Toque suavemente el pocillo de control con la gota, evitando que la punta del cuentagotas entre en contacto directo con la superficie del portaobjetos. Añada una gota (20-25 µl) de muestra de paciente diluida a los pocillos numerados.  
**PRECAUCIÓN:** SI LA PUNTA DEL CUENTAGOTAS TOCA DIRECTAMENTE LA SUPERFICIE DEL PORTAOBJETOS, SE PUEDE DAÑAR EL SUSTRATO DE ANTÍGENO.
- 5. INCUBACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS (30±5 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18 y 24°C)**

Ponga los portaobjetos en una cámara cubierta y húmeda (basta con una placa de Petri con una toalla de papel humedecida). Incube con la tapa puesta durante 30 minutos (±5 minutos) a temperatura ambiente (18-24°C).
- 6. ENJUAGUE CON PBS**

Saque los portaobjetos de la bandeja de la incubadora y aclárelos un poco con PBS utilizando una jeringa o una pipeta de Pasteur o serológica. No utilice la jeringa directamente sobre los pocillos.  
**NOTA:** Para evitar la contaminación cruzada de los portaobjetos con 10 pocillos, dirija el chorro de PBS a la línea media del portaobjetos, inclinándolo primero hacia los pocillos 1-3 y luego hacia los pocillos 4-6.
- 7. LAVADO CON PBS (10 minutos)**

Lave los portaobjetos con PBS durante 10 minutos, en una placa de tinción de portaobjetos o en una jarra Coplin. Este lavado puede durar hasta 30 minutos sin que varíen los resultados finales. Una vez utilizada, tire la solución de lavado PBS.
- 8. REACTIVO FLUORESCENTE PARA DETECTAR ANTICUERPOS (cubra los pocillos con 10-12 gotas)**

Saque los portaobjetos del PBS de uno en uno y sumérgalos 3-5 veces en agua desionizada o destilada. Pase un papel secante o una toalla de papel por el borde del portaobjetos para retirar el agua sobrante. Vuelva a colocar de inmediato el portaobjetos en la cámara de incubación y cubra los pocillos por completo con el reactivo fluorescente para detectar anticuerpos; empiece por poner una gota en cada pocillo. Repita la operación en cada portaobjetos. El reactivo fluorescente para detectar anticuerpos ha sido titulado para compensar el agua desionizada o destilada residual que queda en el portaobjetos tras el enjuague.  
**NOTA:** Es importante que los pocillos del portaobjetos no se sequen durante este procedimiento, pues se podría dañar el sustrato. NO SEQUE EL PORTAOBJETOS NI DEJE QUE PASEN MÁS DE 15 SEGUNDOS SIN AÑADIR EL REACTIVO.
- 9. INCUBACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS (30±5 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18 y 24°C)**

Ponga la tapa de la cámara de incubación y cúbrala con una toalla de papel para impedir la exposición a la luz, si la cámara no es opaca. Deje que los portaobjetos se incuben 30 minutos (±5 minutos) a temperatura ambiente (18-24°C).
- 10. ENJUAGUE CON PBS**

Retire los portaobjetos de la bandeja de la incubadora y enjuáguelos un poco con PBS. No utilice la jeringa directamente sobre los pocillos.
- 11. LAVADO CON PBS (10 minutos)**

Lave los portaobjetos con PBS durante 10 minutos, en una placa de tinción de portaobjetos o en una jarra Coplin. Este lavado puede durar hasta 30 minutos sin que varíen los resultados finales.
- 12. PREPARACIÓN DE LOS CUBREOBJETOS**

Saque los portaobjetos del PBS de uno en uno y sumérgalos 3-5 veces en agua desionizada o destilada. Pase un papel secante o una toalla de papel por el borde del portaobjetos para retirar el agua sobrante. NO SEQUE EL PORTAOBJETOS NI DEJE QUE PASEN MÁS DE 15 SEGUNDOS SIN PONER EL CUBREOBJETOS. Añada 4-5 gotas de medio de preparación semipermanente en la línea media de cada portaobjetos. Coloque el cubreobjetos con cuidado, evitando que se formen bolsas de aire, haciendo bajar suavemente el cubreobjetos de un lado del portaobjetos al otro.  
**NOTA:** Si pone demasiado medio de preparación puede que la fluorescencia de fondo sea elevada debido a la diseminación de la luz, o que la resolución de las células no sea clara (imagen borrosa). Si ha puesto demasiado medio de preparación, puede retirarlo del portaobjetos secando suavemente el cubreobjetos con papel secante o para lentes, evitando cualquier movimiento directo del cubreobjetos.

**ASISTENCIA TÉCNICA:** +1-916-363-2649  
o correo electrónico: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

