



## **SISTEMA DI ANALISI DEGLI ANCA**

**Per uso diagnostico in vitro**  
**Per Uso Professionale**

*USO PREVISTO: analisi in fluorescenza indiretta degli anticorpi per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) nel siero umano. Questo sistema di analisi deve essere usato come ausilio nella determinazione di anticorpi associati alla vasculite autoimmune.*

### **RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE**

Gli anticorpi anticitoplasma dei neutrofili (ANCA) sono un gruppo di anticorpi reagenti con gli antigeni citoplasmatici nei neutrofili umani. Sebbene questi anticorpi furono riportati per la prima volta nel 1964 (1), la prima volta che fu riportato un collegamento degli stessi con la patologia fu nel 1982, quando Davies et al. riportarono gli anticorpi in otto pazienti con glomerulonefrite segmentale necrotizzante (2). Nel 1984, furono riportati altri quattro pazienti con vasculite e glomerulonefrite. Nel 1985, van der Woude et al. dimostrarono che gli ANCA avevano un'alta associazione con la granulomatosi di Wegener, e che il titolo anticorporeale era in correlazione con l'attività della patologia (3). Nel 1988, Falk e Jennette riportarono che gli ANCA hanno più di una specificità antigenica (4). Un successivo rapporto dimostrò che la specificità di ANCA era in correlazione con le caratteristiche patologiche delle vasculiti (5).

Nell'analisi ad immunofluorescenza per ANCA sono osservabili svariati pattern di colorazione cellulare. Due importanti pattern di colorazione sono stati descritti e ben caratterizzati quando nell'analisi ad immunofluorescenza ANCA si usano neutrofili fissati in etanolo. Gli autoanticorpi che mostrano un pattern citoplasmatico granulare sottile, denominati C-ANCA, in genere sono diretti contro una proteasi di serina, Proteinasi 3 (PR3). È stato dimostrato che questi anticorpi hanno una forte associazione con la granulomatosi di Wegener. L'altro importante pattern della colorazione, quello perinucleare, o pattern P-ANCA, che è in genere dovuto agli anticorpi diretti contro la mieloperossidasi (MPO), è stata associata alla vasculite sistemica e alla glomerulonefrite idiopatica necrotizzante e semilunare (4). Il pattern P-ANCA è un artefatto indotto dall'uso di etanolo come fissativo (4). Se i neutrofili sono fissati in formalina, la mieloperossidasi (il maggior antigene responsabile del pattern P-ANCA nelle cellule fissate con etanolo) resta associata ai granuli primari (alfa), e mostra una distribuzione citoplasmatica granulare. La proteinasi 3 (PR3) resta associata ai granuli primari (alfa) sia nei fissativi con etanolo che in quelli con formalina.

### **PRINCIPIO DEL TEST**

Il sistema di analisi degli anticorpi anticitoplasma dei neutrofili (ANCA) della IC utilizza la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta, descritta per la prima volta da Weller e Coons (6). I campioni dei pazienti, diluiti, sono incubati con neutrofili umani che sono fissati sui vetrini del microscopio per consentire lo specifico legame degli ANCA. Se sono presenti ANCA, gli anticorpi si legano agli antigeni neutrofili. Dopo il lavaggio per rimuovere anticorpi non specifici, il substrato viene incubato con anti-IgG umane coniugate con fluoresceina. Quando i risultati sono positivi, avviene la formazione di un complesso stabile in tre parti composto dall'anticorpo fluorescente antiumano legato agli ANCA umani che sono legati all'antigene presente nelle cellule. Tale complesso può essere visualizzato con l'ausilio di un microscopio a fluorescenza. I campioni positivi per C-ANCA avranno una particolare colorazione citoplasmatica granulare dei neutrofili sia sui vetrini fissati in etanolo che su quelli fissati in formalina. Nei campioni positivi per P-ANCA, si noterà una colorazione diffusa o periferica dei neutrofili sulle cellule fissate con etanolo ed una colorazione granulare

del citoplasma in quelle fissate con formalina. Se il campione è negativo per gli ANCA, non si vedrà alcuna colorazione specifica dei neutrofili.

## COMPONENTI DEL SISTEMA - MATERIALI FORNITI

**Uso:** tutti i componenti sono pronti per l'uso senza che siano necessarie la suddivisione in aliquote o la ricostituzione (tranne il tampone PBS che deve essere sciolto in acqua deionizzata o distillata prima dell'uso).

**Conservazione:** tutti i componenti possono essere conservati alla temperatura di 2-10°C. Dopo la ricostituzione, il tampone PBS deve essere conservato in contenitori con tappo a vite alla temperatura di 2-10°C per massimo quattro settimane o fino a che si presentano segni di contaminazione o altri cambiamenti visibili.

**Stabilità:** tutti i componenti restano stabili per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Non usare alcun componente oltre la data di scadenza.

### REAGENTI REATTIVI

**Vetrini per substrato ANCA:\*\*** Vetrini a pozzetto contenenti neutrofili umani stabilizzati e fissati direttamente sui pozzetti per il test. L'esclusivo design a fossa del vetrino minimizza la contaminazione incrociata dei pozzetti durante l'analisi. La busta del vetrino viene riempita con un gas inerte non tossico che favorisce la stabilità delle cellule. Se il contenitore non appare ben gonfio quando il vetrino è rimosso dal kit, la busta è danneggiata e il vetrino non deve essere usato.

**Diluente per campione ANCA:** numero di catalogo 10100 (100 ml). Esclusivo diluente tamponato per campioni utilizzato per la diluizione dei campioni dei pazienti.

**Controllo positivo C-ANCA:** numero di catalogo 10021-12. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo C-ANCA. Questo siero mostra una colorazione granulare del citoplasma tra i segmenti nucleari dei neutrofili sia su vetrini fissati in etanolo che su quelli fissati in formalina.

**Controllo positivo P-ANCA:** numero di catalogo 10021-11. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo P-ANCA. Questo siero mostra una colorazione nucleare dei neutrofili diffusa o periferica, sui vetrini fissati in etanolo e a fluorescenza citoplasmatica granulare sui vetrini fissati in formalina.

**Controllo titolabile C-ANCA:** numero di catalogo 10026-12. Fiala pronta per l'uso contenente 0,25 ml di siero liquido stabile di controllo umano positivo C-ANCA. Questo controllo va trattato come un campione del paziente non diluito. Per informazioni sul titolo medio vedere l'etichetta.

**Controllo titolabile P-ANCA:** numero di catalogo 10026-11. Fiala pronta per l'uso contenente 0,25 ml di siero liquido stabile di controllo umano positivo P-ANCA. Questo controllo va trattato come un campione del paziente non diluito. Per informazioni sul titolo medio vedere l'etichetta.

**Controllo negativo:** numero di catalogo 10031. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano negativo ANCA. Questo siero mostra una fluorescenza dei neutrofili a bassa intensità, non specifica, verde spento.

**Reagente anticorpo fluorescente, specifico per IgG:** numero di catalogo 10009 (9 ml). Anti-IgG umane di capra coniugate con FITC (fluorescein isothiocyanate, fluoresceina isotiocianato). Questo reagente contiene blu di Evans come colorante di contrasto. Il reagente si presenta pronto all'uso in flaconi contagocce di precisione.

### COMPONENTI NON REATTIVI

**Tampone PBS:** numero di catalogo 1011. Polvere salina tamponata al fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Ciascuna confezione contiene polvere tamponata sufficiente a fare 1 litro. (Nei kit di analisi completi, viene fornita una confezione di polvere tamponata per cinque vetrini).

---

**\*\*Questo vetrino è protetto da uno o più dei seguenti brevetti statunitensi e stranieri: 4387972; D-274261; D-273261; brevetto canadese 1171302 ed altri brevetti in corso di registrazione.**

**Preparazione:** sciogliere una confezione di polvere tamponata in un (1) litro di acqua deionizzata o distillata e conservare in frigorifero ad una temperatura di 2-10°C per massimo 4 settimane o fino a che non compaiono segni di contaminazione o altri cambiamenti visibili.

**Mezzo di fissaggio semipermanente:** numero di catalogo 1111. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 5 ml di mezzo di fissaggio a base di glicerolo.

**Vetrini coprioggetto:** numero di catalogo 1041. Ciascuna confezione contiene dieci vetrini coprioggetto 24 x 60 mm N. 1.

## ALTRI MATERIALI NECESSARI - MA NON FORNITI

Pipette volumetriche per l'erogazione di volumi da 20-25 µl  
Vaschette Coplin o capsule di colorazione  
Flacone morbido o pipette di Pasteur  
Pipette sierologiche  
Contenitori da un litro (per tampone PBS)  
Acqua deionizzata o distillata  
Provette per preparare le diluizioni seriali opzionali  
Carta bibula o assorbente  
Camera per incubazione  
Guanti a perdere  
Timer da laboratorio  
Microscopio a fluorescenza dotato di filtro eccitatore da 495 nm e filtro di sbarramento da 515 nm

## PRECAUZIONI

1. Tutti i materiali di origine umana usati per la preparazione dei controlli per questo prodotto sono stati analizzati e trovati negativi (non ripetutamente reattivi) per gli anticorpi del virus dell'immunodeficienza umana tipo 1 (HIV-1), del virus della immunodeficienza umana tipo 2 (HIV-2), del virus dell'epatite C (HCV) e per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) con un metodo approvato dalla FDA. Nessun metodo di analisi è in grado di garantire con completa sicurezza che siano assenti HIV-1, HIV-2, virus dell'epatite C, virus dell'epatite B o altri agenti infettivi. Quindi, tutti i sieri di controllo vanno maneggiati secondo le stesse modalità utilizzate per i materiali potenzialmente infettivi.
2. Tutti i campioni dei pazienti devono essere maneggiati osservando le precauzioni di sicurezza biologica di livello 2, come raccomandato per ogni siero umano potenzialmente infettivo o per campioni di sangue nel manuale pubblicato per i CDC/NIHM (Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, Centri per il Controllo delle Infezioni/Istituti Nazionali per la Sanità): *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La diluizione di componenti o la sostituzione di componenti diversi da quelli forniti in questo sistema può dare risultati non coerenti.
4. Il sodio azide (0,09%) viene usato come conservante. Il sodio azide può reagire nelle tubature di piombo o rame formando sali metallici di azide esplosivi. Quando si eliminano i reagenti, far scorrere grandi quantità di acqua del rubinetto per evitare la formazione di potenziali residui nelle tubature. Il sodio azide è un veleno e può essere tossico se ingerito.
5. Questo kit è per uso diagnostico *in vitro*.
6. Il siero di controllo titolabile è destinato ad essere usato nel monitoraggio da lotto a lotto e nella riproducibilità interfase. Non è destinato alla misurazione della sensibilità complessiva o della specificità del dosaggio.
7. Non fumare, non mangiare o non bere nelle aree in cui sono maneggiati i campioni o i reagenti del kit.
8. Evitare sempre gli spruzzi e la formazione di aerosol.
9. Tempi e temperature di incubazione diversi da quelli specificati possono dare risultati errati.
10. La contaminazione incrociata dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi.
11. Prima dell'uso, la vetreria di laboratorio riutilizzabile deve essere lavata e sciacquata a fondo e completamente liberata da ogni residuo di detergente. Prima dell'uso, tutta la vetreria di laboratorio deve essere pulita e asciutta.
12. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti, i vetrini e i campioni a temperatura ambiente (18-24°C).
13. Indossare guanti a perdere quando si maneggiano campioni e reagenti e dopo lavare accuratamente le mani.
14. La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi.
15. Non pipettare mai con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la cute e le mucose. In caso di contatto, lavare abbondantemente con un sapone germicida e acqua.

# RACCOLTA DI CAMPIONI

**Raccolta:** il siero è il campione preferito. Devono essere prelevati con tecnica asettica circa 5 ml di sangue intero per venopuntura usando una provetta di raccolta sterile a vuoto o un altro sistema di raccolta adatto. Lasciare che il sangue si coaguli a temperatura ambiente (18-24°C). Non appena possibile, il siero deve essere separato dal coagulo in modo da ridurre al minimo l'emolisi.

**Sostanze interferenti:** non vanno usati sieri che mostrano un alto grado di emolisi, ittero, lipemia o crescita microbica, perché può verificarsi una diminuzione del titolo anticorpale nei campioni positivi. Campioni con livelli di lipidi molto alti possono causare la formazione di una pellicola fluorescente non specifica sul substrato cellulare. L'uso di campioni a digiuno o diafanizzanti per ultracentrifugazione può eliminare questo problema. Campioni contenenti sostanze particellari visibili vanno chiariti per centrifugazione prima dell'analisi.

**Conservazione:** i sieri possono essere conservati a 2-10°C fino ad una settimana. Se l'analisi viene ulteriormente rimandata, i sieri devono essere conservati congelati a -20°C o a una temperatura inferiore. Il siero non deve essere conservato in freezer autosbrinanti.

**ATTENZIONE:** il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni dei pazienti può dare origine a falsi risultati positivi o a falsi risultati negativi.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

### CONTROLLO DELLA QUALITÀ

I controlli positivo, negativo e del bianco devono essere analizzati nei pozzetti previsti per il controllo qualità su ciascun vetrino. Il controllo positivo C-ANCA dovrebbe mostrare una colorazione citoplasmatica granulare dei neutrofili verde mela brillante tra i segmenti nucleari, sia sui vetrini fissati in etanolo che su quelli fissati in formalina. Il controllo positivo P-ANCA dovrebbe mostrare una colorazione nucleare dei neutrofili diffusa o periferica, sui vetrini fissati in etanolo e a fluorescenza citoplasmatica granulare sui vetrini fissati in formalina. Il controllo negativo non dovrebbe mostrare alcuna fluorescenza verde brillante. Nel controllo negativo può essere osservata una fluorescenza verde spento, non specifica. Il controllo del bianco si usa per osservare la fluorescenza non specifica da parte del reagente anticorpo, e non dovrebbe mostrare alcuna colorazione fluorescente verde. Il colorante di contrasto fornito nel coniugato può dare alle cellule una sbiadita colorazione rossa. Se i controlli non appaiono come descritto, il test non è valido e deve essere ripetuto.

### CONTROLLO TITOLABILE OPZIONALE

Nel leggere i titoli, molti laboratori iniziano a leggere dal pozzetto contenente il campione più diluito e leggono "all'indietro" fino alla diluizione 1:20. Il primo pozzetto in cui è visibile una colorazione citoplasmatica chiaramente distinguibile è il punto di equivalenza della reazione. Raccomandiamo questa tecnica per determinare i punti di equivalenza della reazione.

Il titolo medio e la gamma del titolo ( $\pm$  una diluizione su ciascun lato della media) determinati per ciascun numero di lotto sono stati stabiliti nel nostro laboratorio e sono indicati come guida. Questo controllo è fornito per consentire a ciascun laboratorio di valutare la riproducibilità (di precisione) del proprio test ANCA. Dal momento che questo controllo non è destinato ad essere un indicatore dell'accuratezza del titolo, ciascun laboratorio deve stabilire il proprio punto medio di equivalenza della reazione per questo campione e deve usare tali informazioni per valutare la riproducibilità interfase (di precisione).

Attraverso analisi multiple di questo controllo titolabile, usando il sistema di analisi in fluorescenza degli ANCA della Immuno Concepts, è stato stabilito un valore medio del titolo per ciascun numero di lotto. Il numero di lotto, il titolo medio e la gamma del titolo ( $\pm$  una duplice diluizione su ciascun lato della media) sono indicati sull'etichetta della fiala e vanno usati come guida della performance del sistema di analisi.

I valori ottenuti nel nostro laboratorio possono essere diversi dai vostri. Di seguito sono indicati alcuni tra i fattori che possono influenzare i risultati.

1. Il tipo di fonte luminosa. Fonti luminose al mercurio producono una maggiore energia di eccitazione a 495 nm rispetto a quelle al quarzo/alogene. Le fonti luminose al mercurio da 50 watt, 100 watt e 200 watt differiscono poco nell'energia di eccitazione a 495 nm. Fonti luminose al quarzo/alogene da 100 watt generano una maggiore energia di eccitazione a 495 nm rispetto a quelle al quarzo/alogene da 50 watt.

2. La condizione e l'età della fonte di luce. Questo in particolare per le fonti luminose al mercurio che in genere mostrano una graduale riduzione nell'energia di eccitazione a 495 nm prima di esaurirsi. Questa riduzione graduale dell'energia di eccitazione può comportare una significativa perdita di sensibilità dopo diverse settimane. Questo problema può essere evitato tenendo una registrazione dei tempi. Per risultati ottimali, sostituire le lampadine a mercurio da 50 watt dopo 100 ore e quelle da 100 o 200 watt dopo 200 ore. Le fonti luminose al quarzo/alogene in genere non mostrano una graduale riduzione dell'energia di eccitazione prima di esaurirsi.
3. Il tipo di filtro di eccitazione usato. I filtri eccitatori ad interferenza danno maggiore sensibilità in una lunghezza d'onda molto più ridotta rispetto ai filtri eccitatori ad assorbimento. Per maggiori informazioni, consultare il manuale del proprio microscopio a fluorescenza o contattare il rappresentante.
4. Il giusto allineamento del percorso ottico del microscopio. Per istruzioni, consultare il manuale del proprio microscopio a fluorescenza.
5. L'apertura numerica dell'obiettivo. Con fluorescenza a luce incidente (Epi), la fluorescenza cresce in modo esponenziale man mano che aumenta anche l'apertura numerica (NA) dell'obiettivo. Questo può far sì che un obiettivo da 40X con una NA di 0,65 legga una o più diluizioni più basse rispetto ad un obiettivo da 40X con un NA di 0,85. L'apertura numerica è stampata sul lato dell'obiettivo. La sensibilità del microscopio a luce fluorescente trasmessa non è influenzata da NA.
6. I filtri a soppressione. I filtri a soppressione riducono le specifiche lunghezze d'onda dell'eccitazione e possono essere usati per ridurre la sensibilità. Per maggiori informazioni, vedere il manuale del proprio microscopio a fluorescenza o contattare il rappresentante.
7. La precisione e l'accuratezza della tecnica di diluizione, dell'apparecchiatura e della performance delle procedure di analisi.

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL PAZIENTE

Per visualizzare i neutrofili si raccomanda un ingrandimento totale di 400X.

**Negativo:** un siero è considerato negativo per ANCA se, ad una diluizione di 1:20, la colorazione verde fluorescente delle cellule è inferiore o uguale al pozzetto provetta di controllo negativo. Nei neutrofili si può osservare colorazione non specifica di fondo dovuta ad anticorpi eterofili o autoanticorpi.

**Positivo:** un siero si considera positivo per gli ANCA se, ad una diluizione di 1:20, le cellule in ciascun campo mostrano una fluorescenza citoplasmatica granulare simile a quella osservata con il controllo cANCA su vetrini fissati in etanolo o in formalina. Alternativamente, un siero si considera positivo per gli ANCA se, ad una diluizione di 1:20, le cellule mostrano una fluorescenza diffusa o periferica simile a quella osservata con il controllo pANCA su vetrini fissati in etanolo.

## RIPORTO DEI RISULTATI

**Screening:** i risultati devono essere riportati come positivi o negativi alla diluizione di 1:20.

**Pattern della colorazione:** molti anticorpi possono causare la colorazione del citoplasma e/o del nucleo dei neutrofili. Esistono due importanti pattern di colorazione specifica.

**C-ANCA (colorazione classica o citoplasmatica):** la colorazione dei granuli alfa (primari) nel citoplasma mostra un pattern costante di colorazione citoplasmatica a chiazze, spesso con una concentrazione della colorazione tra i lobi del nucleo. La chiazzeria citoplasmatica sarà osservabile sia con neutrofili fissati in etanolo che con neutrofili fissati in formalina.

**P-ANCA (colorazione perinucleare):** colorazione uniforme o omogenea del nucleo multilobo, spesso con marcata colorazione periferica dei lobi nucleari su neutrofili fissati in etanolo. Su neutrofili fissati in formalina, questi anticorpi mostrano una colorazione citoplasmatica granulare.

Gli antinucleari ed altri autoanticorpi possono reagire con i neutrofili, quindi, prima di riportare la presenza di ANCA, tutti i campioni positivi vanno rianalizzati per gli ANA usando un substrato cellulare HEp-2.

**Titolazione opzionale:** i risultati vanno riportati come il reciproco della diluizione dell'ultimo pozzetto in cui è stata osservata una reazione positiva.

## LIMITI DEL TEST

1. Le diagnosi non possono essere fatte solo sulla base del rilevamento dell'anticorpo anti-citoplasma dei neutrofili. Il medico deve interpretare questi risultati confrontandoli con l'anamnesi e i sintomi del paziente, i dati fisici e altre procedure diagnostiche.
2. La cura non va iniziata sulla sola base di un test positivo per gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili. Prima di iniziare qualunque trattamento devono essere considerate indicazioni cliniche, altri risultati di laboratorio e l'impressione clinica del medico.
3. Gli anticorpi antinucleari presenti nei campioni dei pazienti possono reagire con il substrato cellulare. Se sono presenti anticorpi antinucleari, i risultati ANCA possono spesso essere interpretati per il diverso carattere della specifica colorazione ANCA, per i titoli diversi e/o per la diversa intensità delle reazioni. Se la reazione dell'anticorpo antinucleare fluorescente è abbastanza forte da oscurare la colorazione ANCA, l'analisi va riportata come "non interpretabile", e va usato un metodo alternativo per stabilire lo status degli ANCA del paziente.
4. A causa delle numerose opzioni disponibili nei microscopi a fluorescenza, si raccomanda di standardizzare le fonti luminose, i filtri e gli strumenti ottici in caso di confronto dei titoli dei pazienti tra i vari laboratori.
5. Per stabilire lo status clinico del paziente, i risultati di questa analisi vanno usati in connessione alle informazioni disponibili a partire da valutazioni cliniche ed altre procedure diagnostiche.

## VALORI ATTESI

Il valore atteso nella popolazione normale è negativo in una diluizione di screening di 1:20. In pazienti con patologie, sono stati riportati titoli alti fino 1:640 (7).

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

### CAMPIONI NORMALI

Furono testati in parallelo, usando il kit ANCA della Immuno Concepts e un altro kit disponibile in commercio, campioni di siero di 497 donatori di sangue (247 maschi e 250 femmine). Tutti i campioni che erano positivi su vetrini fissati in etanolo in questo gruppo furono testati anche per gli anticorpi antinucleari (ANA) usando il sistema di analisi degli ANA HEp-2 della Immuno Concepts.

Tra i campioni normali ce n'erano 22 positivi per ANA e vennero considerati non interpretabili per ANCA. I rimanenti campioni discrepanti furono testati per gli anticorpi a MPO e PR3 usando le analisi ELISA per definire il vero status degli anticorpo.

### SIERI PRECEDENTEMENTE DEFINITI COME POSITIVI PER ANCA ATTRAVERSO IMMUNOFLOURESCENZA INDIRETTA

Da laboratori di riferimento negli Stati Uniti, nel Regno Unito e in Australia, si ottennero campioni di siero che erano stati giudicati positivi per ANCA usando analisi IFA in-house. In questa parte dello studio furono esaminati un totale di 383 sieri che si prevedeva fossero positivi per ANCA. Questi campioni furono testati in parallelo usando il kit ANCA della Immuno Concepts ed un altro kit reperibile in commercio. I campioni discrepanti furono testati per ANA usando il sistema di analisi degli ANA HEp-2 della Immuno Concepts e per gli anticorpi a MPO e PR3 usando le analisi ELISA.

Mettendo assieme i risultati della popolazione normale e di quella anormale, nel confronto iniziale per il sistema di analisi degli ANCA della Immuno Concepts con neutrofili umani fissati in etanolo, si ottennero i dati riportati di seguito (Tabella 1).

		Metodo di confronto	
		Positivo	Negativo
Etanolo IC ANCA	Positivo	324	94
	Negativo	124	316

Questi dati producono la seguente statistica comparativa.

Sensibilità relativa: 72,3%

Specificità relativa: 77,1%

Concordanza complessiva: 74,6%

Nel confronto iniziale per il sistema di analisi degli ANCA della Immuno Concepts con neutrofili umani fissati in formalina, si ottennero i dati riportati di seguito (Tabella 2).

		Metodo di confronto	
		Positivo	Negativo
Formalina IC ANCA	Positivo	255	52
	Negativo	45	528

Questi dati producono la seguente statistica comparativa.

Sensibilità relativa: 85,0%

Specificità relativa: 91,0%

Concordanza complessiva: 89,0%

Molti autoanticorpi, diversi da quelli associati con vasculite autoimmune, possono reagire con i neutrofili umani (8). Per confermare che gli anticorpi rilevati con qualunque analisi ad immunofluorescenza degli ANCA siano clinicamente significativi, si raccomandano analisi di conferma usando saggi ELISA per la mieloperossidasi (MPO) e la proteinasi 3 (PR3) (9).

Tutti i campioni discrepanti nelle tabelle che precedono, furono testati per anticorpi antinucleari e per anticorpi a MPO e PR3. Tenendo conto dei risultati di queste analisi, nella tabella 3 vediamo i risultati complessivi del sistema di analisi degli ANCA della Immuno Concepts con neutrofili umani fissati in etanolo.

		Metodo di confronto	
		Positivo	Negativo
Etanolo IC ANCA	Positivo	380	32
	Negativo	6	434

Questi dati producono la seguente statistica comparativa.

Sensibilità relativa: 98,4%

Specificità relativa: 93,1%

Concordanza complessiva: 95,5%

Nella tabella 4 vengono mostrati i risultati complessivi del sistema di analisi degli ANCA della Immuno Concepts con neutrofili umani fissati in formalina.

		Metodo di confronto	
		Positivo	Negativo
Formalina IC ANCA	Positivo	292	13
	Negativo	5	548

Questi dati producono la seguente statistica comparativa.

Sensibilità relativa: 98,3%

Specificità relativa: 97,7%

Concordanza complessiva: 98,6%

#### CAMPIONI DI SIERO DI PAZIENTI CON VASCULITI NOTE

Furono testati campioni ottenuti da 102 pazienti con vasculite clinicamente caratterizzata usando i neutrofili della Immuno Concepts fissati in etanolo e fissati in formalina. Nel tabella 5 vengono mostrati i risultati di questo confronto.

**Tabella 5**

Diagnosi clinica	Numero	Positivo	Pattern della colorazione (fissaggio in etanolo)
Granulomatosi di Wegener	30	26 (86,7%)	tutti C-ANCA
Poliarterite nodosa	12	8 (66,7%)	tutti P-ANCA
Poliarterite microscopica	20	18 (90,0%)	tutti P-ANCA
Sindrome Churg-Strauss	3	2 (66,7%)	un P-ANCA; uno sia P-ANCA che C-ANCA
Immunocomplesso semilunare Glomerulonefrite	15	10 (66,7%)	tutti P-ANCA
Malattia infiammatoria dell' intestino	22	17 (77,3%)	tutti P-ANCA atipici

## REATTIVITÀ CROCIATA

Furono testati sieri di 57 pazienti con vari disturbi autoimmuni, sia con il sistema di analisi degli ANCA della Immuno Concepts con neutrofili umani fissati in etanolo che con il sistema di analisi degli ANCA della Immuno Concepts con neutrofili umani fissati in formalina. Tre di questi campioni mostravano, sui neutrofili fissati in etanolo, un colorazione nucleare atipica che somigliava al pattern P-ANCA. Tutti e tre questi campioni provenivano da pazienti con SLE, erano positivi per gli anticorpi anti-DNA e mostravano un ANA positivo con un pattern omogeneo. Un altro campione mostrava una chiazzeria citoplasmatica sui neutrofili fissati in etanolo, ma era negativo sui neutrofili fissati in formalina e sull'analisi ANA. Questo campione fu giudicato come una reazione non specifica. Tutti gli altri sieri in questo gruppo erano negativi sia sui neutrofili fissati in etanolo che su quelli fissati in formalina. Dal momento che molti autoanticorpi possono reagire in modo non specifico con i neutrofili umani (8), le analisi ad immunofluorescenza positive devono sempre essere confermate usando analisi specifiche per gli anticorpi associati a ANCA.

## RIPRODUCIBILITÀ

Furono compiuti studi intrasaggio, intragiorni e intralotti per dimostrare la riproducibilità del sistema di analisi degli ANCA della Immuno Concepts con neutrofili umani fissati in etanolo e con neutrofili umani fissati in formalina. I sieri usati in questi studi comprendevano tre campioni P-ANCA positivi (uno che mostrava colorazione forte, uno che mostrava colorazione moderata e uno che mostrava colorazione debole), e tre campioni C-ANCA positivi (che mostravano ciascuno una colorazione forte, moderata o debole). Furono anche usati sei campioni negativi per ANCA. Nello studio intrasaggio, questi sieri furono analizzati in replicati di sei pozzetti ciascuno. Per la riproducibilità intragiorni e intralotti, questi 12 sieri furono analizzati ciascuno su tre numeri di lotto di kit in tre occasioni separate. I sei campioni negativi erano negativi su tutti i vetrini testati e i campioni positivi erano positivi, con intensità di fluorescenza costante, su tutti i vetrini testati.

## RIFERIMENTI

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.

In caso di danni all'imballaggio protettivo, contattare Immuno Concepts prima dell'uso.



Fornitore



Rappresentante autorizzato  
nella Comunità Europea



Limitazione Di  
Temperatura



Contiene sufficiente per <n> test



Leggere le  
istruzioni per l'uso



Dispositivo Medico Diagnostico In vitro



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9779 Business Park Drive Sacramento, CA. 95827  
Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649  
Email: [techservice@immunoconcepts.com](mailto:techservice@immunoconcepts.com)

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



**REF** 1105: Blu di Evans

<b>R45</b>	Può provocare il cancro
<b>S45</b>	In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).
<b>S53</b>	Evitare l'esposizione – procurarsi speciali istruzioni prima dell'uso

# PROCEDURA DEL TEST ANCA

- 1. RICOSTITUZIONE DEL TAMPONE (PBS)**  
Sciogliere il contenuto di una confezione di tampone in un litro di acqua deionizzata o distillata. Coprire e conservare alla temperatura di 2-10°C fino a quattro settimane o fino a che non si presentino segni di contaminazione o altri cambiamenti visibili.
- 2. DILUIZIONE DEI CAMPIONI DEI PAZIENTI**  
Screening: diluire i campioni del paziente a 1:20 aggiungendo 0,05 ml (50 µl) di siero a 0,95 ml (950 µl) di diluente per campioni.  
Titolo semi-quantitativo: per preparare diluizioni seriali duplici di campioni di screening (ad es. 1:40, 1:80, 1:160...1:640), rimuovere 0,5 ml della diluizione 1:20 e mescolarla con 0,5 ml di diluente per campioni per ottenere una diluizione a 1:40, e continuare le diluizioni seriali in tal modo.
- 3. DILUIZIONE OPZIONALE DEL CONTROLLO TITOLABILE**  
Trattare il controllo opzionale titolabile come un campione del paziente non diluito. Diluire il controllo a 1:20 aggiungendo 0,05 ml (50 µl) di siero di controllo a 0,95 ml di diluente per campioni. Preparare diluizioni seriali duplici del controllo titolabile, come sopra descritto.
- 4. PREPARAZIONE DEI VETRINI DEL SUBSTRATO (20-25 µl/pozzetto)**  
Rimuovere il/i vetrino/i dal contenitore/i e porre i sieri di controllo sui pozzetti di controllo come descritto di seguito. Capovolgere il flacone contagocce di controllo e premere delicatamente fino a che in punta è visibile la goccia. Appoggiare delicatamente la goccia sul pozzetto di controllo appropriato evitando il contatto diretto della punta del contagocce con la superficie del vetrino. Aggiungere 1 goccia (20-25 µl) di campione diluito del paziente ai pozzetti numerati.  
**ATTENZIONE:** IL CONTATTO DIRETTO DELLA PUNTA DEL CONTAGOCCE CON LA SUPERFICIE DEL VETRINO PUÒ DANNEGGIARE IL SUBSTRATO ANTIGENE.
- 5. INCUBAZIONE DEI VETRINI (30 ± 5 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-24°C)**  
Mettere il/i vetrino/i in una camera umida, coperta (una capsula di Petri con carta assorbente inumidita andrà bene). Incubare, col coperchio, per 30 minuti (± 5 minuti) a temperatura ambiente (18-24°C).
- 6. RISCIAQUO COL PBS**  
Rimuovere il/i vetrino/i dal piatto dell'incubatore e sciacquare brevemente con PBS usando una bottiglia a zampillo, una pipetta di Pasteur o una pipetta sierologica. Non far zampillare il tampone direttamente sui pozzetti.  
**NOTA:** per evitare la contaminazione incrociata sui vetrini con 10 pozzetti, orientare il flusso di PBS lungo la linea mediana del vetrino, inclinando prima verso le provette 1-3 e poi verso quelle 4-6.
- 7. LAVAGGIO COL PBS (10 minuti)**  
Lavare il/i vetrino/i per 10 minuti con PBS in un piatto per la colorazione del vetrino o una vaschetta Coplin. Questo lavaggio può durare fino a 30 minuti senza che i risultati finali dell'analisi varino. Eliminare la soluzione di lavaggio PBS dopo l'uso.
- 8. REAGENTE ANTICORPO FLUORESCENTE (coprire i pozzetti con 10-12 gocce)**  
Rimuovere uno alla volta i vetrini dal PBS e immergerli 3-5 volte in acqua deionizzata o distillata. Tamponare il vetrino sul lato con carta bibula o con carta assorbente in modo da eliminare l'acqua in eccesso. Riportare immediatamente il vetrino nella camera di incubazione e coprire completamente i pozzetti usando il reagente anticorpo fluorescente; iniziare mettendo una goccia su ogni pozzetto. Ripetere l'operazione per ciascun vetrino. Il reagente anticorpo fluorescente è stato titolato al fine di compensare l'acqua deionizzata o distillata residua che resta sul vetrino dopo il risciacquo.  
**NOTA:** è importante che i pozzetti dei vetrini non si asciughino durante questa procedura onde evitare il danneggiamento del substrato.  
**TAMPONARE O ASCIUGARE IL VETRINO IN MANIERA CHE LO STESSO NON RESTI SENZA REAGENTE ANTICORPO FLUORESCENTE PER PIÙ DI 15 SECONDI.**
- 9. INCUBAZIONE DEI VETRINI (30 ± 5 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-24°C)**  
Mettere il coperchio sulla camera di incubazione e coprire con carta assorbente per impedire l'esposizione alla luce se la cella non è opaca. Lasciare incubare il/i vetrino/i per 30 minuti (± 5 minuti) a temperatura ambiente (18-24°C).
- 10. RISCIAQUO COL PBS**  
Rimuovere il/i vetrino/i dal piatto dell'incubatore e sciacquare brevemente con PBS. Non far zampillare il tampone direttamente sui pozzetti.
- 11. LAVAGGIO COL PBS (10 minuti)**  
Lavare il/i vetrino/i per 10 minuti con PBS in un piatto per la colorazione del vetrino o una vaschetta Coplin. Questo lavaggio può durare fino a 30 minuti senza che i risultati finali dell'analisi varino.
- 12. MONTAGGIO DEL VETRINO COPRIOGGETTI**  
Rimuovere uno alla volta i vetrini dal PBS e immergerli 3-5 volte in acqua deionizzata o distillata. Tamponare il vetrino sul lato con carta bibula o con carta assorbente in modo da eliminare l'acqua in eccesso.  
**TAMPONARE O ASCIUGARE IL VETRINO IN MANIERA CHE NON RIMANGA SENZA COPRIVETRINO PER PIÙ DI 15 SECONDI.** Aggiungere 4-5 gocce di mezzo di fissaggio semipermanente lungo la linea mediana di ciascun vetrino. Posizionare con attenzione il vetrino coprioggetto, evitando vuoti d'aria, abbassando delicatamente il vetrino coprioggetto da un estremo all'altro del vetrino.  
**NOTA:** una quantità eccessiva di mezzo di fissaggio sul vetrino può causare un'alta fluorescenza di fondo, dovuta alla dispersione della luce o alla mancanza di risoluzione chiara delle cellule (immagine sfocata). L'eccesso del mezzo di fissaggio può essere eliminato dal vetrino tamponando delicatamente il vetrino coprioggetto con carta assorbente o carta per pulire lenti evitando qualsiasi movimento diretto del vetrino coprioggetto.

**PER ASSISTENZA TECNICA:** +1 916-363-2649

oppure a mezzo e-mail: [techservice@immunoconcepts.com](mailto:techservice@immunoconcepts.com)