



SISTEMA DE TESTE PARA ANCA

*Para uso em diagnóstico in vitro
Para uso profissional*

USO PRETENDIDO: Este é um teste indireto de anticorpo fluorescente para a detecção semiquantitativa de autoanticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) no soro humano. Este sistema de teste deve ser usado como auxiliar na detecção de anticorpos associados à vasculite autoimune.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Os autoanticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) são um grupo de anticorpos que reagem com antígenos do citoplasma de neutrófilos humanos. Embora esses autoanticorpos tenham sido relatados originalmente em 1964 (1), o primeiro relato ligando-os a doenças foi em 1982, quando Davies *et al.* informaram a presença dos anticorpos em oito pacientes com glomerulonefrite necrosante segmentar (2). Em 1984, foram relatados mais quatro pacientes com vasculite e glomerulonefrite. Em 1985, van der Woude *et al.* mostraram que o ANCA tinha alta associação com a granulomatose de Wegener, e que o título de anticorpos correlacionou-se com a atividade da doença (3). Em 1988, Falk e Jennette relataram que o ANCA tem mais que uma especificidade para antígeno (4). Um relato subsequente mostrou que a especificidade do ANCA correlacionava-se com as características patológicas da vasculite (5).

No teste imunofluorescente para ANCA, podem ser observados vários testes de coloração celular. Dois importantes padrões de coloração foram descritos e bem caracterizados quando os neutrófilos fixados em etanol são usados no teste imunofluorescente para ANCA. Os autoanticorpos que mostra fino padrão citoplasmático granular, denominados C-ANCA, em geral são direcionados contra a serina protease, Proteinase 3 (PR3). Esses autoanticorpos demonstraram ter alta associação com a granulomatose de Wegener. Ou outro padrão de coloração importante, o perinuclear, ou padrão P-ANCA, que normalmente se deve a anticorpos direcionados contra mieloperoxidase (MPO), foi associado a vasculite sistêmica e glomerulonefrite necrosante idiopática e glomerulonefrite em crescente (4). O padrão P-ANCA é um artefato induzido pelo uso de etanol como fixador (4). Se os neutrófilos forem fixados em formalina, a mieloperoxidase (o principal antígeno responsável pelo padrão P-ANCA nas células fixadas em etanol) continua associada aos grânulos primários (alfa), e mostra distribuição citoplasmática granular. A proteinase 3 (PR3) continua associada aos grânulos primários (alfa) nos fixadores etanol ou formalina.

PRINCÍPIO DO TESTE

O teste de autoanticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) da Immuno Concepts usa a técnica de anticorpo fluorescente indireto (IFA), descrita pela primeira vez por Weller e Coons (6). As amostras de pacientes são incubadas com neutrófilos humanos, que são fixadas em lâminas de vidro para microscópio para permitir ligação específica de ANCA. Se os ANCA estiverem presentes, os autoanticorpos ligam-se a antígenos neutrofílicos. Depois de lavagem para remover os anticorpos não-específicos, o substrato é incubado com IgG anti-humana conjugada a fluoresceína. Quando os resultados são positivos, há formação de um complexo estável de três partes, que consistem em anticorpo anti-humano fluorescente ligados a ANCA humanos, que são ligados a antígeno localizado nas células. Esse complexo pode ser visualizado com o auxílio de um microscópio fluorescente. As amostras que são positivas para C-ANCA mostram coloração citoplasmática granular distintiva dos neutrófilos em lâminas fixadas em etanol e formalina. Nas amostras positivas para P-ANCA, verificar-se-á a coloração nuclear difusa ou periférica ou dos neutrófilos nas células fixadas em

etanol, e coloração granular do citoplasma nas células fixadas em formalina. Se a amostra for negativa para ANCA, não será constatada coloração específica dos neutrófilos.

COMPONENTES DO SISTEMA - MATERIAIS FORNECIDOS

Uso: Todos os componentes vêm prontos para uso, sem necessidade de compor alíquotas ou de reconstituição (exceto para o tampão PBS que deve ser dissolvido em água desionizada ou destilada antes do uso).

Armazenamento: Todos os componentes podem ser armazenados em refrigeração de 2 °C a 10 °C. Depois da reconstituição, o reagente tampão PBS deve ser armazenado em recipientes com tampa de rosca e em refrigeração a de 2 °C a 10 °C por até quatro semanas ou até que haja sinais de contaminação ou de outras alterações visíveis.

Estabilidade: Todos os componentes continuam estáveis por pelo menos 12 meses a partir da data de fabricação. Não utilizar qualquer componente depois de sua data de validade.

REAGENTES REATIVOS

Lâminas de substrato de ANCA:** Lâminas que contêm neutrófilos humanos estabilizados e fixados diretamente nos poços de teste. O modelo único de lâmina com fossos minimiza a contaminação cruzada dos poços durante o teste. A bolsa da lâmina é cheia com um gás inerte não-tóxico que contribui para a estabilidade das células. Se a bolsa não parecer insuflada quando a lâmina for removida do kit, ocorreu algum dano na bolsa e a lâmina não deve ser usada.

Diluyente da amostra ANCA: Número de Catálogo 10100 (100 ml). Diluyente tamponado de amostra patenteado para diluir amostras de pacientes.

Controle positivo para C-ANCA: Número de Catálogo 10021-12. Frasco conta-gotas pronto para usar, que 1,0 ml de soro humano positivo para C-ANCA. Esse soro demonstra coloração granular do citoplasma entre os segmentos nucleares dos neutrófilos em lâminas fixadas em etanol e formalina.

Controle positivo para P-ANCA: Número de Catálogo 10021-11. Frasco conta-gotas pronto para usar, que 1,0 ml de soro humano positivo para P-ANCA. Este soro demonstra coloração nuclear difusa ou periférica dos neutrófilos em lâminas fixadas em etanol e fluorescência citoplasmática granular em lâminas fixadas em formalina.

Controle titulável para C-ANCA: Número de Catálogo 10026-12. Frasco pronto para usar que contém 0,25 ml de soro humano líquido estável de controle positivo para C-ANCA. Esse controle deve ser tratado como uma amostra não-diluída de paciente. Ver as informações sobre titulação média na etiqueta do frasco.

Controle titulável para P-ANCA: Número de Catálogo 10026-11. Frasco pronto para usar que contém 0,25 ml de soro humano líquido estável de controle positivo para P-ANCA. Esse controle deve ser tratado como uma amostra não-diluída de paciente. Ver as informações sobre titulação média na etiqueta do frasco.

Controle negativo: Número de Catálogo 10031. Frasco pronto para usar que contém 1,0 ml de soro humano de controle negativo para ANCA. Este soro demonstra fluorescência verde escuro não-específica e de baixa intensidade dos neutrófilos.

Reagente específico para IgG para anticorpo fluorescente: Número de Catálogo 10009 (9 ml). IgG anti-humana de cabra conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Este reagente contém azul de Evans como contracolorante. O reagente vem pronto para usar em frascos conta-gotas de precisão.

COMPONENTES NÃO-REATIVOS

Tampão PBS em pó: N° de Catálogo 1011. Solução salina tamponada com fosfato em pó (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contém pó de tampão suficiente para fazer 1 litro. (É fornecida uma bolsa de pó de tampão para cada cinco lâminas nos kits completos de teste.)

Preparação: Dissolver uma bolsa de pó de tampão em um litro de água desionizada ou destilada, tampar e armazenar no refrigerador de 2 °C a 10 °C por até quatro semanas ou até que ocorram sinais de contaminação ou outras alterações visíveis.

****Esta lâmina está protegida por uma ou mais das seguintes patentes dos EUA e estrangeiras: 4387979; D-274261; D-273261; Patente canadense 1171302 e outras patentes pendentes.**

Meio de montagem semipermanente: N° de Catálogo 1111. Frasco pronto para usar que contém 5,0 ml de meio de montagem com base em glicerol.

Laminulas: N° de Catálogo 1041. Cada pacote contém dez laminulas de 24x60 mm No. 1 de vidro.

MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS - PORÉM NÃO FORNECIDOS

Pipetas volumétricas para dispensar volumes de 20 a 25 µl
Jarras de Coplin ou placas de coloração
Almotolia ou pipetas Pasteur
Pipetas sorológicas
Recipientes de um litro (para tampão PBS)
Água desionizada e destilada
Tubos de ensaio para preparar diluições opcionais de soro
Papel absorvente ou papel-toalha
Câmara para incubação
Luvas descartáveis
Temporizador de laboratório
Microscópio fluorescente equipado com filtro excitador de 495 nm e filtro de barreira de 515 nm

PRECAUÇÕES

1. Todos os materiais de origem humana usados na preparação de controles para este produto foram testados e foram negativos (não-reativos repetidamente) para anticorpos para o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1), vírus da imunodeficiência humana-2 (HIV-2), vírus da hepatite C (HCV) e para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), segundo métodos aprovados pela FDA. Nenhum método de teste pode oferecer garantia total de que HIV-1, HIV-2, hepatite C, hepatite B ou outros agentes infecciosos estejam ausentes. Assim, todos os soros de controle devem ser manuseados da mesma maneira que materiais com potencial infeccioso.
2. Todas as amostras de pacientes devem ser manuseadas no nível de Biossegurança 2, conforme as recomendações para amostras de soro ou sangue humano com potencial infeccioso constantes no Manual dos Centers for Disease Control/National Institutes of Health: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. A diluição dos componentes ou a substituição dos componentes além dos fornecidos com o sistema podem gerar resultados inconsistentes.
4. A azida sódica (0,09%) é usada como conservante. A azida sódica pode reagir com instalações hidráulicas de chumbo ou cobre e formar sais de azida metálica explosivos. Ao descartar os reagentes, enxaguar com grandes volumes de água corrente para evitar possíveis resíduos no encanamento. A azida sódica é um veneno e pode ser tóxica quando ingerida.
5. Este kit destina-se ao uso para diagnóstico *in vitro*.
6. O soro de controle titulável destina-se ao uso na monitoração da reprodutibilidade de cada lote e de cada execução. Não se destina como medidor da sensibilidade ou especificidade gerais(al) do ensaio.
7. Não fumar, comer ou beber nas áreas em que as amostras ou reagentes do kit são manuseados.
8. Evitar respingos ou geração de aerossóis todas as vezes.
9. Os tempos e temperaturas de incubação além dos especificados podem gerar resultados errôneos.
10. A contaminação cruzada de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos.
11. A vidraria reutilizável deve ser lavada e totalmente enxaguada, de modo a remover todo o detergente antes do uso. Toda a vidraria deve ser limpa e seca antes do uso.
12. Deixar todos os reagentes, lâminas e amostras chegarem à temperatura ambiente (18 °C a 24 °C) antes de usar.
13. Usar luvas descartáveis ao manusear amostras e reagentes, e lavar completamente as mãos depois.
14. A contaminação microbiana de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos.
15. Nunca pipetar com a boca e evitar o contato dos reagentes e amostras com a pele e a mucosa. Se ocorrer contato, lavar com sabão germicida e quantidade abundante de água.

COLETA DE AMOSTRA

Coleta: O soro é a amostra preferida. Cerca de 5 ml de sangue total devem ser coletados de modo asséptico, por punção venosa com tubo de coleta estéril e a vácuo ou com outro sistema de coleta adequado. Deixar o sangue coagular em temperatura ambiente (18 °C a 24 °C). O soro deve ser separado do coágulo por centrifugação, assim que possível para minimizar a hemólise.

Substâncias interferentes: Os soros que apresentam alto grau de hemólise, bile, lipemia ou crescimento microbiano não devem ser usados, porque a redução do título de anticorpo pode ocorrer nas amostras positivas. As amostras com níveis muito altos de lípidos podem gerar a formação de uma película fluorescente não-específica sobre o substrato celular. O uso de amostras de jejum ou a limpeza de amostras por ultracentrifugação pode eliminar esse problema. As amostras que contêm matéria particulada visível devem ser clareadas por centrifugação antes dos testes.

Armazenamento: O soro pode ser armazenado de 2 °C a 10 °C por até uma semana. Se os testes demorarem mais que isso, o soro deve ser armazenado congelado a -20 °C ou menos. O soro não deve ser armazenado em refrigerador ou freezer com autodescongelamento.

CUIDADO: O congelamento e descongelamento repetitivo das amostras dos pacientes pode gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

CONTROLE DE QUALIDADE

Controles positivos, negativos e solução de branco devem ser executados nos poços destinados ao controle de qualidade em cada lâmina. O controle positivo para C-ANCA deve apresentar coloração fluorescente amarelo esverdeado brilhante granular no citoplasma dos neutrófilos, entre os segmentos nucleares em lâminas fixadas em etanol ou formalina. O controle positivo para P-ANCA deve apresentar coloração nuclear amarelo esverdeado difusa ou periférica nos neutrófilos em lâminas fixadas em etanol, e fluorescência citoplasmática granular nas lâminas fixadas em formalina. O controle negativo não deve apresentar nenhuma fluorescência verde brilhante. A fluorescência amarelo esverdeado escuro não-específica e de baixa intensidade, pode ser observada no controle negativo. A solução de branco é usada para observar fluorescência não-específica do reagente para anticorpo e não deve exibir coloração fluorescente verde. A contracoloração fornecida no conjugado pode corar as células com vermelho escuro. Se os controles não aparecerem conforme a descrição, o teste é inválido e deve ser repetido.

CONTROLE TITULÁVEL OPCIONAL

Ao ler os títulos, muitos laboratórios começam a leitura no poço que contém a amostra mais diluída e leem "de trás para a frente" até a diluição de 1:20. O primeiro poço no qual um padrão claramente discernível é visível é o ponto final de titulação. Recomendamos esta técnica para determinar os pontos finais de titulação.

O título médio e a faixa de título (\pm uma diluição em cada lado da média) determinados para cada lote foram estabelecidos em nosso laboratório e são fixados como orientação. Esse controle é fornecido, para permitir que cada laboratório avalie a reprodutibilidade (precisão) de seus testes para ANCA. Desde que não se pretende que esse controle seja um indicador da exatidão do título, cada laboratório deve estabelecer seu próprio ponto final médio do título para essa amostra, e deve usar essa informação para avaliar reprodutibilidade de cada execução (precisão).

Por meio de múltiplos testes desse controle titulável, usando o Sistema de teste Fluorescente para ANCA da Immuno Concepts, estabeleceu-se um valor de título médio para cada número de lote. O número de lote, o título médio e a faixa de título (\pm uma diluição dupla em cada lado da média) são declarados na etiqueta do frasco e devem ser usados como orientação no teste de desempenho do sistema.

Os valores obtidos em nosso laboratório podem diferir dos seus valores. Alguns dos muitos fatores que podem afetar seus resultados podem incluir o seguinte, sem a isso se limitar:

1. Tipo de fonte de luz usada. As fontes de luz de mercúrio produzem maior energia de excitação a 495 nm do que o quartzo ou halogênio. As fontes de luz de mercúrio de 50 watt, 100 watt e 200 watt diferem um pouco quanto à energia de excitação a 495 nm. As fontes de luz de quartzo ou halogênio de 100 watt produzem maior energia de excitação a 495 nm que as mesmas fontes de 50 watt.
2. Condição e tempo de uso da fonte de luz. Isso é particularmente verdadeiro para as fontes de luz de mercúrio, que em geral, apresentam redução gradual da energia de excitação a 495 nm antes de queimar. Essa redução gradual da energia de excitação pode resultar em perda significativa de sensibilidade durante várias semanas. Esse problema é evitado mantendo-se um registro de tempo de uso. Para obter melhores resultados, deve-se trocar as lâmpadas de mercúrio de 50 watt depois de 100 horas de uso, e as lâmpadas de mercúrio de 100 ou 200 watt, depois de 200 horas. As fontes de luz de quartzo e halogênio em geral, não apresentam redução gradual da energia de excitação antes de queimar.
3. Tipo de filtro excitador usado. Os filtros excitadores de interferência fornecem mais sensibilidade em comprimento de onda muito mais estreito do que os filtros excitadores de absorção. Consultar o manual do microscópio ou o representante de vendas para obter mais informações.

4. Alinhamento adequado da via de luz do microscópio. Consultar as instruções do manual do microscópio fluorescente.
5. Abertura numérica da objetiva. Com a luz fluorescente incidente (Epi), a fluorescência aumenta de maneira exponencial, pois da abertura numérica (NA) da objetiva aumenta ainda mais. Isso pode causar objetiva de 40X, com NA de 0,65 para ler uma ou mais diluições inferiores a objetiva de 40X com NA de 0,85. A abertura numérica está marcada ao lado da objetiva.
6. Filtros de supressão. Os filtros de supressão reduzem os comprimentos de onda específicos de excitação e podem ser usados na redução da sensibilidade. Consultar o manual do microscópio ou o representante de vendas para obter mais informações.
7. Precisão e exatidão da técnica de diluição, do equipamento e do desempenho dos procedimentos do teste.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO PACIENTE

O aumento total de 400X é recomendado para visualizar os neutrófilos

Negativo: O soro é considerado negativo para ANCA se, na diluição de 1:20, a coloração verde fluorescente das células for menor ou igual à do poço de controle negativo. A coloração não-específica de fundo devido a anticorpos ou autoanticorpos heterófilos pode ser observada nos neutrófilos.

Positivo: O soro é considerado positivo para ANCA se, na diluição de 1:20, as células em cada campo demonstrarem fluorescência citoplasmática granular similar à observada com o controle para C-ANCA em lâminas fixadas em etanol ou formalina. Alternativamente, o soro é considerado positivo para ANCA se, na diluição de 1:20, as células demonstrarem fluorescência nuclear difusa ou periférica similar à observada com o controle para C-ANCA em lâminas fixadas em etanol ou formalina.

LAUDO DE RESULTADOS

Seleção: Os resultados devem ser relatados como positivos ou negativos na diluição de 1:20.

Padrões de coloração: Muitos autoanticorpos podem causar coloração do citoplasma e/ou do núcleo dos neutrófilos. Existem dois padrões importantes de coloração específica:

C-ANCA (coloração clássica ou citoplasmática): A coloração dos grânulos alfa (primários) no citoplasma mostra padrão de coloração citoplasmática pontilhado uniforme, em geral, com uma concentração de cor entre os lobos do núcleo. O pontilhado citoplasmático será visto em neutrófilos fixados em etanol ou formalina.

P-ANCA (coloração perinuclear): Coloração regular ou homogênea do núcleo multilobulado, com frequência, com coloração periférica acentuada dos lobos nucleares em neutrófilos fixados em etanol. Nos neutrófilos fixados em formalina, esses anticorpos mostram coloração citoplasmática granular.

Os autoanticorpos antinucleares e outros podem reagir com os neutrófilos, de modo que todas as amostras positivas devem ser testadas para ANA, com substrato de células HEp-2 antes de se relatar a presença de ANCA.

Titulação opcional: Os resultados devem ser relatados como a recíproca da diluição do último poço em que se verificou reação positiva.

LIMITAÇÕES DO TESTE

1. O diagnóstico pode ser feito com base apenas na detecção de anticorpos anticitoplasma de neutrófilos. O médico precisa interpretar esses resultados em conjunto com a história, os sintomas e os achados físicos do paciente e com outros procedimentos de diagnóstico.
2. O tratamento não deve ser iniciado com base unicamente em um teste positivo para anticorpos anticitoplasma de neutrófilos. As indicações clínicas, outros achados laboratoriais e a impressão clínica do médico devem ser considerados antes de iniciar qualquer tratamento.
3. Anticorpos antinucleares presentes nas amostras do paciente podem reagir com o substrato celular. Se os anticorpos antinucleares estiverem presentes, os resultados de ANCA podem, com frequência ser interpretados devido ao caráter diferente da coloração específica do ANCA, aos títulos diferentes e/ou à intensidade das reações. Se a reação do anticorpo antinuclear fluorescente for forte o suficiente para obscurecer a coloração do ANCA, deve relatar o teste como “não passível de interpretação”, devendo-se, então, empregar um método alternativo de determinação do estado do ANCA no paciente.

4. Como existem muitas opções de microscópios fluorescentes, recomenda-se que as fontes de luz, filtros e a óptica sejam padronizados ao comparar a titulação de pacientes entre laboratórios.
5. Os resultados desse teste devem ser usados em conjunto com as informações obtidas na avaliação clínica e em outros procedimentos diagnósticos, para determinar o estado clínico do paciente.

VALORES ESPERADOS

O valor esperado na população normal é negativo na diluição de seleção de 1:20. Nos pacientes portadores de doença, foram relatados valores de título de até 1:640 (7).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

AMOSTRAS NORMAIS

As amostras de soro de 497 doadores de sangue (247 homens e 250 mulheres) foram testadas em paralelo, utilizando-se o kit de ANCA da Immuno Concepts e outro kit encontrado no comércio. Todas as amostras positivas em lâminas fixadas em etanol nessa população também foram testadas para anticorpos antinucleares (ANA) usando o Sistema de teste HEp-2 ANA da Immuno Concepts.

Entre as amostras normais, havia 22 que foram positivas para ANA, e foram consideradas não passíveis de interpretação para ANCA. As amostras discrepantes restantes foram testadas para anticorpos para MPO e PR3 usando ensaios ELISA para determinar o verdadeiro estado de anticorpos.

SOROS ANTERIORMENTE DETERMINADOS POSITIVOS PARA ANCA POR IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA

As amostras de soro, que foram consideradas positivas para ANCA nos ensaios IFA internos, foram obtidas de laboratórios de referência nos EUA, Reino Unido e Austrália. Um total de 383 amostras de soro, que esperamos sejam positivas para ANCA, foram examinadas nesta parte do estudo. Essas amostras foram testadas em paralelo com o kit de ANCA da Immuno Concepts e outro kit encontrado no comércio. As amostras discrepantes foram testadas para ANA com o Sistema de teste HEp-2 ANA da Immuno Concepts, e para anticorpos para MPO e PR3 usando ELISA.

Combinando os resultados da população normal e da anormal, obtivemos os seguintes dados na comparação inicial para o Sistema de teste para ANCA com neutrófilos humanos fixados em etanol (Tabela 1):

| | Método de comparação | |
|--------------------------------|----------------------|----------|
| | Positivo | Negativo |
| Etanol da Immuno Concepts ANCA | 324 | 94 |
| | 124 | 316 |

Esses dados geram a seguinte estatística comparativa:

Sensibilidade relativa: 72,3%
 Especificidade relativa: 77,1%
 Concordância geral: 74,6%

Na comparação inicial para o Sistema de teste para ANCA da Immuno Concepts com neutrófilos humanos fixados em formalina, obtivemos os seguintes dados (Tabela 2):

| | Método de comparação | |
|-----------------------------------|----------------------|----------|
| | Positivo | Negativo |
| Formalina da Immuno Concepts ANCA | 255 | 52 |
| | 45 | 528 |

Esses dados geram a seguinte estatística comparativa:

Sensibilidade relativa: 85,0%
 Especificidade relativa: 91,0%
 Concordância geral: 89,0%

Muitos autoanticorpos que não são associados a vasculite autoimune podem reagir com neutrófilos humanos (8). Para confirmar que os anticorpos detectados por qualquer teste imunofluorescente para ANCA têm significância clínica, recomenda-se veementemente realizar ensaios ELISA para mieloperoxidase (MPO) e proteinase 3 (PR3) (9).

Todas as amostras discrepantes nas tabelas acima foram testadas quanto a anticorpos antinucleares e anticorpos para MPO e PR3. Considerando os resultados desses testes, vemos os resultados gerais para o Sistema de teste para ANCA da Immuno Concepts com neutrófilos humanos fixados em etanol na Tabela 3:

| Etanol da Immuno Concepts ANCA | Método de comparação | |
|--------------------------------------|----------------------|----------|
| | Positivo | Negativo |
| Positivo | 380 | 32 |
| Negativo | 6 | 434 |

Esses dados geram a seguinte estatística comparativa:

Sensibilidade relativa: 98,4%
Especificidade relativa: 93,1%
Concordância geral: 95,5%

Os resultados gerais do Sistema de teste para ANCA da Immuno Concepts com neutrófilos humanos fixados em formalina encontram-se na Tabela 4:

| Formalina da Immuno Concepts ANCA | Método de comparação | |
|---|----------------------|----------|
| | Positivo | Negativo |
| Positivo | 292 | 13 |
| Negativo | 5 | 548 |

Esses dados geram a seguinte estatística comparativa:

Sensibilidade relativa: 98,3%
Especificidade relativa: 97,7%
Concordância geral: 98,6%

AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM VASCULITE CONHECIDA

As amostras obtidas de 102 pacientes com vasculite clinicamente caracterizada foram testadas com neutrófilos fixados em etanol e com formalina da Immuno Concepts. Os resultados dessa comparação são mostrados na Tabela 5:

Tabela 5

| Diagnóstico clínico | Número | Positivo | Padrão de coloração (fixados com etanol) |
|---|--------|------------|--|
| Granulomatose de Wegener | 30 | 26 (86,7%) | Todos os C-ANCA |
| Poliarterite nodosa | 12 | 8 (66,7%) | Todos os P-ANCA |
| Poliarterite microscópica | 20 | 18 (90,0%) | Todos os P-ANCA |
| Síndrome de Churg-Strauss | 3 | 2 (66,7%) | Um P-ANCA; um P-ANCA e um C-ANCA |
| Glomerulonefrite em crescente por imunocomplexo | 15 | 10 (66,7%) | Todos os P-ANCA |
| Doença intestinal inflamatória | 22 | 17 (77,3%) | Todos os P-ANCA atípicos |

REATIVIDADE CRUZADA

O soro de 57 pacientes com vários transtornos autoimunes foi testado no Sistema de teste para ANCA da Immuno Concepts com neutrófilos humanos fixados em etanol e formalina, ambos da Immuno Concepts. Três dessas amostras mostraram um tipo de coloração nuclear atípica, que se assemelhou ao padrão de P-ANCA, em neutrófilos fixados em etanol. Essas três amostras eram de pacientes com LES, eram positivas para anticorpos anti-DNA e mostravam-se positivas para ANA com um padrão homogêneo. Uma amostra adicional mostrou pontilhado citoplasmático nos neutrófilos fixados em etanol, mas foi negativa nos neutrófilos fixados em formalina e no teste para ANA. Essa amostra foi considerada uma reação não-específica. Todas as outras amostras de soro dessa população foram negativas nos

neutrófilos fixados com etanol e formalina. Desde que muitos autoanticorpos podem reagir com neutrófilos humanos de maneira não-específica (8), os testes imunofluorescentes positivos devem sempre ser confirmados usando-se ensaios específicos para anticorpos associados ao ANCA.

REPRODUTIBILIDADE

Foram realizados estudos intraexecução, entre dias e entre lotes para demonstrar a reprodutibilidade do Sistema de teste para ANCA da Immuno Concepts com neutrófilos humanos fixados em etanol formalina, ambos da Immuno Concepts. O soro usado nesse estudo inclui três amostras positivas para P-ANCA (uma que apresentou forte coloração, uma com coloração moderada e uma com coloração fraca), e três amostras positivas para C-ANCA (uma com forte coloração, uma com coloração moderada e a outra, fraca). Também foram usadas seis amostras negativas para ANCA. No estudo intraexecução, essas 12 amostras de soro foram testadas em replicações de seis poços cada uma. Na reprodutibilidade entre dias e entre lotes, essas 12 amostras foram executadas uma vez em três números de lotes de kits em três ocasiões distintas. As seis amostras negativas em todas as lâminas testadas e as amostras positivas foram coerentes quanto à intensidade fluorescente em todas as lâminas testadas.

BIBLIOGRAFIA

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 Necrotizing 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.

Em caso de dano na embalagem protetora, entre em contato com a Immuno Concepts antes de usar.



Fabricante



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Limitação de temperatura



Contém o suficiente para <n> testes



Consultar Instruções de uso



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9779 Business Park Drive Sacramento, CA. 95827
Assistência Técnica EUA: 1.800.251.5115 Fora dos EUA: 1.916.363.2649
Email: techservice@immunoconcepts.com

Cat 10060-11-I,

4.11.02.003.103-Pt

Rev 1.0 © Copyright 2007

Frases indicadoras de perigo da Diretiva IVD (In Vitro Diagnostic Medical Devices, Dispositivos médicos de diagnóstico In Vitro) (2001/59/EC)



REF 10009: Azul de Evan

| | |
|------------|--|
| R45 | Pode causar câncer. |
| S45 | Em caso de acidente ou se você se sentir mal, procure assistência médica imediatamente (mostrar o rótulo sempre que possível). |
| S53 | Evitar exposição – obter instruções especiais antes de usar. |

PROCEDIMENTO DO TESTE PARA ANCA

- 1. RECONSTITUIÇÃO DE TAMPÃO (PBS)**

Dissolver o conteúdo de um pacote de tampão em um litro de água desionizada ou destilada. Tampar e armazenar de 2 °C a 10 °C por até quatro semanas, ou até que haja sinais de contaminação ou de outras alterações visíveis.
- 2. DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DO PACIENTE**

Seleção: Diluir as amostras do paciente até 1:20, adicionando 0,05 ml (50 µl) de soro a 0,95 ml (950 µl) de Diluente de amostra. Titulação semiquantitativa: Para fazer duas diluições em série das amostras selecionadas (por exemplo, 1:40, 1:80, 1:160... 1:640), remover 0,5 ml da diluição de 1:20 e misturar com 0,5 ml de diluente da amostra para atingir a diluição de 1:40, e continuar as diluições em série dessa maneira.
- 3. DILUIÇÃO DE CONTROLE TITULÁVEL OPCIONAL**

Tratar o controle titulável opcional como uma amostra de paciente não diluída. Diluir o controle até 1:20 adicionando 0,05 ml (50 µl) do soro de controle a 0,95 ml do diluente da amostra. Fazer duas diluições em série do controle titulável conforme descrição acima.
- 4. PREPARAÇÃO DE LÂMINAS COM SUBSTRATO (20-25 µl/poço)**

Remover a(s) lâmina(s) da bolsa e colocar soro de controle nos poços de controle, da seguinte maneira: Inverter o frasco conta-gotas de controle e comprimi-lo suavemente até que uma gota fique visível na ponta. Deixar a gota tocar suavemente no poço de controle apropriado, evitando o contato direto da ponta do conta-gotas com a superfície da lâmina. Adicionar 1 gota (20-25 µl) de amostra do paciente diluída aos poços numerados.
CUIDADO: O CONTATO DIRETO DO CONTA-GOTAS COM A SUPERFÍCIE DA LÂMINA PODE RESULTAR EM DANO NO SUBSTRATO DE ANTÍGENO.
- 5. INCUBAR LÂMINAS (30 ± 5 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 24 °C)**

Colocar a(s) lâmina(s) em uma câmara úmida coberta (a placa de Petri com papel-toalha umedecido é adequada). Incubar, com a tampa no lugar, por 30 minutos (± 5 minutos) em temperatura ambiente (18 °C a 24°C).
- 6. ENXÁGUE COM PBS**

Remover a(s) lâmina(s) da bandeja de incubação e enxaguar com PBS, usando almotolia, pipetas Pasteur ou pipeta sorológica. Não borrifar o tampão diretamente nos poços.
NOTE: Para evitar a contaminação cruzada nas lâminas de 10 poços, direcionar o jato de PBS ao longo da linha média da lâmina, inclinando primeiro na direção dos poços 1-3, seguindo-se a inclinação para os poços 4-6.
- 7. LAVAGEM COM PBS (10 minutos)**

Lavar a(s) lâmina(s) por 10 minutos com PBS em placa de coloração de lâmina ou jarra de Coplin. Essa lavagem pode estender-se por até 30 minutos, sem ocasionar variabilidade nos resultados finais do teste. Descartar a solução de lavado do PBS depois do uso.
- 8. REAGENTE DE ANTICORPO FLUORESCENTE (Cobrir os poços com 10 a 12 gotas)**

Remover uma lâmina por vez do PBS e mergulhá-la 3 a 5 vezes em água desionizada ou destilada. Bater esse lado da lâmina em papel absorvente ou papel-toalha para remover o excesso de água. Devolver a lâmina imediatamente para a câmara de incubação e cobrir os poços completamente, usando reagente de anticorpo fluorescente; começar colocando uma gota sobre cada poço. Repetir para cada lâmina. O reagente de anticorpo fluorescente foi titulado para compensar o resíduo de água desionizada ou destilada na lâmina depois do enxágue.
NOTA: É importante que os poços de lâminas não sequem durante esse procedimento e que não ocorra dano ao substrato.
NÃO COLOCAR A LÂMINA EM PAPEL ABSORVENTE NEM SECAR DE MANEIRA ALGUMA OU PERMITIR QUE ELA REPOUSE SEM REAGENTE DE ANTICORPO FLUORESCENTE POR MAIS DE 15 SEGUNDOS.
- 9. INCUBAR LÂMINAS (30 ± 5 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 24 °C)**

Colocar a tampa na câmara de incubação e cobrir com papel-toalha para evitar exposição à luz, se a câmara não for opaca. Deixar a(s) lâmina(s) incubar(em) por 30 minutos (± 5 minutos) em temperatura ambiente (18 °C a 24 °C).
- 10. ENXÁGUE COM PBS**

Remover a(s) lâmina(s) da bandeja de incubação e enxaguar rapidamente com PBS. Não borrifar o tampão diretamente nos poços.
- 11. LAVAGEM COM PBS (10 minutos)**

Lavar a(s) lâmina(s) por 10 minutos com PBS em placa de coloração de lâmina ou jarra de Coplin. Essa lavagem pode estender-se por até 30 minutos, sem ocasionar variabilidade nos resultados finais do teste.
- 12. COLOCAÇÃO DA LAMÍNULA**

Remover uma lâmina por vez do PBS e mergulhá-la 3 a 5 vezes em água desionizada ou destilada. Bater esse lado da lâmina em papel absorvente ou papel-toalha para remover o excesso de água.
NÃO COLOCAR A LÂMINA EM PAPEL ABSORVENTE NEM SECAR MANEIRA ALGUMA OU PERMITIR QUE ELA REPOUSE SEM LAMÍNULA POR MAIS DE 15 SEGUNDOS. Adicionar 4 a 5 gotas de meio de montagem semipermanente ao longo da linha média de cada lâmina. Colocar a lamínula cuidadosamente na posição, evitando bolsas de ar, abaixando suavemente a lamínula de uma extremidade da lâmina para a outra.
NOTA: O excesso de meio de montagem na lâmina pode resultar em alta fluorescência de fundo, devido à dispersão da luz ou em falta de boa resolução das células (imagem borrada). O excesso de meio de montagem deve ser removido suavemente colocando-se a lamínula em papel absorvente enquanto se evita qualquer movimento direto.

PARA ASSISTÊNCIA TÉCNICA:

EUA: 1-800-251-5115 Fora dos EUA: 1-916-363-2649
Email: techservice@immunoconcepts.com

