



## **ANCA-TESTSYSTEM**

**För diagnostisk användning in vitro**  
**För yrkesmässigt bruk**

*Avsedd användning: Detta är ett indirekt fluorescerande antikroppstest för halvkvantitativ detektion av antineutrofila cytoplasmiska autoantikroppar (ANCA) i humanserum. Testsystemet skall användas som hjälpmedel för detektion av antikroppar associerade med autoimmun vaskulit.*

### **SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET**

Antineutrofila cytoplasmiska autoantikroppar (ANCA) är en grupp antikroppar som reagerar med cytoplasmiska antigener i humana neutrofiler. Även om dessa antikroppar ursprungligen rapporterades 1964 (1), associerades de med en sjukdom för första gången i en rapport 1982 när Davis o.a. rapporterade att antikropparna förekom hos åtta patienter med segmental nekrotiserande glomerulonefrit (2). 1984 rapporterades ytterligare fyra patienter med vaskulit och glomerulonefrit. 1985 visade van der Woude o.a. att ANCA är starkt förknippad med Wegeners granulomatos och att antikroppnivåerna står i relation till sjukdomens aktivitet (3) 1988 rapporterade Falk och Jennette att ANCA har mer än en antigenspecificitet (4). En efterföljande rapport visade att ANCA-specificiteten står i relation till de patologiska kännetecknen för vaskulitid (5).

I det immunfluorescerande ANCA-testet kan flera cellformiga färgningsmönster noteras. Två betydande färgningsmönster har beskrivits och blivit väl karaktäriserade med användande av etanolbeständiga neutrofiler i det immunfluorescerande ANCA-testet. Autoantikroppar som uppvisar ett finkornigt cytoplasmiskt mönster (C-ANCA) riktas vanligtvis mot en serinproteas, proteinas 3 (PR3). Dessa autoantikroppar har visat sig i hög grad vara förknippade med Wegeners granulomatos. Det andra betydande färgningsmönstret - det perinukleära mönstret, eller P-ANCA-mönstret - som vanligtvis beror på antikroppar mot myeloperoxidase (MPO) har associerats med systemisk vaskulit och idiopatisk nekrotiserande och halvmåneformad glomerulonefrit (4). P-ANCA-mönstret är en artefakt som uppkommit genom användning av etanol som fixeringsmedel (4). Om neutrofilerna är beständiga i formalin, förblir myeloperoxidase (den antigen som i huvudsak ansvarar för P-ANCA-mönstret i etanolbeständiga celler) associerad med de primära (alfa-) kornen och uppvisar en kornig cytoplasmisk fördelning. Proteinase 3 (PR3) förblir associerad med primära (alfa-) korn i antingen etanol- eller formalinfixeringsmedel.

### **TESTPRINCIP**

Immuno Concepts antineutrofila cytoplasmiska autoantikroppanalys (ANCA) använder den indirekta fluorescerande antikroppsteknik (IFA) som först beskrivits av Weller och Coons (6). Spädda patientprover odlas med humana neutrofiler som är fixerade på objektglas på glasmikroskop för att tillåta specifik ANCA-bindning. Om det förekommer ANCA binder autoantikropparna till de neutrofila antigenerna. Efter tvättning för att avlägsna ospecifika antikroppar odlas substratet med antihuman IgG konjugerad med fluorescein. Om resultatet är positivt bildas ett stabilt komplex i tre delar bestående av en fluorescerande antikropp bunden till en human ANCA, som i sin tur är bunden till en antigen belägen i cellerna. Detta komplex kan studeras i fluorescerande mikroskop. Prover som är C-ANCA-positiva uppvisar en särskiljande kornig cytoplasmisk färgning av neutrofilerna på både etanol- och formalinbeständiga objektglas. I prover som är P-ANCA-positiva syns en diffus eller perifer nukleär färgning av neutrofilerna på etanolbeständiga celler och en kornig färgning av cytoplasman på formalinbeständiga celler. Om provet är ANCA-negativt syns ingen specifik färgning av neutrofilerna.

## SYSTEMKOMPONENTER - MATERIAL SOM INGÅR

**Användning:** Alla komponenter levereras bruksfärdiga utan krav på delning eller rekonstitution (förutom PBS-bufferten som måste lösas upp i avjoniserat eller destillerat vatten före användning).

**Förvaring:** Alla komponenter kan kylförvaras i 2-10 °C. Efter rekonstitution skall PBS-bufferten förvaras i skruvlockbehållare under kylning i 2-10 °C upp till fyra veckor, eller tills det syns tecken på kontamination eller andra synliga förändringar.

**Stabilitet:** Alla komponenter är stabila i minst tolv månader från tillverkningsdatum. Använd inte någon komponent efter dess utgångsdatum.

### REAKTIVA REAGENSER

**ANCA substratobjektglas:** Objektglas som innehåller humana neutrofiler som stabiliserats och fixerats direkt på testbrunnarna. Ett unikt vallgravsformat objektglas minimerar korskontamination mellan brunnarna under analysen. Objektglaspåsen är fylld med en stabil giffri gas som bidrar till cellernas stabilitet. Om påsen inte verkar vara fylld när objektglaset avlägsnas från satsen är påsen skadad, och objektglaset skall då inte användas.

**ANCA provspädningsvätska:** Katalognummer 10100 (100 ml). Patentskyddad buffrad provspädningsvätska som används för spädnings av patientprover.

**C-ANCA positiv kontroll:** Katalognr 10021-12. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml C-ANCA positivt humankontrollserum. Detta serum uppvisar kornig färgning av cytoplasman mellan neutrofilernas nukleära segment på såväl etanol- som formalinbeständiga objektglas.

**P-ANCA positiv kontroll:** Katalognr 10021-11. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml C-ANCA positivt humankontrollserum. Detta serum uppvisar diffus eller perifer nukleär färgning av neutrofilerna på etanolbeständiga objektglas och kornig cytoplasmisk fluorescens på formalinbeständiga objektglas.

**C-ANCA titrerbar kontroll:** Katalognr 10026-12. Bruksfärdig ampull innehållande 0,25 ml vätskestabil C-ANCA positivt humant kontrollserum. Denna kontroll skall behandlas som ett outspätt patientprov. Se etiketten för information om medelantikroppnivå.

**P-ANCA titrerbar kontroll:** Katalognr 10026-11. Bruksfärdig ampull innehållande 0,25 ml vätskestabil P-ANCA positivt humant kontrollserum. Denna kontroll skall behandlas som ett outspätt patientprov. Se etiketten för information om medelantikroppnivå.

**Negativ kontroll:** Katalognr 10031. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml ANCA negativt humant kontrollserum. Detta serum uppvisar lågintensiv, icke-specifik matt grön fluorescens av neutrofilerna.

**Fluorescerande antikroppreagens - IgG-specifik:** Katalognummer 10009 (9 ml). Getantihuman IgG-konjugerad till fluorescein isotiocyanat (FITC). Denna reagens innehåller Evans blå som en motfärg. Reagensen levereras bruksfärdig i precisionspipettflaskor.

### ICKE-REAKTIVA KOMPONENTER

**PBS-buffert:** Katalognummer 1011. Fosfatbuffrat saltlösningpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0.2). Varje förpackning innehåller tillräckligt med buffertpulver för att ge 1 liter. (En förpackning med buffertpulver levereras för vart femte objektglas i kompletta testsatser).

**Framställning:** Lös upp en förpackning buffertpulver i 1 liter avjoniserat eller destillerat vatten och förvara avkylt i 2-10°C i upp till fyra veckor eller tills det syns tecken på kontamination eller andra synliga förändringar.

**Halvpermanent monteringsmedel:** Katalognr 1111. Bruksfärdig pipettampull innehållande 5 ml glycerolbaserat monteringsmedel.

**Skyddsremсор:** Katalognummer 1042. Varje paket innehåller 10 st 24 x 64 mm skyddsremсор nr 1 av glas.

## OVRIGT MATERIAL SOM BEHÖVS - MEDFÖLJER EJ

Volymetriska pipetter för pipettering av 20-25 µl volymer  
Coplín-kärl eller färgnings-skålar  
Klämflaska eller Pasteur-pipetter

Serologiska pipetter  
Enlitersbehållare (för PBS-buffert)  
Avjoniserat eller destillerat vatten  
Provrör för framställning av serumspädningar  
Läskapper eller pappershanddukar  
Inkubationskammare  
Engångshandskar  
Laborietidur  
Fluorescerande mikroskop med 495 nm matarfilter och 515 nm spärrfilter

## FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. Allt material av humant ursprung som använts för att förbereda kontroller för denna produkt har testats med en FDA-godkänd metod och visat sig vara negativt (inte upprepat reaktivt) för antikroppar mot humant immunbristvirus-1, humant immunbristvirus-2 (HIV-1 och HIV-2), antikroppar mot hepatit C-virus (HCV) samt hepatit B ytantigen (HBsAg) . Ingen testmetod kan helt garantera att det inte förekommer HIV-1, HIV-2, hepatit C-virus, hepatit-B-virus eller andra smittämnen. Därför skall allt kontrollsera hanteras som potentiellt smittsamt.
2. Alla patientprover på biosäkerhetsnivå 2 skall hanteras enligt rekommendationerna för potentiellt smittsamt humanserum eller blodprov i Centrum för Sjukdomskontroll/Nationella hälsoinstitutets manual: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Spädning av komponenter eller byte till andra komponenter än de som medföljer detta system kan ge motsägande resultat.
4. Natriumazid (0,09%) används som konserveringsmedel. Natriumazid kan reagera med ledningsrör av bly eller koppar och bilda explosiva metallazidsalter. När reagenser kasseras skall man spola med rikliga mängder kranvatten för att skölja bort eventuella rester i avloppsledningarna. Natriumazid är ett gift och kan vara toxiskt vid förtäring.
5. Denna sats är avsedd för diagnostisk användning *in vitro*.
6. Det titrerbara kontrollserumet är avsett för användning vid övervakning av reproducerbarheten mellan olika loter eller serier. Det är inte avsett för mätning av den totala sensitiviteten eller analysens specificitet.
7. Undvik att röka, äta eller dricka i områden där prover eller satsreagenser hanteras.
8. Undvik alltid stänk och alstring av aerosoler.
9. Andra inkubationstider och temperaturer än de angivna kan ge felaktiga resultat.
10. Korskontamination mellan reagenser och prover kan ge felaktiga resultat.
11. Återanvändningsbart glas måste tvättas och noggrant sköljas från rengöringsmedel innan det används. Allt glas måste rengöras och torkas före användning.
12. Placera alla reagenser, objektglas och prov i rumstemperatur (18-24°C) före användning.
13. Använd engångshandskar vid hantering av prover och reagenser, och tvätta händerna noggrant efteråt.
14. Mikrobisk kontamination av reagenser eller prover kan ge felaktiga resultat.
15. Pipettera aldrig med munnen och undvik att komma i kontakt med reagenser och prov med hud eller slemhinnor. Tvätta med bakteriedödande tvål och rikligt med vatten om sådan kontakt inträffat.

## PROVTAGNING

**Provtagning:** Serum rekommenderas som prov. Cirka 5 ml helblod skall tas aseptiskt genom venpunktion med hjälp av ett sterilt vakuumbloodtagningrör eller annat lämpligt blodtagningssystem. Låt blodet koagulera i rumstemperatur (18-24°C). Serum skall så snart som möjligt separeras från koagler för att minimera hemolys.

**Störande substanser:** Sera som uppvisar en hög grad av hemolys, ikterus, lipemi eller mikrobiell tillväxt skall inte användas, eftersom antikroppnivån kan minska i positiva prover. Prover med mycket höga lipidnivåer kan leda till att en ospecifik fluorescerande film bildas över cellsubstratet. Detta problem kan undvikas genom användning av prover som får fast form eller klar färg genom ultracentrifugering. Prover som innehåller synliga partiklar bör klargöras genom centrifugering före analysen.

**Förvaring:** Sera kan förvaras i 2-10°C under högst en vecka. Om analysen fördröjs ytterligare, skall sera frysas i -20°C eller lägre. Serum bör inte förvaras i självavfrostande fryslagerum.

**WARNING:** Upprepad frysning/upptining av patientprover kan ge falskt positiva eller negativa resultat.

# TOLKNING AV RESULTAT

## KVALITETSKONTROLL

Positiva, negativa och färglösa kontroller bör köras i de brunnar som tillhandahålls för kvalitetskontroll på varje objektglas. Den C-ANCA-positiva kontrollen skall uppvisa ljusst äppelgrön fluorescerande kornig cytoplasmisk färgning av neutrofilerna mellan de nukleära segmenten på antingen etanol- eller formalinbeständiga objektglas. Den P-ANCA-positiva kontrollen skall uppvisa ljusst äppelgrön diffus eller perifer nukleär färgning av neutrofilerna på etanolbeständiga objektglas och kornig cytoplasmisk fluorescens på formalinbeständiga objektglas. Den negativa kontrollen skall inte uppvisa någon ljusgrön fluorescens. Den negativa kontrollen kan uppvisa låg intensitet och en matt grön fluorescens. Den färglösa kontrollen används för att observera ospecifik fluorescens av antikroppreagensen och bör inte uppvisa någon grön fluorescerande färgning. Den motfärg som ingår i konjugatet kan färga brunnarna i en matt röd färg. Om kontrollerna inte ser ut enligt beskrivningarna är testet ogiltigt och bör göras om.

## TILLHÖRANDE TITRERBAR KONTROLL

Vid läsning av antikroppnivåerna börjar många laboratorier med att läsa den brunn som innehåller det mest spädda provet och läser „baklänges“ till spädningen 1:20. Den första brunnen med klart urskiljbar cytoplasmisk färgning är antikroppnivåns ändpunkt. Vi rekommenderar denna teknik för att fastställa antikroppnivåns ändpunkter.

Det medelvärde och spridningsområde för antikroppnivån ( $\pm$  en spädning på var sin sida om medelvärdet) som bestämts för varje lotnummer har fastställts i vårt laboratorium och uppges för vägledning. Denna kontroll tillhandahålls för att varje laboratorium skall ha tillgång till ANCA-testernas reproducerbarhet (precision). Eftersom kontrollen inte är avsedd att utgöra en indikator på antikroppnivåns precision, bör varje laboratorium etablera sitt eget medelvärde för antikroppnivåns ändpunkt för provet i fråga och använda denna information för att bedöma reproducerbarheten (precisionen) från serie till serie.

Genom upprepade analyser av denna titrerbara kontroll med användande av Immuno Concepts fluorescerande ANCA-testsystem har ett medelantikroppvärde fastställts för varje lotnummer. Lotnumret och antikroppnivåns medelvärde och spridningsområde för ( $\pm$  en dubbel spädning på vardera sidan om medelvärdet) står angivna på flaskans etikett och skall användas som vägledning för testsystemets prestanda.

De värden som erhållits i vårt laboratorium kan skilja sig från era. Några av de faktorer som kan påverka resultaten kan vara, men är inte begränsat till:

1. Typ av ljuskälla: Ljuskällor av kvicksilver ger högre exciteringsenergi vid 495 nm än kvarts/halogen. Ljuskällor av kvicksilver på 50 watt, 100 watt och 200 watt skiljer sig något i exciteringsenergi vid 495 nm. Kvarts-/halogenljuskällor på 100 watt ger högre exciteringsenergi vid 495 nm än kvarts-/halogenljuskällor på 50 watt.
2. Ljuskällans skick och ålder: Detta gäller framför allt ljuskällor av kvicksilver som i allmänhet uppvisar en gradvis minskning i exciteringsenergi vid 495 nm, innan de smälter ned. Denna gradvisa minskning i exciteringsenergi kan leda till en avsevärd förlust i känslighet över flera veckors tid. Detta problem kan undvikas genom att föra en tidsloggbok. För bästa resultat: Byt ut 50 watts glödlampor av kvicksilver efter 100 timmar och 100 eller 200 watts glödlampor av kvicksilver efter 200 timmar. Kvarts-/halogenljuskällor uppvisar i allmänhet ingen gradvis minskning i exciteringsenergi, innan de smälter ned.
3. Vilken typ av matarfilter som används: Störningsmatarfilter ger större känslighet över en mycket smalare våglängd än absorptionsmatarfilter. Se bruksanvisningen till det fluorescerande mikroskopet eller kontakta säljaren för mer information.
4. Korrekt placering av mikroskopljusets bana: Se bruksanvisningen till det fluorescerande mikroskopet för mer information.
5. Objektivets numeriska bländaröppning: Med infallande ljusfluorescens (Epi) ökar fluorescensen exponentiellt, medan den numeriska bländaröppningen (NA) ökar additivt. Detta kan göra att ett 40X-objektiv med en NA på 0,65 läser en eller flera spädningar lägre än ett 40X-objektiv med en NA på 0,85. Den numeriska bländaröppningen står angiven på sidan av objektivet. Det fluorescerande ljustransmissionsmikroskopets känslighet påverkas inte av NA.
6. Spärrfilter: Spärrfilter minskar specifika exciteringsvåglängderna och kan användas för att minska känsligheten. Se bruksanvisningen till det fluorescerande mikroskopet eller kontakta säljaren för mer information.
7. Precision och exakthet i spädningsteknik, utrustning och testmetodernas genomförande.

## TOLKNING AV PATIENTRESULTAT

400 gångers total förstoring rekommenderas för granskning av neutrofilerna.

**Negativt:** Ett serum betraktas som ANCA-negativt om den gröna fluorescerande färgningen av cellerna vid spädningen 1:20 är mindre eller lika med den negativa kontrollbrunnen. Ospecifik bakgrunds färgning på grund av heterofila antikroppar eller autoantikroppar kan observeras i neutrofilerna.

**Positivt:** Ett serum betraktas som ANCA-positivt om cellerna i varje fält vid spädningen 1:20 uppvisar en kornig cytoplasmisk fluorescens liknande den som observeras med C-ANCA-kontrollen av endera etanol- eller formalinbeständiga objektglas. Alternativt betraktas ett serum som ANCA-positivt om cellerna vid spädningen 1:20 uppvisar en diffus eller perifer nukleär fluorescens liknande den som observeras med P-ANCA-kontrollen på etanolbeständiga objektglas.

## RESULTATRAPPORTERING

**Screening:** Resultaten skall rapporteras som positiva eller negativa vid spädning 1:20.

**Färgningsmönster:** Många antikroppar kan ge upphov till färgning av cytoplasman och/eller neutrofilkärnan. Det finns två betydande specifika färgningsmönster:

**C-ANCA (klassisk eller cytoplasmisk färgning):** Färgning av alfa-korn (primära) i cytoplasman ger ett jämnt fläckigt cytoplasmiskt färgningsmönster, ofta med en färgkoncentration mellan kärnans lobber. Den cytoplasmiska färgningen förekommer med antingen etanolbeständiga eller formalinbeständiga neutrofiler.

**P-ANCA (perinukleär färgning):** Slät eller homogen färgning av den kärna som är försedd med flera lobber, ofta med markerad perifer färgning av nukleärlobberna på etanolbeständiga neutrofiler. På formalinbeständiga neutrofiler uppvisar dessa antikroppar en kornig cytoplasmisk färgning.

Antinukleära och andra autoantikroppar kan reagera med neutrofiler. Därför skall alla positiva prover ANA-testas med HEP-2 cellsubstrat innan förekomsten av ANCA rapporteras.

**Tillhörande bestämning av antikroppnivå:** Resultaten skall rapporteras som en växelverkan av spädningen i den sista brunn där en positiv reaktion noteras.

## TESTETS BEGRÄNSNINGAR

1. Diagnos kan inte ställas enbart på grundval av detektion av antineutrofil cytoplasmisk antikropp. Läkaren måste tolka dessa resultat med hänsyn till patientens tidigare sjukdomar och symptom, de fysiska upptäckterna och andra diagnostiska metoder.
2. Behandling bör inte påbörjas enbart på grundval av ett positivt test för antineutrofila cytoplasmiska antikroppar. Kliniska indikationer, andra laborieupptäckter och läkarens kliniska intryck måste beaktas innan behandling påbörjas.
3. Antinukleära antikroppar som förekommer i patientprovet kan reagera med cellsubstratet. Om det förekommer antinukleära antikroppar kan ANCA-resultaten ofta övertolkas på grund av den specifika ANCA-färgningens olikartade beskaffenhet, olika antikroppnivåer och/eller reaktionernas intensitet. Om den fluorescerande antinukleära antikroppreaktionen är stark nog för att dölja ANCA-färgningen skall testet rapporteras som "ej möjligt att tolka". En alternativ metod måste då användas för att fastställa patientens ANCA-status.
4. Då det finns många olika alternativ att tillgå när det gäller fluorescerande mikroskop, rekommenderas att ljuskällor, filter och optik standardiseras när man jämför patienters antikroppnivåer mellan laboratorier.
5. Resultaten av detta test skall användas tillsammans med den information som finns från den kliniska utvärderingen och andra diagnostiska metoder för att fastställa patientens kliniska status.

## FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Det förväntade värdet i den normala populationen är negativt vid screeningsspädning 1:20. Hos sjuka patienter har så höga antikroppnivåvärden som 1:640 rapporterats (7).

## PRESTANDA

### NORMALA PROVER

Serumprover från 497 bloddonatorer (247 män och 250 kvinnor) testades parallellt med hjälp av Immuno Concepts ANCA-sats och ytterligare en sats i kommersiell distribution. Alla prover som uppvisade en positiv reaktion på etanolbeständiga objektglas i denna population testades även för antinukleära antikroppar (ANA) med hjälp av Immuno Concepts HEP-2 ANA-testsystem.

Bland de normala proverna fanns 22 prover som var ANA-positiva och dessa betraktades som ej tolkningsbara för ANCA. De återstående avvikande proven testades för antikroppar mot MPO och PR3 med hjälp av ELISA för att fastställa den verkliga antikroppstatusen.

### SERA SOM TIDIGARE FASTSTÄLLTS VARA ANCA-POSITIVA GENOM INDIREKT IMMUNOFLUORESCENS

Serumprov som hade bedömts som ANCA-positiva med interna IFA-analyser erhöles från referenslaboratorier i USA, Storbritannien och Australien. Totalt 383 sera som förväntades vara ANCA-positiva undersöktes i denna del av studien. Dessa prover testades parallellt med Immuno Concepts ANCA-sats och ytterligare en sats som är kommersiellt tillgänglig. Avvikande prover ANA-testades med hjälp av Immuno Concepts HEp-2 ANA-testsystem och även för antikroppar mot MPO och PR3 med hjälp av ELISA-tester.

Genom att kombinera resultaten för den normala och den onormala populationen erhöles följande data vid den första jämförelsen mellan Immuno Concepts ANCA-testsystem och etanolbeständiga humana neutrofiler (tabell 1):

		Jämförelsemetod	
		Positivt	Negativt
IC etanol ANCA	Positivt	324	94
	Negativt	124	316

Dessa data ger följande jämförande statistik:

Relativ sensitivitet: 72,3%  
 Relativ specificitet: 77,1%  
 Total överensstämmelse: 74,6%

I den första jämförelsen mellan Immuno Concepts ANCA-testsystem och formalinbeständiga humana neutrofiler erhöles följande data (tabell 2):

		Jämförelsemetod	
		Positivt	Negativt
IC formalin ANCA	Positivt	255	52
	Negativt	45	528

Dessa data ger följande jämförande statistik:

Relativ sensitivitet: 85,0%  
 Relativ specificitet: 91,0%  
 Total överensstämmelse: 89,0%

Många autoantikroppar, andra än de som är associerade med autoimmun vaskulit, kan reagera med humana neutrofiler (8). För att bekräfta att de antikroppar som detekteras med något immunfluorescerande ANCA-test är av klinisk betydelse rekommenderas bekräftande tester med hjälp av ELISA-analyser av myeloperoxidas (MPO) och proteinas 3 (PR3) (9).

Alla avvikande prover i ovanstående tabeller testades för antinukleära antikroppar och antikroppar mot MPO och PR3. Med dessa tester medtagna i beräkningen redovisas de totala resultaten för Immuno Concepts etanolbeständiga humana neutrofiler i tabell 3:

		Jämförelsemetod	
		Positivt	Negativt
IC etanol ANCA	Positivt	380	32
	Negativt	6	434

Dessa data ger följande jämförande statistik:

Relativ sensitivitet: 98,4%  
 Relativ specificitet: 93,1%  
 Total överensstämmelse: 95,5%

De totala resultaten för Immuno Concepts ANCA-testsystem med formalinbeständiga humana neutrofiler framgår av tabell 4:

		Jämförelsemetod	
		Positivt	Negativt
IC formalin ANCA	Positivt	292	13
	Negativt	5	548

Dessa data ger följande jämförande statistik:

Relativ sensitivitet: 98,3%

Relativ specificitet: 97,7%

Total överensstämmelse: 98,6%

### SERUMPROVER FRÅN PATIENTER MED KÄND VASKULITID

Prover som erhållits från 102 patienter med kliniskt karakteriserad vaskulitid testades med Immuno Concepts etanolbeständiga neutrofiler och Immuno Concepts formalinbeständiga neutrofiler. Resultaten av denna jämförelse visas i tabell 5:

Tabell 5

Klinisk diagnos	Antal	Positivt	färgningsmönster(etanolbeständigt)
Wegeners granulomatos	30	26 (86,7%)	alla C-ANCA
Polyarteritis nodosa	12	8 (66,7%)	alla P-ANCA
Mikroskopisk polyarteritis	20	18 (90,0%)	alla P-ANCA
Churg-Strauss-syndrom	3	2 (66,7%)	ett P-ANCA; ett både P-ANCA och C-ANCA
Halvmånformat immunkomplex Glomerulonefrit	15	10 (66,7%)	alla P-ANCA
Inflammatorisk tarmsjukdom	22	17 (77,3%)	alla atypiska P-ANCA

### KORSREAKTIVITET

Sera från 57 patienter med olika autoimmuna rubbningar testades på både Immuno Concepts ANCA-testsystem med etanolbeständiga humana neutrofiler och Immuno Concepts ANCA-testsystem med formalinbeständiga humana neutrofiler. Tre av dessa prover visade sig ha en atypisk form av nukleär färgning liknande P-ANCA-mönstret på etanolbeständiga neutrofiler. Alla tre av dessa prover som kom från SLE-patienter reagerade positivt på anti-DNA-antikroppar och uppvisade en positiv ANA med ett homogent mönster. Ytterligare en analys uppvisade cytoplasmiska fläckar på de etanolbeständiga neutrofilerna, men var negativ på de formalinbeständiga neutrofilerna och ANA-testet. Detta prov bedömdes vara en ospecifik reaktion. All övrig sera i denna population var negativa på både de etanolbeständiga och formalinbeständiga neutrofilerna. Eftersom många autoantikroppar kan reagera ospecifikt med humana neutrofiler (8), skall positiva immunfluorescerande tester alltid bekräftas med specifika analyser för de ANCA-associerade antikropparna.

### REPRODUCERBARHET

Studier av olika serier, dagar och lotnummer utfördes för att påvisa Immuno Concepts ANCA-testsystems reproducerbarhet med etanolbeständiga humana neutrofiler och Immuno Concepts ANCA-testsystem med formalinbeständiga humana neutrofiler. De sera som användes i denna studie bestod av tre P-ANCA-positiva prover (ett som uppvisade stark färgning, ett som uppvisade medelstark färgning samt ett som uppvisade svag färgning) samt tre C-ANCA-positiva prover (som vardera uppvisade stark, medelstark och svag färgning). Sex prover som var ANCA-negativa användes också. I studien av olika serier testades tolv sera två gånger på sex brunnar vardera. Vid undersökningen av reproducerbarheten mellan olika dagar och lotnummer analyserades dessa tolv sera vardera på tre satslotnummer vid tre olika tillfällen. De sex negativa proverna var negativa på alla objektglas som testades och de positiva proven var positiva och visade jämn fluorescerande intensitet på alla objektglas som testades.

# BIBLIOGRAFI

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.

Kontakta Immuno Concepts innan du använder produkten om skyddsföpackningen är skadad.



Fabrikant



Auktoriserad Representant  
europeiska unionen



Temperatur  
begränsning



Innehåller tillräckligt för <n>  
test



Se instruktionerna



In vitro diagnostiska medicinapparat



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-Sv

Rev 2.0 © Copyright 2011

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



**REF** 1105: Evans blå

<b>R45</b>	Kan ge cancer.
<b>S45</b>	Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare. Visa om möjligt etiketten.
<b>S53</b>	Undvik exponering – Begär specialinstruktioner före användning.

# ANCA TESTPROCEDUR

## 1. REKONSTITUTION AV BUFFERT (PBS)

Lös upp innehållet i en buffertförpackning i 1 liter avjoniserat eller destillerat vatten. Täck och förvara i 2-10°C i upp till fyra veckor eller tills det syns tecken på kontamination eller andra synliga förändringar.

## 2. SPÄDNING AV PATIENTPROV

Screening: Späd patientprovet till 1:20 genom tillsättande av 0,05 ml (50 µl) serum till 0,95 ml (950 µl) provspädningsvätska.  
Semikvantitativ bestämning av antikroppnivå: För att framställa dubbla seriespädningar av screeningprover (t ex 1:40, 1:80, 1:160... 1:640, avlägsnas 0,5 ml av spädningen 1:20 och blandas med 0,5 ml provspädningsvätska för att uppnå spädningen 1:40. Fortsätt därefter med seriespädningarna på detta sätt.

## 3. SPÄDNING AV TILLHÖRANDE TITRERBAR KONTROLL

Behandla den tillhörande titrerbara kontrollen som ett outspätt patientprov. Späd kontrollen 1:20 genom att tillsätta 0,05 ml (50 µl) kontrollserum till 0,95 ml provspädningsvätska. Framställ dubbla spädningar av den titrerbara kontrollen (se skiss nedan).

## 4. IORDNINGSTÄLLANDE AV OBJEKTGLAS FÖR SUBSTRAT (20-25 µl/brunn)

Avlägsna objektglaset/objektglasen från påsen/påsarna och placera kontrollsera på kontrollserabrunnar enligt följande: Vänd upp och ned på pipettflaskan och kläm försiktigt tills det syns en droppe på spetsen. För försiktigt droppen mot rätt kontrollbrunn, men undvik direktkontakt mellan pipettspetsen och objektglasets yta. Tillsätt 1 droppe (20-25 µl) utspätt patientprov i de nummerade brunnarna.

**VARNING: DIREKTKONTAKT MELLAN PIPETTSPETSEN OCH OBJEKTGLASETS YTA KAN LEDA TILL ATT ANTIGENSUBSTRATET TAR SKADA.**

## 5. ODLING AV OBJEKTGLAS (30 ± 5 minuter i rumstemperatur, dvs 18-24°C)

Placera objektglaset/-n i en fuktig täckt kammare (en petriskål med fuktad pappershandduk duger). Odlas, med locket på, i 30 minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-24°C).

## 6. PBS-SKÖLJNING

Avlägsna objektglaset/-n från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS genom att använda en sprutflaska, Pasteur, eller serologisk pipett. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.

**OBSERVERA:** Led PBS-flödet längs objektglasets mittlinje för att undvika korskontamination på tiobrunnars objektglas genom att först luta glaset mot brunnarna 1-3 och därefter mot brunnarna 4-6.

## 7. PBS-TVÄTTNING (tio minuter)

Tvätta objektglaset/-n i tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Denna tvättning kan förlängas med upp till 30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas. Kassera PBS-tvättlösningen efter användning.

## 8. FLUORESCERANDE ANTIKROPPREAGENS (täck brunnarna med 10-12 droppar)

Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa det 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten. Knacka objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. Återför genast objektglaset till inkubationskammaren och täck brunnarna helt med fluorescerande antikroppreagens. Börja med att placera en droppe över varje brunn. Upprepa detta för varje objektglas. Den fluorescerande antikroppreagens har titrerats för att kompensera för det avjoniserade eller destillerade vatten som är kvar på objektglaset efter sköljning.

**OBSERVERA:** Det är viktigt att objektglasbrunnarna inte torkar under detta förfarande, annars tar substratet skada.  
**TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT ALDRIG OBJEKTGLASET STÅ UTAN FLUORESCERANDE ANTIKROPPREAGENS LÄNGRE ÄN FEMTON SEKUNDER.**

## 9. ODLING AV OBJEKTGLAS (30 ± 5 minuter i rumstemperatur, dvs 18-24°C)

Placera locket på inkubationskammaren och täck med en pappershandduk för att förhindra att det utsätts för ljus, om kammaren inte är ogenomskinlig. Odlas objektglaset/-n i 30 minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-24°C).

## 10. PBS-SKÖLJNING

Avlägsna objektglaset/-n från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.

## 11. PBS-TVÄTTNING (tio minuter)

Tvätta objektglaset/-n i tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Denna tvättning kan förlängas med upp till 30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas.

## 12. MONTERING AV SKYDDSREMSA

Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa det 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten. Knacka objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. **TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT ALDRIG OBJEKTGLASET STÅ UTAN SKYDDSREMSA LÄNGRE ÄN 15 SEKUNDER.** Tillsätt 4-5 droppar halvpermanent monteringsmedium längs mittlinjen på varje objektglas. Sätt försiktigt skyddsremsan på plats och undvik luftfickor genom att försiktigt lägga ned skyddsremsan från ena änden av objektglaset till den andra.

**OBSERVERA:** Överflödigt monteringsmedium på objektglaset kan leda till hög bakgrundsfluorescens på grund av ljusspridning eller brist på tydlig upplösning av cellerna (suddig bild). Överflödigt monteringsmedium kan avlägsnas från objektglaset genom att skyddsremsan försiktigt torkas med läskpapper eller linspapper. Undvik att röra direkt vid skyddsremsan.

**TEKNISK HJÄLP:** +1-916- 363-2649

eller e-mail: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

