



ANTI-NEUTROPHIL CYTOPLASMIC ANTIBODIES (ANCA)

COD 44850 24 determinaciones		COD 44851 60 determinaciones	
COD 44898 60 determinaciones		COD 44963 60 determinaciones	
COD 44852 10 x 6 det.	COD 44878 10 x 6 det.	COD 44895 10 x 6 det.	
COD 44911 10 x 12 det.		COD 44964 10 x 6 det.	
Reactivos para la determinación cualitativa de ANCA Sólo para uso in vitro en el laboratorio clínico			

ANTICUERPOS ANTI-CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS

ANCA-Etanol
ANCA-Formalina
ANCA-Metanol
ANCA-Etanol-ANA

Inmunofluorescencia Indirecta
NEUTRÓFILOS HUMANOS

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) y los anticuerpos anti-nucleares (ANA) del suero se unen a sus correspondientes antígenos presentes en los neutrófilos humanos y en las secciones de hígado de rata, respectivamente. Una vez unidos, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas humanas conjugado con fluoresceína y se visualizan por microscopía de fluorescencia¹.

CONTENIDO

	COD. 44850	COD. 44851	COD. 44898	COD. 44963
A. ANCA-Etanol	4 x 6 det.	10 x 6 det.	-	-
A. ANCA-Formalina	-	-	10 x 6 det.	-
A. ANCA-Etanol-ANA	-	-	-	10 x 6 det.
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. C-ANCA	1 x 0.3 mL	1 x 0.3 mL	-	1 x 0.3 mL
C+. P-ANCA	1 x 0.3 mL	1 x 0.3 mL	1 x 0.3 mL	1 x 0.3 mL
C+. ANA-Ho	-	-	-	1 x 0.3 mL
C-. Control Negativo	1 x 0.3 mL	1 x 0.3 mL	1 x 0.3 mL	1 x 0.3 mL
D. IgG FITC/Evans	1 x 3 mL	1 x 3 mL	1 x 3 mL	2 x 3 mL
E. Medio de Montaje	1 x 3 mL	1 x 3 mL	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Papel secante	1 x 10	1 x 10	1 x 10	-

	COD. 44852	COD. 44878	COD. 44895	COD. 44911	COD. 44964
A. ANCA-Etanol	10 x 6 det.	-	-	10 x 12 det.	-
A. ANCA-Formalina	-	10 x 6 det.	-	-	-
A. ANCA-Metanol	-	-	10 x 6 det.	-	-
A. ANCA-Etanol-ANA	-	-	-	-	10 x 6 det.

COMPOSICIÓN

ANCA-Etanol

- A. Portaobjetos:** Neutrófilos humanos fijados con etanol.
- B. PBS (10x):** Fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro sódico, azida de sodio 0,95 g/L pH 7,2.
- C+. Control Positivo C-ANCA:** Suero humano con anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) "patrón citoplasmático", azida de sodio 0,95 g/L.
- C+. Control Positivo P-ANCA:** Suero humano con anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) "patrón perinuclear", azida de sodio 0,95 g/L.
- C-. Control Negativo:** Suero humano, azida de sodio 0,95 g/L.
- D. IgG FITC/Evans:** Anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas IgG humanas conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), azul de Evans, azida de sodio 0,95 g/L.
- E. Medio de Montaje:** Mowiol, glicerol, Tris, azida de sodio 0,95 g/L.
- F. Papel secante.**

ANCA-Formalina

- A. Portaobjetos:** Neutrófilos humanos fijados con formalina.

ANCA-Metanol

- A. Portaobjetos:** Neutrófilos humanos fijados con metanol.

ANCA-Etanol-ANA

- A. Portaobjetos:** Neutrófilos humanos fijados con etanol y secciones de hígado de rata (RL).
- C+. Control Positivo ANA-Ho:** Suero humano con anticuerpos anti-nucleares (ANA), azida de sodio 0,95 g/L.

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

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

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

Indicaciones de deterioro:

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

REACTIVOS AUXILIARES

Cod. 44852, 44878, 44895, 44911 y 44964 precisan de alguno de los siguientes reactivos auxiliares, que pueden adquirirse de forma separada:

- B. PBS (10x).**
- D. IgG FITC/Evans.**
- E. Mounting Medium.**
- C+. C-ANCA.**
- C+. P-ANCA.**
- C+. ANA-Ho.**
- C+. X-ANCA.** Suero humano con anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos "patrón perinuclear atípico", azida de sodio 0,95 g/L.
- C-. Control Negativo.**

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

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

Los demás componentes están listos para su uso.

EQUIPO ADICIONAL

- Cámara húmeda.
- Cubeta de lavado.
- Cubreobjetos de 24 x 60 mm.
- Microscopio de fluorescencia equipado con filtros de excitación de 495 nm y de emisión de 525 nm para la visualización del FITC.

MUESTRAS

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

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

Para la titulación de una muestra positiva, realizar diluciones dobles en PBS a partir de la 1/40. Sin embargo, cada laboratorio debería establecer su propio ejemplo de dilución basado en las características de la población.

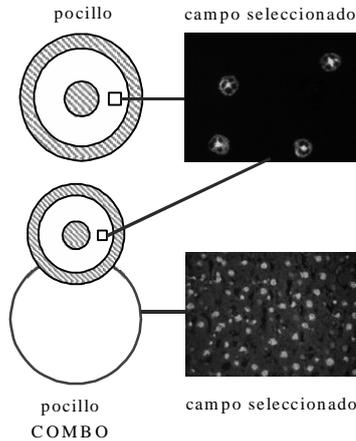
PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
2. Depositar una gota de la muestra diluida o de los Controles en los pocillos del portaobjetos (A), procurando cubrirlo perfectamente (Nota 1 y 2).
3. Incubar el portaobjetos en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminar las gotas de las muestras inclinando el portaobjetos y golpeándolo ligeramente. Evitar la mezcla de sueros.
5. Eliminar el suero remanente en el portaobjetos lavándolo con PBS (ver preparación del Reactivo). (Nota 3).
6. Lavar el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con PBS durante 5 minutos. Cambiar el PBS y repetir el lavado.
7. Secar cuidadosamente el portaobjetos utilizando el papel secante suministrado. El sustrato debe permanecer siempre húmedo.
8. Depositar el mismo volumen dispensado en el punto 2 de Reactivo D en cada pocillo. Colocar el portaobjetos en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.
9. Lavar (ver paso 6) y secar (ver paso 7).
10. Depositar varias gotas de Reactivo E sobre el portaobjetos y colocar un cubreobjetos procurando evitar la formación de burbujas de aire.

LECTURA

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





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

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

En algunos casos, el patrón de marcaje P-ANCA observado en neutrófilos fijados con etanol puede deberse a anticuerpos anti-nucleares (ANA). Estos resultados deben ser confirmados ensayando la muestra en neutrófilos fijados con **formalina** o con los portaobjetos de doble determinación que contienen neutrófilos fijados con etanol y secciones de **hígado de rata (RL)**.

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

El patrón ANA-Ho en RL muestra fluorescencia uniforme y homogénea en todo el interior del núcleo de la célula en interfase y en neutrófilos fijados con etanol muestra el patrón P-ANCA.

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

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

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

CONTROL DE CALIDAD

Para verificar la funcionalidad del procedimiento de ensayo, el Control Positivo P-ANCA y el Control Negativo deben ser ensayados junto con las muestras de los pacientes tanto en portaobjetos fijados con etanol como en portaobjetos fijados con formalina. El Control Positivo C-ANCA únicamente debe ser ensayado en portaobjetos fijados con etanol. El Control Positivo X-ANCA debe ser ensayado en portaobjetos fijados con metanol. El Control Positivo ANA-Ho debe ser ensayado en portaobjetos ANCA-Etanol-ANA.

Los Controles Positivos deben proporcionar los marcajes específicos descritos en el apartado anterior.

El Control Positivo P-ANCA ensayado en portaobjetos fijados con formalina debe proporcionar patrón de marcaje C-ANCA.

El Control Negativo no debe proporcionar marcaje específico alguno.

En general, la intensidad de fluorescencia observada en los portaobjetos fijados con formalina es moderada.

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

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

- El conjugado IgG FITC/Evans está calibrado frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmunoglobulinas humanas de oveja conjugadas con FITC.
- La especificidad del Control Positivo C-ANCA está verificada frente al suero humano de referencia PR3-ANCA #16 de la CDC. La especificidad del Control Positivo P-ANCA está verificada frente al suero humano de referencia MPO-ANCA #15 de la CDC. La especificidad del Control Positivo ANA-Ho está verificada frente al suero de referencia AF/CDC1 del Centers for Disease Control.

- El patrón de marcaje C-ANCA observado en portaobjetos fijados con etanol es el resultado de la unión del anticuerpo con la proteinasa 3. En portaobjetos fijados con formalina, este patrón de marcaje corresponde a la unión del anticuerpo con la mieloperoxidasa.
- El patrón de marcaje P-ANCA, observado en portaobjetos fijados con etanol, es el resultado de la unión del anticuerpo con la mieloperoxidasa.
- El patrón de marcaje X-ANCA, observado en portaobjetos fijados con metanol, es el resultado de la unión del anticuerpo a múltiples especificidades antigénicas, como catepsina G, lactoferrina o elastasa.
- El patrón de marcaje ANA-Ho, observado en portaobjetos fijados con etanol es el resultado de la unión del anticuerpo con antígenos antinucleares (ANA).

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Existe una muy fuerte asociación entre la granulomatosis de Wegener y la aparición de marcaje C-ANCA asociado a PR3. Este patrón de marcaje es prácticamente exclusivo de pacientes con esta enfermedad y su especificidad diagnóstica es superior al 90%. La sensibilidad depende del estadio de la enfermedad pero puede situarse en torno al 66%⁽²⁾. El patrón P-ANCA asociado a MPO, puede encontrarse en vasculitis idiopáticas necrosantes, como la poliangiitis microscópica, la glomerulonefritis creciente idiopática, el síndrome de Churg-Strauss, la poliarteritis nodosa y la granulomatosis de Wegener. Las sensibilidades de P-ANCA para poliangiitis microscópica y para el síndrome de Churg-Strauss son 58% y 74,5%, respectivamente, mientras que las especificidades son del 81% y del 95%^(3,4). El patrón X-ANCA está asociado al diagnóstico de enfermedades inflamatorias del intestino, como la colitis ulcerosa (50-70%) y la enfermedad de Crohn (10-30%), además de otras enfermedades autoinmunes no vasculares⁽⁵⁾. El patrón ANA-Ho es indicativo de lupus eritematoso sistémico. La determinación de anticuerpos anti-nucleares tiene una sensibilidad superior al 95% para el lupus eritematoso sistémico, y una baja especificidad⁽⁶⁾.

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

NOTAS

1. Para la determinación ANCA-Etanol-ANA el volumen a dispensar es de 60 µL.
2. Evitar tocar las células del pocillo durante todo el procedimiento.
3. Utilizar un frasco lavador o pipeta para este lavado, evitando la posible contaminación con las muestras adyacentes.

BIBLIOGRAFIA

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, Allen NB, Landsman P, Feussner JR The Role of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (c-ANCA) Testing in the Diagnosis of Wegener Granulomatosis: A Literature Review and Meta-analysis. Ann Intern Med. 1995;123(12):925-932.
3. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, Lesavre P, Lüdemann J, Rasmussen N, Sinico RA, Wiik A, van der Woude FJ. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. Kidney Int. 1998; 53 (3): 743-53
4. Sinico RA, Di Toma L, Maggiore U, Bottero P, Radice A, Tosoni C, Grasselli C, Pavone L, Gregorini G, Monti S, Frassi M, Vecchio F, Corace C, Venegoni E, Buzio C. Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. Arthritis Rheum. 2005;52(9):2589-93.
5. Savige J, Dimech W, Fritzler M, et al. Addendum to the international Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. Am J Clin Pathol 2003;120:312-318.
6. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.