

MS 10310030095

Imuno-CON

ANCA

*Kit para determinação qualitativa e
semi-quantitativa de anticorpos
anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA)
no soro humano por imunofluorescência indireta.*

CÓD. 1124-I: 24 determinações



WAMA Diagnóstica

Rua Aldo Germano Klein, 100 - CEAT
CEP 13560-971 - São Carlos - SP
Fone (16) 3377.9977 / Fax (16) 3377.9970
www.wamadiagnostica.com.br

Imuno-CON ANCA

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

As Vasculites Sistêmicas são um grupo de doenças distintas com grande dificuldade de diagnóstico e classificação. O quadro clínico é polimórfico e em geral grave. A freqüente sobreposição dos achados clínicos e histológicos dificultam o diagnóstico, podendo acarretar graves conseqüências.

A associação entre anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) e certas formas de vasculites sistêmicas tornou-se o principal exame laboratorial no estudo dessas doenças. A granulomatose de Wegener é uma grave vasculite sistêmica, que é fatal se não tratada. A clássica tríade de Wegener generalizada é caracterizada por vasculite granulomatosa necrotizante do pulmão e de vias aéreas superiores, associada a glomerulonefrite.

Os ANCA são auto-anticorpos dirigidos contra constituintes dos neutrófilos. Dois padrões de ANCA podem ser observados pela imunofluorescência indireta quando os neutrófilos (substrato) são fixados em etanol: padrão citoplasmático (c-ANCA), dirigido contra uma serina protease existente nos grânulos primários (azurófilos) dos neutrófilos, a Proteinase 3, que apresenta uma fluorescência granular difusa, típica no citoplasma dos neutrófilos, e padrão perinuclear (p-ANCA), dirigido contra a proteína mieloperoxidase existente nos grânulos primários (azurófilos) dos neutrófilos, mostrando fluorescência perinuclear.

O padrão c-ANCA é predominantemente associado com granulomatose de Wegener, e p-ANCA tem sido associado com várias formas de vasculites sistêmicas, como poliarterite microscópica ativa (80%), glomerulonefrite necrotizante rapidamente progressiva, etc.; bem como associada com outras condições clínicas tais como: retocolite ulcerativa, arterite de células gigantes, policondrite crônica atrofiante, infecção pelo vírus HIV. Entretanto, nas vasculites sistêmicas o p-ANCA correlaciona-se com doença renal em cerca de 90 % dos casos.

ANCA ocorre em mais de 90% dos pacientes com vasculites

sistêmicas ativas e em 67% com vasculite limitada ativa. A incidência de ANCA varia em pacientes em remissão clínica. Pacientes com granulomatose de Wegener podem ocasionalmente ser ANCA negativos. A correta interpretação dos resultados obriga o conhecimento dos achados clínicos no paciente.

O Kit ImunoCon-ANCA da WAMA utiliza neutrófilos (substrato) fixados com etanol para técnica de imunofluorescência indireta, a qual é atualmente o único teste padronizado internacionalmente para detecção destes anticorpos.

PRINCIPIO DO MÉTODO

Quando anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos estão presentes no soro, eles se ligam ao substrato (preparação otimizada de neutrófilos humanos). Anticorpos não ligados são removidos por lavagem. Os anticorpos específicos ligados, de classe IgG, são revelados por uma antigamaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína. As reações são observadas sob um microscópio de fluorescência equipado com filtros apropriados. A presença de ANCA é demonstrada por fluorescência granular difusa no citoplasma (c-ANCA) ou perinuclear (p-ANCA).

APRESENTAÇÃO DO KIT

CÓD. 1124-I - (24 determinações)

1. Lâminas com 6 áreas reativas com substrato de neutrófilos humanos (4 lâminas)
2. Antigamaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (1 x 5ml)
3. Tampão diluente (60ml)
4. Tampão fosfato salino (PBS) (2x1g)
5. Glicerina tamponada (5ml)
6. Soro controle positivo (0,5ml)
7. Soro controle negativo (0,5ml)
8. Lamínulas

9. Instruções de uso

ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Lâminas com neutrófilos (1): deixá-las atingirem em temperatura ambiente por 15 minutos antes de retirá-las do envelope. Estáveis em geladeira (2-8°C) até a data do vencimento.

Antigamaglobulina humana (IgG) marcada (2): pronta para uso. Estável em geladeira (2-8°C). Proteger da luz. Contém azida sódica 0,1%. Estável até a data do vencimento.

Tampão diluente (3): pronto para uso. Conservar em geladeira (2-8°C). Contém azida sódica 0,1%. Estável até a data do vencimento.

Tampão Fosfato Salino (PBS) (4): dissolver o conteúdo de 1 frasco para 1 litro de água destilada, obtendo-se uma solução com pH=7,2. Conservar em geladeira (2-8°C) em recipiente limpo e fechado. É estável até a data do vencimento sem dissolver. Descartar se ocorrer mudança do pH ou turvação.

Glicerina tamponada (5): pronta para uso. Estável em geladeira (2-8°C) até a data do vencimento. Não conservar a temperatura inferior a 2°C para evitar cristalização. Contém azida sódica 0,1%.

Soro controle positivo (6): pronto para uso. Contém azida sódica 0,1%. Estável até a data do vencimento.

Soro controle negativo (7): pronto para uso. Contém azida sódica 0,1%. Estável até a data do vencimento.

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

Microscópio de fluorescência

Pipetas sorológicas

Jarra de Coplin ou similar

Água destilada ou deionizada

Frasco para 1 litro

Câmara de incubação

Papel absorvente

AMOSTRAS

Somente utilizar amostras de soro livre de hemólise e contaminação

bacteriana. Em caso de necessidade as amostras podem ser conservadas no freezer à -20°C, no máximo por 6 (seis) meses, ou entre 2 a 8 °C por uma semana.

PROCEDIMENTO

a. Teste Qualitativo (screening): para triagem e eliminação dos soros não regentes.

1. Diluir o soro de cada paciente a 1/10 com tampão diluente(3) (0,1ml de soro + 0,9ml do tampão diluente)

2. Deixar a(s) lâmina(s) atingir a temperatura ambiente por 15 minutos antes de retirá-la(s) do envelope. Removê-la(s) sem tocar no substrato, rotulá-la(s) e colocá-la(s) em câmara úmida.

3. Pingar 1 gota (50○l) dos controles positivo (6) e negativo (7) , sem diluir, nas áreas 1 e 2 da(s) lâmina(s), respectivamente. Evitar transbordar as áreas.

4. Pingar 1 gota (50○l) dos soros desconhecidos diluídos 1/10 nas áreas restantes, evitando transbordar.

5. Incubar em câmara úmida por 30 minutos, em temperatura ambiente.

6. Remover a(s) lâmina(s) da câmara úmida. Segurá-la(s) por uma extremidade e lavá-la(s) com tampão fosfato salino (PBS) (4), aproximadamente 10 ml. Usando uma pipeta dirigir o PBS pela borda longitudinal da(s) lâmina(s), tendo o cuidado de não atingir diretamente as áreas reativas, evitando com isso prejudicar o substrato. Colocar a(s) lâmina(s) em uma jarra de Coplin ou similar e lavá-la(s) com PBS por 10 minutos, agitando suavemente o Coplin algumas vezes.

7. Remover a(s) lâmina(s) do Coplin, uma de cada vez. Tirar o excesso de PBS sacudindo-a sobre papel absorvente. Secar em torno das áreas reativas e ir **IMEDIATAMENTE** para etapa 8 para não secar o local da reação.

8. Retornar a câmara úmida. Pingar 1 gota (50○l) da antigamaglobulina marcada (2) em cada área da(s) lâmina(s), tendo o cuidado de recobri-las totalmente.

9. Incubar a(s) lâmina(s) por 30 minutos em câmara úmida, em temperatura ambiente, protegendo do excesso de luz.

10. Remover a(s) lâmina(s) da câmara úmida. Segurá-la(s) por uma extremidade e lavá-la(s) com tampão fosfato salino (PBS), aproximadamente 10ml. Usando uma pipeta dirigir o PBS pela borda longitudinal da(s) lâmina(s), tendo o cuidado de não atingir diretamente as áreas reativas, evitando com isso prejudicar o substrato. Colocar a(s) lâmina(s) em uma jarra de Coplin ou similar e lavá-la(s) com PBS por 10 minutos, agitando suavemente o Coplin algumas vezes.

ATENÇÃO: Lavagens inadequadas podem alterar a morfologia das células polimorfonucleares (neutrófilos) e levar a um aumento da fluorescência de fundo.

11. Remover a(s) lâmina(s) do Coplin, uma de cada vez. Tirar o excesso de PBS sacudindo-a(s) sobre papel absorvente. Secar em torno das áreas reativas e ir **IMEDIATAMENTE** para a etapa 12 para não secar o local da reação.

12. Pingar 3 a 4 gotas de glicerina tamponada (5) entre as áreas reativas. Cobrir a(s) lâmina(s) com uma lamínula evitando a formação de bolhas. Secar o excesso da glicerina com papel absorvente. Limpar o dorso da(s) lâmina(s).

13. Ler em microscópio de fluorescência. É conveniente fazer a leitura no mesmo dia. Entretanto, no caso de não ser possível, conservá-la(s) em geladeira (2-8°C) protegida da luz e lê-la(s) no dia seguinte. A glicerina não deve secar. Se isto ocorrer colocar mais glicerina.

b. Teste Semi-Quantitativo. (Titulação): para determinar o título do anticorpo dos soros positivos no teste Qualitativo (screening).

1. Partindo da diluição 1/10, diluir os soros positivos em tampão diluente (3) a 1/20, 1/40, 1/80 ou mais.

2. Deixar a(s) lâmina(s) atingir a temperatura ambiente por 15 minutos antes de retirá-la(s) do envelope. Removê-la(s) sem tocar no substrato, rotulá-la(s) e colocá-la(s) em câmara úmida.

3. Pingar 1 gota (50 μ l) dos controles positivo (6) e negativo (7), sem diluir, nas áreas 1 e 2 da(s) lâmina(s), respectivamente. Evitar

Imuno-CON ANCA

transbordar as áreas.

4. Pingar 1 gota (50 μ l) dos soros diluídos nas áreas restantes usando uma áreas para cada diluição. Evitar transbordar as áreas.

5. Seguir as etapas de 5 a 13 do teste de triagem (screening).

RESULTADO DAS LEITURAS.

Reação Negativa: AUSÊNCIA de fluorescência verde-maça característica. Comparar com o controle negativo. A imagem da amostra deve ser sempre igual ao controle negativo.

Reação Positiva: PRESENÇA de fluorescência verde-maça característica no citoplasma (c-ANCA) ou perinuclear (p-ANCA).

INTERPRETAÇÃO

Os resultados dos testes deverão ser reportados como **Não Reagentes** (inferior a 1/10) ou **Reagentes** com o título correspondente.

Soros que mostrarem fluorescência até a diluição 1/80 serão reportados como **Reagente maior ou igual a 1/80**, ou, preferencialmente, a maior diluição que apresentar reação positiva, informando sempre a tipo de fluorescência, se citoplasmática ou perinuclear.

Soros ANA (Anticorpo Antinuclear) positivos podem acarretar reações positivas semelhantes as reações p-ANCA.

Os títulos de c-ANCA estão frequentemente relacionados com atividades da doença, e decrescem quando a terapêutica imunossupressora é introduzida.

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Algumas vezes, soros muito fracos ou com excesso de anticorpos (Fenômeno de prozona) podem resultar resultados negativos.

Em alguns casos de presença de dois ou mais anticorpos podem resultar em resultados errados, levando a impossibilidade na detecção de ANCA ou a supressão de seu título se o anticorpo tem um título maior que o anti-ANCA. A causa mais comum de interferentes nos

testes de imunofluorescência para ANCA é a presença de ANA positivo.

Alguns pacientes com granulomatose de Wegener podem apresentar teste de imunofluorescência negativo.

Soros de ANA positivos podem ser confundidos com p-ANCA. Na dúvida, tais soros deverão ser testados para ANA com substrato de Hep-2, ou corte de tecido, ou testado com substrato ANCA fixado em formalina, no qual o ANA será negativo.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

1. Reagentes somente para uso diagnóstico “in vitro”.
2. Como se emprega azida sódica 0,1% como conservante nos controles, conjugado, tampão diluente e glicerina tamponada, o descarte dos reativos deve ser acompanhado de grandes volumes de água para evitar acúmulo de resíduos de azida nos encanamentos, pois esta pode reagir com chumbo ou cobre formando sais altamente explosivos. Além disso, azida é tóxica quando ingerida.
3. Todos os materiais humanos usados na preparação dos controles foram testados, com resultados negativos, para antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), HIV-1 e 2, HCV e HTLV-1. Porém, como nenhum método diagnóstico oferece completa segurança da ausência destes e de outros agentes infecciosos, recomenda-se tratar os soros controles humanos como materiais potencialmente infecciosos.
4. Seguir boas práticas laboratoriais (BPLs) na conservação, manuseio e descarte dos materiais.
5. Seguir exatamente as instruções de uso para que os resultados sejam válidos.
6. Não substituir componentes deste kit com o de outros fabricantes, nem usar componentes de lotes e códigos diferentes.
7. Não usar reagentes após a data de validade.

INCIDÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-CITOPLASMA DE NEUTROFILOS

Condição Clínica	% de Positivos
Granulomatose de Wegener	
Generalizada	
Ativa	96
Remissão parcial	71
Remissão completa	41
Recorrência local	8
Localizada	
Ativa	67
Remissão parcial	54
Remissão completa	32
Doença Inflamatória Intestinal	
Colite ulcerativa	70
Colangite esclerosante primaria	82
Doença de Crohn (freqüentemente título baixo)	27
Controle de Doença	
Doadores de sangue	0
Doenças autoimune do tecido conjuntivo	0
Doença granulomatosa	0
Doença renal primaria	1

SIMBOLOGIA



O conteúdo é suficiente para (n) testes



Produto diagnóstico *in vitro*



Limite de temperatura



Consultar instruções para uso



Data limite de utilização



Número do catálogo



Número do lote



Proteger do calor

BIBLIOGRAFIA

1. Addis, B. J.: Wegener 's granulomatosis, ANCA, and microscopic polyarteritis. **J. Pathol.**, 164: 189-190, 1991.
2. Andrassy, K. et al.: Diagnostic signosticance of anticytoplasmatic antibodies (ACPA/ANCA) in detection of Wegener's granulomatosis and other forms of vasculitis. **Nefron**, 49: 257-258, 1988.
3. Daouk, g. H. et al.: Inhibition of proteinase 3 by ANCA and its correlation with disease activity in Wegener's granulomatosis. **Kidney Intern.**, 47: 1528-1536, 1995.
4. Davenport, ^a et al.: Clinical relevance of testing for antineutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) with a standard indirect immunoflourescence ANCA test in pactionts with upper or lower respiratory tract symptoms. **Thorax**, 49:213-217, 1994.
5. Kallenberg, C. G. M. et al.: Antineutrophil cytoplasmic antibodies: A still-growing class of autoantibodies in inflammatory disorders. **Am. J. Med.**, 93:675-682, 1992.
6. Nolle, B. et al.: Anticytoplasmatic antibodies: their immunodiagnostic value in Wegener's granulomatosis. **Ann. Int. Med.**, 11:28-40, 1989.
7. Roa, J. K. et al.: The role of antineutrophil cytoplasmic antibody (c-ANCA) testing in the diagnosis of Wegener's granulomatosis. **Ann. Intern. Med.**, 123: 925-932, 1995.
8. Savige, J. A : Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and renal diseases. **AUST. NZ J. Med.**, 25: 40-41, 1995.
9. Venning, M. C. et al.: The role of antibodies to a neutrophil cytoplasmic antigen in tehe diagnosis and mana gement of Wener' s granulomatosis and microscopic polyarteristis **APMIS**, 97 (siupl. 1) :31, 1989.
10. Venning, M. c. et al.: Antibodies directed against neutrophil (C-ANCA and p-ANCA) are of distinct diagnostic value in systemic vasculitis. **Quart. J. Med.**, 77: 1287-1296, 1990.

V EDIÇÃO: 04/2007

TERMO DE GARANTIA

A **WAMA Diagnóstica** garante a troca deste conjunto diagnóstico, desde que o mesmo esteja dentro do prazo de validade e que seja comprovado por sua assessoria técnica que não houve falhas na execução, manuseio e conservação deste produto. A **WAMA** e seus distribuidores não se responsabilizam por falhas no desempenho do kit sob essas condições.