مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۸، شماره ۱۱، بهمن ۱۴۰۰ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

طراحی و تهیه لام تشخیصی آنتی‌بادی‌های ضد سیتوپلاسم نوتروفیل (ANCA) با روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم

مجید خوش میرصفا: استادیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده ایمونولوژی و بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

محمدعلی عصاره زادگان: دانشیار ایمونولوژی، : مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده ایمونولوژی و بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) assareh.ma@iums.ac.ir

فائزه شهبا: دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده ایمونولوژی و بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: آزمایش آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها (ANCA) اولین درخواست در تشخیص اولیه و غربال بیماران مشکوک به بیماری‌های خودایمن واسکولیت عروق کوچک و همچنین پیگیری روند درمان بیماران است که با استفاده از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFA) حضور آنتی‌بادی‌ها علیه آنتی‌ژن‌ها درون سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها را بررسی می‌شود. هدف از این مطالعه طراحی و تهیه لام‌های تشخیص آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها (ANCA) به روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم است.

روش کار: با استفاده از روش گرادیانت شیب غلظت و محلول دکستران، نوتروفیل‌ها از خون محیطی افراد سالم جدا شدند. خلوص و بازده سلول‌های استخراج شده توسط رنگ آمیزی رایت گیمسا، لام نئوبار و دستگاه شمارش گر اتوماتیک بررسی شد. با استفاده از فیکساتور اتانول، نوتروفیل‌های جدا شده بروی اسلاید فیکس و رنگ آمیزی فلورسانت شدند.

یافته‌ها: خلوص و تعداد نوتروفیل‌های جدا شده توسط دستگاه شمارشگر سلولی بررسی شد. بسته به نوتروفیل ورودی بطور میانگین (±انحراف استاندارد) تعداد نوتروفیل‌های جدا شده برابر با (۹۵۰±)۶۰۰۰ سلول در هر میکرولیتر بود. میانگین خلوص نوتروفیل‌های جدا شده برابر با ۹۴/۱ درصد بود. همچنین توسط رنگ آمیزی تریپان بلو درصد سلول‌های زنده بیش از ۸۵ درصد قبل از فیکساسیون تعیین گردید. آنالیز نتایج رنگ‌آمیزی فلورسانس غیر مستقیم ANCA بر روی لام‌های تهیه شده در مقایسه با برند تجاری مرجع کاملا منطبق بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که روش بکار برده شده می‌تواند برای تجاری سازی و تولید لام‌های ANCA جهت اهداف تشخیصی بکار گرفته شود. در این زمینه علاوه بر بهینه نمودن مراحل جداسازی و فیکس نمودن سلول‌ها نیاز است جهت تولید در تعداد انبوه و تجاری، پایداری لام‌های تهیه شده در زمان انبارش و نگهداری نیز ارزیابی قرار گرفته و بهینه شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

کلیدواژه‌ها

آنتی‌بادی علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها،
لام تشخیصی،
ایمونوفلورسانت غیرمستقیم،
نوتروفیل،
واسکولیت

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۳

تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۱۱/۱۱

شیوه استناد به این مقاله:

Khoshmirsafa M, Assarehzadegan M, Shahba F. Design and Preparation of Diagnostic Slides for Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA) by Indirect Immunofluorescence Method. Razi J Med Sci. 2021;28(11):89-98.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-25]

Razi Journal of Medical Sciences. 2021;28(11):89-98. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Design and Preparation of Diagnostic Slides for Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA) by Indirect Immunofluorescence Method

Majid Khoshmirsafa: Immunology Research Center, Institute of Immunology and Infectious Diseases, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, & Department of Immunology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Mohammad-Ali Assarehzadegan: Immunology Research Center, Institute of Immunology and Infectious Diseases, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, & Department of Immunology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (* Corresponding author) assareh.ma@iums.ac.ir
Faezeh Shahba: Immunology Research Center, Institute of Immunology and Infectious Diseases, Iran University of medical Sciences, Tehran, Iran, & Department of Immunology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: One of the most important tests for the detection of antibodies against neutrophil cytoplasm in autoimmune vasculitis diseases is the Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA) test. The ANCA test is the first order in the initial diagnosis and screening of patients with suspected autoimmune diseases, including small-vessel vasculitis, as well as the follow-up of patients' treatment, which uses indirect immunofluorescence assay (IFA) to detect the presence of antibodies against antigens in the cytoplasm of neutrophils. In addition to vasculitis, the evaluation of this antibody is used in other autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), and inflammatory bowel diseases (IBD).

To prepare IFA slides for diagnostic purposes, neutrophils extracted from human peripheral blood are used as substrates. The IFA is a common and acceptable method in medical diagnostic laboratories for the detection of these autoantibodies. The first experience in the development of this technique back to the work of Koons and Kaplan, although today, this method has been widely developed in the field of laboratory diagnosis as well as research in basic medical sciences. A distinct advantage of the immunofluorescence assay is its applicability to fresh tissue and fixed cells.

This method is based on the specific antigen binding to specific antibodies conjugated with fluorescent dyes and fluorescent light emission. There is two common types of immunofluorescence assay include direct and indirect immunofluorescence used for detection autoantibodies. In the direct immunofluorescence method, specific antibodies are conjugated to fluorescent dyes, and by binding to their specific antigen, the green fluorescent light is recognized under a fluorescent microscope. Although this procedure is faster, it is less often applied in medical diagnostic labs. In the IFA method, a specific antibody against the target antigen (called the primary antibody) binds to the target antigen recognized by a secondary antibody that is against the fixed region of the primary antibody and conjugated with fluorescent dyes, such as fluorescein isothiocyanate (FITC). In the indirect immunofluorescence assay, due to the binding of several secondary antibodies to the primary antibody, the generated fluorescence signals will be amplified, which in turn increases the fluorescence intensity and sensitivity. The aim of this study was to design and prepare slides for antibodies detection against antigens in cytoplasm neutrophils by the indirect immunofluorescence method.

Furthermore, the next step by optimizing fluorescent patterns to detect different types of antibodies against neutrophil cytoplasm by indirect immunofluorescence method. Since 1980, the search for antibodies against the neutrophil cytoplasm has been recognized as one of the most effective diagnostic tools for diseases associated with small to medium-sized vasculitis. ANCA in the diagnosis and follow-up of the treatment of vasculitic diseases including granulomatosis with polyangiitis, formerly known as Wegener granulomatosis, microscopic polyangiitis, Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, formerly known as

Keywords
ANCA,
Diagnosis slide,
Indirect immunofluorescence assay,
Neutrophil,
Vasculitis

Received: 04/09/2021
Published: 31/01/2022

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-25]

Churg – Strauss syndrome, is used. Most laboratories around the world use IFA for screening and early detection of ANCA.
After the ANCA test is positive, the target antigens of the antibodies are evaluated by the ELISA method. The two most common targets of autoantibodies are myeloperoxidase (MPO) and proteinase-3 (PR-3) in patients with vasculitis.
However, a clinical association of these vasculitis diseases with other antigens such as elastase, lactoferrin, azurocidin, lysozyme, H-Lamp-2, and other lesser-known antigens has also been observed.
Antibodies against neutrophil cytoplasm have also been reported in other small vessel vasculitis diseases such as microscopic polyangiitis (MPA), eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA), and necrotizing crescentic glomerulonephritis. Initially, the non-commercial ELISA method was used to diagnose PR3-ANCA and MPO-ANCA, but inconsistent results between laboratories showed the global need for standardization of this test . In 1998, fifteen laboratory centers around the world evaluated and standardized the standard method for measuring antibodies against neutrophil cytoplasm (ANCA) and its specific antigens, including PR3 and MPO, by indirect immunofluorescence and ELISA in patients with idiopathic systemic vasculitis. . The result of this standardization increased the detection value of ANCA by immunofluorescence and ELISA methods.
One of the most important pillars of the commercialization of a product is the supply of raw materials with appropriate and sustainable quality. The first step in producing ANCA slides is the isolation of high purity and standard quality peripheral blood neutrophil cells. Peripheral blood neutrophils are short-lived, highly sensitive cells that cannot be stored for long periods of time, and it is recommended that these cells be isolated from whole blood immediately after blood sampling. To date, several methods have been proposed to isolate neutrophils from peripheral blood. In this study, it was shown that using the dextran method and subsequent separation by centrifugal gradient method with filament is one of the cost-effective methods with high purity to provide the ANCA test substrate.
Methods: Using the Ficoll density gradient centrifugation and dextran solution, neutrophils were isolated from the peripheral blood of healthy individuals (without a history of any disease, especially autoimmune diseases in themselves and first-degree relatives). The purity and efficiency of the isolated cells were evaluated by Wright Giemsa staining, the neobar slide, and an automatic counting machine. Isolated neutrophils were fixed on slides using an ethanol fixative. At this stage, by selecting the best protocol, in terms of time and type of neutrophil fixation stage, they were fixed on the slide. In the next step, using positive and negative samples that have already been determined by ANCA with valid commercial kits (IVD certified), the slides containing fixed cells were fluorescent stained and compared with control samples.
Results: The number and purity of neutrophils isolated were evaluated by a Sysmex automatic cell counter. Depending on the peripheral blood neutrophils, the mean(±standard deviation) of the number of isolated neutrophils was 6000(±950) cells per microliter. According to white blood cell differential count, the mean purity of isolated neutrophils was 94.1%. Also, by trypan blue staining, the percentage of viable cells was determined to be more than 85% before fixation. The results of ANCA indirect fluorescent staining on the prepared slides were completely consistent with the results of control samples.
Conclusion: The results of this study showed that the method used can be applied for the commercialization and production of ANCA slides. In this regard, in addition to optimizing the steps of separation and fixing the neutrophils, it is necessary to evaluate and optimize the stability of the prepared slides during storage and production in order to produce in large numbers.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Khoshmirsafa M, Assarehzadegan M, Shahba F. Design and Preparation of Diagnostic Slides for Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA) by Indirect Immunofluorescence Method. Razi J Med Sci. 2021;28(11):89-98.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-25]

مقدمه

یکی از آزمایش‌های مهم در تشخیص آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها (Antineutrophil-Cytoplasmic Antibodies,ANCA) در بیماری‌های خودایمن واسکولیت تست ANCA می‌باشد. آزمایش ANCA اولین درخواست در تشخیص اولیه و غربال بیماران مشکوک به بیماری‌های خودایمن واسکولیت عروق کوچک و همچنین پیگیری روند درمان این بیماران است که با استفاده از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFA)، حضور آنتی‌بادی‌ها علیه آنتی‌ژن‌هایی در سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها را بررسی می‌شود. علاوه بر بیماری‌های واسکولیتی، ارزیابی این آنتی‌بادی در سایر بیماری‌های خودایمن نظیر لوپوس اریتماتوز سیستمیک، آرتریت روماتوئید و همچنین افتراق بیماری‌های التهابی روده (Inflammatory-Bowl Diseases: IBD) نیز بکار می‌رود (۱، ۲).

در تست ANCA، سرم‌های مشکوک بر روی لام‌هایی با سوبسترا نوتروفیل (فیکس شده) با آنتی‌بادی‌های متصل به کونژوگه فلورسنت (مانند فلئورسین ایزوتیوسیانات، FITC) بررسی می‌شوند. برای تهیه لام‌های ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFA) برای اهداف تشخیصی، از سلول‌های نوتروفیل استخراج شده از خون محیطی انسان به عنوان سوبسترا استفاده می‌گردد (۱، ۲).

سنجش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFA) یک روش‌های پرکاربرد و البته قدیمی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی برای بررسی اتوآنتی‌بادی‌ها است. اولین تجربیات در تکوین و ابداع این تکنیک به فعالیت کونز و کاپلان باز می‌گردد، البته این روش تا به امروز در حوزه تشخیص آزمایشگاهی و همچنین تحقیقات علوم پایه پزشکی توسعه زیادی پیدا کرده است (۱، ۳). مزیت متمایز روش سنجش ایمونوفلورسانس قابلیت استفاده آن بروی بافت و یا سلول تازه و همچنین سلول‌های ثابت (فیکس) شده است؛ این روش بر اساس اتصال آنتی‌بادی‌های اختصاصی به رنگ‌های فلوروسنت و ساطع شدن نور فلورسانس به دنبال اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن اختصاصی خود است. دو نوع رایج از روش ایمونوفلورسانس شامل مستقیم و غیر مستقیم (Direct and Indirect Immunofluorescence) می‌باشد (۱، ۳). در روش ایمونوفلورسانس مستقیم آنتی‌بادی اختصاصی به رنگ‌های فلوروسنت متصل شده (کونژوگه) و با اتصال به آنتی‌ژن اختصاصی خود زیر میکروسکوپ فلورسانت، نور سبز فلورسانس بررسی می‌شود. این روش سریع‌تر بوده ولی در آزمایشگاه تشخیص طبی کاربرد کمتری دارد. در روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFA)، آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن مورد نظر که به اصطلاح آنتی‌بادی اولیه نامیده می‌شود پس از اتصال به آنتی‌ژن هدف، توسط آنتی‌بادی ثانویه که علیه ناحیه ثابت آنتی‌بادی اولیه است و به رنگ‌های فلوروسنت نظیر فلئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) متصل شده است، تایید می‌گردد. در روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم به دلیل اتصال چندین آنتی‌بادی ثانویه به آنتی‌بادی اولیه، سیگنال‌های فلورسانس تولید شده تقویت خواهد شد که این امر خود سبب افزایش شدت فلورسانس و حساسیت آزمایش می‌شود (۴).

از سال ۱۹۸۰ تاکنون جستجوی آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها (ANCA) به عنوان یکی از کارآمدترین ابزارهای تشخیصی برای بیماری‌های مرتبط به التهاب عروق (واسکولیت) کوچک تا متوسط شناخته شده است. آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها (ANCA) در تشخیص و پیگیری اثربخشی درمان بیماری‌های واسکولیتی شامل گرانولوماتوز همراه با پلی آنژیت (Granulomatosis with polyangiitis) که سابقاً گرانولوماتوز واگنر (Wegener granulomatosis) شناخته می‌شد، پلی آنژیت میکروسکوپیک (Microscopic polyangiitis)، گرانولوماتوز ائوزینوفیلیک همراه با پلی آنژیت (Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis) که در گذشته سندروم چرچ استراس (Churg–Strauss syndrome) شناخته می‌شد به کار می‌روند. اکثر آزمایشگاه‌ها در سراسر دنیا از روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFA) برای غربال و شناسایی اولیه آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها (ANCA) استفاده می‌کنند (۵).

پس از مثبت شدن تست ANCA، آنتی‌ژن‌های مورد هدف آنتی‌بادی‌ها با روش الایزا مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. به صورت متداول دو آنتی‌ژن میلو پراکسیداز (MPO) و پروتئیناز-۳ (PR-3) از شایع‌ترین اهداف

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-25]

اتوآنتی‌بادی‌هـــا ضـــد آنتی‌ژن‌هـــای سیتوپلاســـمی نوتروفیل‌هـا در بیمـاران واسـکولیتی هسـتند. اگـر چـه ارتباط بالینی بیماری‌های واسکولیتی نـامبرده شـده بـا آنتی‌ژن‌هـــای دیگـــری نظیـــر الاســـتاز، لاکتـــوفرین، آزروســـیدین (Azurocidin)، لیـــزوزیم، H-Lamp-2 و سایر آنتی‌ژن‌های کمتر شناخته شده، نیز مشاهده شـده است (۶، ۷).

الگوهـای فلورسـانس مـرتبط بـا تسـت ANCA، بـا آنتی‌ژن‌های مـورد هـدف اتوآنتی‌بادی‌هـای در بیمـاری خودایمن ارتباط دارد. بطوریکه اغلب الگـوی c-ANCA (Cytoplasmic ANCA) با آنتی‌ژن‌های PR3 و الگو p-ANCA (Perinuclear ANCA) با آنتی‌ژن‌هـای MPO در ارتباط است. در این زمینه مطالعـات مختلـف تاییـد کرده‌اند که بیماری گرانولوماتوز همـراه بـا پلـی آنژیـت (گرانولوماتوز واگنر) در ۸۰ تا ۹۰ درصد موارد با الگـوی c-ANCA و ۵۰ تا ۸۰ درصد مـوارد، الگـوی p-ANCA با بیماری پلی آنژیت میکروسکوپیک همراهـی دارد (۵-۷).

مطالعـات متعـددی از سـال ۱۹۹۰ در مـورد بهینـه نمودن لام‌های سوبسترای نوتروفیلی منتشر شده اسـت. در اکثر این مطالعات نشان داده شده است کـه اسـتفاده از فیکساتیو ها مختلف برای نوتروفیل‌هـا اثـر مهمـی در ایجاد و تمایز الگوی ایمونوفلورسانس در تسـت ANCA دارند. در حال حاضر استفاده از محلول‌های ثابت‌کننـده بر پایه اتانول کاربرد بیشتری نسـبت بـه فیکسـاتیوهای فرمالینی برای فیکس نمودن نوتروفیل‌ها دارند (۸-۱۰).

در حـال حاضـر محصـولات و لام هـا بـا سوبسـترای نوتروفیلی مورد استفاده بـرای انجـام تسـت ANCA در ایران وارداتی بوده و در کشور این گونه لام هـا بصـورت تجاری تولید نمی‌شوند. هدف از این مطالعـه طراحـی و تهیه لام‌های تشـخیص آنتی‌بادی‌هـا علیـه سیتوپلاسـم نوتروفیل‌هـــا (ANCA) بـــه روش ایمونوفلورســـانس غیرمسـتقیم اسـت و در مرحلـه بعـد بـا بهینـه نمـودن الگوهـای فلورسـانس بـرای تشـخیص انـواع مختلـف آنتی‌بادی‌هـا علیـه سیتوپلاسـم نوتروفیل‌هـا بـا روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم است کـه می‌توانـد مرحلـه ابتـدایی و نخسـتین از بومی‌سـازی و تولیـد تجـاری سوبسترا های (لام‌هـای) تشـخیص آزمایشـگاهی تسـت ANCA در کشور باشد.

روش کار

این مطالعه کـه از نـوع طراحـی-تولیـدی می‌باشـد از نوتروفیل‌های افراد سالم فاقد بیماری خونی، خود ایمنی و زمینه‌ای بـرای تهیـه لام‌هـای ANCA اسـتفاده شـد. همچنین برای ارزیابی لام‌های تولیـد شـده از سـرم‌های ANCA مثبت و منفی تایید شده با کیت تجـاری دارای تاییدیه CE و اداره کل تجهیزات پزشکی استفاده شد.

جداسازی نوتروفیل‌ها: خون وریدی همراه بـا مـاده ضـد K3-EDTA از ۵ فـرد سـالم فاقـد هرگونـه بیماری‌های خونی، زمینه‌ای و خـودایمنی جـدا شـده و بصورت میکس (Pooled) استفاده شد. در هر مرحلـه از تهیه و آماده سازی لام ها، نمونه‌ها بصـورت تـازه تهیـه شده و بلافاصله برای جداسازی نوتروفیل‌های اقدام شد. با استفاده از پروتکل دکسـتران- فـایکول در دو مرحلـه نوتروفیل‌ها جداسازی شدند. به طور خلاصـه خـون تـام تهیه شده با نسبت ۲ به ۳ با محلـول دکسـتران ٪۴ (در NaCl 0.9g%) به آهستگی مخلوط شـد و پـس از سـه ساعت انکوباسیون در دمـای اتـاق محلـول رویـی جـدا سـازی شـده و بـه محلـول فـایکول ۱/۰۸۴ گـرم در میلی‌لیتر (Ficoll-Paque1.084 g/mL, GE, Sweden) به آهستگی اضافه گردید. پـس از سـانتریفیوژ در دمـای اتاق ۳۰ دقیقه در ۴۰۰g رسـوب زیـر محلـول فـایکول جدا شد. به علت وجود تعـداد کمـی گلبول‌هـای قرمـز، یک مرحله خالص‌سازی با استفاده از محلول‌هایپوتونیک در زمـان بسـیار کوتـاه (چنـد ثانیـه) انجـام شـد. نوتروفیل‌های جدا شده با لام نئوبار و همچنین دسـتگاه شمارشگر اتوماتیک (Cell Counter) مورد ارزیابی قـرار گرفتند. با استفاده از رنگ آمیزی رایت و گیمسا ظاهر و مورفولوژی سلول‌های نوتروفیل بررسـی شـد. همچنـین درصد سلول‌های زنده توسط رنـگ آمیـزی تریپـان بلـو ۰/۴ درصد زنده قبل از فیکساسیون تعیین شد.

فیکس نمـودن سـلول‌ها بـر روی لام: لام‌هـا بـا طراحـــی ۱۰ چاهـــک از شـــرکت بهـــار افشـــان (Baharafshan, Tehran, Iran) خریـــداری شـــد. نوتروفیل‌های جدا شده متناسب با تعداد سلول استخراج شده با محلول سـرم فیزیولوژیـک (۰/۹ گـرم در دسـی لیتر) رقیق شدند، بطـوری کـه در هـر چاهـک (گـوده) تعداد بـین ۴ تـا ۸ هـزار سـلول قـرار گرفـت. بـه طـور میانگین معادل تعـداد ۱۰ تـا ۵۰ (±۳۰) سـلول در هـر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-25]

شکل ۱- در قسمت بالای تصویر، لام همراه قطرات نوتروفیل در چاهک‌ها را نشان می‌دهد که پس از خشک شدن با اتانول فیکس می‌شوند. در قسمت پائین تصویر جار مرطوب نمایش داده شده که از آب برای ایجاد رطوبت پس از بسته شده استفاده می‌شود و در مرحله انکوبه نمودن نمونه‌ها روی چاهک‌ها استفاده شد.

شان با عدسی شیء ۴۰X قرار گرفت. با استفاده از فیکساتور اتانول خالص (Pure) سلول‌ها بر روی لام شیشه ای فیکس شدند (۴, ۱۱). به طور خلاصه، سلول‌ها در رقت تعیین شده به مقدار ۴۰ میکرولیتر به صورت مقعر روی لام ریخته شده (شکل ۱) و بعد از خشک شدن کامل، فیکساتور اتانول به مقدار ۵۰ میکرولیتر به سلول‌ها اضافه شد و بعد از تبخیر کامل فیکساتور، نمونه‌ها همراه با بسته های نم گیر به صورت بسته بندی تا شروع رنگ آمیزی داخل یخچال قرار داده شدند.

رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFA): در تست ANCA برای تعیین حضور و مقدار آنتی بادی های علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها با روش نیمه کمی از سلول‌های نوتروفیل که بر روی لام فیکس شده اند به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود. پس از مواجهه (انکوباسیون) نمونه‌های سرم و سلول‌های نوتروفیل و طی زمان انکوباسیون سلول‌ها شسته شده و اتوآنتی بادی های متصل شده توسط آنتی گلوبولین انسانی کونژوگه با ماده فلورسنت FITC با میکروسکوپ فلورسانس بررسی شده و نتایج مثبت با تعیین رقت و گزارش نوع الگوی فلورسانس در سلول گزارش شد. به طور خلاصه اندازه گیری آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها با استفاده از لام‌های تهیه شده؛ به شرح ارائه شده انجام شد. نمونه‌های سرم با رقت ۱:۲۰ با محلول PBS (Phosphate-buffered Saline) با pH فیزیولوژیک (۷/۲ تا ۷/۴) رقیق شد. نمونه‌های رقیق شده به خوبی همگن و یکنواخت شدند. مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده به همراه گروه کنترل منفی و مثبت به چاهک ها اضافه شدند. لام های حاوی نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در اتاقک مرطوب در دمای اتاق نگهداری شدند. سرم ها رقیق شده روی لام به آهستگی با بافر PBS به همراه ۰/۰۵ درصد دترژنت توئین ۲۰ (Tween20) از روی سطح لام شسته شده، سپس لام ها در جار حاوی PBS همراه با حرکت ۳ بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. مقدار ۲۵ میکرولیتر آنتی‌بادی کونژوگه با ماده فلورسنت FITC (human Anti-IgG Antibody-FIT, Avicenna, Iran) را به هر چاهک اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در اتاقک مرطوب و تاریک در دمای اتاق انکوبه شد. آنتی‌بادی کونژوگه روی لام به آهستگی با PBS از روی سطح لام شسته شده، سپس دوباره لام ها در جار حاوی PBS همراه با حرکت، ۳ بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند (دور از نور). لام ها به صورت افقی در جایی دور از جریان هوا و نور قرار داده شدند تا رطوبت سطح لام خشک شد (از آنجائیکه رطوبت روی سطح لام نباید بطور کامل از بین برود، از کاغذ رطوبت گیر به منظور خشک نمودن اطراف چاهک ها استفاده شد) سپس یک قطره بافر مونته (pH=9.2-9.3) روی هر چاهک ریخته و لامل روی آن قرار داده شد. با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس شدت و نوع الگوی لام ها بررسی شدند. برای نمونه‌های مثبت این مراحل با استفاده از رقت های سریالی سرم (۲۰-۴۰-۸۰-۱۶۰) تا کسب نتیجه منفی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-25]

تکرار شدند. نتیجه آزمایش به صورت واکنش منفی (بدون مشاهده نور فلورسانس در سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها) و برای نمونه‌های مثبت با تعیین تیتر و ذکر الگو انجام شد. نمونه‌های مثبت به صورت ۲ الگوی شایع سیتوپلاسمی و اطراف هسته ای گزارش شدند. تیتر مثبت اولیه تعیین شده در آزمایش ۱:۲۰ است که برای نمونه‌های مثبت رقت های سریالی با ضریب ۲ شامل تیترهای ۱:۴۰، ۱:۱۶۰ و بیشتر ۱:۱۶۰ گزارش شد آخرین تیتر مثبت (که رقت بعدی منفی باشد) نتیجه رقت آزمایش است (۱, ۳, ۴). همزمان با لام تهیه شده از لام تجاری معتبر با گواهی و تأئیدیه IVD و CE با برند GA (Generic Assay, Germany) نیز استفاده شد. نتایج برای مقایسه با یکدیگر به صورت کیفی مقایسه گردیدند. این مطالعه با کد اخلاق به شماره IR.IUMS.REC.1398.1299 در دانشگاه علوم پزشکی ایران به تصویب رسیده است.

تجزیه و تحلیل اطلاعات با آزمون های آماری: از نرم افزار اکسل و SPSS برای ثبت و تجزیه تحلیل آماری استفاده شد. نتایج بدست آمده به صورت کیفی و درصد گزارش شدند.

یافته‌ها

بررسی خلوص و کیفیت نوتروفیل‌های جدا شده: خلوص و تعداد نوتروفیل‌های جدا شده توسط دستگاه شمارش گر اتوماتیک سلولی سیسمکس تعیین شد (Sysmex cell counter XN-1000, Japan). بطور میانگین ± انحراف استاندارد تعداد ۹۵۰ ± ۶۰۰۰ نوتروفیل در هر میکرولیتر جدا شده بود. بر اساس شمارش افتراقی گلبول‌های سفید انجام شده، به طور میانگین خلوص نوتروفیل‌های جدا شده برابر با ۹۴/۱ درصد بود. همچنین توسط رنگ آمیزی تریپان بلو درصد سلول‌های زنده بیش از ۸۵ درصد قبل از فیکساسیون تعیین شدند.

رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس غیر مستقیم: نتایج رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس غیر مستقیم ANCA بر روی لام‌های تهیه شده در مقایسه با برند تجاری مرجع (GA) کاملا منطبق بود. تصاویر و نتایج بدست آمده در جدول‌های ۱ و ۲ و همچنین شکل ۲ نشان داده شده است. همچنین نتایج بررسی الگوی typical ANCA بر اساس الگوی سیتوپلاسمی و اطراف هسته ای منطبق با برند تجاری مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

آزمایش غربالگری ANCA به طور رایج برای تشخیص بیماری‌های واسکولیت های عروق (ANCA-associated vasculitis, AAV) کوچک تا متوسط بکار می‌رود. بر اساس توافق سال ۱۹۹۹ از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFA) بر روی نوتروفیل‌های انسانی برای بررسی حضور آنتی‌بادی علیه

جدول ۱- مقایسه نتایج بدست آمده از لام‌های تهیه شده با نمونه تجاری. نتایج برای نمونه‌های مثبت و منفی کاملا منطبق (بصورت کیفی) در مقایسه با لام تجاری مشاهده شد. نمونه‌های سرم با رقت ۱ به ۲۰ تهیه شدند.

گروه	نمونه های منفی	نمونه های مثبت
	†۳۰	††۵۰
لام تهیه شده	۳۰	۵۰
لام تجاری (GA)	۳۰	۵۰

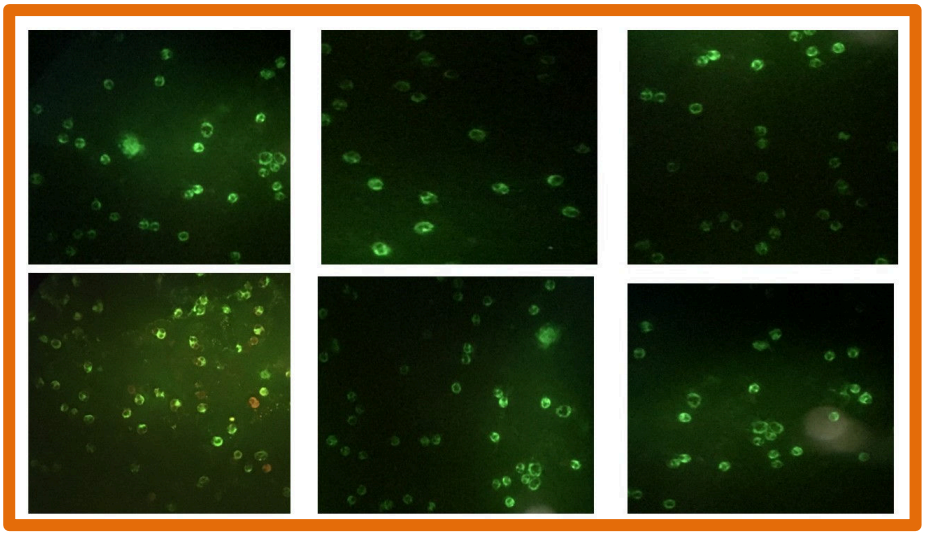
† ۳۰ چاهک: ۱۵ نمونه دوتایی و †† ۵۰ چاهک: ۲۵ نمونه دو تایی

جدول ۲- مقایسه نتایج بدست آمده از لام‌های تهیه شده با نمونه تجاری در مقابل سرم‌های مثبت

گروه	نمونه های مثبت با تیتر ۱:۲۰	نمونه های مثبت با تیتر ۱:۴۰	نمونه های مثبت با تیتر ۱:۸۰
	†۲۸	††۱۲	†††۱۰
لام تهیه شده	۲۸ (۱۰۰٪)	۱۲ (۱۰۰٪)	۱۰ (۱۰۰٪)
لام تجاری (GA)	۲۸ (۱۰۰٪)	۱۲ (۱۰۰٪)	۱۰ (۱۰۰٪)

† ۲۸ چاهک: ۱۴ نمونه دوتایی؛ †† ۱۲ چاهک: ۶ نمونه دوتایی؛ ††† ۱۰ چاهک: ۵ نمونه دوتایی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-25]



شکل ۲- تصاویر نوتروفیل‌های رنگ آمیزی شده با عدسی (۴۰X)

جدول ۳- مقایسه ارزش تشخیصی روش الایزا و روش ایمونوفلورسانس برای تشخیص بیماری‌های واسکولیتی (۴،۶،۷)

ارزش تشخیصی	روش ایمونوفلورسانت غیرمستقیم (IIF)		سنجش ایمنی با روش آنزیمی (ELISA)	
	C-ANCA	P-ANCA	PR3-ANCA	MPO-ANCA
اختصاصیت در زمان کنترل بیماری	٪۹۸-۹۵	٪۹۶-۸۰	٪۹۸-۸۶	٪۹۹-۹۱
حساسیت تشخیص در بیماران تازه تشخیص داده شده EGPA	٪۷۷-۶۴	٪۲۱-۱۱	٪۸۱-۶۵	٪۲۴-۹
حساسیت تشخیص در بیماران تازه تشخیص داده شده MPA	٪۲۳-۵	٪۸۹-۵۸	٪۲۷-۵	٪۸۸-۵۸

MPA: microscopic polyangiitis, EGPA: Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis

آنتی‌ژن‌های درون سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها استفاده می‌شود. نمونه‌هایی که در این مرحله مثبت می‌شوند با استفاده از روش الایزا برای تعیین نوع اختصاصیت آنتی‌بادی‌ها (آنتی‌ژن‌های هدف) شامل آنتی‌بادی‌های علیه PR3 و MPO موردر بررسی قرار می گیرند (۴، ۱۱).

در سال ۱۹۵۹ برای اولین بار آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها (ANCA) در سرم افراد با بیماری‌های مزمن التهابی گزارش شد. در حالیکه ارتباط بین حضور این آنتی‌بادی‌ها و بیماری‌های واسکولیتی (بطور ویژه گلومرولونفریت) در سال ۱۹۸۵ توسط Vander woude و همکاران شان در یک مطالعه کوهورت بر روی بیماران آلمانی و دانمارکی با نام الگوی آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها (C-ANCA) گزارش شد (۱۲، ۱۳). بعدها در سال ۱۹۸۹ پس از الگوی C-ANCA، الگوی آنتی‌بادی‌های اطراف هسته ای ((Prenuclear علیه نوتروفیل‌ها به اختصار P-ANCA با روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFA) در بیماران با آرتریت سیستمیک و گلومرولونفریت گزارش شد. در همان زمان آنتی‌ژن‌های مرتبط با الگوهای C-ANCA و P-ANCA به ترتیب با نام های PR3 و MPO گزارش شدند (۱۳).

آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها (ANCA) در سایر بیماری‌های واسکولیتی عروق کوچک نظیر پلی آنژیت میکروسکوپیک (MPA)، گرانولوماتوز ائوزینوفیلیک همراه با پلی آنژیت (EGPA)، گلومرولونفریت کرسنتیک نکروزان (Necrotizing crescentic glomerulonephritis) نیز گزارش شده است. در ابتدا برای تشخیص PR3-ANCA و MPO-ANCA از روش الایزا غیر تجاری (in house) استفاده می‌شد ولی نتایج متناقض بین آزمایشگاه‌ها نیاز جهانی برای استاندارد سازی این تست را نشان داد (۴، ۷). در سال ۱۹۹۸ پانزده مرکز آزمایشگاهی در سراسر دنیا روش استاندارد برای سنجش آنتی‌بادی‌ها علیه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-25]

سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها (ANCA) و آنتی‌ژن‌های اختصاصی آن شامل PR3 و MPO را با روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم و الایزا در بیماران واسکولیت سیستمیک ایدیوپاتیک ارزیابی و استاندارد نمودند. نتیجه این استاندارد سازی سبب افزایش ارزش تشخیص ANCA با روش ایمونوفلورسنت و الایزا شد (جدول ۳) (۵، ۱۴، ۱۵).

یکی از مهمترین ارکان تجاری سازی یک محصول تامین مواد اولیه با کیفیت مناسب و پایدار است. اولین اقدام جهت تولید لام‌های ANCA جداسازی سلول‌های نوتروفیل خون محیطی با خلوص بالا و کیفیت استاندارد است. نوتروفیل‌های خون محیطی سلول‌هایی با عمر کوتاه و بسیار حساس بوده که قابلیت نگهداری طولانی مدت ندارند و توصیه می‌شود بلافاصله پس از خونگیری این سلول‌ها از خون تام جدا شوند. تا به امروز روش‌های متعددی برای جدا کردن نوتروفیل‌ها از خون محیطی معرفی شده است. در این مطالعه نشان داده شد با استفاده از روش دکستران و متعاقب آن جداسازی با روش گرادیانت سانتریفیوژ همراه با فایکول یکی از روش‌های مقرون به صرفه همراه با خلوص بالا برای تامین سوبسترای تست ANCA است (۱۶، ۱۷). گزارش های متعددی نشان داده اند که این روش اثر کمی بر روی مولکول ها و آنتی‌ژن‌های داخل سلولی نوتروفیل گذاشته و نوتروفیل‌ها را با خلوص بالاتری جدا می نماید (۱۳). البته روش‌های جداسازی با اثربخشی و همچنین سرعت بالاتر نظیر FACS و MACS نیز جهت مطالعات با اهداف متفاوتی نیز وجود دارند که بعلت هزینه بالا و استفاده در حجم خون محدود، قابلیت تجاری سازی برای جدا نمودن نوتروفیل‌ها در تعداد و حجم بالا را ندارند (۱۸-۲۰). در این مطالعه با استفاده از محلول دکستران ۴٪ و پس از آن جدا نمودن نوتروفیل‌ها توسط شیب گرادیانت ساتریفیوژ بر روی فایکول، سلول‌های نوتروفیل با خلوص بالای ۹۰٪ بدست آمد که بلافاصله جهت فیکس نمودن بر روی لام ها مورد استفاده قرار گرفت.

تا سال ۱۹۹۹ که استفاده از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای غربالگری بیماری‌های واسکولیت عروق کوچک مورد استاندارد سازی قرار گرفت گزارش های متعدی در مورد اثر فیکساتیوهای مختلف بر روی مولکول ها و آنتی‌ژن‌های درون سلول نوتروفیل‌ها منتشر شد (۲). در این مطالعات گزارش شد که استفاده از فیکساتور نظیر فرمالدئید و مشتقات آن می‌تواند بر بار الکتریکی آنتی‌ژن‌های کنار هسته اثر گذاشته و الگوهایی نظیر P-ANCA که ناشی ازاتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن‌هایی نظیر MPO باشد را تحت تاثیر قرار داده و تشخیص و شناسایی آن را بر روی سوبسترای نوتروفیل در زیر میکروسکوپ فلورسانت را ممکن نسازد (۸-۱۰). بدین منظور نیز توصیه مجامع علمی استفاده از سوبسترای نوتروفیلی با استفاده از محلول‌های فیکساتور (ثابت‌کننده) اتانول است. این محلول اثر کمی بر بار الکتریکی و ساختار آنتی‌ژن‌های درون سیتوپلاسم نوتروفیل بویژه آنتی‌ژن‌های اطراف هسته داشته و برای تمایز الگوهای C-ANCA و P-ANCA از حساسیت قابل قبولی برخوردار است. در این مطالعه ثابت نمودن (فیکس) سلول‌ها با استفاده از اتانول انجام شد و الگوی های اطراف هسته ای بخوبی از الگوی سیتوپلاسمیک متمایز شد.

در این مطالعه با استفاده از سلول‌های نوتروفیل جدا شده از خون محیطی انسان که بر روی لام با استفاده از محلول اتانول فیکس شده اند لام جهت انجام تست ANCA با روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم تهیه شد. مقایسه با نمونه تجاری مرجع (دارای گواهی IVD وتائیدیه CE) نشان داد که لام‌های تجاری تهیه شده دارای حساسیت تشخیصی برابر برای تشخیص الگوهای C-ANCA در افراد دارای سرم حاوی آنتی‌بادی علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها است. نتایج این مطالعه ابتدایی نشان می دهد که روش بکار برده شده در جداسازی و فیکس نمودن نوتروفیل‌ها می‌تواند برای تجاری سازی و تولید لام‌های ANCA بکار گرفته شود. در این زمینه علاوه بر بهینه نمودن مراحل جداسازی و فیکس نمودن سلول‌ها نیاز است جهت تولید انبوه و تجاری، پایداری لام‌های تهیه شده در زمان انبارش و نگهداری نیز ارزیابی و بهینه شود.

References

1. Baslund B, Segelmark M, Wiik A, Szpirt W, Petersen J, Wieslander J. Screening for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): is

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-25]

indirect immunofluorescence the method of choice?. Clin Exp Immunol.1995;99:486-492.

2. Davenport A, Lock R, Wallington T, Feest T. Clinical significance of anti-neutrophil cytoplasm antibodies detected by a standardized indirect immunofluorescence assay. QJM-Int J Med. 1994;87:291-299

3. Csernok E, Moosig F, Current and emerging techniques for ANCA detection in vasculitis. Nat Rev Rheumatol. 2014;10:494-501

4. Bossuyt X, Tervaert J-W, Arimura Y, Blockmans D, Flores-Suárez LF, Guillevin L, et al. Revised 2017 international consensus on testing of ANCAs in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. Nat Rev Rheumatol. 2017;13:683-692

5. Ball GV. The history of ANCA-associated vasculitis. Rheum Dis Clin N AM. 2010;36:439-446

6. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. Nat Med. 2009;15:623-625.

7. Rao DA, Wei K, Merola JF, O'Brien WR, Takvorian SU, Dellaripa PF, et al., Myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibodies (MPO-ANCA) and proteinase 3-ANCA without immunofluorescent ANCA found by routine clinical testing. J Rheumatol. 2015;42:847-852.

8. Chowdhury S, Broomhead V, Spickett G, Wilkinson R, Pitfalls of formalin fixation for determination of antineutrophil cytoplasmic antibodies. J Clin Pathol. 1999;5:475-477.

9. Shim YJ, Won D, Prefixation of Neutrophils for Neutrophil Antibody Testing. Lab Med. 2014;45:120-131.

10. Lin MW, Silvestrini RA, Culican S, Campbell D, Fulcher DA. A dual-fixed neutrophil substrate improves interpretation of antineutrophil cytoplasmic antibodies by indirect immunofluorescence. AM J Clin Pathol. 2014;142:325-330.

11. Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). AM J Clin Pathol. 1999;111:507-513.

12. Beauvillain C, Delneste Y, Renier G, Jeannin P, Subra JF, Chevailler AJC, et al., Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: how should the biologist manage them? Clin Rev Allergy Immunol. 2008;35:47-58.

13.Allard-Chamard H, Liang PJC, Antineutrophil cytoplasmic antibodies testing and interpretation. Clin Lab Med. 2019;39:539-552.

14. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, et al. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. Kidney Int. 1998;53:743-753.

15. Davies D, Moran J, Niall J, Ryan G. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? Brit Med J. 1982;282:606.

16. Maqbool M, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R. Optimisation of laboratory procedures for isolating human peripheral blood derived neutrophils. Med J Malaysia. 2011;66296-299.

17 .Mosca T, Forte WC. Comparative efficiency and impact on the activity of blood neutrophils isolated by Percoll, Ficoll and spontaneous sedimentation methods. Immunol Invest. 2016;45:29-37.

18 .Nauseef WM, Isolation of human neutrophils from venous blood. Methods Mol Biol. 2007;412:15-20.

19 .Quinn MT, DeLeo FR, Bokoch GM, Neutrophil methods and protocols. Preface. 2007;412:467-4.

20 .Nishibata Y, Matsuzawa S, Satomura Y, Ohtsuka T, Kuhara M ,Masuda S, et al., Neutrophil fixation protocols suitable for substrates to detect anti-neutrophil cytoplasmic antibodies by indirect immunofluorescence. Pathol-Res Pract. 2021;228:153661.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-25]