



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
فانزه 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

کلیدواژه‌ها

آنتی‌بادی علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها، لام تشخیصی، ایمونوفلورسانس غیرمستقیم، نوتروفیل، واسکوئیت

زمینه و هدف: آزمایش آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها (ANCA) اولین درخواست در تشخیص اولیه و غربال بیماران مشکوک به بیماری‌های خودایمن واسکوئیت 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 گرادینت 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 600 ± 950 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 کاملاً 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.

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 به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.

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

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 fluorescently 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 (\pm standard deviation) of the number of isolated neutrophils was 6000 (\pm 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.

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 Bowel 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 میکروسکوپی (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 الیزا مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. به صورت متداول دو آنتی‌ژن میلو پراکسیداز (MPO) و پروتئیناز-۳ (PR-3) از شایع‌ترین اهداف

روش کار

این مطالعه که از نوع طراحی-تولیدی می‌باشد از نوتروفیل‌های افراد سالم فاقد بیماری خونی، خود ایمنی و زمینه‌ای برای تهیه لام‌های ANCA استفاده شد. همچنین برای ارزیابی لام‌های تولید شده از سرم‌های ANCA مثبت و منفی تایید شده با کیت تجاری دارای تاییدیه CE و اداره کل تجهیزات پزشکی استفاده شد.

جداسازی نوتروفیل‌ها: خون وریدی همراه با ماده ضد K3-EDTA از ۵ فرد سالم فاقد هرگونه بیماری‌های خونی، زمینه‌ای و خودایمنی جدا شده و بصورت میکس (Pooled) استفاده شد. در هر مرحله از تهیه و آماده سازی لام‌ها، نمونه‌ها بصورت تازه تهیه شده و بلافاصله برای جداسازی نوتروفیل‌های اقدام شد. با استفاده از پروتکل دکستران-فایکول در دو مرحله نوتروفیل‌ها جداسازی شدند. به طور خلاصه خون تام تهیه شده با نسبت ۲ به ۳ با محلول دکستران ۴٪ (در ساعت انکوباسیون در دمای اتاق محلول رویی جدا سازی شده و به محلول فایکول ۱/۰۸۴ گرم در میلی‌لیتر (Ficoll-Paque 1.084 g/mL, GE, Sweden) به آهستگی اضافه گردید. پس از سانتریفیوژ در دمای اتاق ۳۰ دقیقه در ۴۰۰g رسوب زیر محلول فایکول جدا شد. به علت وجود تعداد کمی گلبول‌های قرمز، یک مرحله خالص‌سازی با استفاده از محلول‌های پوتونیک در زمان بسیار کوتاه (چند ثانیه) انجام شد. نوتروفیل‌های جدا شده با لام نئوبار و همچنین دستگاه شمارشگر اتوماتیک (Cell Counter) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از رنگ آمیزی رایت و گیمسا ظاهر و مورفولوژی سلول‌های نوتروفیل بررسی شد. همچنین درصد سلول‌های زنده توسط رنگ آمیزی تریپان بلو ۰/۴ درصد زنده قبل از فیکساسیون تعیین شد.

فیکس نمودن سلول‌ها بر روی لام: لام‌ها با طراحی ۱۰ چاهک از شرکت بهار افشان (Baharafshan, Tehran, Iran) خریداری شد. نوتروفیل‌های جدا شده متناسب با تعداد سلول استخراج شده با محلول سرم فیزیولوژیک (۰/۹ گرم در دسی لیتر) رقیق شدند، بطوری که در هر چاهک (گوده) تعداد بین ۴ تا ۸ هزار سلول قرار گرفت. به طور میانگین معادل تعداد ۱۰ تا ۵۰ ($30 \pm$) سلول در هر

اتوانتی‌بادی‌ها ضد آنتی‌ژن‌های سیتوپلاسمی نوتروفیل‌ها در بیماران واسکولیتی هستند. اگر چه ارتباط بالینی بیماری‌های واسکولیتی نامبرده شده با آنتی‌ژن‌های دیگری نظیر الاستاز، لاکتوفرین، آزروسیدین (Azurocidin)، لیزوزیم، H-Lamp-2 و سایر آنتی‌ژن‌های کمتر شناخته شده، نیز مشاهده شده است (۶، ۷).

الگوهای فلورسانس مرتبط با تست ANCA، با آنتی‌ژن‌های مورد هدف اتوانتی‌بادی‌های در بیماری خودایمن ارتباط دارد. بطوریکه اغلب الگوی c-ANCA (Cytoplasmic ANCA) با آنتی‌ژن‌های PR3 و الگو p-ANCA (Perinuclear ANCA) با آنتی‌ژن‌های MPO در ارتباط است. در این زمینه مطالعات مختلف تایید کرده‌اند که بیماری گرانولوماتوز همراه با پلی آنژیت (گرانولوماتوز واگنر) در ۸۰ تا ۹۰ درصد موارد با الگوی c-ANCA و ۵۰ تا ۸۰ درصد موارد، الگوی p-ANCA با بیماری پلی آنژیت میکروسکوپییک همراهی دارد (۵-۷).

مطالعات متعددی از سال ۱۹۹۰ در مورد بهینه نمودن لام‌های سوبسترای نوتروفیلی منتشر شده است. در اکثر این مطالعات نشان داده شده است که استفاده از فیکساتیو‌ها مختلف برای نوتروفیل‌ها اثر مهمی در ایجاد و تمایز الگوی ایمونوفلورسانس در تست ANCA دارند. در حال حاضر استفاده از محلول‌های ثابت‌کننده بر پایه اتانول کاربرد بیشتری نسبت به فیکساتیوهای فرمالینی برای فیکس نمودن نوتروفیل‌ها دارند (۸-۱۰). در حال حاضر محصولات و لام‌ها با سوبسترای نوتروفیلی مورد استفاده برای انجام تست ANCA در ایران وارداتی بوده و در کشور این گونه لام‌ها بصورت تجاری تولید نمی‌شوند. هدف از این مطالعه طراحی و تهیه لام‌های تشخیصی آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها (ANCA) به روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم است و در مرحله بعد با بهینه نمودن الگوهای فلورسانس برای تشخیص انواع مختلف آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها با روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم است که می‌تواند مرحله ابتدایی و نخستین از بومی‌سازی و تولید تجاری سوبستراهای (لام‌های) تشخیص آزمایشگاهی تست ANCA در کشور باشد.



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.

شده به خوبی همگن و یکنواخت شدند. مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده به همراه گروه کنترل منفی و مثبت به چاهکها اضافه شدند. لام‌های حاوی نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در اتاقک مرطوب در دمای اتاق نگهداری شدند. سرم‌ها 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 لام‌ها 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 لام‌ها در جار حاوی PBS همراه با حرکت، ۳ بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند (دور از نور). لام‌ها 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 رطوبت‌گیر به منظور خشک نمودن اطراف چاهکها 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 لام‌ها بررسی شدند. برای نمونه‌های مثبت این مراحل با استفاده از رقت‌های سریالی سرم (۲۰-۴۰-۸۰-۱۶۰) تا کسب نتیجه منفی

شان با عدسی شیء ۴۰X قرار گرفت. با استفاده از فیکساتور اتانول خالص (Pure) سلول‌ها بر روی لام شیشه‌ای 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 بسته‌های نم‌گیر 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 آنتی‌بادی‌های 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 اتوانتی‌بادی‌های متصل شده توسط آنتی‌گلوبولین 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 اندازه‌گیری 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

تکرار شدند. نتیجه آزمایش به صورت واکنش منفی (بدون مشاهده نور فلورسانس در سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها) و برای نمونه‌های مثبت با تعیین تیترو و ذکر الگو انجام شد. نمونه‌های مثبت به صورت ۲ الگوی شایع سیتوپلاسمی و اطراف هسته ای گزارش شدند. تیترو مثبت اولیه تعیین شده در آزمایش ۱:۲۰ است که برای نمونه‌های مثبت رقت‌های سریالی با ضریب ۲ شامل تیتروهای ۱:۴۰، ۱:۱۶۰ و بیشتر ۱:۱۶۰ گزارش شد آخرین تیترو 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 تأییدیه 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.

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

تجزیه و تحلیل اطلاعات با آزمون‌های 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

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

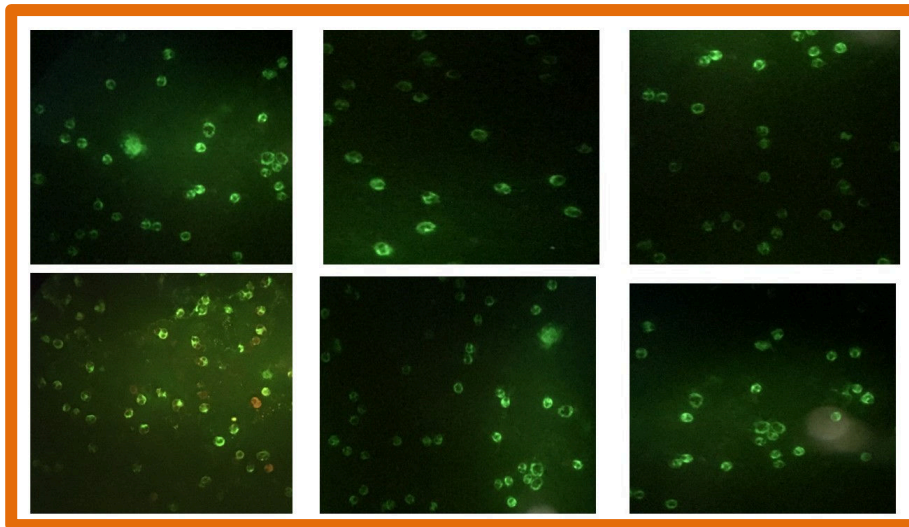
گروه	نمونه های منفی	نمونه های مثبت
	۳۰	۵۰
لام تهیه شده	۳۰	۵۰
لام تجاری (GA)	۳۰	۵۰

† 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 تیترو ۱:۲۰	نمونه های مثبت با تیترو ۱:۴۰	نمونه های مثبت با تیترو 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



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)			
	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

در 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 نام‌های PR3 و MPO گزارش شدند (۱۳).

آنتی‌بادی‌ها علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها (ANCA) در سایر بیماری‌های واسکولیتی عروق کوچک نظیر پلی آنژییت میکروسکوپی (MPA)، گرانولوماتوز ائوزینوفیلیک همراه با پلی آنژییت (EGPA)، گلومرولونفریت کرسنتیک نکرروزان (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

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 مورد بررسی قرار می‌گیرند (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-

مولکول‌ها 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 الگوهای نظیر P-ANCA که ناشی از اتصال 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 ANCA IVD و تائیدیه 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 می‌دهد 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

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 گرادینانت سانتیفریوژ همراه با فایکول یکی از روش‌های مقرون به صرفه همراه با خلوص بالا برای تامین سوبسترای تست ANCA است (۱۶، ۱۷). گزارش‌های متعددی نشان داده اند که این روش اثر کمی بر روی مولکول‌ها و آنتی‌ژن‌های داخل سلولی نوتروفیل گذاشته و نوتروفیل‌ها را با خلوص بالاتری جدا می‌نماید (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 گرادینانت سانتیفریوژ بر روی فایکول، سلول‌های نوتروفیل با خلوص بالای ۹۰٪ بدست آمد که بلافاصله جهت فیکس نمودن بر روی لام‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

تا سال ۱۹۹۹ که استفاده از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای غربالگری بیماری‌های واسکولیت عروق کوچک مورد استاندارد سازی قرار گرفت گزارش‌های متعددی در مورد اثر فیکساتیوهای مختلف بر روی

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, Schönemarker 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;66:296-299.

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.