


CS

Protilátky proti cytoplasmě neutrofilů (fixováno-formolem)

REF
A060PL
IVD
Rx Only

50

URČENO K POUŽITÍ

Standardní metody IFA umožňují pozorování několika různých vzorců. Dva dobře definované vzorce jsou C-ANCA a P-ANCA. Vzorec P-ANCA vykazuje nerovnoměrné granulární zbarvení cytoplazmy. Během 2. mezinárodního ANCA workshopu bylo dohodnuto, že tyto dva odlišné vzorce by měly být použity pro podklasifikaci protilátek.

Detekce protilátek proti cytoplasmě neutrofilů (ANCA) pomocí metod IFA se ukázala jako užitečná pomůcka při hodnocení diagnózy pacienta a do určité míry i jeho prognózy a reakce na terapii. Ačkoli bylo provedeno mnoho studií s IFA ANCA, dostupnost EIA testu specifického pro MPO (enzymová imunotestová analýza) dále zlepšila celkový diagnostický obraz. Použití EIA a IFA současně umožňuje co nejlepší hodnocení pacienta. MPO a PR3 EIA umožňují velmi rychlé kvalitativní i kvantitativní hodnocení.

ZÁSADA TESTU

Primární reakce v tomto testu spočívá v interakci lidské protilátky (sérum pacienta) se specifickým antigenem (lidskými granulocyty). Pokud je v séru pacienta přítomna ANCA protilátka, dojde k vytvoření komplexu antigen–protilátka. Tento komplex je následně označen konjugátem antihuman s označením FITC, který umožňuje vizualizaci reakce pomocí mikroskopu.

REAGENCIE

Dodané materiály:

1. Konjugát FITC IgG (3 ml) je po obdržení nutné skladovat při teplotě 2 – 8 °C. Konjugát je při této teplotě stabilní až do data expirace uvedeného na etiketě.
2. Preparáty antigenů ANCA (lidské granulocyty) fixované formalinem je po obdržení nutné skladovat při teplotě 2 – 8 °C. Zkontrolujte na etiketě konkrétní datum expirace.
3. Pozitivní kontrola P-ANCA (0.5 ml), vykazující vzorec P-ANCA, by měla být po obdržení skladována při teplotě 2 – 8 °C. Zkontrolujte na etiketě konkrétní datum expirace.
4. Negativní kontrola ANCA (0.5 ml) by měla být po obdržení skladována při teplotě 2 – 8 °C. Zkontrolujte na etiketě konkrétní datum expirace.
5. Sada pufrů – fosfátově pufovaný roztok (PBS) je stabilní při pokojové teplotě. Zkontrolujte na etiketě konkrétní datum expirace. Pufr je třeba rekonstituovat 1 litrem destilované vody (DI H₂O). Rekonstituovaný pufr neobsahuje konzervační látky a měl by být skladován při teplotě 2 – 8 °C. Je nutné dbát na zabránění kontaminace.
6. Montážní médium by mělo být skladováno při teplotě 2 – 8 °C. Zkontrolujte na etiketě konkrétní datum expirace.

Každá sada obsahuje následující součásti v dostatečném množství pro provedení počtu testů uvedeného na obalu.

SLD	Podložní skříčka ANCA: deset 5-jamkových skříček s absorpčním papírem a sáčkem s vysoušečem.
CONJ	Konjugát: Kozi protilátka proti lidskému IgG značená FITC. Obsahuje fosfátový pufr s BSA a kontrastní barvivo. Dva jantarové lahvičky po 3 ml. Připraven k použití.
CTRL +	Pozitivní kontrola p-ANCA: Obsahuje lidské sérum pozitivní na p-ANCA spolu s konzervačními látkami. Jeden mikrozkušavka s oranžovým víčkem, 0.5 ml, připraveno k použití.
CTRL -	Negativní kontrola: Obsahuje lidské sérum negativní na ANCA spolu s konzervačními látkami. Jedna mikrozkušavka se zeleným víčkem, 0.5 ml, připraveno k použití.
COVGLS	Krycí skříčko. Balení dvanácti kusů, rozměry 24 x 60 mm, tloušťka č. 1.

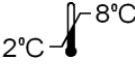
BUF PBS	Fosfátově pufovaný roztok (PBS): pH 7.2 ± 0.2. Obsah každého balení pufru vysypte do jednoho litru destilované nebo deionizované vody. Míchejte, dokud se všechny soli úplně nerozpustí. Dva balíčky, dostatečné k přípravě 2 litrů roztoku.
MNTMED	Montážní médium (pufovaný glycerol): Dvě lahvičky s bílým uzávěrem, průhledné, po 3 ml, obsah 3 ml. Připraveno k použití.

POZNÁMKA: Konjugát a kontroly obsahují kombinaci Proclinu (0.05 % obj./obj.) a azidu sodného (<0.1 % hm./hm.) jako konzervačních látek.

MATERIÁLY POTŘEBNÉ, ALE NEZAHRNUTÉ

1. Stojan na zkumavky nebo mikrotitrační systém.
2. Mikropipeta s rozsahem 2 – 20 µl.
3. Stupňované skleněné pipety.
4. 1 l stupňovaný válec.
5. Barvicí miska.
6. Vlhká komora.
7. Čisté nádoby na zředěné pufrů.
8. Destilovaná nebo deionizovaná voda.
9. Fluorescenční mikroskop.
10. Papírový ručník bez vláken.
11. Časovač (60 minutový rozsah).

PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ

	Neotevřená sada.
	Preparáty, kontrolní vzorky a konjugát by měly být skladovány při teplotě 2–8 °C.
	Rehydratovaný PBS (stabilní po dobu 30 dnů).
*Po otevření musí být preparáty použity tentýž den. Ostatní připravené reagenty, kromě PBS, lze použít do uvedeného data spotřeby.	

OPATŘENÍ

Upozornění:

1. Všechny lidské složky byly testovány na (HBsAg) a HTLVIII/LAV metodou schválenou FDA a byly shledány negativními (ne opakovaně reaktivními). Toto však nezaručuje absenci HBsAg nebo HTLVIII/LAV. Se všemi lidskými složkami by mělo být zacházeno s odpovídající opatrností.
2. Sodík azid (<0.1 %) obsažený v kontrolách a konjugátu je při požití toxický.
3. Nepoužívejte složky po uplynutí jejich doby použitelnosti.
4. Postupujte přesně podle pokynů uvedených v tomto návodu, aby byly výsledky platné.
5. K in vitro diagnostickému použití
6. Manipulujte s preparáty za okraje, protože přímý tlak na antigenové jamky může antigen poškodit.
7. Jakmile je postup zahájen, nedovolte vyschnutí antigenu v jamkách. To by mohlo vést k falešně negativním výsledkům testu nebo nežádoucím artefaktům.
8. Používejte pro každý vzorek a reagent samostatné pipetové špičky, aby se zabránilo křížové kontaminaci.
9. Reagenty by měly být kontrolovány na známky bakteriální nebo plísňové kontaminace.
10. Nepoužívejte znovu podkladový preparát.

ODBĚR SÉRA

Sérologické vzorky by měly být odebírány za aseptických podmínek. Hemolýza se zabrání rychlým oddělením séra od sraženiny. Sérum by mělo být skladováno při teplotě 2–8 °C, pokud má být analyzováno během několika dnů. Sérum může být uchováváno po dobu 3 až 6 měsíců při teplotě -20 °C nebo nižší. Lipemické a silně hemolytické sérum by mělo být vyvarováno. Při přepravě vzorků při pokojové teplotě se důrazně doporučuje přidání konzervační látky, jako je 0.01 % thimerosal nebo méně než 0.1 % sodíku azidu.

POSTUP TESTOVÁNÍ

Skríníng: Zřed'te testovací sérum v poměru 1:20 (1 díl vzorku pacienta na 19 dílů ředidla) v PBS.n

Titrování: Přípravte zdvojnásobující se ředění séra začínající ředěním 1:20 (tj. 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 atd.). Preparáty jsou připraveny k použití poté, co dosáhnou pokojové teploty.

1. Nechte preparát dosáhnout pokojové teploty před otevřením obalu. Roztrhněte obal na zářezu. Opatrně vyjměte preparát a vyhněte se dotýkání antigenových oblastí. Preparát je nyní připraven k použití.
2. Na antigenové jamky naneste 30 μ l séra.
3. Umístěte preparát s pacientovým sérem a kontrolami do vlhké komory na 35 ± 5 minut při pokojové teplotě (přibližně 20–25 °C).
4. Vyjměte preparát z vlhké komory. Pomocí mycí lahvičky jemně opláchněte zbytky séra z preparátu, přičemž se vyhněte přímému směřování proudu na jamku.
5. Propláchněte v PBS (kat. č. 1601) ve dvou samostatných pěti minutových změnách.
6. Položte na laboratorní stůl savý papír savou stranou nahoru. Vyjměte preparát z PBS a obraťte ho tak, aby podkladová strana směřovala k savé straně papíru. Zarovnejte jamky s otvory na papíru. Položte preparát na savý papír. Nedovolte vyschnutí podkladu.
7. Otřete zadní stranu preparátu suchým papírovým ručníkem bez vláken. Při otírání vyvíjejte dostatečný tlak, aby se absorboval pufr. Nedovolte vyschnutí podkladu.
8. Na každou antigenovou jamku naneste 30 μ l konjugátu. Opakujte kroky 3–7.
9. Na preparát naneste 4–5 kapek montážního média.
10. Přiložte krycí sklíčko. Preparát prohlédněte pod fluorescenčním mikroskopem.

Poznámka: Pro zachování fluorescence skladujte nasklíčovaný preparát ve vlhké komoře umístěné v temné chladničce.

Poznámka: Je třeba dbát na to, aby doba inkubace nebo oplachování nebyla prodlužována. Podklad by byl tím ovlivněn a výsledkem by byla špatná morfologie.

KONTROLA KVALITY

1. V každodenním testování musí být zahrnuty pozitivní a negativní kontrolní sérum, aby byla potvrzena reprodukovatelnost, citlivost a specifita testovacího postupu.
2. Negativní kontrolní sérum by mělo vykazovat minimální (+) nebo žádnou fluorescenci. Pokud tato kontrola vykazuje silnou fluorescenci, může být problém v kontrolním antigenovém podkladu, konjugátu nebo v technice.
3. Pozitivní kontrolní sérum by mělo vykazovat jasnou fluorescenci v rozsahu 3+ až 4+. Pokud tato kontrola vykazuje minimální nebo žádnou fluorescenci, může být problém v kontrole, antigenu, konjugátu nebo technice.
4. Kromě pozitivních a negativních kontrol séra by měla být provedena kontrola s PBS, aby se ověřilo, že konjugát nevyvolává nespecifické barvení antigenového podkladu. Pokud antigenový podklad vykazuje jasnou fluorescenci v PBS kontrole, proveďte opakování testu s čerstvým konjugátem. Pokud podklad stále fluoreskuje, může být problém v konjugátu nebo antigenu.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pozitivní

Pozitivní výsledek je hlášen, když cytoplazma lidského granulocytového podkladu vykazuje fluorescenci 1+ nebo vyšší. P-ANCA a C-ANCA způsobí podobné nerovnoměrné granulární zbarvení cytoplazmy při fixaci formalinem.

C-ANCA a P-ANCA se mohou vyskytovat současně.

Protilátky C-ANCA jsou spojeny s klasickou granulomatózou s poliagitidou (GPA).

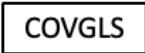
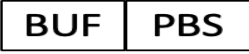
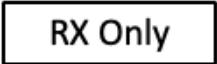
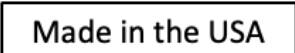
Protilátky P-ANCA (MPO) jsou spojeny s onemocněními omezenými na ledviny.

Negativní

Sérum je považováno za negativní na ANCA, pokud je fluorescencí cytoplazmy méně než 1+. Pacienti by měli být testováni na substrátu ANA HEp-2, aby se předešlo záměně s atypickými ANCA. Atypické ANCA barví cytoplazmu buněk HEp-2, zatímco pravé ANCA jsou na substrátu HEp-2 negativní, pokud pacient nemá současně protilátky ANA i ANCA.

SLOVNÍK SYMBOLŮ

Na označení tohoto produktu mohly být použity následující symboly.

Symbol	Popis	Symbol	Popis
	Výrobce		Chraňte před slunečním zářením
	<i>In vitro diagnostický lékařský prostředek</i>		Jediné použití jamky testu
	Katalogové číslo		Krycí sklíčko
	Dostatečné pro n testů		Preparát ANCA substrátu (lidské granulocyty)
	Šaržový kód		PBS pufr
	Použít do		Montážní médium
	Omezení skladovací teploty		Konjugát
	Pouze na lékařský předpis		Pozitivní kontrola
	Konzultovat do elektronického pokyny k použití		Negativní kontrola
	Skladujte ve vzpřímené poloze		Vyrobeno v USA

Bibliografie

1. Wilk A a van der Woude F: Protilátky proti cytoplazmě neutrofilů (ANCA): Historický přehled. APMIS 97 (Dodat. 6):7, 1989.
2. Wilk A: Vymezení standardního postupu pro detekci ANCA nepřímou imunofluorescencí. APMIS 97 (Dodat. 6):12–13, 1989.
3. Rasmussen N a Wilk A: Vyšetření IgG-ANCA nepřímou imunofluorescencí v sérech zaslaných na 1. mezinárodní workshop o ANCA, 1988. APMIS 97 (Dodat. 6):16–20, 1989.
4. van der Woude FJ a kol.: Autoprotilátky proti neutrofilům a monocytům: Nástroje pro diagnostiku a ukazatel aktivity onemocnění u Wegenerovy granulomatózy. Lancet, 13. února:425–429, 1985.
5. Falk R.J. a Jennette J.C.: Autoprotilátky proti cytoplazmě neutrofilů se specificitou pro myeloperoxidázu u pacientů se systémovou vaskulitidou a idiopatickou nekrotizující a srpkovitou glomerulonefritidou. N Engl J Med 38(25):1651–1657, 1988.
6. Goldschmeding R. a kol.: Odlišné imunologické specifity a asociace onemocnění u c-ANCA a p-ANCA. Neth J Med 36(3):121–125, 1990.



ZEUS Scientific
200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
Bezplatná linka (USA): 1-800-286-2111, Volba 2
Mezinárodní: +1 908-526-3744
Fax: +1 908-526-2058
Webové stránky:
[www.zeusscientific.com](<http://www.zeusscientific.com>)
dIFine je registrovaná ochranná známka společnosti ZEUS Scientific

Pro zákaznický servis v USA kontaktujte ZEUS Scientific, volejte bezplatně nebo napište na e-mail orders@zeusscientific.com.
Pro technickou podporu v USA kontaktujte ZEUS Scientific, volejte bezplatně nebo napište na e-mail support@zeusscientific.com.
Pro dotazy ohledně zákaznického servisu a technické podpory mimo USA kontaktujte svého místního distributora.

EC	REP
----	-----

Emergo Europe
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

