

**CS**

ASA (Jícen Opice)

REF**FA6001****IVD****Rx Only****80**

URČENO K POUŽITÍ

Souprava Protilátka proti kůži (ASA) je určena pro kvalitativní a semikvantitativní detekci protilátek spojených s pemfigem a bulózním pemfigoidem pomocí techniky nepřímé imunofluorescenční analýzy (IFA) a je určena pro diagnostické použití *in vitro*.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ

Většina odborníků se shoduje, že je vhodné provádět sérologické testy na přítomnost protilátek u všech případů podezření na pemfigus vulgaris (PV) a bulózní pemfigoid (BP) (1–4). Specifické protilátky lze prokázat prakticky ve všech aktivních případech, zejména pokud jsou testy opakovány v různých fázích onemocnění (1). Nejčastěji doporučovaným substrátem pro tyto sérologické testy je jícen opice (6). Pomocí tohoto substrátu lze v jednom testu detekovat specifické protilátky jak pro PV, tak pro BP. Protilátky proti PV reagují s mezibuněčnými látkami mezi buňkami dlaždicového epitelu jícnu opice, zatímco protilátky proti BP reagují se základní membránou vrstvy dlaždicového epitelu (1, 4, a 6). Barvení jader dlaždicového epitelu antinukleárními protilátkami se může objevit, pokud bylo sérum získáno od pacientů se systémovým lupusem nebo jinými onemocněními pojivové tkáně (7). Výrazné mezibuněčné barvení může být detekováno u případů pemfigus vegetans, pemfigus foliaceus (včetně brazilské formy) a pemfigus erythematosus (1). Ačkoli samotný sérologický test nestačí k určení dávkování léčivé terapie u PV, pokles titru na polovinu je známkou účinné kontroly průběhu onemocnění. U BP sice existuje určitá souvislost mezi titrem a aktivitou onemocnění, prognostická hodnota je však menší než u PV kvůli kolísání titru. Sérologické testy mohou být diagnostické pro PV nebo BP; nicméně často je vhodné provést přímé imunohistochemické vyšetření biopsií kožních lézí (1, 2). Přímé imunofluorescenční vyšetření kožních biopsií může být usnadněno použitím fixačního a promývacího roztoku ZEUS pro tkáně, připraveného podle Michela (5). Tento nový fixační roztok eliminuje nutnost okamžitého zmrazení vzorku biopsie a umožňuje přepravu čerstvých tkáňových biopsií kůže a jiných tkání až po dobu 5 dnů při pokojové teplotě.

PRINCIP TESTU

ASA (Jícen Opice) je navržen k detekci přítomnosti cirkulujících protilátek proti pemfigu a bulóznímu pemfigoidu v lidském séru. Test využívá tkáňový substrát z jícnu opice a koží anti-lidskou imunoglobulinovou protilátku upravenou pro optimální ředění a bez nespecifického pozadí. Reakce probíhá ve dvou krocích:

1. Krok jedna je interakce protilátek proti kůži v séru pacienta s jícnem opice..
2. Krok dva je interakce FITC–značené anti-lidské imunoglobulinové protilátky s protilátkami navázanými na mezibuněčný cement epitelálních buněk u pemfigu nebo na zónu bazální membrány u bulózního pemfigoidu v případě pozitivního testu (podrobnosti viz část Postup testu).

ASA (jícen opice) detekuje protilátky jak proti pemfigu vulgaris (PV), tak proti bulóznímu pemfigoidu (BP). Test je obzvláště užitečnou laboratorní pomůckou při diagnostice PV a BP, protože většina neléčených pacientů s aktivním onemocněním má v séru přítomné protilátky proti kůži.

REAGENCIA

Dodávaný materiál:

Každá souprava obsahuje následující komponenty v množství postačujícím k provedení počtu testů uvedeného na etiketě obalu.

POZNÁMKA: Konjugát a kontroly obsahují kombinaci Proclínu (0.05 % v/v) a azidu sodného (<0.1 % w/v) jako konzervační látky.

S L D	Podložní skříčka s jícnem opice: Deset osmikomorových skříček s absorpčním papírem a sáčkem s vysoušedlem.
CONJ	Konjugát: Kozí anti-lidská imunoglobulinová protilátka (IgG) značená fluorescein-isothiokyanátem (FITC). Obsahuje fosfátový pufr s BSA a kontrastním barvivem. Dvě lahvičky po 3.5 mL s jantarovým uzávěrem. Připraveno k použití.
CTRL + 1	PV pozitivní kontrola (lidské sérum): Způsobí obarvení dlaždicových epiteliálních buněk substrátu. Jedna lahvička o objemu 0.5 mL s červeným uzávěrem. Připraveno k použití.
CTRL + 2	BP pozitivní kontrola (lidské sérum): Způsobí obarvení bazální membrány substrátu. Jedna lahvička o objemu 0.5 mL s modrým uzávěrem. Připraveno k použití.
CTRL -	Negativní kontrola (lidské sérum): Nezpůsobí žádné obarvení substrátu. Jedna lahvička o objemu 0.5 mL se zeleným uzávěrem. Připraveno k použití.
BUF PBS	Fosfátový pufr se solným roztokem (PBS): pH 7.2 ± 0.2. Obsah každého sáčku s pufrem nasypete do jednoho litru destilované nebo deionizované vody. Míchejte, dokud se všechny soli důkladně nerozpustí. Dva sáčky, postačující k přípravě 2 litrů.
MNTMED	Montovací médium (pufrovaný glycerol): Jedna lahvička o objemu 3.0 mL s bílým uzávěrem a kapací špičkou.
COVGLS	Krycí skříčka: Balení dvanácti kusů, 24 x 60 mm, tloušťka č. 1.

POZNÁMKY:

1. Následující komponenty nejsou závislé na čísle šarže soupravy a mohou být používány zaměnitelně se systémy Sebia IFA Test, pokud jsou čísla produktů shodná: Montovací médium (produkt č.: FA0009S), PBS (produkt č.: 0008S) a krycí skříčka (produkt č.: S8007).

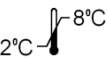
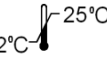
MATERIÁLY POŽADOVANÉ, ALE NEZABEZPEČENÉ

1. diFine® automatizovaný mikroskop nebo řádně vybavený fluorescenční mikroskop s FITC filtrem (450–490 nm).
2. Malé sérologické, Pasteurovy, kapilární nebo automatické pipety.
3. Jednorázové špičky pro pipety.
4. Malé zkušavky, 13 x 100 mm nebo srovnatelné.
5. Stojánky na zkušavky.
6. Barvicí miska: Velká barvicí miska s malým magnetickým míchacím zařízením poskytuje ideální mechanismus pro promývání skříček mezi inkubačními kroky.
7. Destilovaná nebo deionizovaná voda.
8. Odměrný válec o objemu 1 litr.
9. Laboratorní časovač pro sledování inkubačních kroků.
10. Nádoba na odpad, jednorázové rukavice a dezinfekční prostředek (např. 10% domácí bělidlo – 0.5% chlornan sodný).
Následující filtrační systémy, nebo jejich ekvivalenty, byly shledány jako vyhovující pro běžné použití s přenášeným nebo dopadajícím světlem v sestavách temného pole:

Specifikace pro LED zdroje přenášeného světla:		
Světelný zdroj: Rtuťová výbojka 200 W nebo 50 W		
Excitační Filtr	Excitační Filtr:	Excitační Filtr:
KP490	KP490	KP490
BG12	BG12	BG12
FITC	FITC	FITC
Světelný zdroj: Wolfram-halogenová žárovka 100 W		
KP490	KP490	KP490

Dopadající světlo			
Světelný zdroj: Rtuťová výbojka 200 W, 100 W, 50 W			
Excitační Filtr:	Excitační Filtr:	Excitační Filtr:	Excitační Filtr:
KP500	KP500	KP500	KP500
FITC	FITC	FITC	FITC
Světelný zdroj: Wolfram-halogenová žárovka 50 W a 100 W			
KP500	KP500	KP500	KP500
FITC	FITC	FITC	FITC

PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ

	Neotevřená souprava.
	Montovací médium, konjugát, sklíčka, pozitivní a negativní kontroly.
	Rehydratovaný PBS (stabilní po dobu 30 dnů).
	Sáčky s fosfátovým pufrům se solným roztokem (PBS).

OPATŘENÍ

1. Pouze pro diagnostické použití in vitro.
2. Dodržujte běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními činidly. V případě kontaktu s očima okamžitě vypláchněte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Noste vhodný ochranný oděv, rukavice a ochranu očí/obličeje. Nevdechujte páry. Likvidujte odpad v souladu se všemi místními, státními a federálními předpisy.
3. Jamky na sklíčku neobsahují životaschopné organismy. Přesto je považujte za **potenciálně biologicky nebezpečný materiál** a manipulujte s nimi podle toho.
4. Kontroly představují **potenciálně biologicky nebezpečný materiál**. Zdrojové materiály, ze kterých byly tyto produkty získány, byly testovány a vykázaly negativní výsledky na antigen HIV-1, HBsAg a na protilátky proti HCV a HIV schválenými testovacími metodami. Jelikož však žádná testovací metoda nemůže zaručit úplnou nepřítomnost infekčních agens, měly by být tyto produkty zpracovávány na úrovni biologické bezpečnosti 2, jak je doporučeno pro jakýkoli potenciálně infekční lidský vzorek séra nebo krve v příručce center pro kontrolu nemocí/národních zdravotních institutů „Biologická bezpečnost v mikrobiologických a biomedicínských laboratořích“ – aktuální vydání; a ve standardu OSHA pro patogeny přenášené krví (20).
5. Dodržení stanovené doby a teploty inkubací je nezbytné pro dosažení přesných výsledků. **Všechna činidla musí před zahájením testu dosáhnout pokojové teploty (20–25 °C).** Nepoužitá činidla okamžitě vraťte do jejich původních obalů a dodržujte podmínky skladování.
6. Nesprávné promývání může způsobit falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky. Před přidáním konjugátu se ujistěte, že jste minimalizovali množství zbytkového PBS odsátím. Nenechte jamky mezi inkubacemi vyschnout.
7. Konjugát a kontroly obsahují azid sodný v koncentraci <0.1 % (w/v). Bylo zjištěno, že azid sodný může v laboratorním potrubí tvořit azidy olova nebo mědi, které mohou při úderu explodovat. Aby se tomu zabránilo, důkladně opláchněte dřez vodou po vylití roztoků obsahujících azid sodný. Tento konzervační prostředek může být toxický při požití.
8. Ředění nebo falšování těchto činidel může vést k chybným výsledkům.
9. Nikdy nepipetujte ústy. Zabraňte kontaktu činidel a patientských vzorků s pokožkou a sliznicemi.
10. Zabraňte mikrobiální kontaminaci činidel. Může dojít k nesprávným výsledkům.
11. Křížová kontaminace činidel a/nebo vzorků může vést k chybným výsledkům.
12. Znovupoužitelné skleněné nádoby musí být umyty a důkladně opláchnuty, aby bylo zcela zbaveno všech detergentů.
13. Zabraňte rozstřikování nebo tvorbě aerosolů.
14. Nevystavujte činidla silnému světlu během skladování nebo inkubace.
15. Necháň balení se sklíčky vyrovnat na pokojovou teplotu před otevřením ochranného obalu ochrání jamky a absorpční papír před kondenzací.
16. Zachyťte promývací roztok do nádoby na odpad. Ošetřete odpadní roztok dezinfekčním prostředkem (např. 10% domácí bělidlo – 0.5% chlornan sodný). Zabraňte vystavení činidel parám z bělidla.

17. Nevystavujte žádná reaktivní činidla roztokům obsahujícím bělidlo ani silným výparům z těchto roztoků. I stopová množství bělidla (chlornanu sodného) mohou zničit biologickou aktivitu mnoha reaktivních činidel obsažených v této soupravě.
18. Nevývíjejte tlak na obal se sklíčky. Mohlo by dojít k poškození substrátu.
19. Komponenty této soupravy jsou vzájemně sladěny pro optimální citlivost a reprodukovatelnost. Činidla od jiných výrobců by neměla být zaměňována. Pečlivě dodržujte pokyny v příbalovém letáku.
20. Neotevřené/otevřené komponenty jsou stabilní až do data expirace uvedeného na etiketě, za předpokladu, že jsou přísně dodržovány doporučené podmínky skladování. Nepoužívejte po datu expirace. Nezmrazujte.
21. Kontrastní barvivo Evansova modř je potenciálně karcinogenní. Při kontaktu s pokožkou opláchněte vodou. Likvidujte v souladu s místními předpisy.
22. Nenechte sklíčka během postupu zaschnout. V závislosti na podmínkách v laboratoři může být nutné umístit sklíčka během inkubace do vlhké komory.

ODBĚR VZORKŮ

1. Odběr vzorků provádějte v souladu s dokumentem CLSI M29: Ochrana laboratorních pracovníků před pracovními infekčními nemocemi. Žádná známá testovací metoda nemůže zaručit, že vzorky lidské krve nepřenese infekci. Proto by všechny krevní deriváty měly být považovány za potenciálně infekční.
2. Používejte pouze čerstvě odebraná a správně chlazená séra získaná schváleným aseptickým postupem venepunkce pro tento test (8). Nesmí být přidány žádné antikoagulanty ani konzervační látky. Vyhněte se použití hemolytických, lipemických nebo bakteriálně kontaminovaných sér.
3. Vzorek uchovávejte při pokojové teplotě maximálně 8 hodin. Pokud není test proveden do 8 hodin, může být sérum skladováno při teplotě mezi 2–8 °C po dobu nejvýše 48 hodin. Pokud se předpokládá delší prodleva v testování, uchovávejte testovací sérum při –20 °C nebo nižší teplotě. Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování, které může způsobit ztrátu aktivity protilátek a vést k chybným výsledkům. Je odpovědností každé laboratoře, aby na základě dostupné literatury a/nebo vlastních studií stanovila kritéria stability pro své podmínky (11).

POSTUP TESTU

1. Vyjměte sklíčka ze skladování v chladničce a nechte je ohřát na pokojovou teplotu (20–25 °C). Roztrhněte ochranný obal a vyjměte sklíčka. **Nevytlačujte tlakem ploché strany ochranného obalu.**
2. Označte každou jamku příslušným sérem pacienta a kontrolami. **POZNÁMKA: Kontroly se používají neriedené.** Připravte ředění 1:10 (např.: 10 µL séra + 90 µL PBS) z každého patientského séra.

Možnosti ředění:

- a. Uživatelé mohou pozitivní kontrolu titrovat až do koncového ředění, aby sloužila jako semikvantitativní kontrola (1+ minimálně reaktivní). V takových případech by měla být kontrola ředěna dvakrát v PBS. Koncové ředění je stanoveno a vytištěno na lahvičce s pozitivní kontrolou (± jedno ředění). Je třeba poznamenat, že vzhledem k variacím v laboratoři (zařízení atd.) by každá laboratoř měla stanovit své vlastní očekávané koncové ředění pro každou šarži pozitivní kontroly.
- b. Při titraci vzorků pacientů by měla být počáteční i všechna následující ředění připravena výhradně v PBS.
3. Sklíčka promyjte 3–5 minut v PBS.
4. Vyjměte sklíčka z PBS a osušte je pomocí absorpčního papíru se šesti jamkami. Doporučuje se položit absorpční papír na rovný povrch. Poté položte podložní sklíčko s tkání obráceně na absorpční papír. Pevně přitlačte na zadní stranu sklíčka. Během celého testu nedovoďte, aby substrátová tkáň vyschla.
5. Pomocí vhodného dávkovače (uvedeného výše) naneste 70 µL každé kontroly a každého ředěného séra pacienta do příslušných jamek.
6. Inkubujte sklíčka při pokojové teplotě (20–25 °C) po dobu 35 ± 5 minut.
7. Jemně opláchněte sklíčka PBS. **Nedírektujte proud PBS přímo do testovacích jamek.**
8. Sklíčka promývejte ve dvou intervalech po 5 minutách, mezi každým promytím vyměňte PBS.
9. Vyjměte sklíčka z PBS jednotlivě. Otočte sklíčko a zarovnejte jamky do otvorů na dodaných absorpčních papírech. Osušte sklíčko tak, že otřete zadní stranu savým papírem. **UPOZORNĚNÍ:** Umístěte absorpční papír a sklíčko na pevný, rovný povrch. Osušování na papírových utěrkách může poškodit matici sklíčka. **Během testu nenechte sklíčka vyschnout.**
10. Do každé jamky přidejte 60 µL konjugátu.
11. Opakujte kroky 6 až 9.
12. Na každé sklíčko naneste 3–5 kapek montovacího média mezi jamky a přiložte krycí sklíčko. Alternativně lze malé množství montovacího média nanést přímo do každé jamky a poté přiložit krycí sklíčko. Sklíčka ihned vyšetřete vhodným fluorescenčním mikroskopem.

POZNÁMKA: Pokud se předpokládá prodleva při vyšetření sklíček, utěsněte krycí sklíčko čířím lakem na nehty a uložte do chladničky. Doporučuje se, aby byla sklíčka vyšetřena ve stejný den, kdy byl test proveden.

KONTROLA KVALITY

1. Při každém provedení testu musí být zahrnuta pozitivní kontrola a negativní kontrola.
2. Doporučuje se odečíst pozitivní a negativní kontroly před vyhodnocením výsledků testovaných vzorků. To pomůže stanovit referenční hodnoty potřebné k interpretaci testovaného vzorku. Pokud kontroly nevykazují popsany vzhled, jsou výsledky neplatné.

- a. Negativní kontrola – vyznačuje se absencí fluorescenčního barvení dlaždicových epitelálních buněk a/nebo oblasti bazální membrány.
 - b. Pozitivní kontroly – PV pozitivní kontrola se vyznačuje jablečně zeleným fluorescenčním barvením mezi dlaždicovými epitelálními buňkami. BP pozitivní kontrola se vyznačuje specifickým barvením oblasti bazální membrány.
3. Další kontroly mohou být testovány v souladu s pokyny nebo požadavky místních, státních a/nebo federálních předpisů nebo akreditačních organizací.

POZNÁMKY:

- a. **Intenzita pozorované fluorescence se může lišit v závislosti na použitém mikroskopu a filtračním systému.**
- b. **Může docházet k nespecifickému zachycování činidel. Je důležité dostatečně promývat sklíčka, aby se předešlo falešně pozitivním výsledkům.**

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

1. Jakékoli jablečně zelené obarvení výše uvedených specifických struktur v rozsahu od 1+ do 4+ je považováno za pozitivní. Hodnota 1+ je považována za slabou reakci, zatímco 4+ za silnou reakci. Všechna séra, která jsou pozitivní při ředění 1:10, by měla být titrována až do koncového ředění. To se provádí sériovým ředěním na 1:20, 1:40, 1:80 atd. Koncové ředění je nejvyšší ředění, které vykazuje znatelnou pozitivní reakci. Specifické jaderné barvení jader epitelálních buněk je považováno za pozitivní test na antinukleární protilátky, které mohou být spojeny se SLE a jinými onemocněními pojivové tkáně.
2. Titry nižší než 1:10 jsou považovány za negativní.
3. Pozitivní test:
 - a. Specifické mezibuněčné barvení mezi dlaždicovými epitelálními buňkami je považováno za pozitivní test na protilátky proti pemfigu.
 - b. Specifické barvení oblasti bazální membrány je považováno za pozitivní test na bulózní pemfigoid.

OMEZENÍ TESTU

1. ASA (Opičí Jícen) je laboratorní pomůcka a sama o sobě není diagnostická.
2. Výsledky by měly být interpretovány s ohledem na klinický stav pacienta.
3. Tento produkt nemá za cíl stanovit jednoznačnou souvislost mezi vzorem fluorescence a konkrétním onemocněním.
4. Neexistuje žádný americký standard účinnosti.

ODKAZ

1. Kooperativní studie. Využití imunofluorescenčního testu pro vyšetření kůže a séra. Využití imunofluorescence v diagnostice bulózních onemocnění, lupus erythematosus a některých dalších dermatóz. Archiv dermatologie. Sv. III, s. 372–381, 1975.
2. Jablonski S, Chorzelski TP, Beutner EH a kol.: Indikace pro imunofluorescenční vyšetření kůže a séra v dermatologii. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S a kol. (editoři): Imunopatologie kůže. Stroudsburg, Pensylvánie, Dowden, Hutchinson a Ross, s. 1–24, 1973.
3. Chorzelski TP, Jablonski S, Beutner EH: Klinický význam pemfigových protilátek. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S a kol. (editoři): Imunopatologie kůže. Stroudsburg, Pensylvánie, Dowden, Hutchinson a Ross, s. 25–43, 1973.
4. Lever WF: Pemfigus a pemfigoid. Springfield, Illinois, vydavatel Charles C. Thomas, s. 3–226, 1965.
5. Michel B, Milner Y, David K: Zachování tkáňově fixovaných imunoglobulinů v kožních biopsiích pacientů s lupus erythematosus a bulózními onemocněními: Předběžná zpráva. Časopis pro výzkum v dermatologii, sv. 59, s. 449–454, 1973.
6. Anderson P, Hale WL: Imunohistologie lidských protilátek na opičím jícnu. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S a kol. (editoři): Imunopatologie kůže. Stroudsburg, Pensylvánie, Dowden, Hutchinson a Ross, s. 271–286, 1973.
7. Tan EM, Vaughn JH: Antinukleární protilátky: Význam biochemických specifit. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S a kol. (editoři): Imunopatologie kůže. Stroudsburg, Pensylvánie, Dowden, Hutchinson a Ross, s. 367–378, 1973.
8. Postupy pro odběr diagnostických vzorků krve venepunkcí – druhé vydání: schválený standard (1984). Vydal Národní výbor pro klinické laboratorní standardy.
9. Lennette DA: Odběr a příprava vzorků pro virologické vyšetření. In: Příručka klinické mikrobiologie, 4. vydání, EH Lennette, A Balows, WJ Hausler a HJ Shadomy (editoři): Americká společnost pro mikrobiologii, Washington, D.C., kapitola 61, s. 687–693, 1985.
10. Ministerstvo práce Spojených států amerických, Úřad pro bezpečnost a ochranu zdraví při práci: Profesionální expozice patogenům přenášeným krví – konečné nařízení. Federální věstník, sv. 56, s. 64175–64182, 1991.
11. Postupy pro manipulaci a zpracování vzorků krve pro běžné laboratorní testy; schválené pokyny – 4. vydání (2010). Dokument CLSI GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Institut pro klinické a laboratorní standardy, 950 West Valley Road, Kancelář č. 2500, Wayne, Pensylvánie 19087.

SLOVNÍK SYMBOLŮ

Následující symboly mohly být použity na označení tohoto produktu.

Symbol	Popis	Symbol	Popis
	Výrobce	S L D	Podložní sklíčko
IVD	<i>In vitro diagnostický lékařský prostředek</i>	BUF PBS	PBS pufr
REF	Katalogové číslo	MNTMED	Montážní médium
	Dostatečné pro n testů	CONJ	Konjugát
LOT	Šaržový kód	CTRL + 1	PV pozitivní kontrola
	Použit do	CTRL -	Negativní kontrola
	Omezení skladovací teploty	CTRL + 2	BP pozitivní kontrola
RX Only	Pouze pro lékařský předpis	Made in the USA	Vyrobeno v USA
	Konzultovat do elektronického pokyny k použití		Skladujte ve vzpřímený poloze
	Chraňte před slunečním zářením	COVGLS	Krycí sklíčko
CE	Shoda s směrnicí 98/79		



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
Webová stránka: www.zeusscientific.com

Pro zákaznický servis v USA kontaktujte svého místního distributora.

Pro technickou podporu v USA kontaktujte ZEUS Scientific, volejte na bezplatnou linku nebo napište e-mail na support@zeusscientific.com.

Pro zákaznický servis a technickou podporu mimo USA kontaktujte svého místního distributora.

©2019 ZEUS Scientific. Všechna práva vyhrazena.



EMERGO EUROPE
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands