


PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZMĚ NEUTROFILŮ (ANCA)

Kód 44850 24 testů	Kód 44852 10x6 testů	Kód 44878 10x6 testů	PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZMĚ NEUTROFILŮ (ANCA) Nepřímá imunofluorescence Lidské neutrofilů
Kód 44851 60 testů	Kód 44895 10x6 testů	Kód 44911 10x12 testů	
Kód 44898 60 testů			
Skladovat při 2 - 8°C			
Reagencie pro kvalitativní stanovení ANCA. Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích.			

PRINCIP METODY

Protílátky proti cytoplasmě neutrofilů (ANCA) se vážou na odpovídající antigeny přítomné v lidských neutrofilech. K vizualizaci komplexu antigen – protílátka je použito sérum s anti-human imunoglobulinem značeným fluoresceinem. Vyhodnocení se provádí fluorescenčním mikroskopem¹.

OBSAH

Kód	44850	44851	44852	44898	44878	44895	44911
A. ANCA - etanol	4 x 6 testů	10 x 6 testů	10 x 6 testů	-	-	-	10x12 testů
A. ANCA - formalin	-	-	-	10x6 testů	10x6 testů	-	-
A. ANCA - metanol	-	-	-	-	-	10x6 testů	-
B. PBS (10x)	1x100ml	1x100ml	-	1x100ml	-	-	-
C+. C-ANCA	1x0,3ml	1x0,3ml	-	-	-	-	-
C+. P-ANCA	1x0,3ml	1x0,3ml	-	1x0,3ml	-	-	-
C-. Negativní kontrola	1x0,3ml	1x0,3ml	-	1x0,3ml	-	-	-
D. IgG FITC/ Evans	1x3ml	1x3ml	-	1x3ml	-	-	-
E. Montovací medium	1x3ml	1x3ml	-	1x3ml	-	-	-
F. Odsávací papír	1x10	1x10	-	-	-	-	-

SLOŽENÍ

ANCA - Etanol

- A Sklíčka:** Etanolem fixované lidské neutrofilů v každé jamce.
B PBS (10x): Fosforečnan sodný 112,5 mmol/L, fosforečnan draselný 30 mmol/L, chlorid sodný 1,15 mol/L, azid sodný 0,95 g/L, pH 7,2.
C+. C-ANCA Pozitivní kontrola: Lidské sérum obsahující protílátky proti neutrofilům (cytoplazmatická fluorescence), azid sodný 0,95 g/L.
C+. P-ANCA Pozitivní kontrola: Lidské sérum obsahující protílátky proti neutrofilům (perinukleární fluorescence), azid sodný 0,95 g/L.
C-. Negativní kontrola: Lidské sérum, azid sodný 0,95 g/L.
D. IgG FITC/ Evans: Kozí anti-human IgG konjugovaný s fluorescein isothiokyanátem (FITC), Evansova modř 0,01 g/L, azid sodný 0,95 g/L.
E Montovací medium: Mowiol 12%, Glycerol 30%, Tris 20 mmol/L, azid sodný 0,95 g/L.
F Odsávací papír.

ANCA - Formalin

- A Sklíčka:** Formalinem fixované lidské neutrofilů v každé jamce.

ANCA - Methanol

- A Sklíčka:** Metanolem fixované lidské neutrofilů v každé jamce.

Lidská séra použitá při přípravě pozitivní a negativní kontroly byla testována a shledána negativní na přítomnost protilátek anti-HIV a anti-HCV, a stejně tak na HBs antigen. Nicméně zacházejte s kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.

SKLADOVÁNÍ

M44851i-09
07/2019

BioSystems S.A. Costa Brava, 30. 08030 Barcelona (Spain)
Quality System certified according to
EN ISO 13485 and EN ISO 9001 standards

Český překlad 08/2019/VE

Skladujte při 2-8°C.

Reagencie jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno jejich kontaminaci.

Známky zhoršení kvality:

- Kapalně komponenty: Přítomnost částic, zákal
- Sklíčka: natržení sáčku, makroskopické defekty na buněčných kulturách, jako je poškrábání nebo sloupnutí.

POMOCNÉ REAGENCIE

Pro kod 44852,44878 a 44895 se doporučují následující doplňkové reagenty:

- B.** PBS (10x)
- D.** IgG FITC/Evans konjugát s Evansovou modří,
- E.** Montovací medium
- C+.** C-ANCA pozitivní kontrola
- C+.** P-ANCA pozitivní kontrola
- C+.** X-ANCA pozitivní kontrola. Lidské sérum obsahující anti-neutrofilní cytoplazmatické protílátky (ANCA) s "atypickým perinukleárním obrazem", azid sodný.
- C-.** Negativní kontrola

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

PBS: Naředte reagent B destilovanou vodou v poměru 1/10. Stabilní 1 měsíc při 2-8 ° C, pokud byly dodrženy při skladování doporučené teploty, reagent byl dobře uzavřen a nedošlo ke kontaminaci během jeho používání. Všechny ostatní reagenty jsou dodávány připravené k přímému použití.

PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- Zvlhčovací komůrka
- Promývací nádoba
- Krycí sklíčka 24 x 60 mm
- Fluorescenční mikroskop s excitačním filtrem 495 nm a 525 emisním filtrem pro FITC vizualizaci.


VZORKY

Sérum, nebo plazma odebraná standardním postupem. Stabilní po dobu 1 týdne při 2-8°C.
 Sérum zředte 1/20 v PBS (Viz. příprava reagenty).
 K titraci pozitivních vzorků ředte dvojkovou řadou v PBS, přičemž začnete ředěním 1/40.
 Každá laboratoř by si měla zvolit vlastní počáteční ředění na základě populační charakteristiky.

PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte reagenty a vzorky na pokojovou teplotu.
2. Kápněte 1 kapku (25 µL) naředěného vzorku nebo kontroly do každé jamky (A). Ujistěte se, že je jamka kompletně pokrytá. (Poznámka 1).
3. Inkubujte sklíčka 30 minut při pokojové teplotě (15-30°C) uvnitř zvlhčovací komůrky.
4. Sklíčko nakloňte a jeho opatrným poklepáváním o podložku (filtrační papír) odstraňte přebytečné kapky vzorku. Zabraňte promíchání sér.
5. Sklíčka krátce opláchněte v lehkém proudu PBS. (Poznámka 2).
6. Sklíčka důkladně promyjte ponořením do nádoby obsahující fosfátový pufr na dobu 5 minut. Poté fosfátový pufr vyměňte a promývání opakujte.
7. Sklíčko opatrně osušte s použitím speciálního odsávacího papíru. Substrát musí zůstat zůstat vlhký po celou dobu procedury.

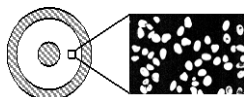
PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZMĚ NEUTROFILŮ (ANCA)

Kód 44850 24 testů	Kód 44852 10x6 testů	Kód 44878 10x6 testů	PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZMĚ NEUTROFILŮ (ANCA) Nepřímá imunofluorescence Lidské neutrofilů
Kód 44851 60 testů	Kód 44895 10x6 testů	Kód 44911 10x12 testů	
Kód 44898 60 testů			
Skladovat při 2 - 8°C			
Reagencie pro kvalitativní stanovení ANCA. Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích.			

- Do každé jamky přidejte 1 kapku reagentu D. Sklíčka inkubujte ve zvlhčovací komůrce při pokojové teplotě (15-30°C) po dobu 30 minut.
- Zopakujte krok 6 a krok 7.
- Kápněte do jamky několik kapek reagentu E a opatrně přikryjte krycím sklíčkem tak, aby nevznikly vzduchové bubliny.

VYHODNOCENÍ

Sklíčka vyhodnocujte s použitím fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 250-400x). Pro lepší výsledky sklíčka vyhodnocujte okamžitě. Pro odečet zvolte pole se stejnoměrně rozloženými buňkami. Intenzita fluorescence v okrajích není charakteristická.



jamka vybrané pole

Pokud je vidět specifická fluorescence při dodržení doporučeného ředění vzorků, je nutné výsledek považovat za pozitivní.

U etanolem fixovaných lidských neutrofilů pro diagnostiku autoimunitní vaskulitidy jsou dva typy fluorescence :

Difúzně zrnitá cytoplazmatická fluorescence s vysokou interlobulární intenzitou u C-ANCA protilátek a s kompaktní perinukleární fluorescencí u P-ANCA protilátek. Také se může objevit méně typická fluorescence, kterou lze hodnotit jako atypické ANCA protilátky.

V některých případech, může být p-ANCA zbarvený obraz pozorovaný na etanolem fixovaných neutrofilech, což bývá způsobené antinukleárními protilátkami (ANA). Tyto výsledky by měly být potvrzeny stanovením vzorku na formalinem fixovaných neutrofilech.

Pouze zbarvení obrazu na formalinem fixovaných lidských neutrofilech ukazuje na autoimunitní vaskulitidu: c-ANCA.

Kromě těchto popsaných obrazů se mohou vyskytnout méně časté vzory, jako je X-ANCA (nebo-li atypická P-ANCA). Tento obraz lze identifikovat jako široce nehomogenní perinukleární zbarvení, případně společně s difúzním cytoplazmatickým vzorem bez zvýraznění interlobulární zóny. Pro správné pozorování tohoto vzoru je nutné užití methanolem fixovaných neutrofilů.

Pozitivní séra lze titrovat. Titr séra je definován jako nejvyšší ředění dávající pozitivní výsledek.

Není-li pozorována žádná typická fluorescence, výsledek je negativní pro tyto protilátky.

KONTROLA KVALITY

P-ANCA pozitivní kontrola (C+) a Negativní kontrola (C-) by měla být testována společně se vzorkem pacienta na obou typech fixovaných neutrofilů (etanolem a formalinem), aby se verifikovala pravdivost zkoušky.

C-ANCA pozitivní kontrola (C+) by měla být testována pouze s etanolem fixovanými neutrofilů.

X-ANCA pozitivní kontrola (C+) by měla být testována pouze s metanolem fixovanými neutrofilů.

Pozitivní kontroly (C+) by měly vykazovat výše popsané specifické zbarvení obrazu.

P-ANCA pozitivní kontrola (C+) by měla ukazovat C-ANCA zbarvení obrazu, pokud je prováděno testování s formalinem fixovanými neutrofilů.

Negativní kontrola (C-) by neměla dávat jakékoliv zbarvení obrazu.

Všeobecně, intenzita fluorescence pozorovaná na formalinem fixovaných neutrofilech je mírná.

Každá laboratoř by si měla stanovit svojí vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

CHARAKTERISTIKA TESTU

- IgG FITC/Evans konjugát je kalibrován proti WHO Mezinárodnímu standardu pro FITC značený ovčí anti-human imunoglobulin.
- Specifita C-ANCA Pozitivní kontroly byla ověřena proti PR3 - ANCA Lidskému Referenčnímu séru # 16 z CDC. Specifita P-ANCA Pozitivní kontroly byla ověřena proti PR3 - ANCA Lidskému Referenčnímu séru # 15 z CDC.
- C-ANCA zbarvení obrazu na etanolem fixovaných lidských neutrofilech je výsledkem přítomnosti protilátek navázaných hlavně na antigen proteinázy 3 (PR-3). U formalinem fixovaných lidských neutrofilů je výsledkem přítomnosti protilátek navázaných hlavně na antigen myeloproteinázy (MPO).
- P-ANCA fluorescence na etanolem fixovaných neutrofilech je výsledkem navázaných protilátek na myeloperoxidázu.
- X-ANCA fluorescence na metanolem fixovaných neutrofilech je výsledkem více antigenní specifiky jako je katepsin G, laktoferin, nebo elastáza.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

C-ANCA fluorescence asociovaná s PR-3 je charakteristická při Wegenerově granulomatóze. Tento typ fluorescence lze téměř výhradně nalézt u pacientů s tímto onemocněním a jeho diagnostická přesnost je vyšší než 90%. Citlivost závisí na stadiu onemocnění, ale protilátky lze nalézt v průměru u 66% případů⁽²⁾. P-ANCA fluorescence asociovaná s MPO lze nalézt u nekrotizující idiopatické vaskulitidy, stejně jako u mikroskopické polyangitidy, idiopatické crescentické glomerulonefritidy, Churg-Straussově syndromu, poliarteritis nodosy a Wegenerově granulomatózy. Citlivost P-ANCA pro mikroskopickou polyangitidu a Churg-Straussův syndrom, je 58% a 74,5%, ve srovnání k tomu je specifita 81% a 95%^(3,4).

x-Anca obraz je asociován se zánětlivými střevními onemocněními jako je ulcerativní kolitida (50-70%), Crohnova choroba (10-30%), stejně tak jako je nonvaskulitidní autoimunitní onemocnění⁽⁵⁾. Klinická diagnóza by neměla být uzavřena jen na základě výsledků jednoho testování, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

POZNÁMKA

- Nedotýkejte se tkáňových řezů v jamkách během zkoušky.
- Na promytí použijte stříčku, nebo pipetu. Zabraňte zkřížené kontaminaci mezi vzorky.

LITERATURA

- Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
- Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, Allen NB, Landsman P, Feussner JR The Role of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (c-ANCA) Testing in the Diagnosis of Wegener Granulomatosis: A Literature Review and Meta-analysis. Ann Intern Med. 1995;123 (12) : 925-932.
- Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, Lesavre P, Lüdemann J, Rasmussen N, Sinico RA, Wiik A, van der Woude FJ. Diagnostic value of standardized assays for anti-

PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZMĚ NEUTROFILŮ (ANCA)

Kód 44850 24 testů	Kód 44852 10x6 testů	Kód 44878 10x6 testů	<p style="text-align: center;">PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZMĚ NEUTROFILŮ (ANCA)</p> <p style="text-align: center;">Nepřímá imunofluorescence Lidské neutrofilů</p> <p style="text-align: center;">CE</p>
Kód 44851 60 testů	Kód 44895 10x6 testů	Kód 44911 10x12 testů	
Kód 44898 60 testů			
Skladovat při 2 - 8°C			
Reagencie pro kvalitativní stanovení ANCA. Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích.			

neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis.
EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. *Kidney Int.*
1998; 53 (3): 743-53

4. Sinico RA, Di Toma L, Maggiore U, Bottero P, Radice A, Tosoni C, Grasselli C, Pavone L, Gregorini G, Monti S, Frassi M, Vecchio F, Corace C, Venegoni E, Buzio C. Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):2589-93.
5. Savige J, Dimech W, Fritzler M, et al. Addendum to the international Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *Am J Clin Pathol* 2003; 120:312-318.

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 29.8.2019

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme přezkoumat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí. Originální návod najdete v soupravě a na internetové adrese:

www.biosystems.es.

Český návod je k dispozici na: www.iktrading.cz

Výhradní distributor:

ČR : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha5, tel.: +420 257 220 760

SK : JK-Trading spol.s.r.o., Mečíkova 30, 841 07 Bratislava, tel.: +421 264 774 591

V případě mimořádných událostí:

ČR : Toxikologické informační středisko (TIS), klinika pracovního lékařství VFN a . LF UK,

tel.: +420 224 91 92 93 a +420 224 91 54 02

SK : Toxikologické informačné centrum Bratislava, 833 05, Limbová 5, tel.: +421 254 774 166