



# PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZME NEUTROFILOV (ANCA)



Kód 44850 24 testov		Kód 44852 10x6 testov	Kód 44878 10x6 testov	<b>PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZME NEUTROFILOV (ANCA)</b>  Nepriama imunofluorescencia Ľudské neutrofilily
Kód 44851 60 testov	Kód 44898 60 testov	Kód 44895 10x6 testov	Kód 44911 10 x 12 testov	
Skladovanie pri 2 - 8°C				
Reagencie na kvalitatívne stanovenie ANCA . Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku				

## PRINCÍP METÓDY

Prottilátky proti cytoplazme neutrofilov (ANCA) zo séra sa viažu na odpovedajúci antigén prítomný v ľudských neutrofiloch. Výsledný komplex antigén-prottilátka je detekovaný pomocou anti-ľudského imunoglobulínu značeného fluoresceínom. Vyhodnotenie sa uskutočňuje pomocou fluorescenčného mikroskopu. <sup>1</sup>

## OBSAH

		kód 44850	kód 44851	kód 44852	kód 44898	kód 44878	kód 44895	kód 44911
A.	ANCA- etanol	4 x 6 testov	10x6 testov	10x6 testov	-	-	-	10x12 testov
A.	ANCA formalín	-	-	-	10x6 testov	10x6 testov	-	-
A.	ANCA metanol	-	-	-	-	-	10x6 testov	-
B.	PBS (10x)	1x100 ml	1x100 ml	-	1x100 ml	-	-	-
C+.	C ANCA	1x0,3 ml	1x0,3 ml	-	-	-	-	-
C+.	P ANCA	1x0,3 ml	1x0,3 ml	-	1x0,3 ml	-	-	-
C-.	Negat. kontrola	1x0,3 ml	1x0,3 ml	-	1x0,3 ml	-	-	-
D.	IgG FITC/ Evans	1x3ml	1x3ml	-	1x3ml	-	-	-
E.	Montov acie médium	1x3ml	1x3ml	-	1x3ml	-	-	-
F.	Savý papier	1x10	1x10	-	1x10	-	-	-

## ZLOŽENIE

### ANCA - etanol

- A. **Sklička** : etanolom fixované ľudské neutrofilily v každej jamke
- B. **PBS(10x)** : Fosforečnan sodný 112,5 mmol/l, fosforečnan draselný 30mmol/l, chlorid sodný 1,15mol/l, azid sodný 0,95g/l, pH 7,2
- C+. **C-ANCA Pozitívna kontrola** : ľudské sérum obsahujúce prottilátky proti cytoplazme neutrofilov (ANCA), cytoplazmatický vzor, azid sodný 0,95 g/l
- C+. **P-ANCA Pozitívna kontrola** : ľudské sérum obsahujúce prottilátky proti cytoplazme neutrofilov (ANCA), perinukleárny vzor, azid sodný 0,95 g/l
- C-. **Negatívna kontrola** : ľudské sérum, azid sodný 0,95g/l
- D. **IgG FITC/Evans** : kozí anti-ľudský IgG konjugovaný s fluoresceín izotiokyanátom (FITC), Evansova modrá 0,01g/l, azid

sodný 0,95g/l

- E. **Montovacie médium** : Mowiol 12%, glycerol 30%, Tris 20mmol/l, azid sodný 0,95g/l
- F. **Savý papier**

### ANCA-formalín

- A. **Sklička** : formalínom fixované ľudské neutrofilily imobilizované v každej jamke

### ANCA – metanol

- A. **Sklička** : metanolom fixované ľudské neutrofilily imobilizované v každej jamke

Ľudské séra použité pri príprave pozitívnej a negatívnej kontroly boli testované s negatívnym výsledkom na anti-HIV a anti-HCV a rovnako na HBs antigen. I napriek tomu zaobchádzajte s kontrolami ako s potencionálne infekčným materiálom.

## SKLADOVANIE

Skladujte pri 2 – 8°C.  
Reagencie sú stabilné do dátumu uvedeného na štítku v prípade, že sú skladované uzatvorené a je zabránené kontaminácii v priebehu ich používania.

### Príznyky zhoršenia kvality :

- Kvapalné reagencie : Prítomnosť zrazeniny, zákalu
- Mikrotitračné doštičky : natrhnutie sáčku, makroskopické defekty na bunečných kultúrach, ako je poškrabanie dna jamiek, odlúpnutie.

## POMOCNÉ REAGENTY

- pre kódy 44852, 44878 a 44895 je potrebné objednávať ďalšie reagenty, ktoré sa dodávajú zvlášť :

- B. **PBS (10x)**
- D. **IgG FITC/Evans (M)**
- E. **Montovacie médium**
- C+. **C-ANCA**
- C+ **P-ANCA**
- C+ **X-ANCA.** Ľudské sérum obsahujúce anti-neutrofilné cytoplazmatické prottilátky (ANCA) s atypickým perinukleárnym vzorom, azid sodný
- C- **Negatívna kontrola**



# PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZME NEUTROFILOV (ANCA)



Kód 44850 24 testov	Kód 44852 10x6 testov	Kód 44878 10x6 testov
Kód 44851 60 testov	Kód 44898 60 testov	Kód 44895 10x6 testov
Kód 44911 10 x 12 testov		
Skladovanie pri 2 - 8°C		
Reagencie na kvalitatívne stanovenie ANCA . Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

## PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZME NEUTROFILOV (ANCA)

Nepriama imunofluorescencia  
Ľudské neutrofilily

### PRÍPRAVA REAGENCIÍ

**PBS:** Reagenciu B nariedte destilovanou vodou v pomere 1/10. Stabilná 1 mesiac pri 2-8 ° C, ak boli pri skladovaní dodržané odporúčané teploty, reagentia bola dobre uzatvorená a nedošlo ku kontaminácii v priebehu jej používania. Ostatné činidlá sú pripravené k priamemu použitiu.

### PRÍDAVNÉ ZARIADENIA

- zvlhčovacia komôrka
- premývacie zariadenie
- krycie sklíčka 24x60 mm
- fluorescenčný mikroskop s excitačným filtrom 495nm a 525 nm emisným filtrom pre FITC vizualizáciu

### VZORKY

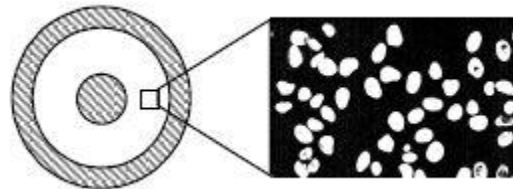
Sérum alebo plazma odobraná štandardným spôsobom. Stabilita – 1 týždeň pri 2 – 8°C. Vzorku pred testovaním zriedte v pomere 1/20 PBS – vid' príprava reagentov. Na titráciu pozitívnych vzoriek riedte dvojkovým radom v PBS – začnite riedením 1/40. Každé laboratórium by si malo stanoviť svoje vlastné riedenie vzorky na základe charakteristiky populácie.

### POSTUP

1. Vytemperujte všetky činidlá na izbovú teplotu.
2. Aplikujte 1 kvapku (25µl) nariedenej vzorky alebo kontroly do každej jamky . Uistite sa, že je kompletne pokrytá. (Poznámka1)
3. Sklíčka dajte do zvlhčovacej komôrky a inkubujte 30 minút pri izbovej teplote (15-30°C).
4. Sklíčko nakloňte a opatrným poklepávaním o filtračný papier odstráňte prebytočné kvapky vzorky. Zabráňte skríženej kontaminácii.
5. Zľahka opláchnite reagentom PBS ( vid' **PRÍPRAVA REAGENCIÍ**). (Poznámka2 )
6. Sklíčka premývajte 5 minút v nádobe obsahujúcej PBS. Potom PBS vymeňte a premývanie zopakujte.
7. Sklíčko opatrne osušte špeciálnym odsávacím papierom.
8. Jamky musia zostať vlhké v priebehu celej procedúry, preto ich nevysušujte. Do každej jamky pridajte 1 kvapku činidla D. Sklíčka inkubujte vo zvlhčovacej komôrke 30minút pri izbovej teplote (15-30°C) .
9. Premývajte podľa bodu 6 a osušte podľa bodu 7.
10. Do každej jamky pridajte niekoľko kvapiek reagentu E a opatrne prekryte krycím sklíčkom tak, aby nevznikli vzduchové bubliny.

### ODČÍTANIE

Sklíčka vyhodnocujte pomocou fluorescenčného mikroskopu (zväčšenie 250-400x). Aby ste dosiahli najlepšie výsledky, vyhodnocujte sklíčka okamžite. Pre odčítanie zvolte vnútornú časť obrazu tak, ako je uvedené na obrázku.



jamka

vybrané pole

Vyberte polia s rovnomerným rozstupom medzi bunkami a s jednotným jasom jadier. Fluorescenčná intenzita v okrajových oblastiach vzorky nie je reprezentatívna. Za pozitívne je možné považovať výsledky, pri ktorých sa dá pozorovať pri doporučenom riedení špecifická fluorescencia . Existujú dva hlavné vzory etanolom fixovaných neutrofilov, ktoré sú spojené s autoimunitnou vaskulitídou : difúzne zrnitá cytoplazmatická fluorescencia s vyššou interlobulárnou intenzitou (C-ANCA) a kompaktná fluorescencia perinukleárnej zóny cytoplazmy ( P-ANCA). V niektorých prípadoch antinukleárne protilátky ANA môžu spôsobiť , že je na etanolom fixovaných neutrofiloch pozorovaný rovnaký obraz ako pri P-ANCA protilátkach. Takéto výsledky by mali byť potvrdené stanovením vzorky na formalínom fixovaných neutrofiloch, pretože existuje iba jeden obraz fluorescencie formalínom fixovaných neutrofilov spojených s autoimunitnou vaskulitídou C-ANCA. Okrem týchto už popísaných vzorov sa môžu vyskytnúť iné, menej časté vzory , ako je X-ANCA (alebo atypický P-ANCA). Tento obraz je možné identifikovať ako široko nehomogénne perinukleárne sfarbenie, ktoré môže byť ešte sprevádzané difúznym cytoplazmatickým vzorom bez zvýraznenia interlobulárnej zóny. Pre správne pozorovanie tohoto vzoru sa odporúča použiť metanolom fixované neutrofilily. Pozitívne séra sa môžu titrovať. Titer séra je definovaný ako najvyššie riedenie vykazujúce pozitívny výsledok. V prípade, že nie je pozorované vyššie uvedené špecifické sfarbenie/fluorescencia, výsledok testu by sa mal považovať za negatívny na tieto protilátky.

### KONTROLA KVALITY

Pozitívna (C+) a negatívna kontrola (C-) by mala byť testovaná spoločne so vzorkou pacienta na formalínom i na etanolom fixovaných neutrofiloch ,aby bolo verifikované správne prevedenie testu.

C-ANCA pozitívna kontrola (C+) by mala byť testovaná iba na etanolom fixovaných neutrofiloch.X-ANCA pozitívna kontrola



# PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZME NEUTROFILOV (ANCA)



Kód 44850 24 testov	Kód 44852 10x6 testov	Kód 44878 10x6 testov	<b>PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZME NEUTROFILOV (ANCA)</b>  Nepriama imunofluorescencia Ľudské neutrofilily
Kód 44851 60 testov	Kód 44898 60 testov	Kód 44895 10x6 testov	
Skladovanie pri 2 - 8°C			
Reagencie na kvalitatívne stanovenie ANCA . Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku			

(C+) by mala byť testovaná iba na metanolom fixovaných neutrofiloch.

Positívne kontroly by mali dávať vyššie popísané špecifické vzory.

Ak sa P-ANCA pozitívna kontrola vykoná na formalínom testovaných neutrofiloch, mala by ukázať C-ANCA fluoreskujúci vzor.

Negatívna kontrola (C-) by nemala dávať žiaden špecifický obraz. Všeobecne platí, že intenzita fluorescencie pozorovaná pri použití formalínom fixovaných neutrofilov je mierna. Každé laboratórium by si malo stanoviť svoju vlastnú vnútornú kontrolu kvality a postupy pre nápravné jednanie v prípade, že kontroly nie sú v tolerančnom rozpätí.

## CHARAKTERISTIKA TESTU

- IgG FITC/Evans konjugát je kalibrovaný oproti WHO Medzinárodnému štandardu pre ovčie anti-ľudský IgG imunoglobulín.
- Špecifická C-ANCA pozitívnej kontroly bola overená oproti PR3 – ANCA ľudskému referenčnému séru # 16 z CDC
- Špecifická P-ANCA pozitívnej kontroly bola overená oproti PR3 – ANCA ľudskému referenčnému séru # 15 z CDC
- C-ANCA fluoreskujúci obraz pri použití etanolom fixovaných neutrofilov je výsledkom väzby prítomných protilátok na antigén proteinázy3 (PR-3). V prípade použitia formalínom fixovaných neutrofilov sa jedná o väzbu protilátok na myeloperoxidázu (MPO).
- P-ANCA fluoreskujúci obraz na etanolom fixovaných neutrofiloch je výsledkom väzby protilátok s myeloperoxidázou.
- X-ANCA fluorescencia na metanolom fixovaných neutrofiloch vzniká v dôsledku väzby protilátok s mnohonásobnou antigénnou špecifitou, ako je katepsín G, laktoferín alebo elastáza.

## DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

C-ANCA fluorescencia asociovaná s PR3 je charakteristická pri Wegenerovej granulomatóze. Tento typ fluorescencie je možné pozorovať takmer výhradne u pacientov s touto chorobou a jeho diagnostická špecifita je vyššia ako 90%. Senzitivita závisí od štádia choroby, ale pohybuje sa okolo 66%.<sup>2</sup>

P-ANCA fluorescenciu asociovanú s MPO je možné pozorovať u pacientov s nekrotizujúcou idiopatickou vaskulitídou, s mikroskopickou polyangitídou, idiopatickou rýchlo progredujúcou glomerulonefritídou, s Churgov-Straussovej synrómom, s poliarteritís nodosa a Wegenerovou granulomatózou.

Senzitivita P-ANCA pre mikroskopickú polyangitídu je 58%, pre Churgov-Straussovej syndróm je 74,5%, zatiaľ čo špecifita je 81% a 95%.<sup>(3,4)</sup>

X-ANCA obraz je spojený s diagnostikou zápalových črevných ochorení, ako je ulcerózna kolitída (50-70%) a Cronova choroba (10-30%), ako aj s ďalšími autoimunitnými nonvaskulitídnyimi ochoreniami.<sup>5</sup>

Klinická diagnóza nemôže byť stanovená na základe výsledkov jediného testu, musí byť posúdená na základe klinických i laboratórnych údajov.

## POZNÁMKY

1. Nedotýkajte sa behom testu buniek fixovaných v jamkách.
2. Na premytie použite stričku alebo pipetu. Zabráňte skříženej kontaminácii medzi vzorkami.

## LITERATÚRA

1. Melnicoff MJ. Immunfluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. 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.
3. 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-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. Savage J, Dimech W, Fritzier 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.

## UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 3.9.2019

Vzhľadom k novej inovácii výrobku sa odporúča prekontrolovať slovenský preklad s originálnym príbalovým letákom tak, že sa porovnajú identifikačné čísla uvedené v zápätí. Originálny návod nájdete v súprave a na internetovej adrese [www.biosystems.es](http://www.biosystems.es).

Slovenský návod je k dispozícii na [www.jktrading.cz](http://www.jktrading.cz).

## Výhradný distribútor:

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

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

V prípade mimoriadnych udalostí:

**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