


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 ANCA – etanol ANCA- formalín ANCA- metanol ANCA-etanol-ANA
Kód 44851 60 testů	Kód 44895 10x6 testů	Kód 44963 60 testů	
Kód 44898 60 testů			
Kód 44911 10x12 testů	Kód 44964 10x6 testů		
Reagencie pro kvalitativní stanovení ANCA. Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích.			

PRINCIP METODY

Sérové anti-neutrofilní cytoplazmatické protilátky (ANCA) a antinukleární protilátky (ANA) se vážou na odpovídající antigeny přítomné v lidských neutrofilech a v řezech jater potkana. Výsledné komplexy antigen-protilátka jsou detekovány pomocí fluoresceinem značeného antihumánního imunoglobulinu a vizualizovány pomocí fluorescenčního mikroskopu¹.

OBSAH

	Kód	44850	44851	44898	44963
A.	ANCA - etanol	4x6 testů	10x6 testů	-	-
A.	ANCA - formalín	-	-	10x6 testů	-
A.	ANCA – etanol-ANA	-	-	-	10x6 testů
B.	PBS (10x)	1x100 ml	1x100 ml	1x100 ml	1x100 ml
C+.	C-ANCA	1x0,3ml	1x0,3ml	1x0,3ml	1x0,3ml
C+.	P-ANCA	1x0,3ml	1x0,3ml	1x0,3ml	1x0,3ml
C+	ANA-Ho	-	-	-	1x0,3ml
C-.	Negativní kontrola	1x0,3ml	1x0,3ml	1x0,3ml	1x0,3ml
D.	IgG FITC/ Evans	1x3 ml	1x3 ml	1x3 ml	2x3 ml
E.	Montovací medium	1x3 ml	1x3 ml	1x3 ml	1x3 ml
F.	Odsávací papír	1x10	1x10	1x10	-

Kód		44852	44878	44895	44911	44964
A.	ANCA - etanol	10x6 testů	-	-	10x12 testů	-
A.	ANCA - formalín	-	10x6 testů	-	-	-
A.	ANCA – metanol	-	-	10x6 testů	-	-
A.	ANCA – etanol-ANA	-	-	-	-	10x6 testů

SLOŽENÍ

ANCA - etanol

- A Sklíčka:** Etanolem fixované lidské neutrofilů v každé jamce.
B PBS (10x): Fosforečnan sodný, fosforečnan draselný, chlorid sodný, azid sodný 0,95 g/L, pH 7,2.
C+ C-ANCA Pozitivní kontrola: Lidské sérum obsahující protilátky proti neutrofilům (cytoplazmatická fluorescence), azid sodný 0,95 g/L.
C+ P-ANCA Pozitivní kontrola: Lidské sérum obsahující protilátky 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, Glycerol, Tris, azid sodný 0,95 g/L.
F Odsávací papír.

ANCA - formalín

A Sklíčka: Formalinem fixované lidské neutrofilů v každé jamce.

ANCA - metanol

A Sklíčka: Metanolem fixované lidské neutrofilů v každé jamce.

ANCA-etanol-ANA

A Sklíčka: Etanolem fixované lidské neutrofilů a řezy kryších jater

C+ ANA-Ho Pozitivní kontrola: Lidské sérum obsahující anti nukleární protilátky (ANA), azid sodný 0,95 g/l.

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

SKLADOVÁNÍ

Skladujte při 2-8°C.

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

Znamky zhoršení kvality:

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

POMOCNÉ REAGENCIE

Pro kód 44852, 44878, 44895, 44911 a 44964 se doporučují následující doplňkové reagencie:

- 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+ ANA-Ho**
- C+.** X-ANCA pozitivní kontrola. Lidské sérum obsahující anti-neutrofilní cytoplazmatické protilátky (ANCA) s "atypickým perinukleárním obrazem", azid sodný.
- C-.** Negativní kontrola

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

PBS: Nařeďte reagenci B destilovanou vodou v poměru 1/10. Stabilní 1 měsíc při 2-8 °C, pokud byly dodrženy při skladování doporučené teploty, reagencie byla dobře uzavřena a nedošlo ke kontaminaci během jejího používání. Všechny ostatní reagencie jsou dodávány připravené k přímému použití.


PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

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

VZORKY

Sérum, nebo plazma odebraná standardním postupem. Stabilní po dobu 1 týdne při 2-8°C. Vzorky před analýzou zřeďte 1/20 v PBS (viz příprava reagencie). K titraci pozitivních vzorků ředte dvojkovou řadou v PBS, přičemž začnete ředěním 1/40.

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 ANCA – etanol ANCA- formalín ANCA- metanol ANCA-etanol-ANA
Kód 44851 60 testů	Kód 44895 10x6 testů	Kód 44963 60 testů	
Kód 44898 60 testů			
Kód 44911 10x12 testů	Kód 44964 10x6 testů		
Reagencie pro kvalitativní stanovení ANCA. Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích.			

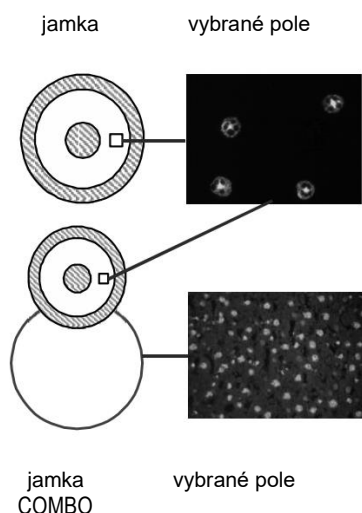
Každá laboratoř by si měla zvolit vlastní počáteční ředění na základě populační charakteristiky.

PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte reagencie 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 1a 2).
3. Inkubujte sklíčka 30 minut při pokojové teplotě (15-30°C) uvnitř zvlhčovací komůrky.
4. Sklíčko nakloňte a opatrným poklepáváním o podložku (filtrační papír) odstraňte přebytečné kapky vzorku. Zabraňte promíchání sér.
5. Sklíčka krátce opláchněte v lehkém proudu PBS. (viz příprava reagiencí, poznámka 3).
6. Sklíčka důkladně promyjte ponořením do fosfátového pufru na dobu 5 minut. Poté fosfátový pufr vyměňte a promývání opakujte.
7. Sklíčko opatrně osušte speciálním odsávacím papírem. Substrát musí zůstat vlhký po celou dobu procedury.
8. Do každé jamky přidejte 1 kapku reagiencí D (jako v bodě 2). Sklíčka inkubujte ve zvlhčovací komůrce při pokojové teplotě (15-30°C) po dobu 30 minut.
9. Zopakujte krok 6 a krok 7.
10. Kápněte do jamky několik kapek reagiencí 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 mezi okrajem a středem se stejnou rovinnou rozloženými buňkami a jednotným jasným jader. Intenzita fluorescence v centru a na okrajích není charakteristická.



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 obraz pozorovaný na etanolem fixovaných neutrofilech, což bývá způsobené antinukleárními protilátkami (ANA). Tyto výsledky by měly být potvrzeny stanovením vzorku na formalínem fixovaných neutrofilech, nebo na COMBO sklíčkách, které obsahují etanolem fixované neutrofilů a řezy krysích jater.

Na formalínem fixovaných neutrofilech existuje pouze jeden obraz spojený s autoimunitní vaskulitidou: C-ANCA.

ANA-Ho obraz vykazuje homogenní a jednotnou fluorescenci v jádře buněk v interfázi a na ethanolem fixovaných neutrofilech vidíme P-ANCA vzor.

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 metanolem fixovaných neutrofilů.

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

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

KONTROLA KVALITY

Pro ověření testu by měla být P-ANCA pozitivní kontrola (C+) a Negativní kontrola (C-) testována společně se vzorkem pacienta na neutrofilech fixovaných etanolem i formalínem.

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.

ANA-Ho pozitivní kontrola by měla být testována pouze na ANCA-etanol-ANA sklíčkách.

Positivní 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 formalínem fixovanými neutrofilů.

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


Všeobecně, intenzita fluorescence pozorovaná na formalínem 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 ovčím anti-human imunoglobulinem.
- Specifita C-ANCA pozitivní kontroly byla ověřena proti PR3 - ANCA lidskému referenčnímu séru # 16 z CDC. Specifita P-ANCA pozitivní kontroly byla ověřena proti MPO-ANCA lidskému referenčnímu séru #15 z CDC . Specifita ANA-Ho pozitivní kontroly byla ověřena proti referenčnímu séru AF/CDC1 z Centers for Disease Control.
- C-ANCA zbarvení obrazu na etanolem fixovaných lidských

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 ANCA – etanol ANCA- formalín ANCA- metanol ANCA-etanol-ANA
Kód 44851 60 testů	Kód 44895 10x6 testů	Kód 44963 60 testů	
Kód 44898 60 testů			
Kód 44911 10x12 testů	Kód 44964 10x6 testů		
Reagencie pro kvalitativní stanovení ANCA. Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích.			

neutrofilech je výsledkem protilátek navázaných hlavně na antigen proteinázy 3 (PR-3). Na formalínem fixovaných lidských neutrofilech je obraz 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 vazby protilátek na více antigenních specifit, jako je katepsin G, laktoferin nebo elastáza. (Jedná se tedy o jiný, atypický obraz který je vidět na PR-3 a MPO).
- ANA-Ho fluorescenční obraz na neutrofilech fixovaných ethanolem je výsledkem vazby protilátky na antinukleární protilátky (ANA).

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 fluorescenci asociovanou s MPO lze nalézt u nekrotizující idiopatické vaskulitidy, stejně jako u mikroskopické polyangitidy, idiopatické crescentické glomerulonefritidy, Churg-Strausssového syndromu, poliarteritidy 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 u jiných nonvaskulitidních autoimunitních onemocnění (5).

ANA-Ho obraz ukazuje na systémový lupus erythematoses. Pro systémový lupus erythematoses je senzitivita stanovení antinukleárních protilátek vyšší než 95 %, ačkoli specifita je poměrně nízká [6].

Klinická diagnóza by neměla být uzavřena jen na základě výsledků jednoho testování, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

POZNÁMKA

1. Pro ANCA-etanol-ANA je potřebný objem 60μl.
2. Nedotýkejte se tkáňových řezů v jamkách během zkoušky.
3. Na promytí použijte stříčku, nebo pipetu. Zabraňte zkřížené kontaminaci mezi vzorky.

LITERATURA

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence 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.

6. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 27.12.2021

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme porovnat 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 Praha 5, tel.: +420 257 220 760

SK : JK-Trading spol.s.r.o., Dlhá 43, 900 31 Stupava, 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