

PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZMĚ NEUTROFILŮ (ANCA)

Kód 44850 24 testů	Kód 44852 10 x 6 testů	Kód 44878 10 x 6 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 10 x 6 testů	Kód 44963 60 testů	
Kód 44898 60 testů			
Kód 44911 10 x12 testů		Kód 44964 10 x 6 testů	
Reagencie pro kvalitativní stanovení ANCA. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.			

PRINCIP METODY

Sérové anti-neutrofilní cytoplazmatické protilátky (ANCA) a anti nukleární 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	4 x 6 testů	10 x 6 testů	-	-
A. ANC -formalín	-	-	10 x 6 testů	-
A. ANCA-etanol-ANA	-	-	-	10 x 6 testů
B. PBS (10x)	1 x 100 ml	1 x 100 ml	1 x 100 ml	1 x 100 ml
C+. C-ANCA	1 x 0,3ml	1 x 0,3ml	1 x 0,3ml	1 x 0,3ml
C+. P-ANCA	1 x 0,3ml	1 x 0,3ml	1 x 0,3ml	1 x 0,3ml
C+. ANA-Ho	-	-	-	1 x 0,3ml
C-. Negativní kontrola	1 x 0,3ml	1 x 0,3ml	1 x 0,3ml	1 x 0,3ml
D. IgG FITC/Evans	1 x 3 ml	1 x 3 ml	1 x 3 ml	2 x 3 ml
E. Montovací medium	1 x 3 ml	1 x 3 ml	1 x 3 ml	1 x 3 ml
F. Absorpční papír	1 x 10	1 x 10	1 x 10	-

Kód	44852	44878	44911	44964
A. ANCA-etanol	10x6 testů	-	10x12 testů	-
A. ANCA-formalín	-	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 fluoresceinem 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 Absorpční papír.**

ANCA – formalín

A Sklíčka: Formalinem fixované lidské neutrofilů v každé jamce.

ANCA-etanol-ANA

A Sklíčka: Etanolem fixované lidské neutrofilů a řezy krysích 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 shledána negativní 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.

Známky 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).** kód 44592.
- D. IgG FITC/Evans** konjugát s Evansovou modří (kód 44697).
- E. Montovací medium** (kód 44694).
- C+. C-ANCA** pozitivní kontrola (kód 44854).
- C+. P-ANCA** pozitivní kontrola (kód 44855).
- C+. ANA-Ho** (kód 44502).
- C-. Negativní kontrola** (kód 44696).

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

PBS: Naředte reagencii 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.

DOPLŇUJÍCÍ VYBAVENÍ

- 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 zředte 1/20 v PBS (viz příprava reagencie). 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.

PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZMĚ NEUTROFILŮ (ANCA)

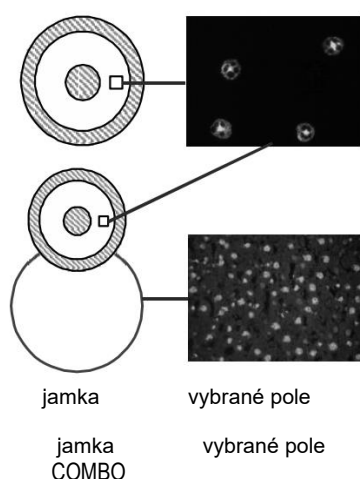
Kód 44850 24 testů	Kód 44852 10 x 6 testů	Kód 44878 10 x 6 testů	CE PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZMĚ NEUTROFILŮ (ANCA) Nepřímá imunofluorescence Lidské neutrofily ANCA–etanol ANCA–formalín ANCA–metanol ANCA-etanol-ANA
Kód 44851 60 testů	Kód 44895 10 x 6 testů	Kód 44963 60 testů	
Kód 44898 60 testů			
Kód 44911 10 x12 testů	Kód 44964 10 x 6 testů		
Reagencie pro kvalitativní stanovení ANCA. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.			

PRACOVNÍ POSTUP

- Vytemperujte reagenty a vzorky na pokojovou teplotu.
- Kápněte 1 kapku (25 µL) naředěného vzorku nebo kontroly do každé jamky (A). Ujistěte se, že je jamka kompletně pokrytá. (Poznámka 1 a 2).
- Inkubujte sklíčka 30 minut při pokojové teplotě (15-30 °C) uvnitř zvlhčovací komůrky.
- Sklička nakloňte a opatrným poklepáváním o podložku (filtrační papír) odstraňte přebytečné kapky vzorku. Zabraňte promíchání sér.
- Sklička krátce opláchněte v lehkém proudu PBS. (viz příprava reagentů) (Poznámka 3).
- Sklička důkladně promyjte ponořením do fosfátového pufru na dobu 5 minut. Poté fosfátový pufr vyměňte a promývání opakujte.
- Skličko opatrně osušte speciálním absorpčním papírem. Substrát musí zůstat vlhký po celou dobu procedury.
- Do každé jamky přidejte 1 kapku reagentu D (jako v bodě 2). Sklička 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.

ODEČÍTÁNÍ

Sklička vyhodnocujte s použitím fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 250-400 x). Pro lepší výsledky sklička vyhodnocujte okamžitě. Pro odečet zvolte pole mezi okrajem a středem se stejnou rovinnou rozložením buněk a jednotným jasnem jader. Intenzita fluorescence v centru a na okrajích není charakteristická.



Pozorování specifického fluorescenčního zbarvení popsaného níže při doporučeném ředění by mělo být považováno za pozitivní výsledek.

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

fluorescenci u P-ANCA protilátek. Také se může objevit méně typická fluorescence, kterou lze hodnotit jako atypické ANCA protilátky.

V některých případech, může být vzor barvení P-ANCA obraz pozorovaný na neutrofilech fixovaných etanolem způsoben anti nukleárními protilátkami (ANA). Tyto výsledky by měly být potvrzeny nanesením vzorku na neutrofily fixované formalinem nebo na podložní sklička s dvojitým stanovením, která obsahují etanolem fixované neutrofily a fezy 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 ukazuje P-ANCA vzor.

Kromě těchto vzorců barvení se mohou vyskytnout méně časté vzory, jako je X-ANCA (nebo atypická P-ANCA) vykazující široké nehomogenní perinukleární zbarvení, případně doprovázené difúzní cytoplazmatickým vzorem bez zvýraznění interlobulární zóny. Pro správné pozorování tohoto vzoru se doporučuje použití neutrofilů fixovaných **metanolem**.

Pozitivní 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 neutrofiley.

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

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

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 formalínem fixovanými neutrofiley.

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 svoji vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

CHARAKTERISTIKA TESTU

- IgG FITC/Evans konjugát je hodnocen podle mezinárodního standardu WHO pro ovčí anti-human imunoglobulin značený FITC.
- 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

PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZMĚ NEUTROFILŮ (ANCA)

Kód 44850 24 testů	Kód 44852 10 x 6 testů	Kód 44878 10 x 6 testů	 PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZMĚ NEUTROFILŮ (ANCA) Nepřímá imunofluorescence Lidské neutrofilů
Kód 44851 60 testů	Kód 44895 10 x 6 testů	Kód 44963 60 testů	
Kód 44898 60 testů			
Kód 44911 10 x12 testů	Kód 44964 10 x 6 testů		
Reagencie pro kvalitativní stanovení ANCA. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.			ANCA-ethanol ANCA-formalín ANCA-metanol ANCA-ethanol-ANA

kontroly byla ověřena proti referenčnímu séru AF/CDC1 z Centers for Disease Control.

- C-ANCA zbarvení obrazu na etanolem fixovaných lidských 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 fluorescence obraz na neutrofilech fixovaných etanolem je výsledkem vazby protilátky na anti nukleární protilátky (ANA).

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Existuje silná souvislost mezi Wegenerovou granulomatózou a přítomností vzoru C-ANCA spojeného s PR-3. Tento vzor barvení se téměř výhradně vyskytuje u pacientů s tímto onemocněním a jeho diagnostická specifita je vyšší než 90 %. Citlivost závisí na stadiu onemocnění, ale lze jej nalézt v průměru u 66 % případů⁽²⁾. Vzorec P-ANCA spojený s MPO lze nalézt u nekrotizující idiopatické vaskulitidy, jako je mikroskopická polyangitida, idiopatická srpkovitá glomerulonefritida, Churg-Straussův syndrom, poliarteritis nodosa a Wegenerova granulomatóza. Senzitivita P-ANCA pro mikroskopickou polyangitidu a Churg-Straussův syndrom je 58 % a 74,5 %, zatímco specifita je 81 % a 95 %^(3,4).

Vzor X-Anca je spojen s diagnostikou zánětlivých střevních onemocnění, jako je ulcerózní kolitida (50-70 %) a Crohnova choroba (10-30 %), stejně jako další nevaskulitická autoimunitní onemocnění⁵. Vzorec ANA-Ho svědčí pro systémový lupus erythematosus. Citlivost na stanovení anti nukleárních protilátek je vyšší než 95 % pro systémový lupus erythematosus, ačkoli specifita je poměrně nízká⁶.

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

POZNÁMKY

1. Pro ANCA-ethanol-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. Melnickoff 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. 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.
6. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 14.4. 2025

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí. Originální návod, LOT certifikát a bezpečnostní listy jsou k dispozici na internetové adrese: <https://einfo.bio> a na: www.jktrading.cz

Výhradní distributor:

ČR: JK-Trading spol.s.r.o., Křivaticová 421/5, 150 21 Praha 5,
tel.: +420 257 220 760, paha@jktrading.cz
SK: JK-Trading spol.s.r.o., Dlhá 43, 900 31 Stupava,
tel.: + 421 264 774 591, jk-trading@jk-trading.sk

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 informační centrum Bratislava, 833 05,
Limbová 5, tel.: +421 254 774 166