

AESKUSLIDES®

Produktová řada IFA



Návod k použití



ANA-HEp2

Obj.č.	Popis	Počet testů
51.100	ANA-HEp2 (12 jamek)	120

nDNA (Crithidia luciliae)

Obj.č.	Popis	Počet testů
53.100	nDNA (10 jamek)	100

ANCA

Obj.č.	Popis	Počet testů
54.200	ANCA Ethanol (10 jamek)	100
54.201	ANCA Formalin (10 jamek)	100

Tkáně hlodavců (játra, ledviny, žaludek)(krysa/myš/LK/LKS)

Obj.č.	Popis	Počet testů
517.050	rLKS – krysa, obaleno (5 jamek)	50
517.101	rLKS – krysa, obaleno (10 jamek)	100
517.051	rLKS – krysa, odděleno (5 jamek)	50
517.100	rLKS – krysa, odděleno (10 jamek)	100
518.050	mLKS – myš, odděleno (5 jamek)	50
518.100	mLKS – myš, odděleno (10 jamek)	100
55.050	rKS – krysa, odděleno (5 jamek)	50
56.050	mKS – myš, odděleno (5 jamek)	50
56.100	mKS – myš, odděleno (10 jamek)	100

EMA (Endomysium)

Obj.č.	Popis	Počet testů
512.050	EMA IgA (5 jamek)	50
512.100	EMA IgA (10 jamek)	100
512.060	EMA IgG (5 jamek)	50
512.101	EMA IgG (10 jamek)	100

ANA-HEp-2

Obj.č.	Popis	Počet testů
51.100	ANA-HEp2 (12 jamek)	120
51.100.demo	ANA-HEp2 (12 jamek) Demo souprava	24
51.100.bulk3	ANA-HEp2 (12 jamek) Bulk souprava x 3	360
51.100.bulk5	ANA-HEp2 (12 jamek) Bulk souprava x 5	600

1. Použití

AESKUSLIDES ANA-HEp-2 je nepřímá imunofluorescenční analýza sloužící k detekci jaderných a/nebo cytoplazmatických autoprotilátek v lidském séru.

Analýza je nástrojem v diferenciální diagnostice systémových revmatoidních onemocnění jako je systémová lupus erythematosus (SLE), smíšené onemocnění pojivových tkání (MCTD), sklerodermie, Sjögrenův syndrom (SS), polymyositida a dermatomyositida.

2. Klinické využití

Antijaderné protilátky (ANA) namířené proti různým jaderným a cytoplazmatickým antigenům se s vysokou frekvencí vyskytují při systémových revmatoidních onemocněních a proto jsou důležitým nástrojem v diferenciální diagnostice těchto chorob. Například SS-A (Ro) a SS-B (La) protilátky jsou spojeny se Sjögrenovým syndromem (SS) a anti-dsDNA, anti-SM, anti-histonové a anti-nukleozomové protilátky se SLE (systémová lupus erythematosus). Anti-RNP protilátky se vyskytují u smíšených onemocnění pojivových tkání (MCTD) a SLE, anti-Sci-70 protilátky jsou spojovány se sklerodermií (progresivní systémová skleróza {PSS}), anti-Jo-1 protilátky s polymyositis a dermatomyositis a anti-centromerové protilátky s CREST syndromem (pro detailnější informace viz kapitola 4 níže).

Nepřímý imunofluorescenční test (IFT) na eukaryotických buňkách např. HEp2 se stal uznávanou metodou pro detekci ANA protilátek. Ačkoliv je IFT citlivým testem, je náročný při velkém počtu vzorků a také zatížen omyly způsobenými subjektivní interpretací a rozdíly mezi fluorescenčními mikroskopy. Specifičnosti jednotlivých typů protilátek je proto třeba určit pomocí přesnějšího testování metodou ELISA používající pro jednoduchou a spolehlivou diferenciaci ANA protilátek specifické cílové antigeny.

Charakteristika antigenu: HEp-2 buňky

Zkřížená reaktivita: není známá

Detekce protilátek je založena na principu nepřímé imunofluorescenční analýzy (IIFA). Mikroskopická sklíčka jsou potažena tkáňovými řezy nebo buňkami tkáňových kultur (HEp-2 buňky (ANA), granulocyty (ANCA) nebo *Crithidia luciliae* (nDNA)). Pokud sérum pacienta obsahuje specifické protilátky, naváží se během první inkubace. Po odstranění nenavázaného materiálu promýváním, navázané protilátky se během druhé inkubace detekují anti-lidskými imunoglobuliny konjugovanými s fluoresceinem. Specifické zelené fluorescenční zbarvení komplexu antigen-protilátka se objeví pod fluorescenčním mikroskopem.

3. Pracovní postup

Nahlédněte do Pracovního postupu uvedeného ve Společném manuálu, kapitola 11, strana 30, kde najdete detailnější informace. Následující detaily se používají u souprav ANA-HEp2:

Doba barvení: 30 – 90 sekund

Doporučený titr pro screening:

- 1:80 pro vzorky dospělých
- 1:40 pro pediatrické vzorky

4. Interpretace

HEp-2 jsou lidské epiteliální buňky, kultivované z tkáně pacientů trpících karcinomem hrtanu. Substrát nabízí homogenní buněčný růst bez dalších buněčných pomocných látek. Pro hodnocení vzorků mají mitotické buňky velký význam, protože lze mnohem přesněji definovat obraz jádra.

Příslušný konečný titr je ředění, kdy pacientovo sérum ještě ukazuje jasnou fluorescenci.

Hodnocení by se mělo vždy provádět s pozitivní i negativní kontrolou. U slabé fluorescence buněčného jádra u titrů v rozmezí 1:40 (děti) - 1:80 (dospělí) nebo u nejasností s ohledem na klinická data, by se výsledky měly porovnat s kontrolami. V takovém případě by se vzorky měly odebrat přibližně každých 6 týdnů a testovat stejným způsobem.¹

¹ Wiik A.Scand J Rheumatol 2005;34:260-8.

4.1. Obraz jaderné membrány

4.1.1 Obraz homogenní jaderné membrány

Hladký homogenní kroužek fluorescence jaderné membrány u buněk v interfázi. Vzorky se silnými protilátkami mohou působit dojmem celistvě obarveného jádra. Podobný obraz je u buněk v telofázi. U buněk v metafázi je fluorescence lokalizována difúzně v cytoplazmě a chromozomální materiál zůstává neobarven.

4.1.2 Obraz pórů v jaderné membráně

Přerušovaná bodová fluorescence podél jaderné membrány. Při proostření skrz jádro je možné toto bodové barvení spatřit po celém jádře. Podobný obraz je v telofázi. V metafázi je fluorescence lokalizována difúzně po celé cytoplazmě. Vzorky se silnými protilátkami mohou působit dojmem celistvě obarveného jádra.

4.2. Nukleoplazmický obraz

4.2.1 Obraz homogenního jádra

Jednotlivá difúzní fluorescence pokrývající kompletní jádro. U některých protilátek hlavně proti chromozomálním komponentům (DNA, histony atp.) lze spatřit zvýrazněnou fluorescenci na okrajích jádra. U některých případů je možné spatřit i intenzivnější zbarvení vnitřního okraje jádra (jaderný lem).

U některých vzorků se může navíc vyskytnout i periferní zbarvení jadérek. Nukleolární barvení je variabilní. V metafázi lze spatřit homogenní nebo periferní zbarvení chromatinu.

Lze rozlišit dva nepatrně odlišné obrazy:

- *homogenní jaderný obraz s homogenním obarvením jadérek*
- *homogenní jaderný obraz s negativními jadérky*

4.2.2. Obraz jaderných skvrn

Lze nalézt mnoho typů obrazu jaderných skvrn, ale může být obtížné je rozeznat. S rozumnou přesností rozpoznáváme 7 typů jaderných skvrn. Chromozomy v metafázi jsou u šesti z nich negativní, pozitivní jsou pouze u centromerového obrazu.

4.2.3 Obraz velkých jaderných skvrn (jaderná matrix) (SC35)

Proměnlivé velké skvrny po celém jádře, dříve nazývané barvení „jaderné matrix“, nejpravděpodobněji způsobené barvením granulí interchromatinu. Jadérka jsou negativní. Cytoplazma v metafázi a telofázi ukazuje difúzně lokalizované skvrny a negativní chromatinové pásy.

4.2.4 Obraz drsných jaderných skvrn

Hustě rozmístěné skvrny různých velikostí, obvykle se vyskytující s většími skvrnami, umístěné po celém jádře buněk v interfázi. Jadérka jsou negativní. Cytoplazma buněk v metafázi a telofázi obsahuje skvrny se zhuštěním okolo chromatinových pásů, jež jsou samy negativní. Tento obraz je obvykle spojen s barvením spliceozomů.

4.2.5 Obraz jemných jaderných skvrn

Obarvení jemných skvrn rovnoměrně rozmístěných, někdy velmi hustě, takže většinou je docíleno homogenního obrazu. Jadérka mohou být pozitivní (zvláště s anti-SSB/La protilátkami) nebo negativní. Cytoplazma buněk v metafázi obsahuje jemné skvrny a zhuštění okolo chromatinových

pásů, jež jsou samy negativní. Jadérka buněk v telofázi mohou být pozitivní, někdy jsou obarveny silněji než u buněk v interfázi.

4.2.6 Zrnitý obraz (jako např. u Scl-70)

Uniformní husté zrnité barvení nukleoplazmy a oblasti chromozomů buněk v metafázi a telofázi, často se zdůrazněnými pozitivními jádérky. Při menším rozlišení může barvení vypadat homogenně. Toto barvení se nevyskytuje pouze u anti-Scl-70 pozitivních sér, ale i u jiných vzorků.

4.2.7 Pleomorfní obraz jaderných skvrn

Jádra proliferaujících (S-fáze) buněk ukazují různé typy skvrn od jemných až po velmi drsné nepravidelné skvrny nukleoplazmy (10-50 % buněk v závislosti na jejich přípravě). U některých buněk jsou stejně zbarvena jádérka. Klidové (G-fáze) buňky a buňky v metafázi jsou negativní. Tento obraz je také znám jako „anti-PCNA“ obraz (anti jaderný antigen proliferaujících buněk), běžně se vyskytuje ve spojení s jinými obrazy.

4.2.8 Centromerový obraz

Spíše uniformní nespojitě skvrny lokalizované po celém jádře (40-60 teček na jádro). Buňky v telofázi a metafázi mají tyto skvrny vždy na kondenzovaném chromozomovém materiálu. Tento obraz je způsoben protilátkami proti kinetochorům chromozomů, které mohou rozpoznávat několik proteinů centromery (CENP-A,B,C,D,E).

4.2.9 Mnohonásobné jaderné tečky (NSp-1)

5-10 bodů na jádro s barvením jaderných substruktur, tzv. PML tělíska (protein promyelocytární leukemie), chromozomy buněk v metafázi a telofázi jsou negativní.

4.2.10 Obraz Kachalových tělísek (Cajal nebo coiled body)

2-6 bodů na jádře lokalizovaných v nukleoplazmě, často v těsné blízkosti jáderek. Chromatinové pásy nejsou v metafázi ani v telofázi zbarveny.

4.3. Nukleolární obraz

4.3.1 Homogenní nukleolární obraz

Fluorescence po celém jádru, chromozomy ani oblasti organizátorů jádru v dělicích se buňkách nejsou zbarveny.

4.3.2 Trsnatý nukleolární obraz

Zářivé shluky větších granul odpovídající fibrilárním centrům nukleolů stejně jako Kachalovým tělískům. U mitotických buněk v metafázi a telofázi se u ekvatoriálního pásu objevuje fluorescenční nepravidelný vějířovitý okraj.

4.3.3 Tečkovaný nukleolární obraz

Malá samostatná zrnka hlavně ve středu nukleolů. U buněk v metafázi je uvnitř chromatinového tělíska 2-5 oddělených skvrnek, korespondujících s oblastí organizátorů jádru.

4.4. Obraz dělicího vřeténka

4.4.1 Obraz centriolů (centrozomu)

Dělicí vřeténko v metafázi má samostatné fluoreskující tečky na každém z pólů ležících kolmo jeden k druhému. U buněk v interfázi se v cytoplazmě objevuje jedna nebo dvě zářící tečky těsně přilehlé k jádru.

4.4.2 Obraz pólů dělicího vřeténka (NuMA)

Jsou zbarvené pouze oblasti pólů dělicího vřeténka buňky v metafázi (trojúhelníkový nebo rohlíkovitý obraz). V telofázi jsou vlákna dělicího vřeténka negativní a ještě více lineárního vzhledu. U klidových buněk a buněk v telofázi se většinou objevuje obraz jemných jaderných skvrn s negativními jádérky, ale i tyto buňky mohou být negativní.

4.4.3 Obraz vláken dělicího vřeténka

Obarvení všech vláken dělicího vřeténka od pólu k chromatinovému pásu u buněk v metafázi. Chromozomy klidových buněk nebo dělicích se buněk nejsou zbarveny.

4.4.4 Obraz dělicího tělíska (MSA-2)

U buněk v profázi a metafázi je fluorescence lokalizována v oblasti chromozomů a to ve formě jemných proužků umístěných kolmo k okraji metafázového pásu. U telofáze je barvení omezeno na vznikající rýhu a zúžení spojující dělicí tělísko mezi buňkami dokončujícími cytokinezi. Obarvené buňky v S a G2 fázi mají samostatné nebo nepravidelné jaderné skvrny. Tento obraz vzniká díky protilátkám proti MSA-2 antigenu (Mitotic Spindle Antigen2).

4.4.5 Obraz C-F

Nejcharakterističtější znak je pozorován u buněk v metafázi, kdy je obraz složen ze dvou skupin hustých velkých granul obklopujících chromozomální ekvatoriální pás jako svorka, často připomínající zip. Tato granula jsou součástí centromery. Okolní cytoplazma je difúzně obarvena. U buněk v profázi je k vidění husté tečkování na chromozomech. Obraz velmi jemných hustých jaderných skvrn se objevuje u nemnoha buněk v interfázi. Tento obraz vzniká díky protilátkám proti MSA-3 antigenu (Mitotic Spindle Antigen 3), který je identický s centromerickým proteinem (CENP-F).

4.5. Obraz cytoplazmatické fluorescence

4.5.1 Obraz jemných cytoplazmatických skvrn

Jemná granula rozptýlená po celé cytoplazmě, která jsou více patrná směrem k okraji buňky, někdy připomínají hvězdný prach. Jádro ani jadérka nejsou zbarvena. Tento obraz je charakteristický pro protilátky proti tRNA-syntetáze. Chromozomální materiál buněk v metafázi je negativní.

4.5.2 Obraz difúzní cytoplazmy

Velmi jemné husté granulární až homogenní barvení nebo zamížený obraz pokrývající kompletní cytoplazmu nebo její část. Jádro neobarveno, ale jadérka mohou být homogenně obarvena, pokud jsou zde protilátky proti ribozomálním RNA proteinům, jejichž prekurzory se v jadérech nalézají. Chromozomální materiál buněk v metafázi je negativní.

4.5.3 Mitochondriální obraz

Velká nepravidelná granula rozprostírající se v retikulární síti z jádra po celé cytoplazmě. Hlavní rozpoznávaný antigenový shluk M2 je složen ze 4 hlavních mitochondriálních proteinů vnitřní membrány. Jádra i jadérka jsou negativní, ale silně pozitivní séra mohou způsobit dojem zbarvení jaderných skvrn.

4.5.4 Lysozomální obraz

Nepravidelné střední až velké organely rozmístěné po celé cytoplazmě, jež mohou být patrné díky protilátkám proti organelám, jako jsou lysozomy nebo peroxozomy. Jádra ani jadérka nejsou obarvena, ale u dělicích se buněk je difúzní zbarvení cytoplazmy.

4.5.5 Obraz Golgiho aparátu

Obarvení polárních organel přiléhajících k jádru a složených z nepravidelných velkých granul. Jádra i jadérka jsou negativní. Cytoplazma dělicích se buněk je difúzně zbarvena se zdůrazněním okolo chromozomálního materiálu.

4.5.6 Aktinový obraz

Barví se stresová vlákna ležící v přímé ohniskové rovině přímo pod plazmatickou membránou. Jádra, jadérka a chromozomy v metafázi jsou negativní. Aktinová vlákna přemostňují celou délku buňky těsně u plazmatické membrány. Lze také spatřit rozšíření buněčné membrány připomínající dendrit.

4.5.7 Vimentinový obraz

Hojná jemná vlákna rozprostírající se po celé cytoplazmě s obarvenou sítí radiálních vláken a souborem svazků okolo jádra ve spiralizované formě.

4.6. Negativní obraz

4.6.1 Negativní – příklad 1

Prakticky není vidět žádná fluorescence cytoplazmy nebo jádra. Jednotlivé a často nepravidelné zelené body objevující se v zorném poli reprezentují shluky konjugátu. Buněčné struktury se mohou jevit jako nahnědlé (např. jadérka), hlavně na starých sklíčkových preparátech nebo preparátech uchovávaných s anti-fade reagensy. Buněčné zbytky mohou zapříčinit artefaktuální zelenavé fluorescentní body.

4.6.2 Negativní - příklad 2

Velmi slabá zelenavá fluorescence jádra, cytoplazmy nebo obou s intenzitou nižší než má slabě pozitivní vzorek. Takový výsledek je nejlépe posuzovat se slabě pozitivním ANA sérem, které zahrneme jako kontrolu citlivosti ke každému dennímu testování spolu s ANA negativním kontrolním sérem a jasně pozitivním ANA kontrolním sérem.

4.7. Nehodnotitelný obraz

Všechny ostatní obrazy barvení související s buněčnými organelami nebo strukturami, které nebyly zahrnuty ve výše uvedené klasifikační taxonomii.

4.8 Příloha

V laboratořích používajících řezy živočišných tkání zpracované kryostatem tj. ledviny nebo játra hlodavců, obvykle ANA substrát postrádá fluorescenční obraz, jako je pleomorfní obraz jaderných skvrn, mnohonásobné jaderné skvrny, obraz Kachalových tělísek, některé nukleolární obrazy a většina cytoplazmatických obrazů. Stejně tak není možné spatřit obrazy dělicího vřeténka. Mitochondriální obrazy mohou být spatřeny na mnoha tkáních v podobě drsných jaderných skvrn, původně objevených na řezech zvířecích ledvin. Obraz homogenní jaderné membrány je často jasně detekovatelný na krysích játrech. Hodnota cut-off pro pozitivní ANA nebo HEP-2 buňky je obvykle nastavena nad 1:100, kdežto na tkáňových řezech je obvykle nastavena na nižší ředění.

Některé obrazy barvení jsou obvykle pozorovány společně v jednom séru tj. obraz mnohonásobných jaderných skvrn dohromady s mitochondriálním obrazem (obojí je charakteristické pro primární biliární cirhózu) a pleomorfní obraz jaderných skvrn společně s homogenním jaderným obrazem nebo obrazem jemných nebo drsných jaderných skvrn (obojí charakteristické pro systémový lupus erythematosus).

Je třeba brát na zřetel, že některé laboratoře a soupravy používají FITC-konjugáty proti všem Ig třídám protilátek. Aktuální praxe je založena na testování s IgG-specifickým konjugátem.

6. Obsah standardní soupravy

6.1 Standardní souprava

		Skříčka (10x v každé soupravě)			Konjugát (lahvička 4 ml)			Pozitivní kontrola (1x 0,5 ml lahvička v každé soupravě)	
Kat.č.	Popis soupravy	Kat.č.	Jamek	Potaženy	Množství	Kat.č.	Popis	Kat.č.	Popis
51.100	ANA-HEp-2 (12 jamek)	s51.100	12	Buňkami ANA-HEp-2	1x	c51.100	IgG (H+L řetězec) Modré víčko: jemně modře zbarvený roztok. Obsahuje: BSA, Anti-humánní protilátky značené fluoresceinem (FITC)	PC51.100	Kontrola ANA vzoru (homogenní) Červené víčko: bezbarvý roztok. Obsahuje: Humánní sérum (naředěné), azid sodný < 0.1% (konzervans)
Poznámka: Obsah zbývajících součástí soupravy tj. společné reagentie (pufry, negativní kontrola, montovací médium atd.) jsou popsány níže v kapitole 7 Společné reagentie obsažené v soupravách, protože ty jsou identické ve všech AESKUSLIDES soupravách.									

6.2 Demo a Bulk soupravy

xxxDemo soupravy mají stejný obsah jako standardní souprava, ale obsahují 2 skříčky místo 10.

Např. kat.č. **51.100 Demo** = kat.č. **51.100** pouze se dvěma skříčky.

xxxBulk3 soupravy jsou množstevní soupravy obsahující 3 násobek obsahu standardní soupravy.

xxxBulk5 soupravy jsou množstevní soupravy obsahující 5 násobek obsahu standardní soupravy.

nDNA (*Crithidia luciliae*)

Obj.č.	Popis	Počet testů
53.100	nDNA (10 jamek)	100
53.100.demo	nDNA (10 jamek) Demo souprava	20
53.100.bulk3	nDNA (10 jamek) Bulk souprava x 3	300
53.100.bulk5	nDNA (10 jamek) Bulk souprava x 5	500

1. Použití

AESKUSLIDES nDNA (*Crithidia luciliae*) je nepřímá imunofluorescenční analýza sloužící k detekci IgG protilátek proti nativní dvoušroubovicové DNA v lidském séru.

2. Klinické využití

Protilátky navazující se na DNA patří do skupiny antijaderných protilátek (ANA), které jsou pozorovány u několika autoimunitních onemocnění. Protilátky reagující s nativní dvouřetězcovou (ds) DNA jsou pokládány za specifické pro systémový lupus erythematosus (SLE) a byly pozorovány u přibližně 50-80 % pacientů.

Protilátky proti dsDNA jsou nalézány během aktivní fáze SLE. Jejich koncentrace v séru pozitivně koreluje se závažností choroby. Proto je detekce těchto protilátek důležitá pro diagnostiku a klinické sledování SLE a byla ustanovena jedním z 11 ACR kritérií pro diagnostiku SLE.

Většina pacientů se SLE má protilátky IgG třídy proti dsDNA. Tyto autoprotilátky jsou spojovány s lupus nephritis. Přibližně u 30 % SLE pacientů se navíc objevují anti-dsDNA protilátky třídy IgA. Existují domněnky, podle kterých přítomnost anti-ds DNA protilátek třídy IgA může definovat určitou podskupinu pacientů se SLE. Ve skutečnosti studie ukazují spojení této podtřídy s určitými parametry aktivity onemocnění, jako je zvýšená hodnota sedimentace erytrocytů, nebo spotřeba C3-komponenty komplementu, stejně jako s klinickými parametry kutánní vaskulitidy, akrální nekrózy a erytému. Zatímco žádné spojení s nefritidou a artritidou nalezeno nebylo.

IgM třída anti-dsDNA protilátek se objevuje u 52 % sér pacientů se SLE. Na rozdíl od IgG a IgA třídy autoprotilátek podtřída IgM s aktivitou onemocnění nekoreluje. Nicméně byla dokázána velmi významná negativní korelace mezi IgM anti-dsDNA protilátkami a lupus nephritis, včetně jejich laboratorních parametrů. Z toho důvodu mohou IgM protilátky indikovat podskupinu pacientů s lupusem chráněných proti riziku rozvoje nephritis.

Charakteristika antigenu: mitochondriální DNA pocházející z *Crithidia luciliae* (jedenbičkatý prvek)

Zkřížená reaktivita: není známá

Detekce protilátek je založena na principu nepřímé imunofluorescenční analýzy (IIFA). Mikroskopická sklíčka jsou potažena tkáňovými řezy nebo buňkami tkáňových kultur (HEp-2 buňky (ANA), granulocyty (ANCA) nebo *Crithidia luciliae* (nDNA)). Pokud sérum pacienta obsahuje specifické protilátky, naváží se během první inkubace. Po odstranění nenavázaného materiálu promýváním, navázané protilátky se během druhé inkubace detekují anti-lidskými imunoglobuliny konjugovanými s fluoresceinem. Specifické zelené fluorescenční zbarvení komplexu antigen-protilátka se objeví pod fluorescenčním mikroskopem.

3. Pracovní postup

Nahlédněte do Pracovního postupu uvedeného ve Společném manuálu, kapitola 11, strana 30, kde najdete detailnější informace. Následující detaily se používají u souprav nDNA:

Doba barvení: 30 – 90 sekund

Doporučený titr pro screening: 1:10

4. Interpretace

Doporučený titr pro screening 1:10

Crithidia luciliae obsahuje obří mitochondrion, známý také jako kinetoplast, který obsahuje pouze dsDNA. Pokud jsou přítomny protilátky proti nDNA objevuje se homogenní fluorescence kinetoplastu, nebo přesněji řečeno jádra a kinetoplastu, jež je umístěn mezi jádrem a bazálním tělískem blízko bičíku.

Hodnocení je vždy třeba provádět s pomocí pozitivní a negativní kontroly.

Vzorek je třeba posuzovat jako nDNA negativní, pokud se fluorescence bazálního tělíska objeví pouze blízko začátku bičíku nebo jádra a neexistují specifické nDNA protilátky.

Příklady ředění:

1:10	10 µl séra + 90 µl ředícího pufru
1:20	10 µl séra + 190 µl ředícího pufru
1:40	10 µl séra + 390 µl ředícího pufru
1:80	10 µl séra + 790 µl ředícího pufru
atd.	

V přítomnosti anti-ds-DNA se imunofluorescence objevuje v podobě charakteristického dvoubodového obrazu, zatímco s non-dsDNA jadernými protilátkami fluoreskuje pouze jádro (dsDNA je důležitým autoantigenem u SLE se specifíčností 95 %).

U pacientů se SLE jsou pozorovány protilátky proti celé škále jaderných antigenů. Největší korelace s touto chorobou je u Sm-protilátek (glykoprotein), které se projevují jako obraz jaderných skvrn u HEp-2 buněk a nDNA-protilátek (periferní nebo homogenní obraz u HEp-2 buněk).

Protilátky proti nativní dvoušroubovicové DNA jsou vysoce specifické pro SLE. Ačkoliv se nízké hladiny nDNA protilátek mohou objevovat i u jiných onemocnění, např. Sjörgenův syndrom, smíšené onemocnění pojivových tkání (MCTD) a dermatomyositida, jsou vysoké titry nDNA protilátek detekovány téměř výlučně u SLE. ²

² Stroch WB; Immunfluoreszenz-Fibel 2nd Edition; Blackweli Wissenschaftsverlag 1997

6. Obsah standardní soupravy

6.1 Standardní souprava

		Sklička (10x v každé soupravě)			Konjugát (lahvička 4 ml)			Pozitivní kontrola (1x 0,5 ml lahvička v každé soupravě)	
Kat.č.	Popis soupravy	Kat.č.	Jamek	Potaženy	Množství	Kat.č.	Popis	Kat.č.	Popis
53.100	nDNA (10 jamek)	sS53.100	10	Buňkami Crithidia luciliae	1x	c53.100	IgG (H+L řetězec) Modré víčko: jemně modře zbarvený roztok. Obsahuje: BSA, Anti-humánní protilátky značené fluoresceinem (FITC)	PC53.100	Pozitivní kontrola nDNA Červené víčko: bezbarvý roztok. Obsahuje: Humánní sérum (naředěné), azid sodný < 0.1% (konzervans)
Poznámka: Obsah zbývajících součástí soupravy tj. společné reagentie (pufry, negativní kontrola, montovací médium atd.) jsou popsány níže v kapitole 7 Společné reagentie obsažené v soupravách, protože ty jsou identické ve všech AESKUSLIDES soupravách.									

6.2 Demo a Bulk soupravy

xxx Demo soupravy mají stejný obsah jako standardní souprava, ale obsahují 2 sklíčka místo 10.

Např. kat.č. **53.100 Demo** = kat.č. **53.100 pouze se dvěma sklíčky**.

xxx Bulk3 soupravy jsou množstevní soupravy obsahující 3 násobek obsahu standardní soupravy.

xxx Bulk5 soupravy jsou množstevní soupravy obsahující 5 násobek obsahu standardní soupravy.

ANCA

Obj.č.	Popis	Počet testů
54.200	ANCA Ethanol (10 jamek)	100
54.200.demo	ANCA Ethanol (10 jamek) Demo souprava	20
54.201	ANCA Formalin (10 jamek)	100
54.201.demo	ANCA Formalin (10 jamek) Demo souprava	20

1. Použití

AESKUSLIDES ANCA je nepřímá imunofluorescenční analýza sloužící k detekci anti-neutrofilních cytoplazmatických autoprotilátek v lidském séru.

Analýza je nástrojem pro diferenciální diagnostiku ANCA asociovaných vaskulitid (AAV), jako je granulomatosis s polyangiitidou (Wenegerova)³, mikroskopická polyangiitida a Churg-Straussův syndrom.

2. Klinické využití

Zkratka ANCA (Anti-neutrofilní cytoplazmatické autoprotilátky) popisuje skupinu protilátek namířených proti různým komponentům neutrofilních granulocytů a monocytů. Zatím je pro detekci ANCA uznávanou metodou nepřímý imunofluorescenční test na ethanolém fixovaných neutrofilech. Bylo zřejmé, že některé ANCA vytvářejí na neutrofilech fixovaných ethanolém cytoplazmatický fluorescenční obraz (C-ANCA), zatímco jiné vytvářejí perinukleární obraz (zvaný p-ANCA). Protože oba obrazy mohou zahrnovat mnoho antigenů, imunofluorescence nestačí pro diferenciální diagnostiku vaskulitidy; proto každý imunofluorescenční test (IFA) by měl být ověřen specifickými ELISA testy.^{4,5}

Některé ANCA způsobují atypický fluorescenční obraz (A-ANCA), který může být technicky obtížně odlišitelný od obrazu vytvářeného na ethanolém fixovaných neutrofilech anti-jadernými protilátkami (ANA). Pro zlepšení jejich rozlišení se používají neutrofilie fixované formalínem. ANCA, které vyvolávají P-ANCA/A-ANCA barvení u neutrofilů fixovaných ethanolém, ukazují cytoplazmatický obraz při použití neutrofilů fixovaných formalínem jako substrátu. V případě, že obraz barvení je negativní, mělo by se provést testování ANA s HEp2.⁶

Myeloperoxidáza (MPO) byla určena jako hlavní P-ANCA antigen (MPO-ANCA). Nicméně další buněčné komponenty jako je laktoferrin, kathepsin G, lysozym a elastáza také způsobují perinukleární fluorescenci a jsou proto zahrnuty do skupiny P-ANCA. Nicméně nejsou specificky spojovány s AAV a mohou hrát roli při diferenciální diagnostice dalších onemocnění nesouvisejících s vaskulitidou.⁷

Pro porovnání je proteináza 3 hlavní cílový antigen C-ANCA (PR3-ANCA).⁸ Dalším antigenem tvořícím C-ANCA je BPI (baktericidní/permeabilitu zvyšující protein).⁹

ANCA se nacházejí často u pacientů s mikroskopickou polyangiitidou (60 % MPO-ANCA, 30 % PR3-ANCA) a u pacientů s Churg-Straussovým syndromem (30 % MPO-ANCA, 30 % PR3-ANCA).¹⁰ Autoprotilátky proti PR3 jsou specifickým serologickým markerem granulomatózy s polyangiitis (Weneger). Zde 50 % (lokalizované onemocnění) až 95 % (generalizované onemocnění) vykazuje PR3-ANCA.¹¹

Protilátky proti dalším antigenům významných u ANCA jako je laktoferrin, kathepsin G, elastáza a BPI byly spojovány s širokým spektrem onemocnění. Nicméně jasný klinický význam se stále zkoumá.⁷ V případě anti-elastázových protilátek byla prokázána korelace s destruktivními lézemi střední čáry indukovanými kokainem (CIMDL).¹²

Charakteristika antigenu: humánní neutrofilie (granulocyty) fixované buď ethanolém, nebo formalínem

Zkřížená reaktivita: Jak je popsáno v kapitole Klinické použití, přítomnost ANA může poskytovat fluorescenční obraz, který může být zaměněn za P-ANCA/A-ANCA. Jinak nebyla přítomna žádná zkřížená reaktivita.

Detekce protilátek je založena na principu nepřímé imunofluorescenční analýzy (IIFA). Mikroskopická sklíčka jsou potažena tkáňovými řezy nebo buňkami tkáňových kultur (HEp-2 buňky (ANA), granulocyty (ANCA) nebo *Crithidia luciliae* (nDNA)). Pokud sérum pacienta obsahuje specifické protilátky, naváží se během první inkubace. Po odstranění nenavázaného materiálu promýváním, navázané protilátky se během druhé inkubace detekují anti-lidskými imunoglobuliny konjugovanými s fluoresceinem. Specifické zelené fluorescenční zbarvení komplexu antigen-protilátka se objeví pod fluorescenčním mikroskopem.

- ³ Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, Hoffman GS, Jayne DR, Jennette JC et al. Granulomatosis with Polyangiitis (Wegener's): An alternative name for Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 863-864.
- ⁴ Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 507-513.
- ⁵ Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, Hagen EC, Jennette JC et al. Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. *Am J Clin Pathol* 2001; 120:312- 318.
- ⁶ Csernok E, Holle JU. Twenty-eight years with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): how to test for ANCA – evidence-based immunology? *Autoimmun Highlights* 2010;1:39-43.
- ⁷ Wiik A, Stummann L, Kjeldsen L, Borregaard N, Ullman S, Jacobsen S et al. The diversity of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) antigens. *Clin Exp Immunol* 1995; 101 Suppl 1:15-17.
- ⁸ Gross WL, Csernok E, Helmchen U. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies, autoantigens, and systemic vasculitis. *APMIS* 1995; 103:81-97.
- ⁹ Zhao MH, Jones SJ, Lockwood CM. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1995; 99: 49-56.
- ¹⁰ Bosch X, Quilabert A, Font J. antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Lancet* 2006; 368: 404-418.
- ¹¹ Holle JU, Csernok E, Gross WL. Wegener Granulomatosis, 2008; In: *Diagnostic Criteria in autoimmune Diseases*, Shoenfeld Y, Cervera R, and Gershwin ME, eds. Humana Press, pp. 99-102.
- ¹² Wiesner O, Russell KA, Lee AS, Jenne DE, Trimarchi M, Gregorini G et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with human neutrophil elastase as a diagnostic marker for cocaine-induced midline destructive lesions but not autoimmune vasculitis. *Arthritis Reum* 2001; 50: 2954-2965.

3. Pracovní postup

Nahlédněte do Pracovního postupu uvedeného ve Společném manuálu, kapitola 11, strana 30, kde najdete detailnější informace. Následující detaily se používají u souprav ANCA:

Doba barvení: 30 – 90 sekund

Doporučený titr pro screening: 1:20

4. Interpretace

Anti-neutrofilní cytoplazmatické protilátky (ANCA) mají velký klinický význam při posuzování cévních poruch pacienta.

Příslušný koncový titr je takový, kde pacientovo sérum dává jasnou pozitivní fluorescenci. Slabá fluorescence s titry mezi 1:20 a 1:80 nebo nejasnosti vzhledem ke klinickým výsledkům by měly být ověřeny pomocí kontrolního sledování. V tomto případě by měly být vzorky odebírány každé 3 týdny a testovány stejným způsobem.

1:20	25 µl séra + 475 µl vzorkového/promývacího pufru
1:40	20 µl séra + 800 µl vzorkového/promývacího pufru (resp. 1:2 ředění 1:20)
1:80	10 µl séra + 790 µl vzorkového/promývacího pufru (resp. 1:2 ředění 1:40)
1:160	10 µl séra + 1590 µl vzorkového/promývacího pufru (resp. 1:2 ředění 1:80)
atd.	

Klasický C-ANCA obraz má granulární homogenní fluorescenci cytoplazmy s minimálně obarvenou oblastí jádra.

P-ANCA obraz má ostře vymezenou perinukleární fluorescenci (neutrofilny fixované ethanolem) nebo C-ANCA cytoplazmatický obraz (neutrofilny fixované formalínem).

5. Tabulka pro interpretaci dat

ANCA

Datum:	Šarže:	Fixace
Číslo sklíčka:	Laborant:	Ethanol: <input type="checkbox"/> Formalin: <input type="checkbox"/>

Jamka č.	ID	Faktor ředění	F.I.	Plazma buněčného jádra	Cytoplazma	Autoprotilátky	Poznámky
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

6. Obsah standardní soupravy

6.1 Standardní souprava

Kat.č.	Popis soupravy	Skříčka (10x v každé soupravě)			Konjugát (lahvička 4 ml)			Pozitivní kontrola (1x 0,5 ml lahvička v každé soupravě)	
		Kat.č.	Jamek	Potaženy	Množství	Kat.č.	Popis	Kat.č.	Popis
54.200	ANCA Ethanol (12 jamek)	s54.200	10	Humánními neutrofily (fixace ethanolom)	1x	c54.100	IgG (H+L řetězec) Modré víčko: jemně modře zabarvený roztok. Obsahuje: BSA, Anti- humánní protilátky značené fluoresceinem (FITC)	PC54.100	ANCA kontrolní obraz C-ANCA Červené víčko: bezbarvý roztok. Obsahuje: Humánní sérum (naředěné), azid sodný < 0.1% (konzervans)
								PC54.101	ANCA kontrolní obraz P-ANCA Červené víčko: bezbarvý roztok. Obsahuje: Humánní sérum (naředěné), azid sodný < 0.1% (konzervans)
54.201	ANCA Formalin (12 jamek)	s54.201	10	Humánními neutrofily (fixace formalínom)	1x	c54.100	IgG (H+L řetězec) Modré víčko: jemně modře zabarvený roztok. Obsahuje: BSA, Anti- humánní protilátky značené fluoresceinem (FITC)	PC54.100	ANCA kontrolní obraz C-ANCA Červené víčko: bezbarvý roztok. Obsahuje: Humánní sérum (naředěné), azid sodný < 0.1% (konzervans)
								PC54.101	ANCA kontrolní obraz P-ANCA Červené víčko: bezbarvý roztok. Obsahuje: Humánní sérum (naředěné), azid sodný < 0.1% (konzervans)

Poznámka: Obsah zbývajících součástí soupravy tj. společné reagentie (pufry, negativní kontrola, montovací médium atd.) jsou popsány níže v kapitole 7 Společné reagentie obsažené v soupravách, protože ty jsou identické ve všech AESKUSLIDES soupravách.

6.2 Demo soupravy

xxx.Demo soupravy mají stejný obsah jako standardní souprava, ale obsahují 2 skříčka místo 10.
Např. kat.č. **54.200 Demo** = kat.č. **54.200 pouze se dvěma skříčkami**.

Tkáně hlodavců (játra, ledviny, žaludek) (krysa/myš/LK/LKS)

Obj.č.	Popis	Počet testů	Další typy
517.050	rLKS – krysa, obaleno (5 jamek)	50	Včetně demo a bulk souprav: xxx.Demo xxx.Bulk3 xxx.Bulk5
517.101	rLKS – krysa, obaleno (10 jamek)	100	
517.051	rLKS – krysa, odděleno (5 jamek)	50	
517.100	rLKS – krysa, odděleno (10 jamek)	100	
518.050	mLKS – myš, odděleno (5 jamek)	50	
518.100	mLKS – myš, odděleno (10 jamek)	100	
55.050	rKS – krysa, odděleno (5 jamek)	50	
56.050	mKS – myš, odděleno (5 jamek)	50	
56.100	mKS – myš, odděleno (10 jamek)	100	

3. Použití

Výše uvedené AESKUSLIDES soupravy jsou nepřímé imunofluorescenční analýzy sloužící k detekci autoprotilátek proti mitochondriálnímu antigenu (AMA), antigenu hladkého svalstva (ASMA), jaterním a ledvinovým mikrosomům (LKM) a cirkulujícím parietálním buňkám (APCA) v lidském séru.

4. Klinické využití

Autoimunitní choroby jsou způsobeny poruchou buněčně a/nebo humorální imunologické reakce. Tyto reakce, které za normální situace působí proti vnějším vlivům, se mohou za určitých okolností obrátit proti vlastnímu tělu a tím způsobit řadu různých onemocnění.

ANA Přítomnost antijaderných protilátek může být detekována u každé připravené tkáně s pomocí pozitivní jaderné fluorescence. Kromě toho se nedoporučuje je používat pro screening ANA obrazu, protože HEp-2 buňky jsou citlivější a umožňují rozpoznat různé typy obrazů.

AMA antimitochondriální protilátky (AMA) přednostně reagují s vnitřní membránou mitochondrií (bohatou na fosfolipidy). AMA se většinou vyskytují u chorob jako je primární biliární cirhóza, pseudo – LE syndrom a různé formy chronických agresivních hepatitid. Vysoké titry AMA protilátek jsou nalézány hlavně u nehnisavých žlučnickových infekcí nebo primární biliární cirhózy (pozitivní výsledky asi u 90 %). Protilátky se v těchto případech objevují před klinickými symptomy a jsou silně ovlivněny terapií během choroby. Nízké titry protilátek jsou pozorovány u sklerodermie, Sjörgenova syndromu, revmatoidní artritidy a dalších autoimunitních onemocnění.

ASMA Protilátky proti hladkým svalům se objevují u různých jaterních chorob, např. akutní a chronické hepatitidy, primární biliární cirhózy a jiných forem jaterních cirhóz. Navíc detekce ASMA potvrzuje diagnózu SLE, infekční mononukleózy, karcinomu ovaria a prsu a maligního melanomu.

LKM Protilátky, které se váží na cytochrom p450 a jsou běžně spojovány s autoimunitní hepatitis typu 2, která se objevuje převážně u podskupiny dívek a mladých žen (80% prevalence). Lze je přidružit i k hepatitidě typu C.

APCA Cirkulující protilátky proti struktuře parietálních buněk žaludeční sliznice se obecně objevují díky perniciózní anémii. Nicméně se mohou vyskytovat i u jiných chorob žaludku (chronická atrofická gastritida, žaludeční vřed), onemocnění štítné žlázy (Hashimotova thyreoitida, myxedém) a vzácněji u hypoferrické anémie, diabetes mellitus a u starších pacientů.

Charakteristika antigenu: myší nebo krysí játra, ledviny, žaludek / krysí nebo myší ledviny, žaludek
Zkřížená reaktivita: není známá

Detekce protilátek je založena na principu nepřímé imunofluorescenční analýzy (IIFA). Mikroskopická sklíčka jsou potažena tkáňovými řezy nebo buňkami tkáňových kultur (HEp-2 buňky (ANA), granulocyty (ANCA) nebo *Crithidia luciliae* (nDNA)). Pokud sérum pacienta obsahuje specifické protilátky, naváží se během první inkubace. Po odstranění nenavázaného materiálu promýváním, navázané protilátky se během druhé inkubace detekují anti-lidskými imunoglobuliny konjugovanými s fluoresceinem. Specifické zelené fluorescenční zbarvení komplexu antigen-protilátka se objeví pod fluorescenčním mikroskopem.

3. Pracovní postup

Nahlédněte do Pracovního postupu uvedeného ve Společném manuálu, kapitola 11, strana 30, kde najdete detailnější informace. Následující detaily se používají u souprav Tkáně hlodavců:

Doba barvení: 3 – 5 minut

Doporučený titer pro screening: 1:20

4. Interpretace

R nebo M LKS/ R nebo M KS (krysa nebo myš, játra, ledviny, žaludek/krysa nebo myš ledviny, žaludek: Kombinované tkáňové řezy umožňují rozlišení různých protilátek v rámci jedné testovací oblasti a mohou být tudíž použity jako diagnostický test pro následující autoimunitní protilátky. (V případě jiných protilátek je vhodné hledat další diagnostickou identifikaci). Hodnocení by mělo vždy být prováděno s pozitivní a negativní kontrolou.

ANA: přítomnost antijaderných protilátek může být detekována u každé připravené tkáně s pomocí pozitivní jaderné fluorescence.

AMA: Na přítomnost antimitochondriálních protilátek ukazuje jemná zrnitá cytoplazmatická fluorescence renálních tubulů. Distální tubuly jsou u mitochondrií vydatnější, proto mají intenzivnější fluorescenci než je tomu u proximálních tubulů.

ASMA: Přítomnost ASMA je indikována fluorescencí hladkých svalových vláken ledvinových a žaludečních cév, muscularis mucosae, vrstvy muscularis ventriculi stejně jako interglandulárních kontraktálních fibril žaludeční sliznice.

APCA: jemně zrnitá fluorescence parietálních buněk v žaludeční slizniční membráně indikuje APCA. Protože AMA s parietálními buňkami reagují také, je třeba při posouzení APCA vyloučit antimitochondriální protilátky (renální tubuly).

LKM: V cytoplazmě proximálních renálních tubulů je vidět specifická fluorescence, není však u distálních. Játra vykazují homogenní fluorescenci hepatocytů a není zde žádná viditelná fluorescence žaludku.

AMA:

1:20-1:80 (např. 10 µl séra + 790 µl ředícího pufru) pozitivní reakce se objevuje u některých jaterních chorob

> 1:160 (např. 10 µl séra + 1590 µl ředícího pufru) indikuje biliární cirhózu. AMA titry zůstávají stejné i po uplynutí dlouhého období a navzdory léčbě, takže určení titru jako měřítko pro kontrolu terapie není vhodné.

ASMA:

1:20-1:80 (např. 10 µl séra + 790 µl ředícího pufru) pozitivní reakce se objevuje u některých jaterních chorob, virové hepatitidy a primární biliární cirhózy. Nicméně titry zde mohou klesat pod rozhodující hranici. Nízké titry lze pozorovat u pacientů se žlučnickovou infekcí, alkoholickou cirhózou, SLE a také u 2 % normální zdravé populace.

> 1:160 (např. 10 µl séra + 1590 µl ředícího pufru) je indikací chronické aktivní hepatitidy. Naproti virové hepatitidě zde titry klesají pouze mírně a mohou přetrvávat po několik let. Vysoké ASMA titry lze nalézt také u pacientů s infekční mononukleózou.

APCA: titr nevypovídá nic o stavu pacientovy choroby. Určení protilátek je třeba hodnotit společně s měřením vnitřního faktoru a/nebo výsledky histopatologie.

Příslušný konečný titr je ten, u něhož má pacientovo sérum jasně pozitivní fluorescenci. Slabá fluorescence u titrů mezi 1:20 a 1:80 nebo nejasnosti s ohledem na klinické výsledky by se měly zkontrolovat dalším monitorováním. Vzorky je v tomto případě třeba odebrat každé tři týdny a znovu testovat stejným způsobem. ¹³

¹³ Thomas L; Labor und Diagnose; 6th Edition; TH-Books GmbH

6. Obsah standardní soupravy

6.1 Standardní souprava

		Skříčka (10x v každé soupravě)			Konjugát (lahvička 3,5 ml)		Pozitivní kontrola (1x 0,5 ml lahvička v každé soupravě)		
Kat.č.	Popis soupravy	Kat.č.	Jamek	Potaženy	Množství	Kat.č.	Popis	Kat.č.	Popis
517.050	rLKS obaleno, 5 jamek	s517.050	5	Krysí LKS tkání (L/K obaleny v žaludku)	1x	CDTIFA	IgG (H+L řetězec) Modré víčko: jemně modře zbarvený roztok. Obsahuje: BSA, Anti-humánní protilátky značené fluoresceinem (FITC)	PCDTIFA	AMA pozitivní kontrola Červené víčko: bezbarvý roztok. Obsahuje: Humánní sérum (naředěné), azid sodný < 0.1% (konzervans)
517.101	rLKS obaleno, 10 jamek	s517.101	10	Krysí LKS tkání (L/K obaleny v žaludku)	1x				
517.051	rLKS odděleno, 5 jamek	s517.051	5	Krysí LKS tkání (oddělené řezy LKS)	1x				
517.100	rLKS odděleno, 10 jamek	s517.100	10	Krysí LKS tkání (oddělené řezy LKS)	2x				
518.050	mLKS odděleno, 5 jamek	s518.050	5	Myší LKS tkání (oddělené řezy LKS)	1x				
518.100	mLKS odděleno, 10 jamek	s518.100	10	Myší LKS tkání (oddělené řezy LKS)	2x				
55.050	rKS odděleno, 5 jamek	s55.050	5	Krysími KS tkáňovými řezy	1x				
56.050	mKS odděleno, 5 jamek	s56.050	5	Myšími KS tkáňovými řezy	1x				
56.100	mKS odděleno, 10 jamek	s56.100	10	Myšími KS tkáňovými řezy	2x				
Poznámka: Obsah zbývajících součástí soupravy tj. společné reagentie (pufry, negativní kontrola, montovací médium atd.) jsou popsány níže v kapitole 7 Společné reagentie obsažené v soupravách, protože ty jsou identické ve všech AESKUSLIDES soupravách									

6.2 Demo a Bulk soupravy

xxxDemo soupravy mají stejný obsah jako standardní souprava, ale obsahují 2 skříčka místo 10.

Např. kat.č. **517.050 Demo** = kat.č. **517.050 pouze se dvěma skříčky**.

xxxBulk3 soupravy jsou množstevní soupravy obsahující 3 násobek obsahu standardní soupravy.

xxxBulk5 soupravy jsou množstevní soupravy obsahující 5 násobek obsahu standardní soupravy.

EMA (Endomysium)

Obj.č.	Popis	Počet testů	Další typy
512.050	EMA IgA (5 jamek)	50	Včetně demo a bulk souprav:
512.100	EMA IgA (10 jamek)	100	
512.060	EMA IgG (5 jamek)	50	
512.101	EMA IgG (10 jamek)	100	xxx.Demo xxx.Bulk3 xxx.Bulk5

1. Použití

AESKUSLIDES EMA IgA a IgG jsou nepřímé imunofluorescenční analýzy sloužící k detekci autoprotilátek proti tkáňové transglutamináze (tTG) v lidském séru.

2. Klinické využití

Gluten-citlivá enteropatie neboli celiakie je charakterizována atrofií malých střevních klků, jež vede k takzvané „flat mukóze“. Je způsobena patologickou intolerancí gliadinu, v alkoholu rozpustné frakci glutenu, obsaženého v pšenici, žitu a ječmeni. Protože celiakie je způsobená absorpcí glutenu, bezlepková dieta chorobu zcela vyléčí a proto je třeba ji dodržovat po celý život. Obnovená konzumace gliadinu vede k návratu symptomů. Onemocnění je vázané na HLA systém (95 % pacientů má DQ2 antigen s alelami DQA1*0501 a DQB1*0201) a manifestuje se v jakémkoliv věku s maximálním nástupem v časném dětství, dokonce i u novorozenců. Výskyt v evropských zemích se pohybuje mezi 1 na 4000 až 1 na 300 případů.

Diagnostika celiakie se dělá pomocí malé střevní biopsie (průkaz „flat mukózy“) a s pomocí serologických markerů. Nejvýznamnějšími jsou protilátky proti gliadinu a proti endomysiu (EMA). Dosud jsou detekovány nepřímou imunofluorescencí, která je omezena pouze na IgA podtřídu. Identifikace tkáňové transglutaminázy (tTG) jako hlavního cílového antigenu EMA poskytuje mnohem snazší možnost diagnostiky celiakie. tTG je enzym, který je po poškození vylučován z buněk, kde má napomoci tkáňové obnově.

Anti-tTG protilátky mají vyšší citlivost a specifickou, než je tomu u anti-gliadin protilátek. Navíc těsněji korelují s aktivitou onemocnění a tím jsou velmi důležité pro sledování diety. Určení IgG protilátek proti tTG je jedinou dostupnou specifickou serologií pro 2-5 % pacientů s IgA deficiencí. Screeningem anti-tTG byl detekován vysoký počet subklinických případů, což podporuje teorii, že většina případů celiakie je neodhalena a neléčena (ledovcový model).¹⁴

Je popsáno, že u pacientů s pemfigem se objevuje fluorescence na opičím jícnu IIF.¹⁵ Protilátky proti kůži jsou namířeny proti mezibuněčným strukturám a jsou charakteristické pro pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus a paraneoplastický pemphigus, odlišení mezi jednotlivými typy pemfiga nejsou s pomocí IIF možné.

¹⁴ Matthias T et al.; Diagnostic Challenges in Celiac Disease and the Role of the Tissue Transglutaminase-Neo-Epitope. Clin Rev Allerg Immunol. 2002; 28-301

¹⁵ Bradwell A.R. et al.; Advanced Atlas of autoantibody patterns: Skin diseases; Birmingham: The Binding Site; 1999; 73-81

Charakteristika antigenu: antigenový substrát: opičí jícen

Zkřížená reaktivita: není známá

Detekce protilátek je založena na principu nepřímé imunofluorescenční analýzy (IIFA). Mikroskopická sklíčka jsou potažena tkáňovými řezy nebo buňkami tkáňových kultur (HEp-2 buňky (ANA), granulocyty (ANCA) nebo *Crithidia luciliae* (nDNA)). Pokud sérum pacienta obsahuje specifické protilátky, naváží se během první inkubace. Po odstranění nenavázaného materiálu promýváním, navázané protilátky se během druhé inkubace detekují anti-lidskými imunoglobuliny konjugovanými s fluoresceinem. Specifické zelené fluorescenční zbarvení komplexu antigen-protilátka se objeví pod fluorescenčním mikroskopem.

3. Pracovní postup

Nahlédněte do Pracovního postupu uvedeného ve Společném manuálu, kapitola 11, strana 30, kde najdete detailnější informace. Následující detaily se používají u souprav Tkáňě hlodavců:

Doba barvení: 3 – 5 minut

Doporučený titr pro screening: 1:5

4. Interpretace

Interpretace 512.050/512.100 EMA IgA

Endomysium je podpůrná struktura, která obklopuje kombinaci hladkých a příčně pruhovaných svalových vláken, jež se nalézají ve střední třetině jícnu. Obsahuje kolagen a retikulin společně s endomysiálním terčem, který již byl charakterizován.

Gliadin je v ethanolu rozpustná frakce glutenu, který je zánětlivým antigenem u celiakie. Protilátky jsou spojovány s celiakií a dermatitis herpetiformis.

Interpretace 512.060/512.101 EMA IgG

Určení protilátek IgG proti tTg je jedinou dostupnou specifickou serologickou metodou pro 2-5 % pacientů s IgA deficiencí.

Příklady ředění:

1:5 50 µl séra + 200 µl vzorkového pufu

1:10 10 µl séra + 90 µl vzorkového pufu

1:20 10 µl séra + 190 µl vzorkového pufu

1:40 10 µl séra + 390 µl vzorkového pufu

1:80 10 µl séra + 790 µl vzorkového pufu

5. Tabulka pro interpretaci dat

EMA

Datum:	Šarže:
Číslo sklíčka:	Laborant:

Jamka č.	ID	Faktor ředění	Endomysium Tunica muscularis mucosae	Hladká svalovina	Autoprotilátky	Poznámky
1						
2						
3						
4						
5						

EMA

Datum:	Šarže:
Číslo sklíčka:	Laborant:

Jamka č.	ID	Faktor ředění	Endomysium Tunica muscularis mucosae	Hladká svalovina	Autoprotilátky	Poznámky
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

6. Obsah standardní soupravy

6.1 Standardní souprava

		Skříčka (10x v každé soupravě)			Konjugát (lahvička 3,5 ml)			Pozitivní kontrola (1x 0,5 ml lahvička v každé soupravě)	
Kat.č.	Popis soupravy	Kat.č.	Jamek	Potaženy	Množství	Kat.č.	Popis	Kat.č.	Popis
512.050	EMA IgA (5 jamek)	s512.050	5	Opičí jícen	1x	c512.050	IgA (α řetězec specifické) Modré víčko: jemně modře zabarvený roztok.	PC512.050	Pozitivní kontrola EMA Červené víčko: bezbarvý roztok. Obsahuje: Humánní sérum (naředěné), azid sodný < 0.1% (konzervans)
512.100	EMA IgA (10 jamek)	s512.100	10		2x		Obsahuje: BSA, Anti-humánní protilátky značené fluoresceinem (FITC)		
512.060	EMA IgG (5 jamek)	s512.00	5		1x	c512.060	IgG (γ řetězec specifické) Modré víčko: jemně modře zabarvený roztok.		
512.101	EMA IgG (10 jamek)	s512.101	10		2x		Obsahuje: BSA, Anti-humánní protilátky značené fluoresceinem (FITC)		
Poznámka: Obsah zbývajících součástí soupravy tj. společné reagentie (puřry, negativní kontrola, montovací médium atd.) jsou popsány níže v kapitole 7 Společné reagentie obsažené v soupravách, protože ty jsou identické ve všech AESKUSLIDES soupravách.									

4.2 Demo a Bulk soupravy

xxxDemo soupravy mají stejný obsah jako standardní souprava, ale obsahují 2 skříčka místo 10.

Např. kat.č. **512.050 Demo** = kat.č. **512.050 pouze se dvěma skříčky**.

xxxBulk3 soupravy jsou množstevní soupravy obsahující 3 násobek obsahu standardní soupravy.

xxxBulk5 soupravy jsou množstevní soupravy obsahující 5 násobek obsahu standardní soupravy.

AESKUSLIDES

SPOLEČNÝ MANUÁL

Následující návod je společný pro celé portfolio produktů AESKUSLIDES. Pro specifické detaily týkající se jednotlivých souprav prosím nahlédněte do konkrétního manuálu, který je také součástí této soupravy.

7. Společné reagentie obsažené v soupravách

a. Společné reagentie

Následující reagentie jsou společné pro celou produktovou řadu AESKUSLIDES. Množství jsou na jednu soupravu:

Kat.č.	Reagentie	Množství/objem		Popis	Připraveno k použití
NCIFA	Negativní kontrola	1x	0,5 ml	Zelené víčko: bezbarvý roztok. Obsahuje: Humánní sérum (naředěné), azid sodný < 0.1% (konzervans)	ANO
EBIFA	Evansova modř 0,2%	1x	3,0 ml	Bílé víčko: Modře zbarvený roztok. Obsahuje: PBS, Evansova modř 0,2% 1:3000 v 1x SWBIFA	NE
MMIFA	Montovací médium	1x	12 ml	Validováno pro použití s HELMED® Bílé víčko: bezbarvý roztok Obsahuje: PBS, Glycerin	ANO
SWBIFA	Vzorkový/promývací pufr	1x	100 ml	Naředte koncentrovaný pufr 1:10 v destilované vodě (např. 100 ml + 900 ml). Obsahuje: BSA PBS, azid sodný (konzervans)	NE

b. Další potřebný materiál (nedodávaný se soupravou)

Destilovaná voda
Zkumavky pro ředění vzorků
Odměrný válec
Pipety
Stopky
Fluorescenční mikroskop s FITC systémem (490 nm excitační filtr, 510 nm bariérový filtr)
Inkubační komůrka
Barvicí vanička
Pipetovací špičky
Krycí sklíčka (24x60 mm)

V případě, že informace o produktu, včetně štítků, je poškozená nebo nesprávná, kontaktujte prosím výrobce nebo dodavatele soupravy.

8. Skladování a trvanlivost

Všechny reagentie uchovávejte při teplotě 2-8 °C a chraňte před světlem. Datum expirace každé komponenty je vyznačeno na etiketě příslušné lahvičky. Nepoužívejte reagentie po uplynutí data expirace.

Všechny reagentie a sklíčka uchovávejte při 2-8 °C v originálních obalech. Rekonstituované roztoky reagentií jsou stabilní nejméně po dobu 1 týdne při teplotě 2-8 °C.

Reagentie a sklíčka používejte pouze do data expirace uvedeného na příslušném obalu.

9. Bezpečnostní opatření při použití

a. Informace o zdravotních rizicích

Tento produkt je určen **POUZE PRO POUŽITÍ IN VITRO**. Se soupravou by měl pracovat pouze personál odborně způsobilý a speciálně vyškolený v manipulaci s diagnostickými metodami IN VITRO. Ačkoli tento produkt není za normálních podmínek používání považován za přímo škodlivý nebo nebezpečný, k zajištění maximální bezpečnosti přečtěte následující text:

Doporučení a bezpečnostní opatření

Tato souprava obsahuje potenciálně nebezpečné komponenty. Přestože reagentie soupravy nejsou klasifikovány jako dráždivé vůči očím a kůži, doporučujeme vyhnout se jejich kontaktu s očima a kůží a při práci používat jednorázové rukavice.

Veškerý materiál lidského původu použitý pro výrobu této soupravy (např. kontroly) byl schválenými metodami testován a potvrzen negativním na HbsAg, Hepatitis C a HIV. Nicméně žádný test nemůže garantovat úplnou absenci virových agens v takovýchto materiálech. Proto zacházejte s kontrolami a vzorky sér pacientů jako s potenciálně infekčními materiály v souladu s platnými předpisy.

Souprava obsahuje materiál živočišného původu (BSA, imunoglobulin) jak je uvedeno v tabulce s obsahem, zacházejte s ní dle místních předpisů.

b. Obecná pravidla pro použití soupravy

1. Nepipetujte ústy. Při manipulaci se soupravou nekuřte, nejezte ani nepijte.
2. Nemíchejte nebo nezaměňujte reagentie s odlišným číslem šarže. Může to způsobit odchylky ve výsledcích.
3. Všechny nádoby po použití zavírejte, abyste se vyvarovali bakteriální kontaminace.
4. Při pipetování všech roztoků vždy používejte nové sterilní špičky.
5. Nikdy nevystavujte komponenty teplotám vyšším než 37 °C.
6. Během pracovního postupu nikdy nenechávejte jamky na sklíčcích vyschnout.
7. Sklíčka nezamrazujte.

Každá laboratoř by si měla stanovit interní kontroly nastavené dle svých laboratorních technologií, kontrol, vybavení a konkrétní populace a to v závislosti na svých vlastních zavedených postupech.

Definitivní klinická diagnóza by neměla být založena pouze na výsledcích provedených testů, ale měla by být stanovena lékařem po zhodnocení všech klinických a laboratorních nálezů.

V případě, že hodnoty kontrol se neshodují s kritérii testu, test je neplatný a musí se opakovat. Měly by se ověřit následující technické problémy: Datum expirace (připravených) reagentií, podmínky uchovávání, pipety, zařízení, fotometr, podmínky inkubace a metody promývání. Pokud testované položky vykazují nenormální hodnoty nebo jakýkoliv druh odchylky nebo když nejsou splněna validační kritéria z omluvitelných příčin, prosím kontaktujte našeho místního distributora.

10. Odběr vzorků, manipulace a uchovávání

Příprava vzorků: Použijte přednostně čerstvě získané vzorky séra. Odběr krve musí být proveden podle platných předpisů. Vzorky krve odebírejte asepticky.

Ikterické, lipemické, hemolyzované nebo bakteriemi kontaminované vzorky mohou způsobovat interferenci.

Séra s obsahem částic by měla být vyčištěna nízkorychlostním odstředěním (<1000 x g). Vzorky krve by měly být odebrány do čistých, suchých a prázdných zkumavek. Po separaci by sérum mělo být ihned použito, případně uschováno v těsně uzavřené zkumavce při teplotě 2-8 °C max. 48 hodin, pro delší uschování pak zamrazeno na teplotu -20 °C. Séra opakovaně nezamrazujte.

11. Pracovní postup

a. Přípravy před pipetováním

Před použitím nechte všechny reagentie vytemperovat na pokojovou teplotu (20-26 °C), dobře promíchejte a dodržujte doporučené inkubační schéma.

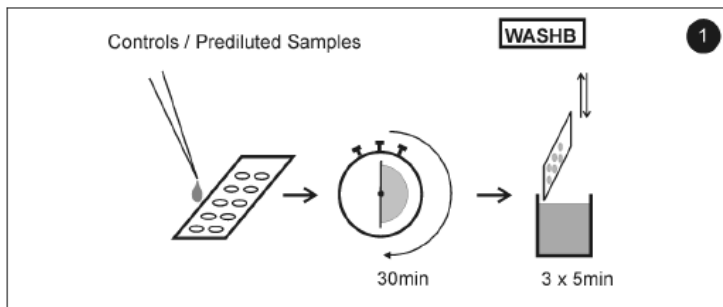
1. Příprava ředícího pufru pro vzorky a promývacího pufru:
Naředte koncentrovaný pufr pro ředění vzorků a promývací pufr 1:10 destilovanou vodou.
2. Ředění vzorků
Séra pacientů naředte pomocí připraveného ředícího pufru (screeningový titr viz kapitola **Pracovní postup** v předchozí části podle druhu soupravy, kterou používáte). Ředění vzorků se liší podle soupravy HEp-2, nDNA, rLKS, EMA atd.
3. Kontroly jsou již připraveny k použití!
4. Připravte si protokol – Tabulka pro interpretaci dat je dostupná v kapitole **Pracovní postup** v předchozí části podle druhu soupravy, kterou používáte.

b. Pracovní postup

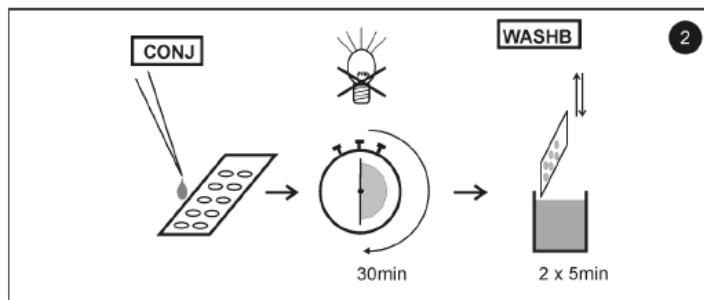
Krok	Popis kroku
1.	Vyjměte příslušný počet sklíček z obalu a označte si je. Nedotýkejte se jamek. Nenechtejте sklíčka vyschnout.
2.	První inkubace: Do příslušných jamek napipetujte adekvátní objem každého naředěného séra a kontroly (ready to use), nedotýkejte se pipetou povrchu sklíčka. Ujistěte se, že každá jamka je zcela pokryta příslušným sérem. Je důležité použít tolik testovaného materiálu, aby byly jamky kompletně zaplněny. Ale zabraňte případnému přetečení vzorku séra mezi dvěma jamkami, došlo by ke znehodnocení výsledků. Inkubujte skla 30 minut při pokojové teplotě ve vlhké inkubační komůrce.
3.	Promývání: Po ukončení inkubace vyjměte skla z inkubační komůrky a krátce je omyjte promývacím puřrem pomocí pipety. Nestříkejte puřr přímo na jamky. Poznámka: Aby nedošlo ke zkřížené kontaminaci na sklíčku, namiřte proud puřru podél střední linie sklíčka. Skla promývejte promývacím puřrem po dobu 15 minut v barvicí vaničce. Pro dosažení optimálních výsledků měňte promývací roztok 3x po 5 minutách. Vyjměte sklíčka z barvicí vaničky a opatřně odstraňte zbytky promývacího puřru. Poznámka: Je důležité nenechat sklíčka během procesu zcela vyschnout, neboť se může poškodit substrát na povrchu jamek. Proto v žádném případě neodsávejte nebo nesušte skla a nenechávejte je bez reakcí déle než pár sekund.
4.	Druhá inkubace: Po promytí ihned vraťte skla do inkubační komůrky a na každou jamku naneste 30 μ l FITC konjugátu tak, aby jamky byly kompletně zaplněny. Inkubujte ve tmě 30 minut při pokojové teplotě.
5.	Promývání: Po ukončení inkubace vyjměte skla z inkubační komůrky a krátce je omyjte promývacím puřrem pomocí pipety. Nestříkejte puřr přímo na jamky. Skla promývejte promývacím puřrem po dobu 10 minut v barvicí vaničce. Pro dosažení optimálních výsledků měňte promývací roztok 2x po 5 minutách.
6.	Nepovinné barvení kontrastním barvivem: Naředte kontrastní barvivo (Evansova modř) 1:3000 promývacím puřrem a dobře promíchejte. Přelijte barvivo do barvicí vaničky a skla v ní inkubujte. Nahlédněte do předchozí části do kapitoly Pracovní postup , kde jsou detaily týkající se doby inkubace soupravy, kterou používáte. Evansova modř překryje nespecifickou fluorescenci pozadí. Vyjměte skla po uplynutí doby inkubace a krátce omyjte promývacím puřrem. Odstraňte zbytky promývacího puřru. Skla v žádném případě nesušte ani neodsávejte zbytky roztoku.
7.	Montování: Přidejte adekvátní množství montovacího média podél střední linie každého skla. Opatřně přikryjte krycím sklem a odstraňte případné vzduchové bubliny.
8.	Odečítání: Sklíčka ihned odečítejte při 400-800 x zvětšení pomocí fluorescenčního mikroskopu. (490 nm excitační filtr, 510 nm bariérový filtr)

c. Pracovní postup - shrnutí

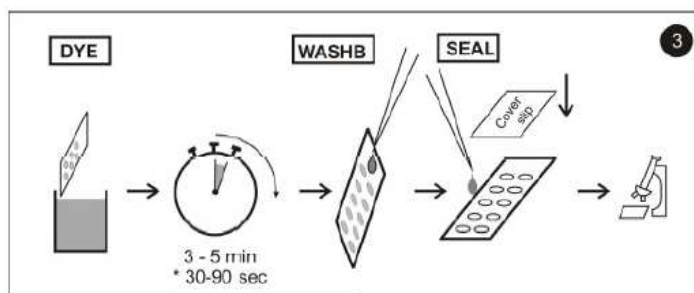
1. Do příslušných jamek napipetujte naředěná séra a kontroly.
2. Do inkubační komůrky dejte malé množství deionizované nebo destilované vody a umístěte skla do komůrky.
3. Inkubujte skla po dobu 30 minut při pokojové teplotě (20-26 °C).
4. Vyměňte sklíčka z komory a krátce je pomocí pipety omyjte promývacím puřem. Promývejte skla 3x 5 minut v barvicí vaničce.



5. Uvnitř inkubační komůrky na každou z jamek naneste dostatečné množství FITC konjugátu.
6. Inkubujte skla 30 minut ve tmě při pokojové teplotě (20-26 °C)
7. Vyměňte sklíčka z komory a krátce je pomocí pipety omyjte promývacím puřem. Promývejte skla 2x 5 minut v barvicí vaničce.



8. Nařeďte kontrastní barvivo (Evansovu modř) 1:3000 promývacím puřem.
9. Inkubujte skla s naředěným barvivem (*pro barvení kontrastním barvivem nahleďněte do předchozí části do kapitoly **Pracovní postup**, kde jsou detaily týkající se doby inkubace soupravy, kterou používáte.



















10. Po uplynutí doby inkubace skla vyměňte a krátce omyjte promývacím puřem.
11. Podél střední linie sklíčka naneste adekvátní množství montovacího média.
12. Sklíčka ihned odečítejte při 400-800 x zvětšení pomocí fluorescenčního mikroskopu. (490 nm excitační filtr, 510 nm bariérový filtr)

10. Řešení potíží

Chyba	Možná příčina	Řešení
Malá hustota buněk	lyze buněk po delším kontaktu s deionizovanou vodou	Postupujte dle doporučeného promývacího postupu
	pufr byl stříknut přímo na substrát jamky	
	substrát byl atakován proteolytickými enzymy	inaktivovat sérum
Nestejněměrná fluorescence	sérum na povrchu jamky vyschlo, fluorescence silnější na okrajích	vždy inkubujte ve vlhkém prostředí
	sérum nebylo na celém povrchu jamky	používejte adekvátní množství testovaného materiálu
	zkřížená reakce mezi jamkami	zamezte přetečení vzorků mezi jamkami u první inkubace
	skla byla označena voskovou tužkou, což způsobilo vznik nesmáčivého filmu na skle	používejte obyčejnou tužku
	nesprávně nastavený mikroskop	zkontrolujte seřízení UV lampy
Difúzní obrázek	skla byla inkubována v lednici bez víčka	překryjte skla lakem na nehty nebo parafínem
	imunofl. mikroskop je špinavý. Možné škrábance na čočce	vyčistěte mikroskop podle instrukcí
Malá nebo žádná fluorescence	konjugát a sklíčka rozmrazena a znovu zamrazena	konjugát a skla skladovat při 2-8°C
	kontroly byly naředěny	zkontrolujte instrukce, použijte ready to use kontroly v soupravě
	bakteriální kontaminace séra nebo konjugátu	zkontrolujte stav
	mikroskop neseřizen	
	hodnota pH promývacího pufru je příliš nízká (pH hodnota 7,4±0,2)	
FITC konjugát byl vystaven světlu	chraňte konjugát před světlem	
Fluorescence na pozadí	nesprávné promytí	zkontrolujte promývací postup
	skla vyschla	nenechávejte nikdy skla zcela vyschnout
	lipemická, hemolytická séra	používejte pouze čerstvá séra
	chyba mikroskopu	zkontrolujte správnost filtru a objektivu

SYMBOLY

	Pro diagnostické použití <i>in vitro</i>
	Katalogové číslo
	Šarže
	Značka evropské shody
	Viz návod k použití
	Použitelné do
	Uchovávejte při 2-8 °C
	Výrobce
	Evansova modř – barvivo
	Pozitivní kontrola
	Negativní kontrola
	Montovací médium
	Konjugát
	Mikroskopická skla
	Promývací/vzorkový pufr
	XX testů

Zplnomocněný zástupce výrobce v České republice:

BioVendor –Laboratorní medicína a.s.

IČ: 63471507

Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, tel: +420 549 124 111, fax: +420 549 211 465

Mail: info@biovendor.cz, www.biovendor.cz