



# PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZME NEUTROFILOV (ANCA)



Kód 44850 24 testov	Kód 44852 10x6 testov	Kód 44878 10x6 testov	<b>PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZME NEUTROFILOV (ANCA)</b>	
Kód 44851 60 testov	Kód 44895 10x6 testov	Kód 44963 60 testov		Nepriama imunofluorescencia Ľudské neutrofilny
Kód 44898 60 testov		Kód 44911 10 x 12 testov		
		Kód 44964 10x6 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	44851	44898	44963
A. ANCA-etanol	4 x 6 testov	10x6 testov	-	-
A. ANCA formalín	-	-	10x6 testov	-
A. ANCA-etanol-ANA	-	-	-	10x6 testov
B. PBS (10x)	1x100ml	1x100 ml	1x100 ml	1x100 ml
C+. C ANCA	1x0,3 ml	1x0,3 ml	1x0,3 ml	1x0,3 ml
C+. P ANCA	1x0,3 ml	1x0,3 ml	1x0,3 ml	1x0,3 ml
C+. ANA-Ho	-	-	-	1x0,3 ml
C-. Negat. kontrola	1x0,3 ml	1x0,3 ml	1x0,3 ml	1x0,3 ml
D. IgG FITC/ Evans	1x3ml	1x3ml	1x3ml	2x3ml
E. Montovacie médium	1x3ml	1x3ml	1x3ml	1x3ml
F. Savý papier	1x10	1x10	1x10	-

kód	44852	44878	44895	44911	44964
A. ANCA-etanol	10 x 6 testov	-	-	10x12 testov	-
A. ANCA formalín	-	10x6 testov	-	-	-
A. ANCA-metanol	-	-	10x6 testov	-	-
A. ANCA-etanol-ANA	-	-	-	-	10x6 testov

## ZLOŽENIE

### ANCA - etanol

- A. **Sklička** : etanolom fixované ľudské neutrofilny v každej jamke
- B. **PBS(10x)** : Fosforečnan sodný, fosforečnan draselný, chlorid sodný, 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 izotiočyanátom (FITC), Evansova modrá 0,01g/l, azid sodný 0,95g/l
- E. **Montovacie médium** Mowiol, Glycerol, Tris, azid sodný 0,95 g/L
- F. **Savý papier**

### ANCA-formalín

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

### ANCA – metanol

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

### ANCA-etanol-ANA

- A. **Sklička** : Etanolom fixované ľudské neutrofilny a rezy kryšej pečene
- C+. **ANA-Ho Pozitívna kontrola**: Ľudské sérum obsahujúce anti nukleárne prottilátky (ANA), azid sodný 0,95g/l.

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.

**Príznačky zhoršenia kvality :**



# PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZME NEUTROFILOV (ANCA)



Kód 44850 24 testov	Kód 44852 10x6 testov	Kód 44878 10x6 testov	<b>PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZME NEUTROFILOV (ANCA)</b>	
Kód 44851 60 testov	Kód 44895 10x6 testov	Kód 44963 60 testov		Nepriama imunofluorescencia Ľudské neutrofilny
Kód 44898 60 testov		Kód 44911 10 x 12 testov		
		Kód 44964 10x6 testov		
Skladovanie pri 2 - 8°C				
Reagencie na kvalitatívne stanovenie ANCA . Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku				

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

### POMOCNÉ REAGENCIE

- pre kódy 44852, 44878, 44895, 44911 a 44964 je potrebné objednávať ďalšie reagencie, ktoré sa dodávajú zvlášť :

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

### 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 – viď príprava reagentií. 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 a vzorky na izbovú teplotu.

2. Aplikujte 1 kvapku (25µl) nariedenej vzorky alebo kontroly do každej jamky . Uistite sa, že je kompletne pokrytá. (Poznámka 1a2).
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 skříženej kontaminácii.
5. Zľahka opláchnite reagentiou PBS ( viď **PRÍPRAVA REAGENCIÍ**). (Poznámka 3 )
6. Sklíčka premývajte 5 minút v nádobe obsahujúcej PBS. Potom PBS vymeňte a premývanie zopakujte.
7. Sklíčko opatrne osušte špeciálnym odsávacím papierom. Substrát musí zostať vlhký v priebehu celej procedúry.
8. Do každej jamky pridajte 1 kvapku činidla D. Sklíčka inkubujte vo zvlhčovacej komôrke 30 minút pri izbovej teplote (15-30°C) .
9. Premývajte podľa bodu 6 a osušte podľa bodu 7.
10. Do každej jamky pridajte niekoľko kvapiek reagentie E a opatrne prekryte krycím sklíčkom tak, aby nevznikli vzduchové bubliny.

### VYHODNOTENIE

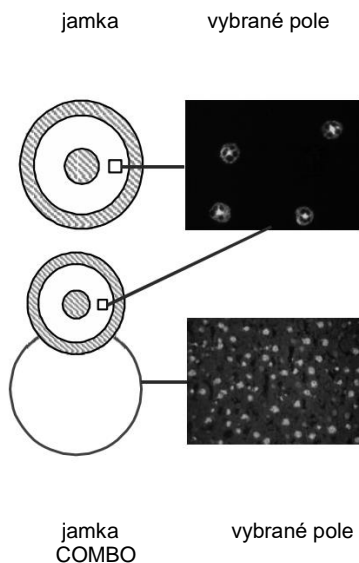
Sklíčka vyhodnocujte pomocou fluorescenčného mikroskopu (zväčšenie 250-400x). Aby ste dosiahli najlepšie výsledky, vyhodnocujte sklíčka okamžite. Pre odčítanie zvolte vnútornú časť obrazu medzi okrajom a stredom tak, že vyberiete polia s rovnomerným rozstupom medzi bunkami a s jednotným jasom jadier. Fluorescenčná intenzita v okrajových oblastiach vzorky nie je reprezentatívna. Za pozitívne je možné považovať výsledky, pri ktorých sa dá pozorovať pri odporúčanom riedení špecifická fluorescencia . Pre diagnostiku autoimunitnej vaskulitídy na etanolom fixovaných ľudských neutrofiloch je možné pozorovať dva druhy fluorescence: Difúzne zrnitá cytoplazmatická fluorescencia s vyššou interlobulárnou intenzitou u C-ANCA protilátok a s kompaktnou perinukleárnou fluorescenciou u P-ANCA protilátok. Môže sa objaviť aj menej typická fluorescencia, ktorú je možné hodnotiť ako atypické ANCA protilátky. V niektorých prípadoch môžu antinukleárne protilátky ANA 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, alebo na COMBO sklíčkach, ktoré obsahujú etanolom fixované neutrofilny a rezy kryšej pečene. Na formalínom fixovaných neutrofiloch existuje iba jeden obraz fluorescence spojený s autoimunitnou

Kód 44850 24 testov	Kód 44852 10x6 testov	Kód 44878 10x6 testov	<h2>PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZME NEUTROFILOV (ANCA)</h2> <p>Nepriama imunofluorescencia Ľudské neutrofilily</p> <p>ANCA – etanol ANCA-formalín ANCA-metanol ANCA-etanol-ANA</p>
Kód 44851 60 testov	Kód 44895 10x6 testov	Kód 44963 60 testov	
Kód 44898 60 testov		Kód 44911 10 x 12 testov	
		Kód 44964 10x6 testov	
Skladovanie pri 2 - 8°C			
Reagencie na kvalitatívne stanovenie ANCA . Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku			

vaskulitídou : C-ANCA.

ANA-Ho obraz vykazuje homogénnu a jednotnú fluorescenciu v jadre buniek v interfáze a na etanolom fixovaných neutrofiloch vidíme P-ANCA vzor.

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

Pozitívne 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 kalibrováný oproti WHO Medzinárodnému štandardu pre ovčie anti-ľudský IgG imunoglobulín.
- Špecifita C-ANCA pozitívnej kontroly bola overená oproti PR3 – ANCA ľudskému referenčnému séru # 16 z CDC
- Špecifita 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 proteinázy 3 (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 protilátky s myeloperoxidázou.
- X-ANCA fluorescencia – nešpecifický obraz- na metanolom fixovaných neutrofiloch vzniká v dôsledku väzby protilátok na viacej antigénnych špecifít, ako je katepsín G, laktoferín alebo elastáza. (Jedná sa teda o iný, atypický obraz, ktorý je vidieť na PR-3 a MPO.)
- ANA-Ho fluorescenčný obraz na neutrofiloch fixovaných etanolom je výsledkom väzby protilátky na antinukleárne protilátky (ANA).

### 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 poliarteritis 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>



# PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZME NEUTROFILOV (ANCA)



Kód 44850 24 testov	Kód 44852 10x6 testov	Kód 44878 10x6 testov	<b>PROTILÁTKY PROTI CYTOPLAZME NEUTROFILOV (ANCA)</b>	
Kód 44851 60 testov	Kód 44895 10x6 testov	Kód 44963 60 testov		Nepriama imunofluorescencia Ľudské neutrofilly
Kód 44898 60 testov		Kód 44911 10 x 12 testov		
		Kód 44964 10x6 testov		ANCA – etanol ANCA-formalín ANCA-metanol ANCA-etanol-ANA
Skladovanie pri 2 - 8°C				
Reagencie na kvalitatívne stanovenie ANCA . Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku				

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 nonvaskulitídnymi ochoreniami.<sup>5</sup>

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

### POZNÁMKY

1. Na ANCA-etanol-ANA je potrebný objem 60 µl.
2. Nedotýkajte sa behom testu buniek fixovaných v jamkách.
3. Na premytie použite stričku alebo pipetu. Zabráňte skříženej kontaminácii medzi vzorkami.

### LITERATÚRA

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. 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.

### UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 29.12.2021.

Vzhľadom k možnej 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., Dlhá 43, 900 31 Stupava  
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