



# ANTI-NUKLEÁRNÍ PROTILÁTKY HEp-2 (ANA-HEp-2)



KÓD 44108 24 testů	KÓD 44508 60 testů	KÓD 44509 120 testů
KÓD 44546 10 x	KÓD 44547 10 x	
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C		
Reagenty pro kvalitativní stanovení anti-nukleárních protilátek Pouze pro laboratorní <i>in vitro</i> diagnostiku		

## ANTI-NUKLEÁRNÍ PROTILÁTKY (ANA-HEp-2)

Nepřímá imunofluorescence  
HEp-2 BUŇKY

### PRINCIP METODY

Antinukleární protilátky (ANA) ze séra se váží na odpovídající antigeny přítomné v HEp-2 buňkách. Výsledný komplex antigen-protilátka je detekován anti-human imunoglobulinem značeným fluoresceinem. Vyhodnocení se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu<sup>1</sup>.

### OBSAH

	KÓD 44108	44508	KÓD 44509
A. Sklíčka	4 x 6 jamek	10 x 6 jamek	10 x 12 jamek
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+ ANA-HEp-2 Poz.kontrola	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
C- Negativní kontrola	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
D. IgG FITC/Evans	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
F. Vysoušecí papír	1 x 4	1 x 10	1 x 10
	KÓD 44546		KÓD 44547
A. Sklíčka	10 x 6 jamek		10 x 12 jamek

### SLOŽENÍ

- A. **Sklička:** HEp-2 buňky v každé jamce.  
 B. **PBS (10x):** Fosforečnan sodný 112,5 mmol/L, fosforečnan draselný 30 mmol/L, chlorid sodný 1,15 mol/L, azid sodný 0,95 g/L. pH 7,2.  
 C+. **ANA-HEp-2 Pozitivní kontrola:** Lidské sérum obsahující anti-nukleární protilátky (ANA) homogeního obrazu, azid sodný 0,95 g/L.  
 C-. **Negativní kontrola** (kód 44696): Lidské sérum, azid sodný 0,95 g/L.  
 D. **IgG FITC/Evans:** Kozí anti-human IgG imunoglobulin konjugovaný s fluorescein isothiokyanátem (FITC), Evansova modř 0,01 g/L, azid sodný 0,95 g/L.  
 E. **Montovací medium:** Mowiol 12%, Glycerol 30%, Tris 20 mmol/L, azid sodný 0,95 g/L.  
 F. **Odsávací papír**

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 potenciálně infekčním materiálem.

### SKLADOVÁNÍ

Skloďte při 2-8°C.  
Reagenty jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno jejich kontaminaci.

#### Známky zhoršení kvality:

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

### POMOCNÉ REAGENCIE

- Pro kódy 44108, 44508 a 44509 není třeba dalších reagentů.
- Pro kódy 44546 a 44547 je třeba objednat následující reagenty:
  - B. **PBS (10x)** (kód 44592)
  - D. **IgG FITC/Evans konjugát** (kód 44697 -3 ml, nebo 44834 - 10 ml)
  - E. **Montovací medium** (kód 44694)
- ANA Pozitivní kontroly pro diferenciaci onemocnění:
  - C+. **ANA-Hep-2 Pozitivní kontrola**
  - C+. **ANA-Sp Pozitivní kontrola** (kód 44503): Lidské sérum obsahující Anti-nukleární protilátky (ANA) s tečkovaným zobrazením, azid sodný 0,95 g/l
  - C+. **ANA-Nu Pozitivní kontrola** (kód 44504): Lidské sérum obsahující Anti-nukleární protilátky (ANA) s nukleolárním zobrazením, azid sodný 0,95 g/l
  - C+. **ANA-Ce Pozitivní kontrola** (kód 44585): Lidské sérum obsahující Anti-nukleární protilátky (ANA) s centromerovým obrazem, azid sodný 0,95 g/l
  - C- Negativní kontrola

### PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

**PBS:** Nařeďte reagent B 1/10 destilovanou vodou. Stabilita 1 týden při 2-8°C. Ostatní reagenty jsou ready to use.

### PŘIDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

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

### VZORKY

Sérum nebo plazma odebraná standardním postupem. Stabilní po dobu 1 týdne při 2-8°C.

Sérum zřeďte 1/80 v PBS (Viz. příprava reagentu). K titraci pozitivních vzorků ředte dvojkovou řadou v PBS, přičemž začnete ředěním 1/160.

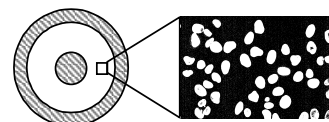
Ačkoliv jsou zde uvedena doporučená ředění, každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní podle populačního charakteru obyvatele.

### PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte reagenty a vzorky na pokojovou teplotu.
2. Kápněte 1 kapku (50 µL) naředěného vzorku, nebo kontroly do každé jamky s tkáňovým řezem (A). Ujistěte se, že řez je kompletně pokrytý. (Poznámka 1).
3. Inkubujte sklička 30 minut při pokojové teplotě (15-30°C) uvnitř zvlhčovací komůrky.
4. Nakloňte sklička a opatrným poklepáním o filtrační papír odstraňte přebytečné kapky vzorku. Zabraňte cross-kontaminaci.
5. Opláchněte krátce v lehkém proudu PBS (viz. příprava reagentu) (Pozn. 2).
6. Sklička důkladně promyjte v nádobě obsahující PBS po dobu 5 minut. Poté PBS vyměňte a promývání zopakujte.
7. Opatrně skličko osušte s použitím speciálního odsávacího papíru. Jamky nevysušujte, musí zůstat vlhké po celou dobu procedury.
8. Do každé jamky přidejte 1 kapku reagentu D. Sklička inkubujte po dobu 30 minut při pokojové teplotě (15-30°C) ve zvlhčovací komůrce.
9. Promyjte podle bodu 6 a osušte podle bodu 7.
10. Přidejte do každé jamky několik kapek reagentu E a opatrně přikryjte krycím skličkem tak, aby nevznikly vzduchové bubliny.

### ODEČÍTÁNÍ

Sklička vyhodnocujte s použitím fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 250-400x). Pro lepší výsledky sklička vyhodnocujte okamžitě. Pro odečet zvolte část zorného pole mezi střední a krajní zónou v části se stejnou vzdáleností mezi buňkami a se stejnou jasností jader. Intenzita fluorescence v okrajích a ve středu není charakteristická.



Najdete-li specifický fluorescenční obraz, který je níže popsán, při doporučeném ředění vzorku, lze mluvit o pozitivním výsledku.

**ANA:** Existuje několik různých nukleárních fluorescenčních zbarvených vzorů ve stejném vzorku séra. Vzory mohou být pozmeněny vlivem naředění séra. Zde jsou 4 hlavní antinukleární vzory:

**Homogenní:** Homogenní, rovnoměrná fluorescence ve všech částech jádra buněk v interfázi. Silná fluorescence buněk v mitóze.

**Okrajová - vnější:** Okrajové zbarvení jader, homogenní fluorescence jádra je méně intenzivnější než jeho okraje.

**Zrnité:** Kropenatá jádra buněk. Nukleoly nejsou zbarvené. Velikosti a tvary jsou různé, protože záleží na reaktivitě antigenu.

**Nukleolární- jádrková fluorescence:** zde jsou dva základní vzory:



# ANTI-NUKLEÁRNÍ PROTILÁTKY HEp-2 (ANA-HEp-2)



KÓD 44108 24 testů	KÓD 44508 60 testů	KÓD 44509 120 testů
KÓD 44546 10 x	KÓD 44547 10 x	
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C		
Reagenty pro kvalitativní stanovení anti-nukleárních protilátek Pouze pro laboratorní <i>in vitro</i> diagnostiku		

## ANTI-NUKLEÁRNÍ PROTILÁTKY (ANA-HEp-2)

Nepřímá imunofluorescence  
HEp-2 BUŇKY

- Nukleolární zbarvení s homogenním vzorem. Často může být nalezeno společně se slabě homogenním fluorescenčním obrazem uvnitř jádra.
- Zrnité nukleoly v interfázi, přerušovaný obraz nukleolárních okrajů mitotických chromosomů.

**Centromerová:** Samostatné tečky v buňkách v interfázi (46 nebo násobky). Linie u chromosomů v metafázi.

Pozitivní séra lze titrovat. Titr séra je definován jako nejvyšší zředění dávající pozitivní výsledek. Není-li pozorována žádná typická fluorescence, výsledek je pro tyto protilátky negativní.

### KONTROLA KVALITY

Pozitivní (C+) a negativní kontrola (C-) by měla být testována společně se vzorkem pacienta, za předpokladu, že byla zakoupena se soupravou kód 44108, 44508 nebo 44509, aby se verifikovala pravdivost zkoušky.

Pozitivní kontrola (C+) by měla vykazovat výše popsaný specifický obraz.

Negativní kontrola (C-) by neměla dávat žádný specifický obraz.

Každá laboratoř by si měla stanovit svoji vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, když kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

### CHARAKTERISTIKA TESTU

IgG FITC/Evans a IgG FITC konjugát je kalibrován proti WHO Mezinárodnímu standardu pro FITC značený ovčí anti-human immunoglobulin.

Specifita ANA- HEp-2 Pozitivní kontroly byla ověřena proti referenčnímu séru AF/CDC1 z Centra pro infekční kontroly.

### DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

**ANA:** Senzitivita antinukleárních protilátek poukazuje z více než 95% na Systémový lupus erythematosus, ačkoliv specifita je velmi nízká<sup>2</sup>.

- **Homogenní obraz:** Svědčí na Systémový lupus erythematosus.
- **Okrajový obraz:** Pacienti s pojivovým tkáňovým onemocněním.
- **Zrnitý obraz:** Úzce souvisí se Systémovým lupus erythematosus, různým pojivovým tkáňovým onemocněním, Sjögrensenovým syndromem, polymyositidou nebo sklerodermií.
- **Nukleolární obraz – jadéřková fluorescence:** Přibližně 50-70% pacientů s překrývající se sklerodermií a polymyositidou. Tento obraz lze nalézt u více než 33% pacientů se systémovou sklerodermií, speciálně však při renálních komplikacích<sup>2</sup>.

–**Centromerový obraz:** protilátky proti centromérám se nachází u pacientů se systémovou sklerózou, zvláště u kožní formy onemocnění (80%). Tyto protilátky lze občas nalézt u některých pojivových onemocnění<sup>3</sup>.

Souprava BioSystems ANA protilátek byla testována na 140 sérech pacientů s různými autoimunitními onemocněními: Systémový lupus erythematosus, Sjögrensenovým syndromem, sklerodermií, CREST syndromem, dermatopolymyositidou, reumatoidní artritidou, autoimunitní hepatitidou a primární biliární cirhózou. Dále byla testována na zdravých dárcích. Výsledky vykazují diagnostickou senzitivitu od 98,3% a specifitu od 93% pro všechna autoimunitní onemocnění.

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

### POZNÁMKA

- Nedotýkejte se tkáňových řezů v jamkách během zkoušky.
- Použijte stříčku, nebo pipetu na promytí. Zabraňte cross-kontaminaci mezi vzorky.

### LITERATURA

- Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.

- Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
- Fritzler MJ, Rattner JB. Autoantibodies to the mitotic apparatus: biological breakthroughs, clinical application, etiological complexity. In: Konrad K, Humbel RL, Meurer M, Shonfeld Y and Tan EM, eds. Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity. Pabst Science Publishers, 2000.

### UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 2.07.2014.

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme přezkontrolovat 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-sa.com](http://www.biosystems-sa.com).

Český návod je k dispozici na: [www.jktrading.cz](http://www.jktrading.cz)

**Výhradní distributor:**

ČR: JK-Trading s r.o., Za Opravnou 5, Praha 5, 155 00

SK: JK-Trading s r.o., Mečíkova 30, Bratislava, 841 07

### VÝROBCE

**BioSystems S.A.** Costa Brava 30, Barcelona (Spain)  
ISO 13485 - TÜV Rheinland - Reg.: SX 60010383 0001  
ISO 9001 - TÜV CERT - Reg.: 01 100 6696