

Kód 44560	48 testů	Kód 44561	12x4 testů	PROTILÁTKY PROTI KŮŽI (ASA) CE	Nepřímá imunofluorescence Opičí jícen
Skladovat při 2 - 8°C					
Reagencie pro kvalitativní stanovení protilátek proti kůži. Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích.					

PRINCIP METODY

Prottilátky proti kůži (ASA) přítomné v séru se vážou na odpovídající antigeny přítomné v řezu opičího jícnu. K vizualizaci komplexu antigen-prottilátka je použito sérum s anti-human imunoglobulinem značeným fluoresceinem. Vyhodnocení se provádí fluorescenčním mikroskopem¹.

OBSAH

		KÓD 44560
A.	Sklička	12 x 4 testů
B.	PBS-(10x)	1 x 100 mL
C-.	Negativní kontrola	1 x 0,3 mL
D.	IgG FITC/Evans (M)	1 x 2,5 mL
E.	Montovací medium	1 x 3 mL
F.	Odsávací papír	1 x 12
		KÓD 44561
A.	Sklička	12 x 4 testů

SLOŽENÍ

- A. **Sklička** : Tkaňový řez opičím jícnem 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-. **Negativní kontrola**. Lidské sérum, azid sodný 0,95 g/L.
- D. **IgG FITC/Evans (M)**: Anti-human IgG imunoglobulin konjugovaný s fluorescein izothiokyanátem (FITC) a navázaný na opičí sérum, 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 potencionálně infekčním materiálem.

SKLADOVÁNÍ

Skladujte 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:

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

POMOCNÉ REAGENCIE

- **Pro kód 44 560** není třeba dalších reagentů.
- **Pro kód 44 561** je třeba objednat následující reagenty:
B. PBS-10x (kód 44592)
D. IgG FITC/Evans (M) - kód 4484 7- 3,5ml, nebo 44882 - 10 ml opičí konjugát s Evansovou modří.
E. Montovací medium (kód 44694)
- **Pozitivní kontroly je možné objednat zvlášť:**

C+. ASA-is: intercelulární pozitivní kontrola. (kód. 44563) Lidské sérum obsahující prottilátky proti kůži orientované proti intercelulární substanci, azid sodný 0,95 g/L.

C+. ASA-bm: bazální membrána pozitivní kontrola. (kód. 44562) Lidské serum obsahující prottilátky proti kůži orientované proti basální membráně, azid sodný 0,95 g/L.

C- Negativní kontrola. (kod 44696)

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

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

PŘÍDAVNÁ 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 zředte 1/10 v PBS (Viz. příprava reagentu).

K titraci pozitivních vzorků ředte dvojkovou řadou v PBS, přičemž začnete ředěním 1/10.

PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte reagencie a vzorky na pokojovou teplotu.
2. Kápněte 1 kapku (50 µL) naředěného vzorku, nebo kontroly do každé jamky s tkaňovým řezem. Ujistěte se, že je jamka kompletně pokrytá. (Poznámka 1).
3. Inkubujte sklička 30 minut při pokojové teplotě (15-30°C) uvnitř zvlhčovací komůrky.
4. Vysušte skličko opatrným nakloněním a poklepáváním o filtrační papír. Zabraňte zkřížené kontaminaci mezi vzorky.
5. Opláchněte skličko krátce v lehkém proudu PBS (viz. Příprava reagentu) (Poznámka 2).
6. Skličko pořádně 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 reagencie 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 reagencie E a opatrně přikryjte krycím skličkem tak, aby nevznikly vzduchové bubliny.


ODEČTÁNÍ

Sklička vyhodnocujte fluorescenčním mikroskopem (zvětšení 250-400x). Pro lepší výsledky sklička vyhodnocujte okamžitě. Pro odečet zvolte vnitřní část tkaňového řezu. Intenzita fluorescence v okrajích není charakteristická. Jestliže najdete specifický fluorescenční obraz, který je níže popsán, při doporučeném ředění vzorku, lze mluvit o pozitivním výsledku.

ASA-intercelulární substance: Je možné pozorovat intercelulární fluorescenci v epitelu.

ASA-basální membrána: je možné pozorovat přímou fluorescenci na epitelální basální membráně.

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

Kód 44560	48 testů	Kód 44561	12x4 testů	 PROTILÁTKY PROTI KŮŽI (ASA) Nepřímá imunofluorescence Opičí jícen
Skladovat při 2 - 8°C				
Reagencie pro kvalitativní stanovení protilátek proti kůži. Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích.				

KONTROLA KVALITY

Pozitivní kontrola (C+1 a C+2) a Negativní kontrola (C-) by měla být testována společně se vzorkem pacienta, 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 svojí vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, když kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

CHARAKTERISTIKA TESTU

- Konjugáty FITC/Evans(M) a FITC/(M) jsou kalibrovány proti WHO mezinárodnímu standardu pro FITC značené ovčí anti-human imunoglobuliny.
- ASA mezibuněčné substance reagují s desmogleinem 3, složkou epidermálních desmozomů. Je to buněčná adhesivní molekula, která náleží ke kadherinovému rodu.
- Protilátky bazální membrány reagují s antigenem nacházejícím se v prostoru mezi lamina densa a hemidesmozómem, který se nachází v dermálním pólu basálních keratinocytů.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Protilátky proti kůži (ASA), které se nacházejí v intercelulárním dlaždicovém epitelu jsou charakteristické pro diferenciální puchýřkovitých kožních onemocnění jako jsou pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus and paraneoplastic pemphigus.

Ačkoliv výsledky získané nepřímou imunofluorescencí jsou velmi specifické pro pemphigus, všechny typy tohoto onemocnění nemohou být detekovány nepřímou imunofluorescencí. U malého procenta pacientů s puchýřnatým onemocněním mohou být prokázány necirkulující protilátky od protilátek vždy přítomných s pacientovou pokožkou².

Protilátky proti mezibuněčným substancím se nacházejí v séru 70% pacientů s bulózní pemfigoidou (bullous pemphigoid) při detekování nepřímou imunofluorescencí, u 20-25% pacientů s těhotenským herpes (herpes gestationis) a u 10% pacientů se zjizveným puchýřnatým onemocněním (cicatricial pemphigoid)³.

Souprava BioSystems protilátky proti kůži byla použita k testování 91 sér pacientů s bulózním onemocněním a u zdravých dárců. Výsledky jsou popsány níže:

Skupina	n	ASA-is	ASA-bm
Pacienti s pemphigus vulgaris	23	18	0
Pacienti s Bullous pemphigoid	18	0	16
Zdraví dárči	50	0	0

Senzitivita BioSystems ASA soupravy byla měřena u 78% pacientů s pemphigus vulgaris a 89% s bullous pemphigoid. Specifita pro obě onemocnění byla 100%.

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

POZNÁMKA

1. Nedotýkejte se tkáňových řezů v jamkách během zkoušky.
2. Použijte stříčku, nebo pipetu na promytí. Zabraňte zkřížené kontaminaci.

LITERATURA

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Mascaró JM, Fairley JA, Giudice GJ, Díaz LA. Autoantibodies in pemphigus vulgaris. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Giudice GJ and Díaz LA. Autoantibodies in bullous pemphigoid, herpes gestationis and cicatricial pemphigoid. In: En: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 29.8.2019

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí. Originální návod najdete v soupravě a na internetové adrese: www.biosystems.es.

Český návod je k dispozici na: www.jktrading.cz

Výhradní distributor:

ČR : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha5, tel.: +420 257 220 760

SK : JK-Trading spol.s.r.o., Mečíkova 30, 841 07 Bratislava, tel.: +421 264 774 591

V případě mimořádných událostí:

ČR : Toxikologické informační středisko (TIS), klinika pracovního lékařství VFN a LF UK, tel.: +420 224 91 92 93 a +420 224 91 54 02

SK : Toxikologické informačné centrum Bratislava, 833 05, Limbová 5, tel.: +421 254 774 166