

MASTAFLUOR™ Combi-3

Imunofluorescenční test na detekci protilátek na krysích tkáňových řezech žaludku /
jater / ledvin

Návod k použití



Pouze pro *in vitro* diagnostiku

MASTAFLUOR™ Combi-3 (ANA, AMA, ASMA, APCA, LKM) REF 606023 10 x 10 testů

Skříčka s kombinací tkáňových řezů ledvin / žaludku také pro detekci: ABBA, ARA, ARIA

Výrobce:

MAST DIAGNOSTICA
Laboratoriums-Präparate GmbH
Feldstraße 20, D-23858 Reinfeld
Deutschland
Tel.: +49 (0) 4533 2007-0
Fax: +49 (0) 4533 2007-68
Web: www.mast-diagnostica.de
E-Mail: mast@mast-diagnostica.de

Distributor:

Gali spol. s r.o.
Ke Stadionu 179
513 01, Semily
Česká republika
Tel.: 481 689 050
Fax: 481 689 051
E-Mail: Info@gali.cz

MASTAFLUOR™ Combi-3 – 2008-06-23

Úvod

Autoimunitní onemocnění jsou vyvolána autoimunitními reakcemi, které jsou charakterizovány autoreaktivitou B a T buněk. Autoimunita je způsobena ztrátou schopnosti imunitního systému tolerovat složky těla vlastní. Existuje velké množství relevantních hypotéz, které dávají jako příčinu vzniku těchto onemocnění do souvislosti genetické a/nebo environmentální faktory.

ABBA: Heterofilní protilátky (HA) jsou protilátky, které reagují se zvířecími tkáněmi. Ačkoliv nejsou reaktivní proti specifickým tkáňovým antigenům. Tyto protilátky vytvářejí fluorescenční nálezy a mohou být mylně zaměněny za skutečné protilátky, které jsou pro onemocnění typické. Jsou pravděpodobně reaktivní vůči skupině krevních antigenů, a tak mohou poskytovat falešně pozitivní výsledky.

AMA: Anti-mitochondriální protilátky (AMA) reagují především s vnitřní membránou mitochondrií (bohatá na fosfolipidy). AMA se většinou objevují u onemocnění jako je primární biliární cirhóza, pseudo-LE syndrom a také se objevují u různých forem chronické agresivní žloutenky. Vysoké titry AMA protilátek se často objevují u nehnisajících infekcí žlučníku nebo u primární biliární cirhózy (pozitivní výsledky až v 90%). V těchto případech se protilátky objevují před klinickými symptomy a jejich titr bude jen stěží ovlivněn léčbou během onemocnění. Nízké titry protilátek jsou pozorovány u sklerodermie, Sjögrenova syndromu, revmatoidní artritidy a u ostatních autoimunitních onemocnění.

ANA: Termín anti-nukleární protilátky (ANA) zahrnuje všechny protilátky, které reagují s antigeny v buněčném jádře. Jsou důležitými markery při diagnostice systémového lupu erythematosus (SLE), sklerodermie, Sjögrenova syndromu nebo různých onemocnění pojivové tkáně, obvykle nazývaných MCTD. Ačkoliv je detekce ANA protilátek pro diagnostiku těchto onemocnění velmi důležitá, je nutné určit konečnou diagnózu v souvislosti s klinickým nálezem. Anti-nukleární protilátky se mohou někdy vyskytovat u onemocnění, která nejsou autoimunitního původu. Jedná se např. o různé infekce, virová onemocnění, hepatitidy, infekční mononukleózu, leukémii, lymfom, melanomy atd. Mimoto jsou ANA protilátky často detekovány u chronické hepatitidy, primární cirhózy, thyroiditidy a alergické encefalitidy. Nízké titry ANA protilátek mohou být přítomny u léčených pacientů nebo u zdravých jedinců.

ARA: Anti-retikulinové protilátky (ARA) jsou přítomny u Crohnovy choroby a u dětí s neléčenou celiakií.

ARIA: Anti-ribosomální protilátky (ARIA) se někdy vyskytují u pacientů se SLE, u kterých je zároveň přítomna renální porucha.

ASMA: Protilátky proti hladkému svalstvu se vyskytují u různých onemocnění jater, jako je např. akutní nebo chronická hepatitida, primární biliární cirhóza a ostatní formy jaterních cirhóz. Mimoto, detekce ASMA protilátek podporuje diagnostiku SLE, infekční mononukleózy, karcinomu prsu a vaječnicků a maligního melanomu.

APCA: Cirkulující protilátky proti strukturám parietálních buněk žaludeční sliznice jsou obecně přítomny u perniciózní anemie.

Nicméně mohou být tyto protilátky detekovány u ostatních onemocnění žaludku (chronická atrofická gastritida, žaludeční vředy), štítné žlázy (Hashimotova thyreoiditida, myxedém) a zřídka u anemie z nedostatku železa, diabetu a u starších pacientů.

LKM: Protilátky proti játrům, ledvinám a mikrozomům (LKM) jsou zaměřeny převážně proti lipoproteinům lokalizovaným v membránách drsného a hladkého endoplazmatického retikula.

Rozlišují se dva typy LKM (Typ I a II):

- LKM protilátky typu I jsou často přítomny u chronické aktivní autoimunitní hepatitidy u dětí, především u mladých dívek. Tento typ hepatitidy je způsoben virem hepatitidy A nebo jinými viry hepatitid, ale nikdy ne virem hepatitidy B.
- LKM protilátky typu II jsou přítomny v případech léky indukované hepatitidy.

Popis

Souprava MASTAFLUOR™ Combi-3 představuje testovací systém, pro detekci specifických protilátek na krysích tkáňových řezech žaludku, jater a ledvin, založený na nepřímé imunofluorescenci.

Princip testu

IFA sklíčka jsou koutována kombinací ledvinových a žaludečních tkáňových řezů. Naředěné sérum nebo plazma pacienta se inkubuje v jamkách na sklíčku. V případě přítomnosti specifických protilátek se vytváří stabilní komplex antigen-protilátka. Nespecifické nebo nenavázané protilátky jsou odstraněny promytím. Specifické imunitní komplexy jsou následně detekovány za využití polyvalentních, FITC konjugátem značených, anti-lidských protilátek. Nespecifické nebo nenavázané protilátky jsou znovu odstraněny promytím. Výsledky mohou být vyhodnoceny vizuálně za využití imunofluorescenčního mikroskopu.

Pozitivní reakce vykazují specifickou fluorescenční reakci na tkáňových řezech žaludku, jater a ledvin.

Součástí soupravy

| Položka | 100 testů | Specifikace |
|--------------------|------------------|--|
| Skříčka | 10 x 10 jamek | Koutována kombinací žaludečních, jaterních a ledvinných krysích tkáňových řezů |
| Pozitivní kontrola | 0,5 mL | Pozitivní sérum, připravené k použití, obsahuje < 0,1% NaN ₃ |
| Negativní kontrola | 0,5 mL | Negativní sérum, připravené k použití, obsahuje < 0,1% NaN ₃ |
| FITC konjugát | 3 mL | Anti-lidský polyvalentní globulin, FITC konjugát, připravený k použití, obsahuje < 0,1% NaN ₃ |
| Evans Blue | 3 mL | Připraven k použití, obsahuje < 0,1% NaN ₃ |
| Montovací médium | 3 mL | Připraveno k použití, obsahuje < 0,1% NaN ₃ |
| PBS | 2 sáčky | 1 sáček pro rozpuštění v 1 L destilované vody, pH 7.2 ± 0.2 |

Potřebný materiál, který není součástí soupravy

1. Sterilní zkumavky
2. Mikropipety a špičky na jedno použití
3. Plastová miska pro inkubaci sklíček, barvicí kvjeta
4. Vlhká komůrka
5. Odměrná baňka pro PBS
6. Destilovaná voda nebo voda vyšší kvality
7. Pinzeta
8. Transmitanční nebo epi-fluorescenční mikroskop se 490 nm excitačním filtrem a s 510 nm filtrem
9. Krycí sklíčka
10. Plastová stříčka na promývání

Uchovávání s trvanlivost reagensů

Souprava MASTAFLUOR™ Combi-3 může být použita do doby expirace, která je uvedena na obale. Souprava musí být skladována při 2 – 8 °C.

Rekonstituovaný PBS prášek by měl být skladován při teplotě 2 – 8 °C po dobu nejdéle 30 dnů.

Vzorky séra a plazmy by měly být skladovány při teplotě 2 – 8 °C po dobu nejdéle 3 dnů před použitím nebo po delší dobu při - 20 °C. Rozmražené vzorky znovu nezmrazujte.

Upozornění a zvláštní opatření

1. Pouze pro *in vitro* diagnostiku.

2. Před prováděním testu čtete pozorně návod k použití. Neměňte pracovní postup.
3. Soupravu nepoužívejte po uplynutí doby expirace.
4. Při práci používejte odpovídající ochranné pracovní pomůcky.
5. Pipety nevkládejte do úst.
6. Využívejte co nejčastěji plastové pomůcky na jedno použití. Skleněné pomůcky pro více použití vždy důkladně omyjte a před použitím je důkladně opláchněte vodou bez přídavku detergentů.
7. Kontrolní séra dodávaná v soupravě byla shledána negativníma na HBsAg a na přítomnost protilátek proti HIV. Nicméně, je třeba s tímto materiálem zacházet jako s potenciálně infekčním, schopným přenosu infekce. Neexistuje stoprocentní jistota, že séra neobsahují žádnou infekci či jinou mikrobiální kontaminaci.
8. Používejte destilovanou vodu nebo vodu vyšší kvality.
9. Nezaměňujte reagentie mezi různými šaržemi, protože reagentie jsou kalibrovány v každé šarži zvlášť.
10. Křížově nekontaminujte reagentie nebo nezaměňte uzávěry na lahvičkách. Vždy používejte čisté pipety a nové špičky zvlášť pro každý vzorek a reagentii.
11. Během provádění testu vždy zabraňte vyschnutí jamek.
12. Při inkubaci nevystavujte sklíčka intenzivnímu slunečnímu záření ani jiným podobným nežádoucím vlivům.
13. Kontaminované plastové pomůcky musí být rychle likvidovány a spáleny. Kontaminované skleněné pomůcky mohou být buď autoklávovány při teplotě 121 °C po dobu 1 hodiny nebo dekontaminovány 2.5 % roztokem chlornanu sodného. Veškerý tekutý odpad by měl být adekvátně dekontaminován např. za využití chlornanu sodného.
14. Nevystavujte FITC-Konjugát přímému slunečnímu záření, UV světlu či světlu ze zářivky. FITC-Konjugát uchovávejte co nejvíce ve tmě.
15. Mikrobiálně kontaminované vzorky séra by neměly být používány.
16. V případě, že je nutné použít hemolytické či lipemické vzorky sér, je nutné je před použitím tepelně inaktivovat při 56 °C.
17. Jak bylo dříve uvedeno, jako konzervant je použit azid sodný. Při požití může být toxický. Azid sodný může reagovat s olovem či se sloučeninami mědi za vzniku vysoce explozivních solí. Vždy odstraňujte do výlevky naředěný velkým množstvím vody.

Pracovní postup

1. Před použitím nechte veškerý materiál vytemperovat na pokojovou teplotu (min. 20 °C).
2. Rozpusťte obsah jednoho sáčku PBS prášku v 1 litru destilované vody nebo vody vyšší kvality.
3. Naředte vzorky pacientů v poměru 1 : 20 s PBS. Příklad: 10 µL séra + 190 µL PBS.
4. Dodávané kontroly jsou připraveny k použití a neředí se.

5. Opatrně vyjměte požadovaný počet sklíček z jejich obalu a důkladně je popište. Sklíčka držte pouze na jejich rohu a nedotýkejte se jamek. Sklíčka umístěte do vlhké komůrky.
6. Aplikujte 20 – 25 µL naředěného vzorku a kontrol do příslušných jamek na sklíčku podle připraveného pracovního postupu. Ujistěte se, že všechny jamky jsou zaplněny a že v nich není přebytek vzorku, který by mohl z jamek přetékat.
Vyhněte se přímému kontaktu špičky pipety s povrchem sklíčka z důvodu možného poškození koutovaného antigenu.
7. Přiklopte vlhkou komůrku a inkubujte při laboratorní teplotě po dobu 30 minut.
8. Po inkubaci opatrně promyjte sklíčka pomocí plastové stříčky s roztokem PBS. Jamky nesmí být promývány přímým proudem roztoku ze stříčky. Opatrné promytí může být provedeno tak, že se přímý proud roztoku PBS ze stříčky namíří na střed sklíčka, které se nejdříve naklopí na stranu směrem k jamkám č. 1 – 5 , a poté se sklíčko naklopí na druhou stranu směrem k jamkám č. 6 – 10.
9. Sklíčka se promývají ponořením do kyvety obsahující roztok PBS po dobu 15 minut. Každých 5 minut vyměňte roztok PBS.
10. Vyjměte sklíčka jedno po druhém z kyvety a vysušte přebytek PBS. Za využití pijáku vysušte prostor okolo jamek. Otfete veškerý přebytek PBS i z druhé strany sklíček. Nedotýkejte se povrchu jamek.
11. Ihned umístěte sklíčko do vlhké komůrky a přidejte 20 – 25 µL FITC konjugátu do každé jamky. Ujistěte se, že ve všech jamkách je konjugát přítomen.
12. Inkubujte sklíčka při laboratorní teplotě v uzavřené vlhké komůrce ve tmě po dobu 30 minut.
13. 15 minut před použitím zapněte mikroskop.
14. Po inkubaci promyjte sklíčka roztokem PBS jako v krocích 9 a 10.
15. Volitelně: přidejte 3-5 kapek Evans Blue do PBS promývacího pufru na posledních 5 minut posledního promývacího kroku. Dojde tak ke zvýšení kontrastu imunofluorescence. Poté promyjte sklíčka PBS pufrem, aby došlo k odstranění veškerého Evans Blue.
16. Aplikujte jednu malou kapku montovacího média do každé jamky. Umístěte krycí sklíčko a ihned odečítejte výsledky. Zabraňte vzniku vzduchových bublin pod krycím sklíčkem. Přebytek montovacího média na sklíčku může způsobit zvýšení fluorescenčního pozadí díky rozptylu světla. Odstraňte přebytek montovacího média např. papírovým ubrouskem. Vyhněte se přímému pohybu krycího sklíčka.
17. Hodnoťte pod fluorescenčním mikroskopem při celkovém zvětšení 200x – 400x.

Interpretace výsledků

Validita testu

Vzorky jsou vyhodnocovány porovnáváním s kontrolami, které jsou dodávány v soupravě.

Další specifické kontroly mohou být objednány separátně.

Interpretace výsledků vzorků

Screeningový titr: 1:20

Vyhodnocování výsledků musí být vždy prováděno společně s pozitivními a negativními kontrolami.

Kombinované tkáňové řezy umožňují odlišení různých protilátek v jedné testovací jamce, a tak mohou být využity pro diagnostiku následujících autoimunitních protilátek (v případě přítomnosti různých protilátek je vhodné využít bližších identifikačních testů).

ABBA: Přítomnost ABBA je indikována fluorescencí kartáčového lemu proximálních tubulů. Jedná se o heterofilní protilátky.

AMA: Přítomnost anti-mitochondriálních protilátek je indikována jemně granulární cytoplasmatickou fluorescencí renálních tubulů. Distální tubuly jsou bohatší na mitochondrie, a proto vykazují intenzivnější fluorescenci v porovnání s proximálními tubuly.

ANA: ANA-pozitivní vzorky jsou charakteristické fluorescencí jader u buněk jaterní tkáně. Vzorky mohou být hodnoceny jako negativní, pokud není fluorescence jádra patrná nebo pokud je přítomno jeho slabě zelené zbarvení. Silně pozitivní vzorky by měly být titrovány z důvodu odhalení skrytého fluorescenčního nálezu nebo smíšených reakcí. Pro odlišení různých nálezů (např. homogenní, nukleolární, centromerní,..) mohou být jako substrát použity HEP-2 buňky.

ARA: Je přítomna fluorescence peritubulárních vláken (tubulárních kapilár), Bowmanových pouzder, perivaskulárních vláken (arteriol, artérií) v ledvinách.

ARIA: Anti-ribosomální protilátky (ARIA) jsou charakterizovány fluorescencí hlavních buněk žaludku, ale ne parietálních buněk.

ASMA: Přítomnost ASMA je indikována přítomností fluorescence vláken hladkých svalů krevních cév ledvin a žaludku, muscularis mucosa, tunica muscularis ventriculi, a také interglandulárních fibril žaludeční sliznice.

APCA: Jemná granulární fluorescence parietálních buněk v žaludeční sliznici je charakteristická pro APCA. AMA protilátky mohou také reagovat s parietálními buňkami, ale tyto anti-mitochondriální protilátky reagují především s renálními tubuly a mohou být vyloučeny z ACA hodnocení.

LKM: Dvě odlišné fluorescence mohou být pozorovány na kombinovaných tkáňových řezech ve stejnou dobu:

- Difúzní cytoplasmatická fluorescence u hepatocytů, přičemž jaderný prostor buňky zůstává tmavý.
- Poměrně slabá fluorescence třetího segmentu proximálního tubulu ledviny, přičemž první a druhý segment vykazuje pouze slabou nebo žádnou fluorescenci.

Poznámka: Distální tubuly vždy vykazují negativitu tam, kde se často pevně váží anti-mitochondriální protilátky.

Příslušné finální ředění séra je definováno pozitivitou fluorescence. Slabá fluorescence buněčného jádra v titrech mezi 1:20 a 1:80 nebo nejasnost ve vztahu ke klinickým výsledkům by měla být řešena cestou opakování testu. V takových případech by měly být vzorky odebrány přibližně po 3 týdnech a měly by být průběžně testovány.

Diagnostická relevance

ABBA

> **1:20** Heterofilní protilátky poskytují falešně pozitivní fluorescenční nálezy, které mohou být mylně zaměněny za nálezy typické pro skutečné protilátky, jež jsou příčinou onemocnění.

AMA

1:20 – 1:80 Pozitivní reakce se vyskytuje u některých onemocnění jater.

> **1:160** Indikuje biliární cirhózu. ANA titry zůstávají konstantní po dlouhou dobu i po ukončení terapie, a proto není užitečné stanovení titru jako ukazatele kontroly terapie.

ANA

1:20 – 1:80 Pozitivní reakce je často pozorována u revmatoidní artritidy (RA) a MCTD. Vzestup titru může indikovat aktivní SLE. Konstantní titry se vyskytují u chronických nebo léčených autoimunitních onemocnění.

> **1:160** Indikuje akutní autoimunitní onemocnění, z čehož v 80% případů je přítomen SLE.

ARA

> **1:20** ARA protilátky jsou přítomny u Crohnovy choroby a u dětí s neléčenou celiakií.

ARIA

> **1:20** Občas přítomny u pacientů se SLE doprovázeným poruchami funkce ledvin.

ASMA

1:20 – 1:80 Pozitivní reakce se vyskytuje u některých jaterních onemocnění, virové hepatitidy a primární biliární cirhózy. Nicméně, výše uvedené titry mohou klesnout pod hranici detekce. Nízké titry mohou být pozorovány u pacientů s infekcí žlučníku, cirhózou způsobenou alkoholem, SLE a u 2% zdravé populace.

> **1:160** Přítomnost chronické hepatitidy. V porovnání s virovou hepatitidou se titry snižují jen částečně a mohou přetrvávat po dobu několika let. U pacientů s infekční mononukleózou se také mohou vysoké titry ASMA protilátek vyskytovat.

APCA Titr APCA protilátek neposkytuje žádné informace o stavu onemocnění. Stanovení protilátek by mělo být vyhodnocováno společně s měřením vnitřního faktoru a/nebo s výsledky z histopatologie.

LKM

> **1:20** LKM protilátky typu II mohou být pozorovány u léky indukované hepatitidy.

Negativní vzorek nevykazuje žádnou zelenou fluorescenci. Může být viditelné zelené zbarvení bez fluorescence.

Omezení / zkřížené reakce

1. Není známa zkřížená reaktivita.
2. Souprava MASTAFLUOR™ Combi-3 se vyznačuje vysokou senzitivitou a specificitou, nicméně, výsledky musí být interpretovány v souladu s dalšími sérologickými testy, klinickým nálezem u pacienta a dalšími faktory.





Přesnost

Inter-assay a intra-assay rozptyly nejsou detekovatelné ve vztahu k intenzitě fluorescence.

Literatura

1. Thomas L., Labor und Diagnose, 5. Auflage (1998), TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt

Vysvětlivky ke zkratkám a ikonám použitým na štítcích

| | |
|---|----------------------|
| SLIDES | Skříčka |
| CONTR + | Pozitivní kontrola |
| CONTR - | Negativní kontrola |
| CONJ | FITC-Konjugát |
| Buffer | PBS Promývací pufr |
| EVANS Blue | Evans Modrá |
| Mounting Medium | Montovací médium |
| LOT | Šarže |
| REF | Katalogové číslo |
| AHG | Anti-lidský globulin |
| RTU | Připraven k použití |
|  | Návod k použití |
|  | Důležité poznámky |
|  | Datum expirace |
|  | Skladování |