MASTAZYME™ ANCA

PR3 (c-ANCA)

MPO (p-ANCA)

Enzymatická imunoesej pro detekci autoprotilátek proti proteináze 3 (PR3) a myeloperoxidáze (MPO) v séru a plasmě

Návod k použití

Pouze pro *in vitro* diagnostiku

Test	Kód	Kit pro
MASTAZYME™ Proteinase 3 (PR3)	735013	12 x 8 testů
MASTAZYME™ Myeloperoxidase (MPO)	735012	12 x 8 testů

Skladujte při 2 – 8 ˚C

	Obsah	Strana
1.	Použití	3
2.	Princip testu	3
3.	Součásti soupravy	3
4.	Potřebný materiál, který není součástí soupravy	4
5.	Upozornění a zvláštní opatření	4
6.	Skladování a stabilita reagencií	5
7.	Odběr vzorku a manipulace	5
8.	Pracovní postup	6
9.	Výsledky a interpretace	7
10.	Charakteristika testu	8
11.	Literatura	8

1. Použití

ELISA souprava MASTAZYME™ PR3 a MPO je určena pro detekci a kvantifikaci specifických protilátek proti proteináze 3 (PR3) a myeloperoxidáze (MPO) v séru a plasmě.

Tento test je určen pouze pro použití *in vitro*.

Všechny výsledky testu musí být interpretovány v souvislosti s ostatními klinickými ukazateli. Pro správnou klinickou interpretaci musí být vzaty v úvahu i výsledky dalších laboratorních testů.

2. Princip testu

Princip testu může být popsán ve čtyřech fázích.

2.1 Inkubace séra

Specifické protilátky se váží k antigenům, které jsou na pevné fázi, a tím vzniká stabilní imunokomplex. Po 30-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě jsou jamky promyty předem zředěným promývacím pufrem, čímž se odstraní všechny nereaktivní komponenty v séru.

2.2 Inkubace s konjugátem

Anti-lidský–IgG konjugát s křenovou peroxidázou je přidán do každé jamky. Konjugát se váže k protilátkám (respektive k antigenu na pevné fázi) a vytváří se tak stabilní „sandwich". Po 30-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě je přebytečný konjugát odstraněn promytím každé jamky promývacím pufrem.

2.3 Reakce se substrátem a její zastavení

Do každé jamky je přidán TMB substrát a v reakci enzym-substrát vznikne stabilní modrý chromogen. Reakce s následnou tvorbou zabarvení je zastavena po 15-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě přidáním 0,5 M H_2SO_4 do jamek. Změna pH způsobí, že se modrá barva chromogenu změní na žlutou.

2.4 Vyhodnocení a interpretace

Intenzita zbarvení je vyhodnocena v readeru při 450 nm (doporučená referenční vlnová délka pro bichromatické měření: 600 – 690 nm). Intenzita zbarvení (OD) je přímo úměrná koncentraci specifických protilátek v séru pacienta.

Výsledky lze číst z kalibrační křivky nebo ze souboru elektronických grafů pomocí 4 parametrové sigmoidní křivky.

3. Součásti soupravy

Souprava se skládá z reagencií pro 12 x 8 = 96 stanovení. Mikrotitrační destičky a roztoky musí být skladovány při teplotě 2 – 8 ˚C. Datum expirace je uvedeno na štítcích jednotlivých součástí kitu.

12 stripů	Mikrotitrační stripy	Jednotlivé stripy obsahují 8 odlamovatelných jamek s navázaným purifikovaným PR3 nebo MPO.
1 x	Držák (rámeček)	

4 x 1,5 mL	Kalibrátory 1 - 4	Stabilizovaná lidská plazma s obsahem protilátek proti PR3 a MPO, naředěná pufrem, připravena k použití.

	Koncentrace anti-PR3 / MPO protilátek [U/mL]
Kalibrátor 1	1
Kalibrátor 2 (Cut-off)	5
Kalibrátor 3	25
Kalibrátor 4	100
Pozitivní kontrola	12,5
Negativní kontrola	2,5

1 x 1,5 mL	Pozitivní kontrola	Stabilizovaná lidská plazma, připravena k použití, může být zařazena do kalibrační křivky.
1 x 1,5 mL	Negativní kontrola	Stabilizovaná lidská plazma, připravena k použití, může být zařazena do kalibrační křivky.
2 x 60 mL	Roztok k ředění vzorků	Roztok PBS s obsahem konzervantu, připraven k použití.
1 x 12 mL	Roztok konjugátu	Roztok HRP s kozí anti-lidskou IgG, připraven k použití.
1 x 12 mL	TMB substrát	3,3´,5,5´ Tetramethylbenzidin, připraven k použití.
1 x 12 mL	Stop roztok	0,5 M roztok kyseliny sírové, připraven k použití.
2 x 50 mL	Promývací pufr 10x koncentrovaný	Roztok PBS/Tween pufru, 10x koncentrovaný. Před použitím nařeďte 1:10, koncentrát může být zahřát až do 37℃ po dobu 15 min. pro rozpuštění případných krystalů.

4. Potřebný materiál, který není součástí soupravy

- 5 µL-, 100 µL- a 500 µL mikro- a multikanálové pipety
- ELISA reader se 450 nm filtrem (referenční filtr 600 – 690 nm)
- Promývač mikrotitračních destiček (v případě manuálního promývání: promývací lahev)
- Zkumavky na ředění sér pacientů
- Odměrný válec
- Destilovaná voda nebo voda vyšší kvality

5. Upozornění a zvláštní opatření

- Pouze pro *in-vitro* diagnostiku! Zabraňte požití či spolknutí! Při práci dodržujte laboratorní bezpečnostní opatření. V laboratoři nejezte, nepijte ani nekuřte.
- Séra, plasmy a pufry této soupravy byly testovány všeobecně uznávanými metodami a jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HIV a HCV. Nicméně z preventivních důvodů je nutné při práci používat ochranné latexové rukavice.

- Skvrny způsobené séry či reagenciemi musí být důkladně odstraněny za použití desinfekčních roztoků (např. 5% chlornan sodný).
- Před prováděním testu je nutné nechat všechny reagencie vytemperovat na pokojovou teplotu (18 – 24˚C).
- Před použitím je nutné reagencie důkladně, ale jemně promíchat např. krouživými pohyby. Vyhněte se třepání, které vede k následné tvorbě pěny.
- Aby byly zajištěny stejné podmínky testu ve všech jamkách mikrotitrační destičky, je nutné pipetovat reagencie ve stejných intervalech.
- Před použitím reagencií se ujistěte, zda není uzávěr či lahvička poškozena a nedošlo tím k možné kontaminaci. Vyvarujte se vzájemného smíchání reagencií. Protože jsou reagencie často citlivé k oxidaci, je důležité nechávat lahvičky otevřené pouze po nezbytně nutnou dobu.
- Kvůli zabránění vzniku kontaminace je nutné používat jednorázové, vyměnitelné špičky na pipety.
- Není možné míchat či jinak používat reagencie ze stejných souprav o jiné šarži.
- Reagencie nepoužívejte po datu jejich expirace.
- V souladu se Správnou Laboratorní Praxí (SLP) a ISO 9001 by měly být veškeré laboratorní pomůcky a přístroje používané pro provedení testu prověřeny z hlediska přesnosti. Toto se týká především pipet, promývacích a čtecích zařízení (ELISA readerů).
- Vyhněte se kontaktu určitých reagencií, a to především stop roztoku a substrátu, s pokožkou, očima a sliznicemi. Hrozí zde riziko podráždění, poleptání a intoxikace. V případě kontaktu omyjte zasažené místo vodou a vyhledejte lékařskou pomoc. Po skončení postupu očistěte všechny použité materiály, potřeby a plochy kvůli zamezení dalšímu kontaktu s reagenciemi.

6. Uchovávání a trvanlivost reagencií

Všechny reagencie skladujte při teplotě 2 – 8˚C.

Datum expirace každé reagencie je uvedeno na štítku lahvičky. Reagencie nepoužívejte po datu jejich expirace. Naředěný promývací pufr je stabilní až 4 týdny, pokud je skladován při teplotě 2– 8˚C. Před použitím se ujistěte, že je pufr vytemperován na laboratorní teplotu.

Po otevření by měla být souprava spotřebována do 3 měsíců.

7. Odběr vzorku a manipulace

Pro stanovení se používá sérum nebo plasma (EDTA, heparin). Vzorky séra či plasmy můžou být skladovány při teplotě 2 – 8˚C po dobu max. 3 dnů. Po delší dobu mohou být alikvotované vzorky skladovány při teplotě -20˚C. Po rozmražení vzorky znovu nezmrazujte. Lipemické, hemolytické, ikterické nebo bakteriemi kontaminované vzorky mohou způsobit falešnou pozitivitu či falešnou negativitu výsledků.

Pacientská séra musí být před testováním předředěna sérum diluentem v poměru 1:101 (např. 5 µL séra + 500 µL sérum diluentu).

8. Pracovní postup

8.1 Příprava reagencií

Před použitím nechte všechny součásti soupravy a vzorky vytemperovat na pokojovou teplotu (18 – 24˚C), všechny reagencie důkladně promíchejte.

Promývací pufr: Zahřejte na teplotu 37˚C pro rozpuštění případných krystalků a poté důkladně promíchejte.
Nařeďte koncentrovaný promývací pufr v poměru 1:10 destilovanou vodou (např. 50 mL koncentrovaného pufru + 450 mL destilované vody). Důkladně promíchejte.

- Pro správné provedení testu je nutné důsledně postupovat podle přiložených instrukcí. Veškeré změny a modifikace jsou v rámci odpovědnosti uživatele.
- Všechny reagencie a vzorky musí být před použitím vytemperovány při pokojové teplotě, ale neměly by se této teplotě vystavovat po dobu delší, než je nezbytně nutné.
- Kalibrační křivka by měla být sestavena při každém kvantitativním testu.
- Nepoužité mikrotitrační destičky vložte zpět do plastového obalu a uchovávejte je v suchu při teplotě 2 – 8˚C.

8.2 Provedení testu

Připravte si dostatečné množství jamek v mikrotitračních destičkách pro kalibrátory, kontroly a vzorky.

Poznámka: Je možné využít i jiné inkubační podmínky. V případě změn v doporučeném pracovním postupu (např. inkubace při teplotě 37˚C místo pokojové teploty) musí uživatel validovat takovéto provedení testu.

1. Pipetujte 100 µL naředěných vzorků (1:101), kalibrátorů a kontrol připravených k použití do příslušných jamek.
2. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30-ti minut.
3. Odstraňte přebytečný obsah z mikrojamek a 3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru. Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitrační destičky na papírovém ručníku.
4. Pipetujte 100 µL roztoku HRP konjugátu do každé jamky.
5. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30-ti minut.
6. Odstraňte přebytečný obsah z mikrojamek a 3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru. Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitrační destičky na papírovém ručníku.
7. Pipetujte 100 µL TMB substrátu do každé jamky.
8. Inkubujte po dobu 15 minut ve tmě při pokojové teplotě.
9. Přidejte 100 µL stop roztoku do každé jamky.

10. Po důkladném promíchání a usušení dna mikrojamek změřte optickou hustotu při 450 nm a vypočítejte výsledky. Blank měřte proti vzduchu. Je doporučeno bichromatické měření za využití referenčních vlnových délek 600 – 690 nm. Výsledné koncentrace jednotlivých vzorků mohou být zjištěny pomocí elektronického programu nebo pomocí manuálního vynesení vůči kalibrační křivce.

    Vytvořené zbarvení je stabilní alespoň 30 minut. Měřte optické hustoty během této doby.

9. Výsledky a interpretace

Kvalitativní hodnocení

Kalibrátor 2 je použit pro kvalitativní interpretaci analýzy v závislosti na specifických požadavcích, které zahrnují nebo eliminují hraniční výsledky. Kvantitativní interpretace není možná za využití pouze samotného kalibrátoru 2.

Kvantitativní hodnocení

Pro výpočet výsledků lze využít PC s vhodným softwarovým programem. V tomto případě jsou výsledky vypočítány za využití algoritmu zpracovávajícího 4 vstupní parametry, potřebné pro sestrojení kalibrační křivky.

Volitelně: Kalibrační křivka je vytvořena zanesením středních hodnot absorbancí jednotlivých kalibrátorů na osu Y a jim odpovídající hodnoty koncentrací jsou vyneseny na osu X za využití buď log/log nebo linear/log milimetrového papíru. Hodnoty koncentrací kontrol a vzorků mohou být potom odečítány přímo z grafu.

Doporučené normální hodnoty

Podle studií provedených na souboru vzorků sér od zdravých dárců a nemocných osob, byla stanovena rozmezí normálních a zvýšených hodnot výsledků. Je doporučeno, aby si každá laboratoř individuálně stanovila svá normální referenční rozmezí, která budou založena na výsledcích získaných ze vzorků lokální populace dárců.

negativní: < 5 U/mL

pozitivní: > 5 U/mL

Interpretace výsledků

Výsledky mohou být ovlivněny více faktory. Klinická diagnóza a prognóza onemocnění nemůže být určena pouze na základě jednoho výsledku vyšetření. Pro správné a definitivní určení diagnózy a prognózy onemocnění je třeba brát v úvahu i další laboratorní ukazatele a klinické příznaky.

c-ANCA: Proteináza 3

Pevná fáze ELISA testu MASTAZYME™ PR3 je potažena vysoce purifikovanou lidskou proteinázou 3. Antigen je extrahován z jiných ANCA příbuzných proteáz z α-granulí neutrofilů (např. katepsin G nebo elastáza), čímž eliminuje zkříženou reaktivitu v případě kontaminace antigenem.

MASTAZYME™ PR3 je ideálním řešením pro konfirmaci nebo subspecifikaci c-ANCA pozitivního séra. Anti-PR3 titry přímo korelují s aktivitou Wegenerovy granulomatózy.

Některá HIV pozitivní séra se můžou ukazovat jako c-ANCA IFA typicky pozitivní. Malignity můžou též poskytovat nespecifické pozitivní výsledky bez jakýchkoliv klinických příznaků vaskulitid. Nespecifické výsledky se častěji vyskytují u IFA a mohou být vyloučeny pomocí ELISA testu.

p-ANCA: Myeloperoxidáza

Pevná fáze ELISA testu MASTAZYME™ MPO je potažena lidskou myeloperoxidázou extrahovanou z granulocytů. Použití nativního antigenu a speciální techniky potažení umožňuje antigenu zachovat si stabilní stav. Díky tomu se nevyskytují zkřížené reakce s GS-ANA.

Pozitivní výsledek významně poukazuje na nekrotizující formu vaskulitidy, Chung-Strausův syndrom nebo Wegenerovu granulomatózu. Thyroidní peroxidáza a myeloperoxidáza mají homologní sekvence aminokyselin. Nebyla však zaznamenána žádná zkřížená reaktivita při použití vysoce pozitivního anti-TPO séra, avšak berte zřetel na případné neobvyklé výsledky.

10. Charakteristika testu

Charakteristiky ELISA testů MASTAZYME™ PR3 nebo MPO byly stanoveny a posouzeny v souladu s Evropskými IVD direktivami. Detailní validační data mohou být poskytnuta na zvláštní přání.

11. Literatura

1. Gross WL. et al., Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: immunobiological aspects, Klin. Wochenschr, 69, 558-566 (1991).
2. Gross WL. et al., ANCA-assoziierte Vaskulitiden (Wegener-Granulomatose, Churg-Strauss-Syndrom, Mikroskopische Polyaniitis) 1. Systemtik, Pathogenese und Klinik, Z.Rheumatol, 54, 279-290 (1995).
3. Seibold f et al., Clinical significance of antibodies against neutrophils in patients with inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis, Gut, 33, 657-662 (1992).
4. Seibold f et al., Neutrophil Autoantibodies: A genetic marker in primary sclerosis colangitis and ulcerative colitis, Gastroenterol, 107, 532-536 (1994).

Poznámky:

Distributor:

GALI spol. s.r.o.
Ke Stadionu 179
Semily, 513 01
Tel: +420 481 689 050
Fax: +420 481 689 051
E-mail: info@gali.cz
Web: www.gali.cz

Výrobce:

Mast Diagnostica GmbH
Feldstraße 20
DE 23858 Reinfeld
Tel.: +49 4533 2007-0
Fax: +49 4533 2007-68
E-mail: mast@mast-diagnostica.de
Web: www.mastgrp.com