AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUSLIDES®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

NÁVOD K
POUŽITÍ

AESKUSLIDES® ANCA

Ref 54.xxx

CE

AESKUSLIDES®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



eIFU
WWW.AESKU.COM

NÁVOD K POUŽITÍ

ANCA

Označení	Popis	Testy
54.100	**ANCA Ethanol** (12 jamek)	120
54.101	**ANCA Formalin** (12 jamek)	120
54.050	**ANCA Ethanol** (6 jamek)	60
54.051	**ANCA Formalin** (6 jamek)	60

Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim
Germany
Phone: +49 6734 9622-0
Fax: +49 6734 9622-2222
Website: www.aesku.com
Mail: info@aesku.com

Obsah

1. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ 1
2. KLINICKÉ POUŽITÍ 1
3. POSTUP POUŽITÍ SOUPRAVY 3
4. INTERPRETACE 3
5. SPECIFICKÉ CHARAKTERISTIKY FUNKCE 3
5.1. Citlivost/specifičnost 3
5.2. Reprodukovatelnost a přesnost 4
6. LIST INTERPRETACE DAT 5
7. OBSAH STANDARDNÍ SOUPRAVY 6
8. BĚŽNÉ REAGENCIE 7
a. Běžné reagencie 7
b. Nezbytné materiály, které nejsou součástí balení 7
9. SKLADOVÁNÍ A DOBA POUŽITELNOSTI 8
10. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI POUŽÍVÁNÍ 8
c. Údaje týkající se zdravotních rizik 8
d. Obecné pokyny k použití 8
11. ODBĚR VZORKŮ, MANIPULACE S NIMI A JEJICH SKLADOVÁNÍ 9
12. POSTUP TESTU 9
e. Příprava před pipetováním 9
f. Provedení testu 10
g. Pracovní postup 11
13. ŘEŠENÍ POTÍŽÍ 12
14. REGULAČNÍ SYMBOLY 13

ANCA

1. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

***AESKUSLIDES*® ANCA** je nepřímý imunofluorescenční test k detekci protilátek proti cytoplazmě neutrofilů (ANCA) v lidském séru.

Test je nástrojem k diferenciální diagnostice vaskulitid spojených s ANCA (AAV), např. granulomatózy s polyangiitidou (Wegenerova)[1], mikroskopické polyangiitidy a syndromu Churg-Straussové.

2. KLINICKÉ POUŽITÍ

Zkratka ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies, protilátky proti cytoplazmě neutrofilů) popisuje skupinu protilátek namířených proti různým částem neutrofilních granulocytů a monocytů. K detekci ANCA byl doposud jako uznávaná metoda používán nepřímý imunofluorescenční test na neutrofilech fixovaných etanolem. Ukázalo se, že některé ANCA vytváří na neutrofilech fixovaných etanolem cytoplazmatický fluorescenční vzor (proto se označují C-ANCA), zatímco další vytváří perinukleární vzor (P-ANCA). Jelikož mohou oba vzory zahrnovat několik antigenů, není imunofluorescence dostatečná k uspokojivé diferenciální diagnostice vaskulitidy. Proto musí být každý imunofluorescenční test (IFT) ověřen specifickými testy ELISA[2,3].

Některé ANCA dávají na neutrofilech fixovaných etanolem vzniknout atypickému fluorescenčnímu vzoru (A-ANCA), který lze technicky těžko odlišit od vzoru vytvářenému antinukleárními protilátkami (ANA). K odlišení se používají neutrofily fixované formalínem. ANCA, které na neutrofilech fixovaných etanolem dávají vzniknout barvení P-ANCA/A-ANCA, budou vykazovat cytoplazmatický vzor, pokud se jako substrát použijí neutrofily fixované formalínem. V případě, kdy bude vzor barvení negativní, se musí provést testování ANA s Hep2 buňkami.[4]

Myeloperoxidáza (MPO) byla identifikována jako hlavní antigen P-ANCA (MPO-ANCA). Další buněčné části, jako je laktoferin, katepsin G, lysozym a elastáza, však mohou také způsobovat perinukleární barvení, a proto je zahrnujeme do skupiny P-ANCA. Nejsou ale výslovně spojeny s AAV a mohou hrát roli v diferenciální diagnostice dalších nevaskulitidových onemocnění.[5]

Naopak proteináza 3 je hlavním cílovým antigenem C-ANCA (PR3-ANCA).[6] Jiným antigenem, který může vytvářet C-ANCA je BPI (baktericidní / propustnost zvyšující protein).[7]

ANCA jsou často přítomné u pacientů s mikroskopickou polyangiitidou (60 % MPO-ANCA, 30 %

[1] Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, Hoffman GS, Jayne DR, Jennette JC et al. Granulomatosis with Polyangiitis (Wegener's): An alternative name for Wegener's Granulomatosis. Arthritis Rheum 2011; 63: 863–864.
[2] Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). Am J Clin Pathol 1999; 111: 507–513.
[3] Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, Hagen EC, Jennette JC et al. Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. Am J Clin Pathol 2003; 120: 312–318.
[4] Csernok E, Holle JU. Twenty-eight years with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): how to test for ANCA – evidence-based immunology? Autoimmun Highlights 2010; 1: 39–43.
[5] Wiik A, Stummann L, Kjeldsen L, Borregaard N, Ullman S, Jacobsen S et al. The diversity of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) antigens. Clin Exp Immunol 1995; 101 Suppl 1: 15–17.
[6] Gross WL, Csernok E, Helmchen U. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies, autoantigens, and systemic vasculitis. APMIS 1995; 103: 81–97.
[7] Zhao MH, Jones SJ, Lockwood CM. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. Clin Exp Immunol 1995; 99: 49–56.

PR3-ANCA) a u pacientů se syndromem Churg-Straussové (30 % MPO-ANCA, 30 % PR3-ANCA).[8] Protilátky proti PR3 jsou specifickým sérologickým markerem granulomatózy s polyangiitidou (Wegenerova). Zde 50 % (lokalizované onemocnění) až 95 % (generalizované onemocnění) vykazuje PR3-ANCA.[9]

Protilátky proti jiným antigenům příslušným k ANCA, jako je laktoferin, katepsin G, elastáza a BPI, byly spojeny s nejrůznějšími onemocněními. Jasný klinický význam se však stále zkoumá.[5] V případě protilátek proti elastáze byla prokázána souvislost s destruktivními lézemi střední linie indukovanými kokainem (CIMDL).[10]

Charakterizace antigenu: lidské neutrofily (granulocyty) fixované etanolem nebo formalínem

Zkřížená reaktivita: Jak bylo popsáno v části o klinickém použití, přítomnost ANA může dát vznik fluorescenčním vzorům, které si lze splést se vzory P-ANCA/A-ANCA. Jinak se nevyskytuje žádná zkřížená reaktivita.

Detekce protilátek je založena na principu nepřímého imunofluorescenčního testu (IIFA). Skleněná mikroskopická sklíčka jsou potažena řezy tkání nebo buňkami (HEp-2 buňky (ANA), granulocyty (ANCA) nebo *Crithidia luciliae* (nDNA)). Pokud sérum pacienta obsahuje specifické protilátky, navážou se na sklíčko během první inkubace. Po odstranění nevázaného materiálu promývacími kroky jsou během druhé inkubace navázané protilátky detekovány imunoglobuliny proti lidským antigenům konjugovanými s fluoresceinem. Specifické zelené fluorescenční barvení komplexu antigen-protilátka je možné pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu.

[8] Bosch X, Guilabert A, Font J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. Lancet 2006; 368: 404–418.

[9] Holle JU, Csernok E, Gross WL. Wegener Granulomatosis. 2008; In: Diagnostic Criteria in autoimmune Diseases, Shoenfeld Y, Cervera R, and Gershwin ME, eds. Humana Press, pp. 99–102.

[10] Wiesner O, Russell KA, Lee AS, Jenne DE, Trimarchi M, Gregorini G et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with human neutrophil elastase as a diagnostic marker for cocaine-induced midline destructive lesions but not autoimmune vasculitis. Arthritis Rheum 2004; 50: 2954–2965.

3. POSTUP POUŽITÍ SOUPRAVY

Podrobné pokyny najdete v Postupu provedení testu uvedeném v Běžných pokynech, části 12. Při použití souprav ANCA dodržujte následující podrobné pokyny:

- Doba kontrastního barvení: 30-90 sekund
- Doporučený screeningový titr:
  - 1:20

4. INTERPRETACE

Protilátky proti cytoplazmě neutrofilů (ANCA) mají hlavní klinický význam při hodnocení cévních poruch pacienta.

Vhodný konečný titr je ten, při kterém sérum pacienta vykazuje jednoduchou pozitivní fluorescenci. Slabá fluorescence s titry mezi 1:20 a 1:80 nebo neurčitost co se týče klinických výsledků musí být ověřena monitorovací kontrolou. V takovém případě musí být vzorky odebírány zhruba každé 3 týdny a testovány podobným způsobem.

1:20	25 µl séra	+	475 µl pufru pro vzorky
1:40	20 µl séra	+	780 µl pufru pro vzorky (respektive 1:2 ředění „1:20“)
1:80	10 µl séra	+	790 µl pufru pro vzorky (respektive 1:2 ředění „1:40“)
1:160	10 µl séra	+	1590 µl pufru pro vzorky (respektive 1:2 ředění „1:80“)

atd.

Klasický vzor C-ANCA vykazuje granulární homogenní cytoplazmatické barvení s minimálním barvením jaderné oblasti.

Vzor P-ANCA vykazuje ostře ohraničené perinukleární barvení (neutrofily fixované etanolem) nebo cytoplazmatický vzor C-ANCA (neutrofily fixované formalínem).

5. SPECIFICKÉ CHARAKTERISTIKY FUNKCE

5.1. Citlivost/specifičnost

Testy ***AESKUSLIDES*®** **ANCA Ethanol** a **ANCA Formalin** byly porovnány s jinými komerčně dostupnými testovými systémy nepřímé imunofluorescence využívajícími neutrofily fixované ethanolem a formalínem. 132 sér od pacientů s diagnózou ANCA asociované vaskulitidy a 375 sér od pacientů s jinými onemocněními („non-healthy controls“) bylo analyzováno ručně a vyhodnoceno na základě dvou čtení. Pro stanovení pozitivních vzorků byla použita mezní hodnota ředění 1:20. Klinické vzorky představovaly plné spektrum autoimunitních onemocnění.

Při porovnání jsme u testu ANCA Ethanol získali následující výsledky:

		Predikát		
		Pozitivní	Negativní	Celkem
***AESKUSLIDES®* ANCA Ethanol**	**Pozitivní**	145	34	179
	Negativní	71	257	328
	Celkem	216	291	507

Citlivost = 145/216 = 67,1 % (95 % CI: 60,6–73,0 %)
Specifičnost = 257/291 = 88,3 % (95 % CI: 84,1–91,5 %)

Při porovnání jsme u testu ANCA Formalin získali následující údaje:

		Predikát		
		Pozitivní	Negativní	Celkem
***AESKUSLIDES®* ANCA Formalin**	**Pozitivní**	66	35	101
	Negativní	16	390	406
	Celkem	82	425	507

Citlivost = 66/82 = 80,5 % (95 % CI: 70,6–87,6 %)
Specifičnost = 390/425 = 91,8 % (95 % CI: 88,8–94,0 %)

95% intervaly spolehlivosti jsou intervaly spolehlivosti podle Wilsonovy metody[11].

5.2. Reprodukovatelnost a přesnost

Za účelem prokázání reprodukovatelnosti testů ***AESKUSLIDES®* ANCA Ethanol** a **ANCA Formalin** byly provedeny vnitrolaboratorní a mezilaboratorní studie a studie mezi šaržemi. Osm vzorků séra bylo testováno pomocí testu ***AESKUSLIDES®* ANCA Ethanol**. U testu ***AESKUSLIDES®* ANCA Formalin** bylo použito deset vzorků. Soubor vzorků zahrnující negativní, nízce pozitivní, středně a vysoce pozitivní vzorky reprezentující dva různé vzory (P-ANCA a C-ANCA) byl zpracován ručně a pomocí automatizovaného systému **HELIOS® Automated IFA System** a vyhodnocen na základě dvou čtení. U vnitrolaboratorních a mezilaboratorních studií byly vzorky testovány v průběhu pěti dnů, přičemž každý den byly na třech studijních pracovištích provedeny dva cykly a tři replikáty na cyklus. K prokázání variability mezi šaržemi byly vzorky ***AESKUSLIDES®* ANCA Ethanol** a **ANCA Formalin** testovány v deseti replikátech pomocí tří různých šarží souprav. Pozitivní a negativní shody byly ≥ 90 %. Vzorky vykazovaly konzistentní vzory a intenzitu fluorescence ve všech testovaných jamkách.

[11] Wilson, E. B. (1927). Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. Journal of the American Statistical Association, 22(158), 209–212. https://doi.org/10.2307/2276774

6. LIST INTERPRETACE DAT

ANCA

Datum:	Šarže:	Fixace ethanolem: ☐ formalínem: ☐
Č. sklíčka:	Pracovník:	

Č. jamky	ID	Faktor ředění	F.I.	nukleoplazma	cytoplazma	autoprotilátky	poznámky
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							

7. OBSAH STANDARDNÍ SOUPRAVY

		SKLÍČKA				KONJUGÁT			POZITIVNÍ KONTROLA		
Označení soupravy	Popis soupravy	Označení	Jamky	Potaženo	Množství	Označení	Popis	Množství	Označení	Popis	Množství
54.100	**ANCA Ethanol (12 jamek)**	**S54.100**	12	lidské neutrofily (fixace etanolem)	10	**C54.100**	**IgG** s modrým víčkem: roztok zbarvený lehce do modra Obsah: BSA, Tween, protilátka proti lidským antigenům značená fluoresceinem (FITC)	1 x 4,8 ml	**PC54.100**	Kontrola vzoru ANCA – C-ANCA S červeným víčkem: bezbarvý roztok. Obsah: lidské sérum (naředěné), azid sodný < 0,1 % (konzervační roztok).	1 x 0,5 ml
									PC54.101	Kontrola vzoru ANCA – P-ANCA S červeným víčkem: bezbarvý roztok. Obsah: lidské sérum (naředěné), azid sodný < 0,1 % (konzervační roztok).	
54.101	**ANCA Formalin (12 jamek)**	**S54.101**	12	lidské neutrofily (fixace formalínem)	10	**C54.101**	**IgG** s modrým víčkem: roztok zbarvený lehce do modra Obsah: BSA, Tween, protilátka proti lidským antigenům značená fluoresceinem (FITC)	1 x 4,8 ml	**PC54.100**	Kontrola vzoru ANCA – C-ANCA S červeným víčkem: bezbarvý roztok. Obsah: lidské sérum (naředěné), azid sodný < 0,1 % (konzervační roztok).	1 x 0,5 ml
									PC54.101	Kontrola vzoru ANCA – P-ANCA S červeným víčkem: bezbarvý roztok. Obsah: lidské sérum (naředěné), azid sodný < 0,1 % (konzervační roztok).	
54.050	**ANCA Ethanol (6 jamek)**	**S54.050**	6	lidské neutrofily (fixace etanolem)	10	**C54.050**	**IgG** s modrým víčkem: roztok zbarvený lehce do modra Obsah: BSA, Tween, protilátka proti lidským antigenům značená fluoresceinem (FITC)	1 x 2,4 ml	**PC54.100**	Kontrola vzoru ANCA – C-ANCA S červeným víčkem: bezbarvý roztok. Obsah: lidské sérum (naředěné), azid sodný < 0,1 % (konzervační roztok).	1 x 0,5 ml
									PC54.101	Kontrola vzoru ANCA – P-ANCA S červeným víčkem: bezbarvý roztok. Obsah: lidské sérum (naředěné), azid sodný < 0,1 % (konzervační roztok).	
54.051	**ANCA Formalin (6 jamek)**	**S54.051**	6	lidské neutrofily (fixace formalínem)	10	**C54.051**	**IgG** s modrým víčkem: roztok zbarvený lehce do modra Obsah: BSA, Tween, protilátka proti lidským antigenům značená fluoresceinem (FITC)	1 x 2,4 ml	**PC54.100**	Kontrola vzoru ANCA – C-ANCA S červeným víčkem: bezbarvý roztok. Obsah: lidské sérum (naředěné), azid sodný < 0,1 % (konzervační roztok).	1 x 0,5 ml
									PC54.101	Kontrola vzoru ANCA – P-ANCA S červeným víčkem: bezbarvý roztok. Obsah: lidské sérum (naředěné), azid sodný < 0,1 % (konzervační roztok).	
POZNÁMKA: Zbývající části souprav, tj. běžné reagencie (neg. kontrola, fixační médium atd.) jsou popsány níže v části 8 BĚŽNÉ REAGENCIE.											

8. BĚŽNÉ REAGENCIE

a. Běžné reagencie

Označení	Reagencie	Množství /objem		Popis	Připravena k použití
NCANCA	Negativní kontrola	1 ×	0,5 ml	Se zeleným víčkem: bezbarvý roztok. Obsah: lidské sérum (naředěné), azid sodný < 0,1 % (konzervační roztok).	ANO
*** EBIFA**	Evansova modř 0,2 %	1 ×	1,5 ml	S bílým víčkem: modře zbarvený roztok. Obsah: PBS, Evansova modř. Nařeďte 0,2 % Evansovu modř v poměru 1:3000 v 1× WBIFA.	NE
MMIFA	Fixační médium	1 ×	8 ml	Validováno k použití s HELMED® S bílým víčkem: bezbarvý roztok. Obsah: PBS, glycerin.	ANO
WBIFA	Promývací pufr (10×)	1 ×	100 ml	S bílým víčkem: bezbarvý roztok. Nařeďte koncentrovaný pufr destilovanou vodou v poměru 1:10 (např.: 100 ml + 900 ml). Obsah: PBS, azid sodný (konzervační roztok).	NE
SBIFA	Pufr pro vzorky (1×)	1 ×	70 ml	S bílým víčkem: bezbarvý roztok. K ředění séra pacienta. Obsah: BSA, PBS, azid sodný (konzervační roztok).	ANO

Množství jsou uvedena na soupravu. (*) musí se objednat samostatně.

b. Nezbytné materiály, které nejsou součástí balení

1. Destilovaná voda
2. Zkumavky k ředění vzorku
3. Odměrná baňka
4. Odměrná pipeta
5. Stopky
6. Fluorescenční mikroskop se systémem FITC (excitační filtr – 490 nm, bariérový filtr – 510 nm)
7. Inkubátor
8. Miska na barvení
9. Pipetovací špičky
10. Krycí sklíčka (24 × 60 mm)
11. Střička

Pokud jsou informace o výrobku, včetně značení, chybné nebo nesprávné, kontaktujte výrobce nebo dodavatele testovací soupravy.

9. SKLADOVÁNÍ A DOBA POUŽITELNOSTI

Všechny reagencie skladujte při teplotě 2-8 °C / 35,6-46,4 °F chráněné před intenzivním světlem. Datum expirace každé části je uvedeno na příslušném štítku. Po uplynutí data expirace reagencie nepoužívejte. Všechny reagencie a sklíčka skladujte při teplotě 2-8 °C / 35,6-46,4 °F v jejich původních obalech. Jakmile jsou rekonstituované roztoky připravené, jsou stabilní po dobu minimálně 1 týdne při teplotě 2-8 °C / 35,6-46,4 °F. **Reagencie a sklíčka se mohou používat pouze do data expirace uvedeného na každé části.**

10. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI POUŽÍVÁNÍ

c. Údaje týkající se zdravotních rizik

TENTO VÝROBEK JE URČEN POUZE K DIAGNOSTICKÉMU POUŽITÍ IN VITRO. Proto mohou soupravu používat pouze pracovníci speciálně vyškolení v metodách in vitro diagnostiky. Ačkoli se výrobek nepovažuje za zvlášť toxický ani nebezpečný v podmínkách zamýšleného použití, k zachování maximální bezpečnosti postupujte podle následujících doporučení:

Doporučení a bezpečnostní opatření

Tato souprava obsahuje potenciálně nebezpečné části. Ačkoli nejsou reagencie soupravy klasifikovány jako dráždivé na oči a kůži, doporučujeme nosit jednorázové rukavice a vyhnout se kontaktu s očima a kůží.

Veškerý materiál lidského původu použitý pro některé reagencie této soupravy (např. kontroly) byl testován schválenými metodami a shledán negativním na HBsAg, hepatitidu C a HIV. Žádný test však nemůže zcela zaručit nepřítomnost virových agens v tomto materiálu. S kontrolami souprav a vzorky pacientů proto zacházejte v souladu se státními požadavky, a jako kdyby mohly přenášet infekční onemocnění. Souprava obsahuje materiál zvířecího původu (BSA, imunoglobulin), jak je uvedeno v obsahu. Zacházejte s ní v souladu se státními požadavky.

d. Obecné pokyny k použití

1. Nepipetujte ústy. Při manipulaci se soupravou nekuřte, nejezte ani nepijte.
2. Nemíchejte reagencie s reagenciemi s odlišným číslem šarže ani je jimi nenahrazujte. Mohlo by to vést k odchylkám ve výsledcích.
3. Po použití uchovávejte všechny baňky zavřené, aby nedošlo k bakteriální kontaminaci.
4. Všechny roztoky vždy pipetujte pomocí nových sterilních pipetovacích špiček.
5. Části nikdy nevystavujte vyšším teplotám než 37 °C / 98,6 °F (kromě MMIFA).
6. Během celé doby postupu dávejte vždy pozor, aby jamky sklíčka nevyschly.
7. Sklíčka nikdy nevystavujte mrazu.

Každá laboratoř si musí stanovit vlastní interní kontroly pro vlastní techniky, kontroly, vybavení a populaci pacientů podle zavedených postupů.

Konkrétní klinická diagnóza nesmí být založena pouze na výsledcích provedeného testu. Musí být stanovena lékařem po zhodnocení všech klinických a laboratorních nálezů.

Pokud hodnoty kontrol nesplňují kritéria, test je neplatný a musí se opakovat. Je třeba zkontrolovat následující technické záležitosti: Data expirace (připravených) reagencií, skladovací podmínky, pipety, prostředky, fotometr, inkubační podmínky a způsoby promývání. Pokud testované položky vykazují abnormální hodnoty či jakýkoli druh odchylky nebo pokud nejsou bez opodstatněného důvodu splněna kritéria validace, kontaktujte místního zástupce.

11. ODBĚR VZORKŮ, MANIPULACE S NIMI A JEJICH SKLADOVÁNÍ

Příprava vzorků: Ideální je používat čerstvě odebrané vzorky séra. Odběr krve se musí provést podle státních požadavků. Vzorky krve odeberte asepticky.

Lipemické, iktherické, hemolyzované nebo mikrobiálně kontaminované vzorky mohou způsobit interferenci.

Séra s částicemi se musí vyčistit odstředěním nízkou rychlostí (< 1000 x g). Vzorky krve se musí odebírat do čistých, suchých a prázdných zkumavek. Po separaci se vzorky séra musí použít během prvních 8 hodin, respektive jsou-li pevně uzavřené, je možné je skladovat až 2 týdny při teplotě 2-8 °C / 35,6-46,4 °F nebo zmrazené při teplotě −20 °C / −4 °F po delší dobu. Vzorky opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte.

12. POSTUP TESTU

e. Příprava před pipetováním

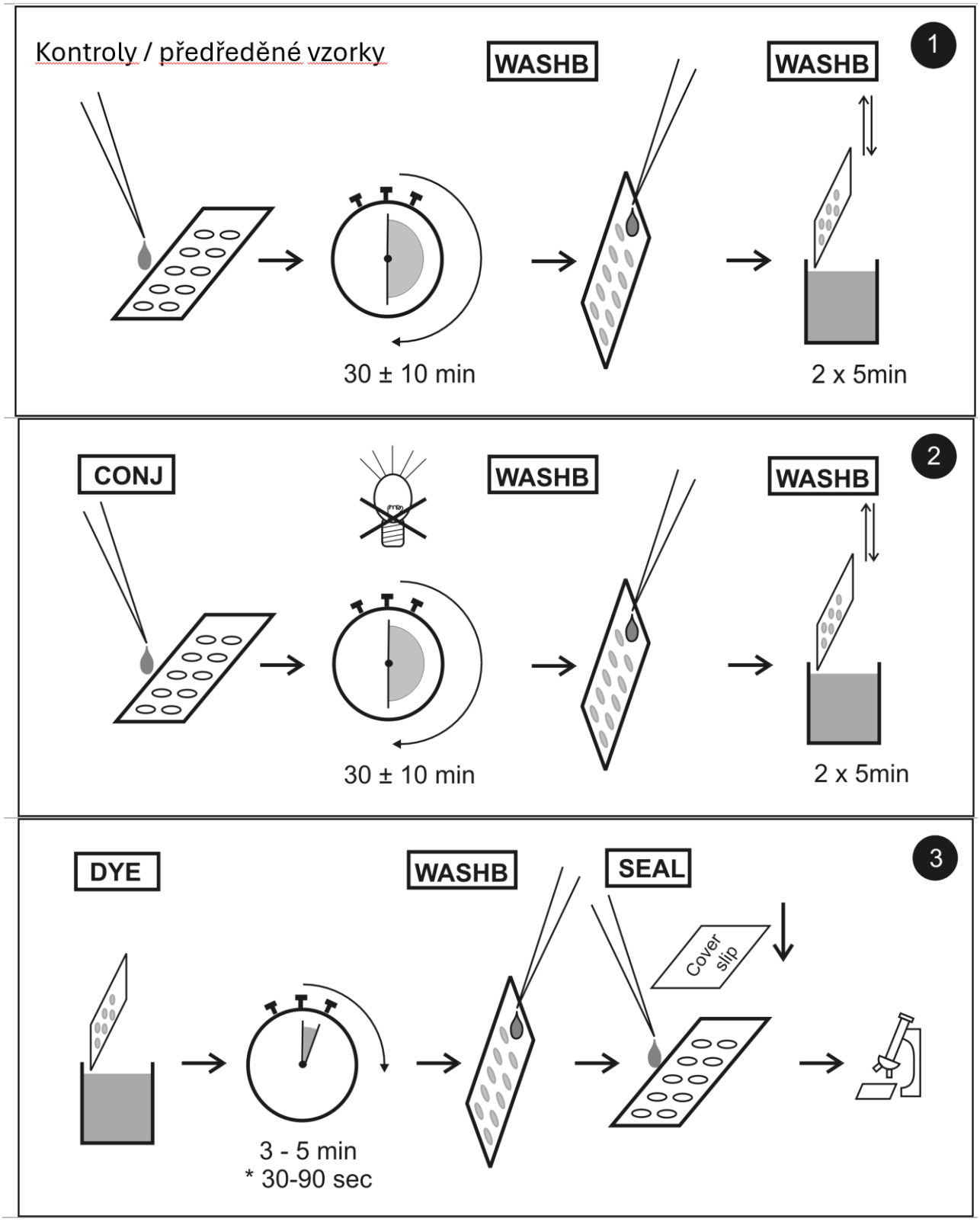
Pokud chcete dosáhnout optimální výkonnosti testu, nechte před použitím všechny části dosáhnout pokojové teploty (20–26 °C / 68–78,8 °F), dobře zamíchejte a postupujte podle doporučeného schématu inkubace.

1. Příprava promývacího pufru: Nařeďte koncentrovaný pufr destilovanou vodou v poměru 1:10.
2. Ředění vzorků: Nařeďte séra pacienta (screeningový titr viz část ***Postup použití soupravy*** v souladu s označením výrobku, který používáte) pomocí pufru pro vzorky (1×). U souprav HEp-2, nDNA, rLKS, EMA atd. mohou být titry odlišné.
3. Kontroly jsou připraveny k použití.
4. Připravte protokol: Listy interpretace dat jsou k dispozici v části ***Postup použití soupravy*** podle označení výrobku, který používáte.
5. V případě zvýšené viskozity a/nebo neprůhlednosti je třeba reagencii fixačního média (MMIFA) před použitím zahřát na 15 minut ve vodní lázni při teplotě 56 °C / 132,8 °F a poté počkat, až dosáhne pokojové teploty (20–26 °C / 68–78,8 °F). Po tomto postupu lze zahřátou reagencii používat až 21 po sobě jdoucích dnů, a to za předpokladu, že je skladována při teplotě 2-8 °C / 35,6-46,4 °F, jak je uvedeno na štítku reagencie a v návodu k použití.

f. Provedení testu

Č.	Popis kroku
1.	Vytáhněte požadovaná sklíčka z obalu a označte je. Nedotýkejte se jamek. Nenechte sklíčka vyschnout.
2.	**Připravte inkubátor**: Do inkubátoru dejte malý objem deionizované nebo destilované vody a vložte sklíčka na podpěry inkubátoru. Sklíčka inkubujte při pokojové teplotě ve vlhkém inkubátoru 30 minut ± 10 minut. U konjugátu použijte stejné inkubační doby. **První inkubace**: Do příslušných jamek napipetujte přiměřený objem každého naředěného séra a kontrol (připraveny k použití). Snažte se pipetou přímo nedotýkat povrchu sklíčka. Zkontrolujte, zda je každá jamka úplně zakrytá odpovídajícím sérem. Je důležité použít tolik testovaného materiálu, kolik je potřeba k úplnému zakrytí jamky. Ale dbejte na to, aby kapalina mezi jamkami neproudila. Mohlo by to vést k nesprávným výsledkům.
3.	**Promytí**: Po inkubaci vytáhněte sklíčka z inkubátoru a pomocí střičky krátce opláchněte promývacím pufrem. Nestříkejte pufr přímo na jamky. POZNÁMKA: Aby nedošlo ke zkřížené kontaminaci nakloňte sklíčko nejprve směrem k jedné řadě, opatrně nechte téct promývací pufr podél středu sklíčka a odtéct dolním okrajem sklíčka. Poté nakloňte sklíčko směrem k další řadě a postup opakujte. Nechte promývací pufr odtéct v místě, kde se nyní nachází dolní okraj sklíčka. Sklíčka omývejte 10 minut promývacím pufrem v misce na barvení sklíček. Dávejte pozor, aby nedošlo k přímému kontaktu pevných částí a substrátu. Pokud chcete docílit optimálních výsledků, pufrovací roztok jednou za 5 minut vyměňte. Vytáhněte sklíčka z misky na barvení a opatrně odstraňte přebytečný promývací pufr. POZNÁMKA: Je důležité, abyste nenechali jamky sklíčka během postupu vyschnout. Mohlo by dojít k poškození substrátu. Žádným způsobem sklíčko neodsávejte ani nesušte ani ho nenechávejte ustát bez reagencie fluorescenční protilátky déle než několik sekund.
4.	**Druhá inkubace**: Po postupu promytí vraťte sklíčko ihned do inkubátoru, zakryjte každou jamku odpovídajícím množstvím konjugátu FITC a zkontrolujte, zda je jamka úplně zakrytá. Sklíčka inkubujte při pokojové teplotě v temnu 30 minut ± 10 minut.
5.	**Promytí**: Po inkubaci vytáhněte sklíčka z inkubátoru a pomocí střičky krátce opláchněte promývacím pufrem. Nestříkejte pufr přímo na jamky. Sklíčka omývejte 10 minut promývacím pufrem v misce na barvení sklíček. Pokud chcete docílit optimálních výsledků, pufrovací roztok jednou za 5 minut vyměňte.
6.	***Volitelné kontrastní barvení**: Naředěte kontrastní barvivo (Evansova modř) promývacím pufrem v poměru 1 : 3 000 a dobře promíchejte. Kontrastní barvení vylijte do misky na barvení a inkubujte v ní sklíčka. Konkrétní inkubační dobu najdete v části ***Postup použití soupravy*** podle označení výrobku, který používáte. Evansova modř pokryje nespecifickou fluorescenci pozadí. Po uplynutí inkubační doby sklíčka vyjměte a krátce opláchněte promývacím roztokem. Odstraňte přebytečný promývací roztok. Žádným způsobem sklíčko neodsávejte ani nesušte.
7.	**Fixační médium**: Přidejte odpovídající objem fixačního média podél středu každého sklíčka. Krycí sklíčko umisťujte opatrně, aby nedošlo ke vzniku vzduchových bublin.
8.	**Čtení**: Sklíčka prohlédněte ihned při celkovém 400–800 násobném zvětšení pomocí fluorescenčního mikroskopu (excitační filtr – 490 nm, bariérový filtr – 510 nm).

g. Pracovní postup



13. ŘEŠENÍ POTÍŽÍ

CHYBA	MOŽNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
Nízká hustota buněk	• Lýza buněk po dlouhotrvajícím kontaktu s deionizovanou vodou. • Pufr byl nastříkán přímo na substrát do jamky.	Postupujte podle doporučeného promývacího postupu.
	Proteolytické enzymy napadly substrát.	Inaktivní sérum.
Nerovnoměrná fluorescence	Sérum je zaschlé v jamkách, fluorescence silnější na okraji.	Vždy inkubujte ve vlhkém prostředí.
	Sérum nezakrývá testovací jamku.	Použijte dostatečný objem testovaného materiálu.
	Zkřížená reakce mezi jamkami.	Při první inkubaci dejte pozor, aby nedošlo k proudění kapaliny mezi jamkami.
	Označení sklíčka voskovou tužkou vytváří na sklíčku film.	Použijte obyčejnou (nevoskovou) tužku.
	Mikroskop není správně nastavený.	Zkontrolujte nastavení UV lampy.
Difúzní obraz	Sklíčko bylo inkubováno v chladničce bez zakrytí.	Utěsněte sklíčko lakem na nehty nebo parafínovým voskem.
	I.F. mikroskop je špinavý. Možné poškrábání čočky.	Mikroskop vyčistěte podle pokynů.
Malá nebo žádná fluorescence	Konjugát a sklíčka byly rozmrazeny a znovu zmrazeny.	Konjugát a sklíčka skladujte při teplotě 2–8 °C / 35-46 °F.
	Naředěné kontroly.	Nahlédněte do pokynů, použijte kontroly soupravy připravené k použití.
	• Bakteriální kontaminace séra nebo konjugátu. • Mikroskop není nastavený. • Hodnota pH promývacího roztoku je příliš nízká (hodnota pH 7,4 ± 0,2).	Zkontrolujte podmínky.
	Konjugát FITC byl vystaven světlu.	Konjugát skladujte chráněný před světlem.
Fluorescence pozadí	• Nesprávné promytí. • Vysušené sklíčko. • Lipemická, hemolytická séra. • Chyba mikroskopu.	• Nahlédněte do pokynů k promývání. • Nenechte sklíčko vyschnout. • Používejte pouze čerstvá séra. • Zkontrolujte, zda máte správný filtr/objektiv.

14. REGULAČNÍ SYMBOLY

IVD	- Diagnosi in vitro	- For in vitro diagnostic use
	- Pour diagnostic in vitro	- Para uso diagnóstico in vitro
	- In-vitro-Diagnostikum	- In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	- Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	- Numero d'ordine	- Cataloge number
	- Référence Catalogue	- Numéro de catálogo
	- Katalognummer	- Αριθμός παραγγελίας
	- Número de catálogo	
LOT	- Descrizione lotto	- Lot
	- Lot	- Lote
	- Chargen Bezeichnung	- Χαρακτηρισμός παρτίδας
	- Lote	
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo	- Unique device identifier
	- Identifiant unique de l'appareil	- Identificador único del dispositivo
	- eindeutige Produktidentifizierung	- Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	- Identificador único do dispositivo	
CE	- Conformità europea	- EC Declaration of Conformity
	- Déclaration CE de Conformité	- Declaración CE de Conformidad
	- Europäische Konformität	- Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- Declaração CE de conformidade	
eIFU WWW.AESKU.COM	- Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso	- See electronical instructions for use
	- Voir les instructions d'utilisation électronique	- Siga las instrucciones electrónicas de uso
	- Elektronsiche Gebrauchsanweisung beachten	- Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Seguir as instruções electrónicas de utilização	
	- Da utilizzarsi entro	- Use by
	- Utilise avant le	- Utilizar antes de
	- Verwendbar bis	- Χρήση μέχρι
	- Utilizar antes de	
+2°C +8°C	- Conservare a 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Store at 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conserver à 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Conservar a 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Lagerung bei 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Φυλάσσεται στους 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conservar entre 2-8°C (35.6-46.4°F)	
	- Prodotto da	- Manufactured by
	- Fabriqué par	- Fabricado por
	- Hergestellt von	- Κατασκευάζεται από
	- Fabricado por	
DYE	- Colorante Blue-Evans	- Evans-Blue Dye
	- coloration au Bleu Evans	- Colorante Azul de Evans
	- Evans-Blue Färbelösung	- Evans Blue
	- Evans Blue	
CONTROL +	- Controllo positivo	- Positive Control
	- Contrôle Positif	- Control Positivo
	- Positiv Kontrolle	- Θετικός ορός ελέγχου
	- Controlo positivo	
CONTROL −	- Controllo negativo	- Negative Control
	- Contrôle Négatif	- Control Negativo
	- Negativ Kontrolle	- Αρνητικός ορός ελέγχου
	- Controlo negativo	
SEAL	- Mezzi di montaggio	- Mounting media
	- milieu de montage	- Medio de montaje
	- Mounting Medium	- Μέσο μονιμοποίησης
	- Meio de montagem	
CONJ	- Coniugato	- Conjugate
	- Conjugé	- Conjugado
	- Konjugat	- Σύζευγμα
	- Conjugado	
	- Vetrino per microscopio	- Microscope slide
	- lame de microscope	- Portaobjetos
	- Objektträger	- Αντικειμενοφόρο πλακίδιο
	- Lâmina	
WASHB 10x	- Tampone di lavaggio	- Wash Buffer
	- Tampon de Lavage	- Solución de lavado
	- Waschpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	- Solucão de lavagem	
SB 1x	- Tampone di campione	- Sample Buffer
	- Tampon de Echantillons	- Solución de muestras
	- Probenpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	- Solução para amostras	

	- Numero di determinazioni	- Number of determnations
	- Nombre de déterminations	- Número de determinaciones
	- Anzahl der Prüfungen	- Αριθμός προσδιορισμών
	- Número de determinações	
	- Non riutilizzare	- Do not reuse
	- Ne pas réutiliser	- No reutilizar
	- Nicht wiederverwenden	- Μην επαναχρησιμοποιείτε
	- Não reutilizar	
	- Proteggere dall'esposizione alla luce	- Protect from exposure to light
	- Protéger de l'exposition à la lumière	- Proteger de la exposición a la luz
	- Vor Sonnenlicht schützen	- Προστασία από την έκθεση στο φως
	- Proteger da exposição à luz	
	- Conservare all'asciutto	- Store dry
	- Stocker au sec	- Almacenar en seco
	- Trocken aufbewahren	- Αποθηκεύστε ξηρά
	- Armazenar em local seco	
	- Non utilizzare se la confezione è danneggiata e consultare le istruzioni per l'uso	- Do not use if package is damaged and consult instructions for use
	- Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter le mode d'emploi.	- No utilizar si el envase está dañado y consultar las instrucciones de uso
	- Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist, und Gebrauchsanweisung beachten	- Μην χρησιμοποιείτε εάν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά και συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης.
	- Não utilizar se a embalagem estiver danificada e consultar as instruções de utilização	