AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUSLIDES®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUKCJA OBSŁUGI

AESKUSLIDES® ANCA

Ref 54.xxx

CE

AESKU.DIAGNOSTICS THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS	Nr produktu	54.xxx
	Opis produktu	ANCA
	Nr wydania instrukcji	018: 2026-06-12

AESKUSLIDES®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



eIFU
WWW.AESKU.COM

INSTRUKCJA OBSŁUGI

ANCA

Odniesienie do normy	Opis	Testy
54.100	**ANCA Ethanol** (12 studzienek)	120
54.101	**ANCA Formalin** (12 studzienek)	120
54.050	**ANCA Ethanol** (6 studzienek)	60
54.051	**ANCA Formalin** (6 studzienek)	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

Spis treści

1. PRZEZNACZENIE 1
2. ZASTOSOWANIE KLINICZNE 1
3. PROCEDURA DLA ZESTAWU TESTOWEGO 3
4. INTERPRETACJA 3
5. CHARAKTERYSTYKA SKUTECZNOŚCI SWOISTEJ 3
5.1. Czułość/swoistość 3
5.2. Odtwarzalność i precyzja 4
6. ARKUSZ INTERPRETACJI DANYCH 5
7. STANDARDOWA ZAWARTOŚĆ ZESTAWU 6
8. ZAWARTOŚĆ WSPÓLNYCH ODCZYNNIKÓW 7
a. Wspólne odczynniki 7
b. Materiały wymagane, ale niedołączone 7
9. PRZECHOWYWANIE I OKRES TRWAŁOŚCI 8
10. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI DOTYCZĄCE STOSOWANIA 8
c. Dane dotyczące zagrożeń dla zdrowia 8
d. Ogólne wskazówki dotyczące użytkowania 9
11. POBIERANIE PRÓBEK, POSTĘPOWANIE Z NIMI I ICH PRZECHOWYWANIE 9
12. PROCEDURA OZNACZENIA 10
e. Przygotowanie przed pipetowaniem 10
f. Procedura testu 11
g. Przebieg czynności 12
13. ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW 13
14. SYMBOLE REGULACYJNE 14

ANCA

1. PRZEZNACZENIE

***AESKUSLIDES*® ANCA** to oznaczenie z wykorzystaniem metody immunofluorescencji pośredniej służące do wykrywania przeciwciał przeciwko cytoplazmie neutrofilów (ang. anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies, ANCA) w surowicy ludzkiej.

Oznaczenie to jest narzędziem do diagnostyki różnicowej zapaleń naczyń krwionośnych związanych z ANCA (ang. ANCA-associated vasculitides, AAV), takich jak ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (ziarniniakowatość Wegenera)[1], mikroskopowe zapalenie naczyń i zespół Churga-Strauss.

2. ZASTOSOWANIE KLINICZNE

Akronim ANCA (Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies) opisuje grupę przeciwciał skierowanych przeciwko różnym składnikom monocytów i granulocytów obojętnochłonnych. Do tej pory uznaną metodą wykrywania ANCA był test metodą immunofluorescencji pośredniej neutrofilów utrwalonych etanolem. Okazało się, że niektóre ANCA (zwane C-ANCA) dają cytoplazmatyczny wzorzec fluorescencyjny, podczas gdy inne dają wzorzec okołojądrowy (P-ANCA) w neutrofilach utrwalonych etanolem. Ponieważ oba wzorce mogą występować dla wielu antygenów, immunofluorescencja nie wystarcza do satysfakcjonującej diagnostyki różnicowej zapalenia naczyń; dlatego każdy test immunofluorescencyjny (ang. immunofluorescence test, IFT) należy weryfikować swoistymi testami ELISA[2,3].

Niektóre ANCA dają nietypowy wzorzec fluorescencyjny (A-ANCA), który może być technicznie trudny do odróżnienia od wzorca generowanego przez przeciwciała przeciwjądrowe (ang. anti-nuclear antibodies, ANA) w neutrofilach utrwalonych etanolem. Aby pomóc w ich rozróżnieniu, stosuje się utrwalanie neutrofilów formaliną. ANCA, które powodują barwienie P-ANCA/A-ANCA w neutrofilach utrwalonych etanolem, będą wykazywać wzorzec cytoplazmatyczny, gdy substratem są neutrofile utrwalone formaliną. W przypadku, gdy wzorzec wybarwienia staje się negatywny, należy przeprowadzić badanie na obecność ANA przy użyciu komórek Hep2.[4]

Mieloperoksydaza (MPO) została zidentyfikowana jako główny antygen P-ANCA (MPO-ANCA). Jednak inne składniki komórek, takie jak laktoferyna, katepsyna G, lizozym i elastaza, również powodują barwienie okołojądrowe i dlatego są zaliczane do grupy P-ANCA. Nie są one jednak swoiście związane z AAV i mogą odgrywać rolę w diagnostyce różnicowej innych chorób niezwiązanych z zapaleniem naczyń[5].

[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.

Natomiast proteinaza 3 jest głównym antygenem docelowym C-ANCA (PR3-ANCA)[6]. Innym antygenem, który może wytwarzać C-ANCA, jest BPI (białko bakteriobójcze / zwiększające przepuszczalność)[7].

ANCA są często wykrywane u pacjentów z mikroskopowym zapaleniem naczyń (60% MPO-ANCA, 30% PR3-ANCA) oraz u pacjentów z zespołem Churga-Strauss (30% MPO-ANCA, 30% PR3-ANCA)[8]. Autoprzeciwciała przeciwko PR3 są swoistym markerem serologicznym ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń (ziarniniakowatości Wegenera). W tym przypadku od 50% (choroba miejscowa) do 95% (choroba uogólniona) pacjentów wykazuje PR3-ANCA[9].

Przeciwciała przeciwko innym antygenom istotnym dla ANCA, takim jak laktoferyna, katepsyna G, elastaza i BPI, były związane z wieloma różnymi chorobami. Jednak istotność kliniczna jest tutaj nadal przedmiotem badań[5]. W przypadku przeciwciał przeciwko elastazie wykazano korelację ze zmianami destrukcyjnymi linii pośrodkowej wywołanymi kokainą (ang. cocaine-induced midline destructive lesions, CIMDL)[10].

Charakterystyka antygenu: Ludzkie neutrofile (granulocyty) utrwalone etanolem albo formaliną.

Reaktywność krzyżowa: Jak opisano w rozdziale dotyczącym zastosowań klinicznych, obecność ANA może powodować powstawanie wzorów fluorescencji, które można pomylić z P-ANCA/A-ANCA. Poza tym reaktywność krzyżowa nie występuje.

Wykrywanie przeciwciał opiera się na zasadzie oznaczenia immunofluorescencji pośredniej (IIFA). Szklane szkiełka mikroskopowe są pokrywane wycinkami tkanek lub komórkami (komórki HEp-2 (ANA), granulocytami (ANCA) lub *Crithidia luciliae* (nDNA)). Jeśli surowica pacjenta zawiera swoiste przeciwciała, ulegną one związaniu podczas pierwszej inkubacji. Po usunięciu niezwiązanego materiału podczas etapów płukania związane przeciwciała są wykrywane przez sprzężone z fluoresceiną przeciwciała przeciwko ludzkim immunoglobulinom podczas drugiej inkubacji. Specyficzne zielone barwienie fluorescencyjne kompleksu antygen-przeciwciało można wizualizować za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego.

[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.
[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. PROCEDURA DLA ZESTAWU TESTOWEGO

Szczegółowe instrukcje znajdują się w punkcie 12 instrukcji zatytułowanym Procedura oznaczenia. W przypadku zestawów ANCA należy stosować następujące parametry:

- Czas barwienia kontrastowego: 30–90 sekund
- Zalecane miano przesiewowe:
  - 1:20

4. INTERPRETACJA

Przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów (ANCA) mają duże znaczenie kliniczne w ocenie zaburzeń naczyniowych u pacjenta.

Odpowiednie miano końcowe to takie, w którym surowica pacjenta wykazuje prostą dodatnią fluorescencję. Słaba fluorescencja z mianami od 1:20 do 1:80 lub niejasności w odniesieniu do wyników klinicznych powinny być sprawdzane poprzez monitorowanie kontroli. W takim przypadku próbki powinny być pobierane co około 3 tygodnie i badane w podobny sposób.

1:20	25 µl surowicy	+ 475 µl buforu próbki
1:40	20 µl surowicy	+ 780 µl buforu próbki (odpowiednio 1:2 rozcieńczenia „1:20”)
1:80	10 µl surowicy	+ 790 µl buforu próbki (odpowiednio 1:2 rozcieńczenia „1:40”)
1:160	10 µl surowicy	+ 1590 µl buforu próbki (odpowiednio 1:2 rozcieńczenia „1:80”)

itd.

Klasyczny wzorzec C-ANCA przedstawiający ziarniste, jednorodne barwienie cytoplazmatyczne z minimalnym zabarwieniem obszaru jądrowego.

Wzorzec P-ANCA z ostro zarysowanym barwieniem okołojądrowym (neutrofile utrwalone etanolem) lub wzorzec cytoplazmatyczny C-ANCA (neutrofile utrwalone formaliną).

5. CHARAKTERYSTYKA SKUTECZNOŚCI SWOISTEJ

5.1. Czułość/swoistość

Produkty *AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol i ANCA Formalin porównano z innymi dostępnymi w handlu systemami testów metodą immunofluorescencji pośredniej neutrofilów utrwalonych etanolem i formaliną. 132 surowic pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym zapaleniem naczyń związanym z ANCA oraz 375 surowic od pacjentów z innymi schorzeniami (próbki kontrolne pochodzące od osób ze schorzeniami) poddano analizie ręcznej i ocenie przez dwóch diagnostów. Do określenia, które próbki są dodatnie, wykorzystano rozcieńczenie odcięcia 1:20. Próbki kliniczne pochodziły od osób z chorobami autoimmunologicznymi z pełnego spektrum.

W porównaniu uzyskano następujące wyniki dla produktu ANCA Ethanol:

		Predykat		
		Dodatni	Ujemny	Łącznie
***AESKUSLIDES®* ANCA Ethanol**	**Dodatni**	145	34	179
	Ujemny	71	257	328
	Łącznie	216	291	507

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

W porównaniu uzyskano następujące dane dla produktu ANCA Formalin:

		Predykat		
		Dodatni	Ujemny	Łącznie
***AESKUSLIDES®* ANCA Formalin**	**Dodatni**	66	35	101
	Ujemny	16	390	406
	Łącznie	82	425	507

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

Przedziały ufności 95 % są wyliczone zgodnie z metodą Wilsona[11].

5.2. Odtwarzalność i precyzja

Przeprowadzono badania dotyczące odtwarzalności wyników uzyskanych przy użyciu produktów ***AESKUSLIDES®* ANCA Ethanol** i **ANCA Formalin** w ramach laboratorium, pomiędzy laboratoriami oraz pomiędzy partiami. Przy użyciu produktu ***AESKUSLIDES®* ANCA Ethanol** wykonano oznaczenia dla ośmiu próbek surowicy. Dla produktu ***AESKUSLIDES®* ANCA Formalin** przetestowano dziesięć próbek. Zbiór próbek obejmujący próbki ujemne, słabo dodatnie, średnio dodatnie oraz silnie dodatnie, reprezentujące dwa różne wzorce (P-ANCA i C-ANCA) przetworzono ręcznie oraz przy użyciu systemu **HELIOS® Automated IFA System**; oceny dokonało dwóch diagnostów. Do celów oceny w ramach laboratorium i pomiędzy laboratoriami próbki testowano przez pięć dni, z dwoma przebiegami dziennie i trzema replikatami na przebieg, w trzech ośrodkach badawczych. Aby wykazać zmienność pomiędzy partiami, próbki oznaczano przy użyciu produktów ***AESKUSLIDES®* ANCA Ethanol** i **ANCA Formalin** w dziesięciu replikatach z użyciem trzech różnych partii zestawu. Zgodność wyników dodatnich i ujemnych wynosiła ≥ 90 %. We wszystkich testowanych studzienkach dla próbek odnotowano spójne wzorce i intensywności fluorescencji.

[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. ARKUSZ INTERPRETACJI DANYCH

ANCA

Data:	PARTIA:	Utrwalenie etanol: ☐ formalina: ☐
Nr szkiełka:	Operator:	

Nr studzienki	Identyfikator	Współczynnik rozcieńczenia	F.I.	nukleoplazma	cytoplazma	autoprzeciwciała	uwagi
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							

7. STANDARDOWA ZAWARTOŚĆ ZESTAWU

		SZKIEŁKA				KONIUGAT			KONTROLA DODATNIA		
Nr kat. zestawu	**Opis zestawu**	**Nr kat.**	**Studzienki**	**Czym pokryte**	**Ilość**	**Nr kat.**	**Opis**	**Ilość**	**Nr kat.**	**Opis**	**Ilość**
54.100	**ANCA Ethanol** (12 studzienek)	**S54.100**	12	neutrofile ludzkie (utrwalone etanolem)	10	**C54.100**	IgG z niebieskim korkiem: roztwór o lekko niebieskim zabarwieniu. Zawiera: BSA, Tween, przeciwciało przeciwko ludzkiej immunoglobulinie IgG znakowane fluoresceiną (FITC)	1x 4,8 ml	**PC54.100**	Wzorzec ANCA – kontrola C-ANCA Z czerwonym korkiem: bezbarwny roztwór. Zawiera: surowicę ludzką (rozcieńczoną), azydek sodu <0,1% (środek konserwujący)	1x 0,5 ml
									PC54.101	Wzorzec ANCA – kontrola P-ANCA Z czerwonym korkiem: bezbarwny roztwór. Zawiera: surowicę ludzką (rozcieńczoną), azydek sodu <0,1% (środek konserwujący)	
54.101	**ANCA Formalin** (12 studzienek)	**S54.101**	12	neutrofile ludzkie (utrwalone formaliną)	10	**C54.101**	IgG z niebieskim korkiem: roztwór o lekko niebieskim zabarwieniu. Zawiera: BSA, Tween, przeciwciało przeciwko ludzkiej immunoglobulinie IgG znakowane fluoresceiną (FITC)	1x 4,8 ml	**PC54.100**	Wzorzec ANCA – kontrola C-ANCA Z czerwonym korkiem: bezbarwny roztwór. Zawiera: surowicę ludzką (rozcieńczoną), azydek sodu <0,1% (środek konserwujący)	1x 0,5 ml
									PC54.101	Wzorzec ANCA – kontrola P-ANCA Z czerwonym korkiem: bezbarwny roztwór. Zawiera: surowicę ludzką (rozcieńczoną), azydek sodu <0,1% (środek konserwujący)	
54.050	**ANCA Ethanol** (6 studzienek)	**S54.050**	6	neutrofile ludzkie (utrwalone etanolem)	10	**C54.050**	IgG z niebieskim korkiem: roztwór o lekko niebieskim zabarwieniu. Zawiera: BSA, Tween, przeciwciało przeciwko ludzkiej immunoglobulinie IgG znakowane fluoresceiną (FITC)	1x 2,4 ml	**PC54.100**	Wzorzec ANCA – kontrola C-ANCA Z czerwonym korkiem: bezbarwny roztwór. Zawiera: surowicę ludzką (rozcieńczoną), azydek sodu <0,1% (środek konserwujący)	1x 0,5 ml
									PC54.101	Wzorzec ANCA – kontrola P-ANCA Z czerwonym korkiem: bezbarwny roztwór. Zawiera: surowicę ludzką (rozcieńczoną), azydek sodu <0,1% (środek konserwujący)	
54.051	**ANCA Formalin** (6 studzienek)	**S54.051**	6	neutrofile ludzkie (utrwalone formaliną)	10	**C54.051**	IgG z niebieskim korkiem: roztwór o lekko niebieskim zabarwieniu. Zawiera: BSA, Tween, przeciwciało przeciwko ludzkiej immunoglobulinie IgG znakowane fluoresceiną (FITC)	1x 2,4 ml	**PC54.100**	Wzorzec ANCA – kontrola C-ANCA Z czerwonym korkiem: bezbarwny roztwór. Zawiera: surowicę ludzką (rozcieńczoną), azydek sodu <0,1% (środek konserwujący)	1x 0,5 ml
									PC54.101	Wzorzec ANCA – kontrola P-ANCA Z czerwonym korkiem: bezbarwny roztwór. Zawiera: surowicę ludzką (rozcieńczoną), azydek sodu <0,1% (środek konserwujący)	

UWAGA: Zawartość pozostałych składników zestawów, tj. odczynników wspólnych (kontrola ujemna, środek do osadzania preparatu itp.) opisano poniżej w punkcie 8 ZAWARTOŚĆ WSPÓLNYCH ODCZYNNIKÓW.

8. ZAWARTOŚĆ WSPÓLNYCH ODCZYNNIKÓW

a. Wspólne odczynniki

Nr kat.	Odczynnik	Ilość / Objętość		Opis	Gotowy do użycia
NCANCA	Kontrola ujemna	1x	0,5 ml	Z zielonym korkiem: bezbarwny roztwór. Zawiera: surowicę ludzką (rozcieńczoną), azydek sodu <0,1 % (środek konserwujący)	TAK
*** EBIFA**	Błękit Evansa 0,2%	1x	1,5 ml	Z białym korkiem: niebieski roztwór. Zawiera: sól fizjologiczną buforowaną fosforanami, błękit Evansa. Rozcieńczyć błękit Evansa 0,2% w stosunku 1:3000 w 1x WBIFA	NIE
MMIFA	Środek do osadzania preparatu	1x	8 ml	Zatwierdzony do użytku z HELMED®. Z białym korkiem: bezbarwny roztwór. Zawiera: sól fizjologiczną buforowaną fosforanami, glicerynę.	TAK
WBIFA	Bufor do płukania (10x)	1x	100 ml	Z białym korkiem: bezbarwny roztwór. Rozcieńczyć stężony bufor w stosunku 1:10 wodą destylowaną (np. 100 ml + 900 ml). Zawiera: sól fizjologiczną buforowaną fosforanami, azydek sodu (środek konserwujący).	NIE
SBIFA	Bufor próbki (1x)	1x	70 ml	Z białym korkiem: bezbarwny roztwór. do rozcieńczania surowic pacjentów. Zawiera: BSA, PBS, azydek sodu (środek konserwujący).	TAK

Ilości podane są dla zestawu. (*) należy zamówić osobno.

b. Materiały wymagane, ale niedołączone

1. Woda destylowana
2. Probówki do rozcieńczania próbek
3. Kolba pomiarowa
4. Pipeta wolumetryczna
5. Minutnik
6. Mikroskop fluorescencyjny z systemem FITC (filtr wzbudzenia 490 nm, filtr barierowy 510 nm)
7. Tacka inkubatora
8. Naczynie do barwienia
9. Końcówki pipet
10. Szkiełka nakrywkowe (24 x 60 mm)
11. Butelka tryskawka do mycia

Jeśli informacje o produkcie, w tym etykieta, są wadliwe lub nieprawidłowe, należy skontaktować się z producentem lub dostawcą zestawu testowego.

9. PRZECHOWYWANIE I OKRES TRWAŁOŚCI

Wszystkie odczynniki należy przechowywać w temperaturze 2–8 °C/35,6–46,4 °F, chroniąc przed intensywnym działaniem światła. Data ważności każdego składnika jest podana na odpowiedniej etykiecie. Nie należy używać odczynników po upływie terminu ważności.

Przechowywać wszystkie odczynniki i szkiełka w temperaturze 2–8 °C/35,6–46,4 °F w oryginalnych pojemnikach. Po przygotowaniu rekonstytuowane roztwory zachowują stabilność przez co najmniej jeden tydzień w temperaturze 2–8 °C/35,6–46,4 °F. **Odczynniki i szkiełka należy zużyć w terminie ważności wskazanym na każdym elemencie.**

10. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI DOTYCZĄCE STOSOWANIA

c. Dane dotyczące zagrożeń dla zdrowia

PRODUKT JEST PRZEZNACZONY WYŁĄCZNIE DO DIAGNOSTYKI IN VITRO. W związku z tym test przy użyciu tego zestawu może wykonać tylko wykwalifikowany personel specjalnie przeszkolony w zakresie metod diagnostyki in vitro. Chociaż ten produkt nie jest uważany za szczególnie toksyczny ani niebezpieczny w warunkach użytkowania zgodnie z przeznaczeniem, w celu zapewnienia maksymalnego bezpieczeństwa należy zapoznać się z poniższymi informacjami:

Zalecenia i środki ostrożności

Ten zestaw zawiera potencjalnie niebezpieczne elementy. Chociaż odczynniki zestawu nie są sklasyfikowane jako drażniące dla oczu i skóry, zalecamy unikanie kontaktu z oczami i skórą oraz noszenie jednorazowych rękawiczek.

Cały ludzki materiał źródłowy (kontrole itp.) użyty w niektórych odczynnikach tego zestawu został przetestowany zatwierdzonymi metodami i okazał się ujemny pod kątem HbsAg, wirusowego zapalenia wątroby typu C i HIV. Żaden test nie może jednak zagwarantować całkowitej nieobecności czynników wirusowych w takim materiale. W związku z tym należy obchodzić się z kontrolami zestawu i próbkami pacjentów tak, jakby były zakaźne, zgodnie z wymogami krajowymi.

Zestaw zawiera materiał pochodzenia zwierzęcego (BSA, immunoglobuliny), jak określono w spisie zawartości; postępować zgodnie z wymogami krajowymi.

d. Ogólne wskazówki dotyczące użytkowania

1. Nie pipetować ustami. Podczas manipulowania zestawem nie wolno palić tytoniu, jeść ani pić.
2. Nie mieszać ani nie zastępować odczynników o różnych numerach partii. Może to prowadzić do różnic w wynikach.
3. Po użyciu wszystkie kolby powinny zostać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zanieczyszczenia bakteriami.
4. Wszystkie roztwory należy zawsze pipetować przy użyciu nowych, sterylnych końcówek do pipetowania.
5. Nigdy nie wystawiać elementów na działanie temperatur wyższych niż 37 °C/98,6 °F (z wyjątkiem MMIFA).
6. Podczas całej procedury nie wolno dopuścić do wyschnięcia studzienek na szkiełkach.
7. Nigdy nie zamrażać szkiełek.

Każde laboratorium powinno ustalić swoje metody kontroli w oparciu o własne techniki, kontrole, sprzęt i populację pacjentów, zgodnie z własnymi ustalonymi procedurami.

Jednoznaczna diagnoza kliniczna nie powinna opierać się wyłącznie na wynikach wykonanego testu, ale powinna być postawiona przez lekarza po ocenie wszystkich wyników klinicznych i laboratoryjnych.

Jeśli wartości dla kontroli nie spełniają kryteriów, wynik jest nieważny i test należy powtórzyć. Należy sprawdzić następujące kwestie techniczne: daty ważności (przygotowanych) odczynników, warunki przechowywania, pipety, urządzenia, fotometr, warunki inkubacji i metody płukania. Jeśli dla testowanych elementów wykazano nieprawidłowe wartości lub odchylenia lub jeśli kryteria walidacji nie są spełnione z niewyjaśnionych powodów, należy skontaktować się z producentem lub dostawcą zestawu testowego.

11. POBIERANIE PRÓBEK, POSTĘPOWANIE Z NIMI I ICH PRZECHOWYWANIE

Przygotowanie próbek: najlepiej używać świeżo pobranych próbek surowicy. Krew należy pobrać zgodnie z wymogami krajowymi. Próbki krwi pobierać w sposób aseptyczny.

Próbki lipemiczne, żółtaczkowe, zhemolizowane lub skażone mikrobiologicznie mogą powodować zakłócenia.

Surowice zawierające cząstki należy oczyścić przez wirowanie z niską prędkością (<1000 x g). Próbki krwi należy pobierać do czystych, suchych i pustych probówek. Po oddzieleniu próbki surowicy należy zużyć w ciągu pierwszych 8 godzin lub przechowywać szczelnie zamknięte w temperaturze 2–8 °C/35,6–46,4 °F do 2 tygodnie bądź zamrożone w temperaturze -20 °C/-4 °F przez dłuższy czas. Unikać wielokrotnego mrożenia i rozmrażania.

12. PROCEDURA OZNACZENIA

e. Przygotowanie przed pipetowaniem

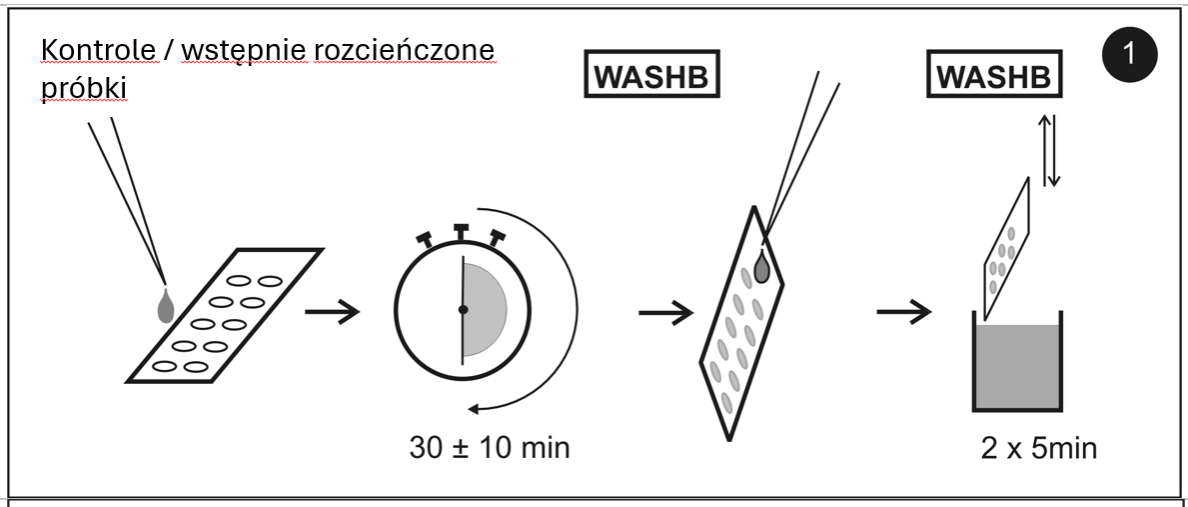
Odczekać przed użyciem, aż wszystkie elementy osiągną temperaturę pokojową (20–26 °C/68–78,8 °F), dobrze wymieszać i postępować zgodnie z zalecanym schematem inkubacji w celu optymalnego przeprowadzenia testu.

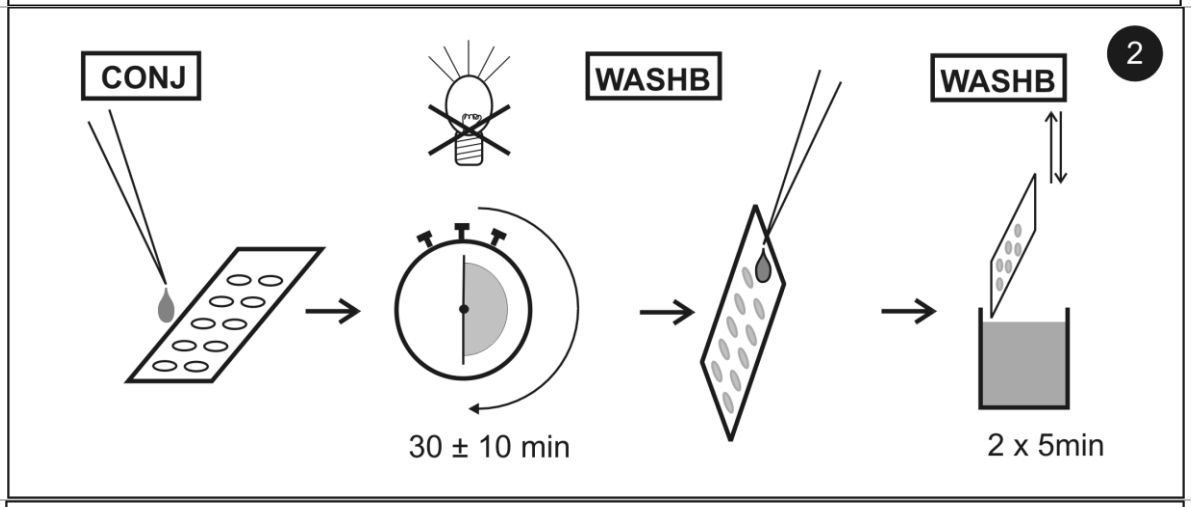
1. Przygotowanie buforu do płukania: rozcieńczyć stężony bufor w stosunku 1:10 wodą destylowaną.
2. Rozcieńczanie próbek: Rozcieńczyć surowicę pacjenta (w celu określenia miana przesiewowego, patrz punkt ***Procedura dla zestawu testowego*** powyżej, zgodnie z numerem katalogowym używanego produktu) za pomocą 1x buforu próbki. Różnią się one między zestawami HEp-2, nDNA, rLKS, EMA itp.
3. Kontrole są gotowe do użycia.
4. Przygotować protokół: szczegółowe informacje na temat czasu inkubacji znajdują się w punkcie ***Procedura dla zestawu testowego*** powyżej, zgodnie z numerem katalogowym używanego produktu.
5. W przypadku zwiększonej lepkości lub nieprzezroczystości przed użyciem środek do osadzania preparatu (MMIFA) podgrzać w kąpieli wodnej przez 15 minut w temperaturze 56 °C/132,8 °F, a następnie pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej (20–26 °C/68–78,8° F). Po tej procedurze podgrzany odczynnik może być używany przez maksymalnie 21 kolejnych dni, pod warunkiem, że jest przechowywany w temperaturze 2–8 °C/35,6–46,4 °F, jak określono na etykiecie odczynnika i w instrukcji użycia.

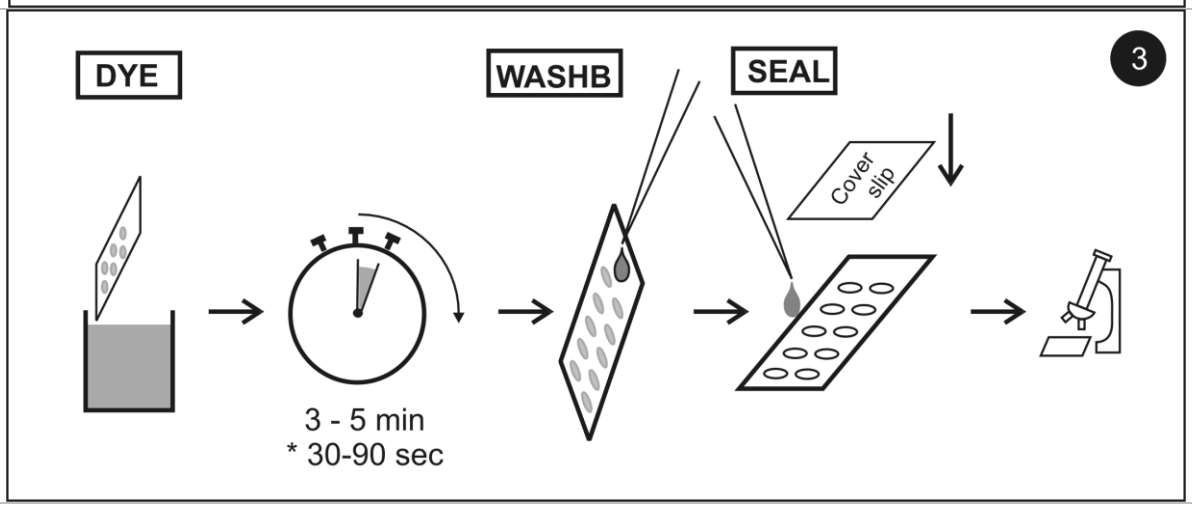
f. Procedura testu

Nr	Opis kroku
1.	Wyjąć niezbędne szkiełka z torebek i oznaczyć je. Nie dotykać studzienek. Nie dopuścić do wyschnięcia szkiełek.
2.	**Przygotowanie tacki inkubatora**: Umieścić niewielką ilość wody dejonizowanej lub destylowanej na tacce inkubatora i umieścić szkiełka na wspornikach na tacce inkubatora. Inkubować szkiełka przez 30 minut ± 10 minut w temperaturze pokojowej na wilgotnej tacce inkubatora. Stosować spójne czasy inkubacji dla koniugatu. **Pierwsza inkubacja**: Odmierzyć pipetą odpowiednią objętość każdej rozcieńczonej surowicy i kontroli (gotowych do użycia) do odpowiednich studzienek; unikać bezpośredniego kontaktu pipety z powierzchnią szkiełka. Upewnić się, że każda studzienka jest całkowicie pokryta odpowiednią surowicą. Istotne jest, aby użyć tyle materiału testowego, ile potrzeba do całkowitego pokrycia studzienki. Należy jednak unikać rozlewania się materiału na sąsiednie studzienki, ponieważ może to prowadzić do nieprawidłowych wyników.
3.	**Płukanie**: Po inkubacji wyjąć szkiełka z tacki inkubatora i krótko przepłukać buforem do płukania za pomocą butelki tryskawki do płukania. Nie rozpylać buforu bezpośrednio na studzienki. UWAGA: Aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu, przechylić szkiełko najpierw w kierunku jednego rzędu i ostrożnie przeprowadzić strumień buforu do płukania wzdłuż linii środkowej szkiełka, tak aby bufor spłynął z dolnej krawędzi szkiełka. Następnie przechylić szkiełko w kierunku drugiego rzędu i powtórzyć tę procedurę, tak aby bufor do płukania spłynął z dolnej krawędzi szkiełka. Płukać szkiełka przez 10 minut buforem do płukania w naczyniu do barwienia szkiełek. Unikać bezpośredniego kontaktu elementów stałych z substratem. Aby uzyskać optymalne wyniki, zmienić roztwór buforu raz po 5 minutach. Wyjąć szkiełka z naczynia do barwienia i ostrożnie usunąć nadmiar buforu do płukania. UWAGA: Istotne jest, aby studzienki na szkiełka nie wyschły podczas procedury, ponieważ może to spowodować uszkodzenie substratu. Nie należy osuszać szkiełka w żaden sposób ani pozostawiać go bez odczynnika przeciwciała fluorescencyjnego na dłużej niż kilka sekund.
4.	**Druga inkubacja**: Po zakończeniu procedury płukania natychmiast umieścić szkiełko z powrotem na tacce inkubatora, pokryć każdą studzienkę odpowiednią objętością koniugatu FITC i upewnić się, że studzienki są całkowicie pokryte. Inkubować szkiełka przez 30 minut ± 10 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
5.	**Płukanie**: Po inkubacji wyjąć szkiełka z tacki inkubatora i krótko przepłukać buforem do płukania za pomocą butelki tryskawki do płukania. Nie rozpylać buforu bezpośrednio na studzienki. Płukać szkiełka przez 10 minut buforem do płukania w naczyniu do barwienia szkiełek. Aby uzyskać optymalne wyniki, zmienić roztwór buforu raz po 5 minutach.
6.	***Opcjonalne barwienie kontrastowe**: Rozcieńczyć barwnik kontrastowy (błękit Evansa) w stosunku 1:3000 buforem do płukania i dobrze wymieszać. Przechylić naczynie z barwnikiem kontrastowym nad naczyniem do barwienia i inkubować w nim szkiełka. Szczegółowe informacje na temat czasu inkubacji znajdują się w punkcie ***Procedura dla zestawu testowego*** powyżej, zgodnie z numerem katalogowym używanego produktu. Błękit Evansa obejmuje niespecyficzną fluorescencję tła. Po inkubacji wyjąć szkiełka i krótko przepłukać buforem do płukania. Usunąć nadmiar buforu do płukania. Nie osuszać szkiełka w żaden sposób.
7.	**Środek do osadzania preparatu**: Dodać odpowiednią objętość środka do osadzania preparatu wzdłuż linii środkowej każdego szkiełka. Ostrożnie umieścić szkiełko nakrywkowe na miejscu, unikając pozostawiania pęcherzyków powietrza.
8.	**Odczyt**: Natychmiast obejrzeć szkiełka pod mikroskopem fluorescencyjnym przy całkowitym powiększeniu 400–800 x. (filtr wzbudzenia 490 nm, filtr barierowy 510 nm).

g. Przebieg czynności







13. ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

BŁĄD	MOŻLIWE PRZYCZYNY	ROZWIĄZANIE
Niska gęstość komórek	• Liza komórek po dłuższym kontakcie z wodą dejonizowaną. • Bufor rozpylany bezpośrednio na substrat w studzience.	Postępować zgodnie z zalecaną procedurą płukania.
	Enzymy proteolityczne zaatakowały substrat.	Dezaktywować surowicę.
Nierównomierna fluorescencja	Surowica wyschła w studzience, fluorescencja silniejsza na krawędzi.	Zawsze inkubować w wilgotnym środowisku.
	Surowica nie pokrywa dobrze studzienki testowej.	Nałożyć odpowiednią ilość materiału testowego.
	Reakcja krzyżowa między studzienkami.	Unikać przelewania materiału między studzienkami przy pierwszej inkubacji.
	Zaznaczenie szkiełka kredką woskową tworzy na nim błonę.	Użyć zwykłego ołówka (nie woskowej kredki).
	Nieprawidłowo wyregulowany mikroskop.	Sprawdzić ustawienia lampy UV.
Obraz rozproszony	Szkiełko inkubowane w chłodziarce bez szkiełka nakrywkowego.	Uszczelnić szkiełko lakierem do paznokci lub woskiem parafinowym.
	Immunofluorescencja. Mikroskop jest brudny. Możliwe zadrapania na obiektywie.	Wyczyścić mikroskop zgodnie z instrukcją.
Niska fluorescencja lub jej brak	Koniugat i szkiełka rozmrożone i zamrożone ponownie.	Koniugat i szkiełka przechowywane w temperaturze 2–8 °C/35,6–46,4 °F.
	Kontrole rozcieńczone.	Sprawdzić instrukcje, użyć gotowego do użycia zestawu kontroli.
	• Skażenie bakteriami surowic lub koniugatu. • Mikroskop nie został wyregulowany. • Zbyt niska wartość pH buforu do płukania (wartość pH 7,4 ± 0,2).	Sprawdzić warunki.
	Koniugat FITC wystawiony na działanie światła	Przechowywać koniugat, chroniąc przed światłem
Fluorescencja tła	• Nieprawidłowo wypłukane. • Szkiełko wyschło. • Surowice lipemiczne, hemolityczne. • Błąd mikroskopu.	• Sprawdzić instrukcje płukania. • Nie dopuścić do wyschnięcia szkiełka. • Stosować wyłącznie świeżą surowicę. • Sprawdzić, czy filtr/obiektyw jest prawidłowy.

14. SYMBOLE REGULACYJNE

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	- For in vitro diagnostic use
REF	- Numero d'ordine	- Cataloge number
	- Référence Catalogue	- Numéro de catálogo
	- Katalognummer	- Αριθμός παραγγελίας
	- Número de catálogo	- Cataloge number
LOT	- Descrizione lotto	- Lot
	- Lot	- Lote
	- Chargen Bezeichnung	- Χαρακτηρισμός παρτίδας
	- Lote	- Lot
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	- Unique device identifier
CE	- Conformità europea	- EC Declaration of Conformity
	- Déclaration CE de Conformité	- Declaración CE de Conformidad
	- Europäische Konformität	- Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- Declaração CE de conformidade	- EC Declaration of Conformity
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	- See electronical instructions for use
	- Da utilizzarsi entro	- Use by
	- Utilise avant le	- Utilizar antes de
	- Verwendbar bis	- Χρήση μέχρι
	- Utilizar antes de	- Use by
+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)	- Store at 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Prodotto da	- Manufactured by
	- Fabriqué par	- Fabricado por
	- Hergestellt von	- Κατασκευάζεται από
	- Fabricado por	- Manufactured by
DYE	- Colorante Blue-Evans	- Evans-Blue Dye
	- coloration au Bleu Evans	- Colorante Azul de Evans
	- Evans-Blue Färbelösung	- Evans Blue
	- Evans Blue	- Evans-Blue Dye
CONTROL +	- Controllo positivo	- Positive Control
	- Contrôle Positif	- Control Positivo
	- Positiv Kontrolle	- Θετικός ορός ελέγχου
	- Controlo positivo	- Positive Control
CONTROL −	- Controllo negativo	- Negative Control
	- Contrôle Négatif	- Control Negativo
	- Negativ Kontrolle	- Αρνητικός ορός ελέγχου
	- Controlo negativo	- Negative Control
SEAL	- Mezzi di montaggio	- Mounting media
	- milieu de montage	- Medio de montaje
	- Mounting Medium	- Μέσο μονιμοποίησης
	- Meio de montagem	- Mounting media
CONJ	- Coniugato	- Conjugate
	- Conjugé	- Conjugado
	- Konjugat	- Σύζευγμα
	- Conjugado	- Conjugate
	- Vetrino per microscopio	- Microscope slide
	- lame de microscope	- Portaobjetos
	- Objektträger	- Αντικειμενοφόρο πλακίδιο
	- Lâmina	- Microscope slide
WASHB 10x	- Tampone di lavaggio	- Wash Buffer
	- Tampon de Lavage	- Solución de lavado
	- Waschpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	- Solucão de lavagem	- Wash Buffer
SB 1x	- Tampone di campione	- Sample Buffer
	- Tampon de Echantillons	- Solución de muestras
	- Probenpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	- Solução para amostras	- Sample Buffer

	- Numero di determinazioni	- Number of determinations
	- Nombre de déterminations	- Número de determinaciones
	- Anzahl der Prüfungen	- Αριθμός προσδιορισμών
	- Número de determinações	– Liczba oznaczeń
	- Non riutilizzare	- Do not reuse
	- Ne pas réutiliser	- No reutilizar
	- Nicht wiederverwenden	- Μην επαναχρησιμοποιείτε
	- Não reutilizar	– Nie używać ponownie
	- 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	– Chronić przed światłem
	- Conservare all'asciutto	- Store dry
	- Stocker au sec	- Almacenar en seco
	- Trocken aufbewahren	- Αποθηκεύστε ξηρά
	- Armazenar em local seco	– Przechowywać w suchym miejscu
	- 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	– Nie używać, jeśli opakowanie jest uszkodzone i zapoznać się z instrukcją obsługi