

## VYŠETŘENÍ ANTI-NUKLEÁRNÍCH PROTILÁTEK (ANA)

Metoda: Nepřímá imunofluorescence

Princip testu:

Testovací souprava je určena pro in-vitro diagnostiku lidských protilátek v séru nebo plazmě. Tkáňový substrát (zde HEp-2 buňky) fixovaný na reakčním skle se inkubuje s naředěnými patientskými vzorky. Při pozitivní reakci se specifické protilátky třídy IgG, IgA, a IgM ze séra pacienta naváží na antigeny přítomné v tkáňovém substrátu. Ve druhém kroku jsou navázané protilátky obarveny pomocí detekčních anti-lidských protilátek značených fluoresceinem (Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/FITC). V mezikrocích je třeba vymýt nenavázané složky. Výsledky testu se odečtou fluorescenčním mikroskopem. Pozitivní séra lze titrovat. Titr séra je definován jako převrácená hodnota nejvyššího ředění dávající pozitivní výsledek.

Pomůcky a reagenty: Reakční sklíčko, séra pac. 1 a 2, poz. a neg. kontrola, konjugát, krycí sklíčko, obohacený PBS: 1 ml TWEEN + 0,5 l PBS, ...

Pracovní postup:

1. Naředte vyš. séra: (Před ředěním sérum důkladně promíchejte na vortexu)

- sérum pac. č. 1) 1 : 81 (= .... ul séra + .... ul PBS-TW)  
a dále ředte geometrickou řadou ze základního ředění 1 : 81 na: 1 : 160, 1 : 320, 1 : 640, 1 : 1280 tak, že smícháte ....ul naředěného séra a .... ul PBS-TW.
- sérum pac. č.2) 1 : 81 a dále ředte na: 1 : 160 a 1 : 320.

Jako pozitivní a negativní kontrolu použijte ověřené sérum pacienta, naředte základním ředěním 1 : 81

2. Po promíchání aplikujte naředěné kontroly a vyš. séra á 25 ul na místa na šabloně takto:

pozice	1 :	pozitivní kontrola	řed.	1 : 81
	2 :	negativní kontrola	řed.	1 : 81
	3 :	vyš. sérum pac. 1)	zákl. řed.	1 : 81
	4 :	1)	řed.	1 : 160
	5 :	1)	řed.	1 : 320
	6 :	1)	řed.	1 : 640
	7 :	1)	řed.	1 : 1280
	8 :	vyš. sérum pac. 2)	zákl. řed.	1 : 81
	9 :	2)	řed.	1 : 160
	10:	2)	řed.	1 : 320

3. Překryjte šablonu sklíčkem - reakčními místy dolů, inkubujte 30 min. při laboratorní tepl.
4. Opláchněte sklíčko opatrně proudem PBS-TW, nechte prát v PBS-TW 5 min.  
(Umyjte šablonu: opláchněte vodou, vydesinfikujte Desprejem, nechte chvíli působit, znovu opláchněte vodou a potom destilovanou vodou a osušte.)
5. Naředte konjugát: 250 ul PBS-TW + 5 ul koncentrátu
6. Aplikujte 20 ul naředěného konjugátu na očíslovaná místa na šablonu v polystyrenovém nosiči, reakční sklíčko vyndejte z promývací lázně, opatrně osušte zadní stranu skla a překryjte jím šablonu s nakapaným konjugátem. Inkubujte 30 min. při laboratorní teplotě.
7. Opláchněte sklíčko opatrně proudem PBS-TW, nechte prát v novém PBS-TW 5 min.
8. Umístěte krycí sklíčko do polystyrenového nosiče, nakapte kapku glycerinu na očíslovaná místa. Vyjměte reakční sklíčko z promývací lázně, opřete spodní hranou o buničitou vatou a opatrně otřete zadní stranu skla. Takto otřené sklo přitiskněte reakčními místy na glycerinové kapky. Krycí sklíčko vycentrujte.

Závěr: (popište co jste provedli za vyšetření a jakou metodou)