

BlueDot

ENA⁶ IgG

Číslo objednávky: ENAD-24

1. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

BlueDot ENA⁶ IgG je souprava immunodot určená k detekci autoprotilátek IgG proti následujícím antigenům: Sm, Sm/RNP, SSA/Ro 60kD, SSB, Jo-1 a Scl-70, pouze v lidském séru.

Tato souprava je určena k potvrzení výsledků antinukleárních vzorců pozorovaných imunofluorescencí, screeningovou a referenční metodou v oblasti autoimunity. Souprava je určena k použití jako pomůcka při diagnostice různých autoimunitních onemocnění (podrobnosti najdete v části 11.5 *Diagnostické hodnoty autoprotilátek*).

Test je určen k potvrzení pozitivní populace IFA a negativní populace IFA se silným podezřením na autoimunitní onemocnění.

Tato souprava je vyhrazena pro profesionální použití v klinických analytických laboratořích. Důrazně doporučujeme předchozí zaškolení (obraťte se na distributora).

Lze ji používat manuálně na třepačce nebo v otevřeném automatizovaném systému immunodot naprogramovaném podle pipetovacího schématu popisovaného v bodě 9.2.

Detekce různých autoprotilátek IgG může být buď kvalitativní (viz bod 10.1), nebo semikvantitativní (viz bod 10.2).

2. PRINCIP TESTU

Tato souprava a všechny její součásti jsou určeny výhradně k manuálnímu použití.

Test je založen na principu enzymové imunoanalýzy. Proužky sestávají z membrány připevněné k plastovému nosiči. Během analýzy jsou proužky inkubovány s ředěným sérem pacienta. Pokud jsou ve vzorku přítomny autoprotilátky pacienta, vážou se na specifický antigen na membráně. Nevázané nebo přebytečné protilátky se v dalším kroku odstraní promytím. Poté se s proužky inkubují lidské imunoglobuliny anti-IgG konjugované s alkalickou fosfatázou a vážou se na komplexy antigen-protilátka na povrchu membrány. Po druhém promytí, kterým se odstraní přebytečný konjugát, se přidá roztok chromogenu/substrátu, což má za následek vznik nerozpustného barevného produktu (fialového), který se vysráží v místě enzymatické reakce. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství protilátek přítomných ve vzorku.

Souprava obsahuje 24 jednorázových testů.

3. OBSAH SOUPRAVY

Před jakýmkoli použitím soupravy zkontrolujte, že souprava obsahuje všechny uvedené položky. Prosím zkontrolujte také, že charakteristiky produktu odpovídají těm uvedeným níže. Pokud jedna z položek chybí nebo je poškozena, soupravu nepoužívejte a kontaktujte svého distributora.

3.1. SOUČÁSTI

URČENO K ŘEDĚNÍ:	(10×) promývací roztok	1× 40 ml – 10× koncentrovaný (bezbarvý) Obsah: H ₂ O • TBS • NaCl • Tween • Konzervační látky	
PŘIPRAVENO K POUŽITÍ:	Tečkové proužky	24 jednotek (každý proužek je určen k jednorázovému použití) 8 teček na každém: 1 negativní kontrola (CO) 6 antigenů 1 pozitivní kontrola (RC)	
	Ředidlo na vzorky	1× 40 ml (žluté) Obsah: H ₂ O • TBS • NaCl • Tween • BSA • Konzervační látky • Barvivo	
	Konjugát	1× 40 ml (červený) Obsah: H ₂ O • TBS • NaCl • KCl • MgCl ₂ • Kozí protilátka proti lidskému IgG konjugovaná s AP • Konzervační látky • Barvivo	
	Substrát	1× 40 ml (hnědá lahvička, bledě žlutý roztok) Obsah: H ₂ O • Konzervační látky • MgCl ₂ • TBS • NBT • BCIP • Stabilizátor NBT	
	Inkubační nosiče	3 jednotky s 8 jamkami pro inkubaci	

Zkratky v abecedním pořadí:

AP = alkalická fosfatáza; BCIP = bromochlorindolyfosfát; BSA = bovinní sérový albumin; KCl = chlorid draselný; MgCl₂ = chlorid hořečnatý; NaCl = chlorid sodný; NBT = tetrazoliová nitromodř; TBS = fyziologický roztok s tris pufrem

Další informace o složení a koncentraci použitých účinných látek naleznete v bezpečnostním listu (MSDS) dostupném na požádání nebo na internetových stránkách www.d-tek.be.

Symbole uváděné na balení soupravy

	Přečtěte si návod k použití		Označení CE + oznámený subjekt
	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro		Na 24 použití
	Uchovávejte při teplotě 2–8 °C		Literatura
	Číslo šarže		Chraňte před přímým slunečním zářením
	Datum použitelnosti		Výrobce
	Kazeta		Upozornění
	Proužek		

3.2. Použité antigeny

Sm	Jádrové proteiny částic snRNP. Obsahuje zejména D protein. Detekovatelné jsou podjednotky E, F, G. Proteiny BB' nejsou detekovatelné (purifikace z bovinního thymu).
Sm/RNP	částice snRNP. Obsahuje v podstatě 68kD, A, BB', C a D proteiny. Lze detekovat významné množství snRNA (purifikace z bovinního thymu).
SSA/Ro 60kD	Protein Ro 60 kD (rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem)
SSB	Protein La 50 kD (rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem)
Jo-1	Histidyl-tRNA syntetáza (rekombinantní, lidská, exprimovaná v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem)
Scl-70	DNA topoizomeráza I (rekombinantní, lidská, exprimovaná v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem)

3.3 Reaktivní složky

Látka	Původ	Zamýšlený účel screeningových souprav ANA	Koncentrace ve screeningových soupravách ANA	Čistota
Kozí protilátka proti lidské IgG-alkalické fosfatáze	Zvířecí (kozí)	Sekundární protilátka (detekční protilátka) v konjugačním pufru	< 0,1 µg/ml v konjugačním pufru	Neznámá. Protilátky proti neimunoglobulinovým složkám séra nejsou detekovatelné.
Sm	purifikováno z bovinního thymu	Biomarker (antigen) potažený na prouzcích	0,04 mg/ml Jedna skvrna Sm = 0,5 µl na každém proužku	> 80 %
Sm/RNP	purifikováno z bovinního thymu	Biomarker (antigen) potažený na prouzcích	0,067 mg/ml Jedna skvrna Sm/RNP = 0,5 µl na každém proužku	> 80 %
SSA/Ro 60kD	rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem	Biomarker (antigen) potažený na prouzcích	0,01 mg/ml Jedna skvrna SSA/Ro 60kD = 0,5 µl na každém proužku	> 80 %
SSB	rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem	Biomarker (antigen) potažený na prouzcích	0,01 mg/ml Jedna skvrna SSB = 0,5 µl na každém proužku	> 80 %
Jo-1	rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem	Biomarker (antigen) potažený na prouzcích	0,02 mg/ml Jedna skvrna Jo-1 = 0,5 µl na každém proužku	> 80 %
Scl-70	rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem	Biomarker (antigen) potažený na prouzcích	0,02 mg/ml Jedna skvrna Scl-70 = 0,5 µl na každém proužku	> 80 %
Protein L	Bakteriální (z Peptostreptococcus magnus)	Reaktivní (pozitivní) kontrola	0,01 mg/ml Jedna skvrna RC = 0,5 µl na každém proužku	> 95 %

Streptavidin-alkalická fosfatáza	Bakteriální (ze Streptomyces avidinii)	Kontrola cut-off (negativní)	< 0,1 µg/ml Jedna skvrna CO = 0,5 µl na každém proužku	Neznámá.
NBT-BCIP	Syntetický (chemická látka)	Substrát pro alkalickou fosfatázu	0,2 mg/ml	≥ 98 %

4. POTŘEBNÝ, ALE NEDODÁVANÝ MATERIÁL

Třepačka / mikropipety / časovač / odměrný válec / destilovaná nebo deionizovaná voda / pinzeta / absorpční a/nebo filtrační papír.

5. UCHOVÁVÁNÍ

Rekonstituovaný promývací roztok je stabilní po dobu minimálně jednoho měsíce při teplotě 2–8 °C. Činidla a proužky lze uchovat při teplotě 2–8 °C až do data expirace uvedeného na každé lahvičce nebo zkumavce.

Vložte nepoužité proužky zpět do dodávané zkumavky, uzavřete ji a uložte při teplotě 2–8 °C. Chromogen/substrát (NBT/BCIP) je třeba uložit při teplotě 2–8 °C.

Při správném uchovávání jsou všechny komponenty testové soupravy stabilní až do uvedeného data expirace.

6. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Všechna činidla jsou určena výhradně k diagnostickému použití in vitro a profesionálnímu použití. S testovou soupravou smí pracovat výhradně vyškolený technický personál.
- Činidla v soupravě nejsou považována za nebezpečná, protože koncentrace obsažených potenciálně nebezpečných chemických látek jsou nižší než prahové hodnoty stanovené nařízeními Evropské unie:

Název	CAS	EINECS	Koncentrace na proužku	Klasifikace podle nařízení ES 1272/2008 Význam H věty
Nitrát celulózy	9004-70-0	-	<5 %	Hořl. roztok 1 H228

Příloha VI k nařízení (ES) č. 1272/2008: Index č.: 603-037-00-6; nařízení Komise (EU) 2015/830; 3.2.1

Název	CAS	EINECS	Koncentrace ve směsi	Klasifikace (v koncentrované formě) podle nařízení ES 1272/2008 Význam H věty
MIT:	55965-84-9	-	<0,0015 %	Akut. tox. 2 H330 Akut. tox. 2 H310 Akut. tox. 3 H301 Žírav. pro kůži 1 C H314; C ≥ 0,6 % Pošk. očí 1 H318; C ≥ 0,6 % Senzib. kůže 1 A H317; C ≥ 0,0015 % Vysoce toxický pro vod. org. 1 H400 Vysoce toxický pro vod. org., s dlouh. úč. 1 H410

Příloha nařízení Komise (EU) 2018/1480; Index č.: 613-167-00-5; nařízení Komise (EU) 2015/830; 3.2.1

Název	CAS	EINECS	Koncentrace ve směsi	Klasifikace (v koncentrované formě) podle nařízení ES 1272/2008 Význam H věty
NaN ₃	26628-22-8	247-852-1	< 0,1 %	Akut. tox. 2 H300 Akut. tox. 1 H310 STOT RE 2 H373 Vysoce tox. pro vod. org. 1 H400 Vysoce tox. pro vod. org., s dlouh. účinky. 1 H410

Příloha VI k nařízení (ES) č. 1272/2008: Index č.: 011-004-00-7; nařízení Komise (EU) 2015/830; 3.2.1

Název	CAS	EINECS	Koncentrace ve směsi	Klasifikace (v koncentrované formě) podle nařízení ES 1272/2008 Význam H věty
NBT	298-83-9	206-067-4	<0,01 %	Akut. tox. 4 H302

Tyto chemické látky jsou však v koncentrované formě toxické. Z toho důvodu je nutné předcházet kontaktu s kůží, očima nebo sliznicemi použitím vhodných osobních ochranných prostředků (rukavice, laboratorní plášť, ochranné brýle). Podobně jako u všech chemických látek spojených se specifickými riziky smí s produktem/součástmi manipulovat pouze kvalifikovaný personál za dodržení potřebných bezpečnostních opatření.

3. Se vzorky pacientů je nutné manipulovat jako s materiálem, který by mohl přenášet infekční onemocnění. Vyžadují tedy vhodné ochranné prostředky (rukavice, laboratorní plášť, ochranné brýle). GLP je nutné aplikovat v souladu se všemi platnými obecnými nebo individuálními bezpečnostními předpisy.
4. Likvidace odpadu: Se vzorky pacientů, inkubovanými testovými proužky a použitými lahvičkami s činidly je nutné manipulovat jako s infekčním odpadem. Krabice a další nádoby nevyžadují samostatný sběr, pokud není uvedeno v oficiálních předpisech jinak.
5. Zdravotnický prostředek obsahuje látky zvířecího, lidského a bakteriálního původu (viz bod 3.3) ve velmi nízké koncentraci. Všechny tyto látky byly vybrány tak, aby neobsahovaly žádné mikrobiální nebo přenosné látky, a v koncentraci použité ve zdravotnickém prostředku nejsou toxické. Přesto je nutné dodržovat na pracovišti uživatele správné laboratorní postupy (brýle, rukavice).

7. DOPORUČENÍ

1. Společnost D-tek a autorizovaní distributoři odmítají zodpovědnost za škody způsobené nepřímo nebo v důsledku následujících skutečností: změny nebo úpravy uvedeného postupu, nesprávné použití soupravy a/nebo použití nekompletní či poškozené soupravy. Tuto soupravu smí používat výhradně kvalifikovaný technický personál.
2. Zodpovědnost společnosti D-tek je omezena ve všech případech na výměnu soupravy.
3. V případě závažného incidentu (poranění, újma na zdraví nebo úmrtí) ve spojitosti s tímto prostředkem IVD je nutné záležitost ihned nahlásit výrobci (viz adresa níže) a kompetentnímu úřadu ve vaší zemi.

8. ODBĚR VZORKŮ, MANIPULACE S NIMI A JEJICH UCHOVÁVÁNÍ

Séra obsahující částčky je nutné centrifugovat nízkou rychlostí. Vzorky krve odebírejte do suchých zkumavek. Nepoužívejte poolované směsi různých sér, jelikož to může zapříčinit nekonzistenci ve výsledcích (viz bod 10.4). Po oddělení je třeba vzorky séra použít ihned nebo je rozdělit na alikvotní díly a uchovávat při teplotě v rozmezí 2–8 °C (po dobu maximálně 14 dnů) či zmrazené při teplotě -20 °C (po delší dobu, maximálně 13 měsíců). Cykly zmrazování/rozmrazování vzorků se mohou opakovat maximálně 10krát.

9. POSTUP ANALÝZY

ZÁKLADNÍ INFORMACE, MANIPULACE A TIPY:

Tečky jsou na proužcích předem zbarvené modrou barvou, aby byly všechny antigeny správně navázány v tečkách na membránu. Toto modré zbarvení zmizí během prvního kroku inkubace. Během inkubace s promývacím roztokem se na membráně vyskytnou bledě růžové zbarvení pozadí, které zmizí při sušení na konci postupu.

Během postupu je nutné protřepat inkubační nosič, aby se zajistil efektivní oběh tekutin po membráně. Doporučujeme použít třepačku. Upravte pohyb třepačky tak, aby nedocházelo k přelévání roztoků nebo křížové kontaminaci mezi jamkami.

Po každém plnění jamek roztokem je třeba inkubační nosič manuálně míchat, dokud nebudou proužky zcela ponořeny, s cílem odstranit vzduchové bubliny, které se mohou zachytit pod proužkem. Případně můžete plovoucí proužky zatlačit dolů do roztoku (pinzetou nebo špičkou pipety), použijte k tomu horní část proužku (plastová část se štítkem).

Nedotýkejte se membránové části proužku prsty, pinzetami ani špičkami pipety. K manipulaci vždy používejte plastovou část se štítkem. Celý postup je nutné zpracovat **při pokojové teplotě (18–25 °C)**.

Popis KONTROL:

Positivní kontrola nebo RC (reakční kontrola) zahrnuje protein (protein L) fixující všechny imunoglobuliny přítomné v testovaném vzorku. Pokud byl test proveden správně, tato kontrola bude na konci testu zbarvená (intenzita závisí na efektivní koncentraci imunoglobulinů ve vzorku).

Absence jakéhokoli zbarvení této tečky na konci testu může znamenat, že vzorek nebyl na proužek napipetován (viz část 10.4 *Řešení potíží*).

Negativní kontrola nebo CO (kontrola Cut-Off) obsahuje protein (streptavidin – alkalická fosfatáza) reagující s enzymatickým substrátem a určitými složkami testovaného vzorku. Pokud byl test proveden správně, tato kontrola bude na konci testu zbarvená. Signál závisí na kinetice substrátu a charakteristikách vzorku. Intenzita této kontroly slouží jako prahová hodnota pro konečnou interpretaci výsledků (viz část 10 *INTERPRETACE VÝSLEDKŮ*).

9.1. Příprava činidel

1. Před použitím ponechte všechny součásti zahřát na pokojovou teplotu (**18–25 °C**).
2. **Nařed'te** koncentrovaný **promývací roztok 10x destilovanou vodou**.
Připravte 15 ml naředěného promývacího roztoku na každý testovaný proužek.
Příklad: 1,5 ml koncentrovaného promývacího roztoku + 13,5 ml destilované vody na jeden proužek
Nenahrazujte činidla ani nemíchejte proužky různých čísel šarží, může to vést k variabilitě výsledků.

9.2. Diagram pro pipetování

1. **Vložte** do jamek jeden **proužek** na pacienta modrými tečkami **otočenými nahoru**.
2. Přidejte **2 ml naředěného promývacího roztoku** na jamku. **Inkubujte** (protřepávejte) **po dobu 10 minut**.
Po správné inkubaci zcela zmizí modré zbarvení teček.
Pokud nezmizí, počkejte s postupem, dokud tečky zcela nevyblednou.
3. **Zlikvidujte** roztok z jamek.
Vylijte tekutinu pomalým převrácením destičky. Proužky se přilepí na dno jamek. Vysušte okraj nosiče absorpčním papírem.
4. Přidejte **1,5 ml ředidla na vzorky** na jamku.
5. Přidejte **10 µl vzorku pacienta** na jamku. **Inkubujte** (protřepávejte) **po dobu 30 minut**.
Nedotýkejte se membrány špičkou pipety. Ideálně aplikujte vzorek do roztoku po horní části proužku (plastová část se štítkem).
Poznámka: Kroky 4 a 5 lze kombinovat předředěním vzorku ve skleněné nebo plastové zkumavce (1,5 ml ředidla na vzorky + 10 µl vzorku pacienta). Promíchejte (přidejte do jamky)

6. **Zlikvidujte** roztok z jamek.
Vylijte tekutinu pomalým převrácením destičky. Proužky se přilepí na dno jamek. Vysušte okraj nosiče absorpčním papírem.
7. **Promývejte 3 x 3 minuty 1,5 ml naředěného promývacího roztoku** na jamku (protřepejte).
Po každém promývacím kroku vylijte tekutinu z jamek pomalým převrácením destičky. Proužky se přilepí na dno jamek. Vysušte okraje nosiče absorpčním papírem.
8. Přidejte **1,5 ml konjugátu** na jamku. **Inkubujte** (protřepávejte) **po dobu 30 minut**.
9. **Zlikvidujte** roztok z jamek.
Vylijte tekutinu pomalým převrácením destičky. Proužky se přilepí na dno jamek. Vysušte okraj nosiče absorpčním papírem.
10. **Promývejte 3 x 3 minuty 1,5 ml naředěného promývacího roztoku** (protřepejte)
Po každém promývacím kroku vylijte tekutinu z jamek pomalým převrácením destičky. Proužky se přilepí na dno jamek. Vysušte okraje nosiče absorpčním papírem.
11. Přidejte **1,5 ml substrátu** na jamku. **Inkubujte** (protřepávejte) **po dobu 10 minut**.
12. **Zlikvidujte** roztok z jamek.
Vylijte tekutinu pomalým převrácením destičky. Proužky se přilepí na dno jamek. Vysušte okraj nosiče absorpčním papírem.
13. **Promývejte 1 x 3 minuty 1,5 ml naředěného promývacího roztoku** na jamku a zastavte tak reakci.
14. **Vytáhněte** proužky z jamek a ponechte je 30 minut schnout na absorpčním papíru. Interpretaci je nutné provést do 24 hodin od zpracování testu.

10. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Je možné provést vizuální (kvalitativní) interpretaci výsledků soupravy. Obecně se ale doporučuje použít skener BlueScan Scanner a software Dr Dot s cílem dosáhnout vyšší přesnosti a semikvantitativní interpretace.

DŮLEŽITÉ OZNÁMENÍ: Všechny parametry této testové soupravy NEMOHOU být pozitivní. V takovém případě test nebude platný. Ke stanovení diagnózy je nutné provést další test!

10.1. Kvalitativní interpretace

1. Sloupněte kryt adheziva na zadní straně každého proužku a připojte proužky s tečkami horní stranou nahoru do označených polí interpretačního listu dodávaného se soupravou. Toto bude označovat příslušné pozice různých kontrol a antigenů na membráně.
2. První horní tečka (**tečka pozitivní kontroly**) musí být pozitivní pro všechny pacienty. Pouze jasně zbarvená tečka pozitivní kontroly zajišťuje, že jsou vaše výsledky platné a postup byl správný a/nebo součásti soupravy nebyly znehodnoceny. Pokud není první horní tečka zbarvená, test selhal a je zakázáno jej dále interpretovat.
3. Srovnajte specifické **antigenní** tečky s **tečkou negativní kontroly** (vždy se jedná o poslední spodní tečku). Intenzita barvy antigenních teček je přímo úměrná titru specifické protilátky ve vzorku pacienta.
Intenzita barvy tečky negativní kontroly bude kolísat dle charakteristik vzorku. Pokud vzorek neobsahuje interferující látky, tečka negativní kontroly může být téměř bezbarvá. Naopak vysoce zbarvená tečka negativní kontroly informuje o vysoké míře nespecifického vázání ve vzorku.

POZITIVNÍ VÝSLEDEK:

Vzorek je považován za pozitivní na specifickou protilátku, pokud je intenzita barvy příslušné antigenní tečky vyšší než intenzita tečky negativní kontroly.

NEGATIVNÍ VÝSLEDEK:

Vzorek je považován za negativní na specifickou protilátku, pokud je intenzita barvy příslušné antigenní tečky nižší nebo rovna intenzitě tečky negativní kontroly.

Poznámka: Slabé zbarvení antigenní tečky v blízkosti intenzity barvy tečky negativní kontroly může být těžké odlišit pouhou jednoduchou vizuální kontrolou. V takových případech doporučujeme používat software Dr Dot a skenovací systém (viz část 10.2) a prostudovat si informace o přesnější interpretaci v příslušných pokynech.

10.2. Semikvantifikace výsledků: použití softwaru Dr Dot a skenovacího systému (potřebný materiál: svorka BlueDiver Clamp, prázdné držáky proužků)

Skener BlueScan Scanner je systém specificky navržený pro odečet proužků imunodot společnosti D-tek. Umožňuje přesné a jednoduché vložení testových proužků.

Software Dr Dot umožňuje semikvantifikaci výsledků. Na základě získaného snímku bude každý výsledek kvantifikován dle hodnoty na škále šedi a srovnán s referenční škálou integrovanou v krytu BlueScan Cover.

Tyto intenzity škály šedi budou transformovány a zobrazeny v arbitrárních jednotkách (AU, od 0 do 100) na základě intenzit kontrol (RC a CO, viz část 9) přítomných na proužku dle následujícího vzorce pro konverzi:

$$\text{Výsledek antigenu } X \text{ (AU)} = \frac{\text{Intenzita škály šedi antigenu } X - \text{Intenzita škály šedi CO}}{\text{Intenzita škály šedi RC} - \text{Intenzita škály šedi CO}} * 100$$

1. Připravte si svorku BlueDiver Clamp a nasadte do ní tolik prázdných držáků proužků, kolik proužků potřebujete analyzovat. Opatrně vložte proužek do každého držáku proužků tak, aby RC směřovala vzhůru.
2. Vložte svorku reaktivní stranou proužků otočenou dolů do příslušné pozice v krytu skeneru BlueScan.
3. Pomocí softwaru Dr Dot začněte proužky skenovat.
4. Software provádí semikvantitativní vyhodnocení výsledků a interpretaci získaných hodnot následovně:

Arbitrární jednotka Dr Dot (AU)	Interpretace
< 5	Negativní
5–10	Nejednoznačný (*)
> 10	Pozitivní

Podrobné informace o systému BlueScan a softwaru Dr Dot naleznete v provozní příručce softwaru Dr Dot

10.3 Důležitá doporučení pro interpretaci výsledků

- Soupravy společnosti D-tek představují diagnostickou pomůcku. V důsledku toho nelze stanovit diagnózu pouze na základě našich souprav. Výsledky je vždy nutné interpretovat v kontextu klinického vyšetření, anamnézy pacienta a výsledků získaných jinými metodami.
Žádná samostatná technika není schopna vyloučit riziko falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků. Dle toho je potřeba, pokud je to možné, provést před použitím soupravy imunodot nepřímý imunofluorescenční test (imunofluorescence je považována za referenční metodu v oblasti autoimunit).
- Intenzita výsledku nemusí být nutně spojena se stupněm intenzity onemocnění, ale spíše s detekovanou hladinou protilátek.
- U zdravých jedinců se mohou vyskytovat nízké titry autoprotilátek. Z toho důvodu je třeba níže pozitivní výsledky (v blízkosti CO, mezi 5 a 10 Dr DOT AU) považovat za nejednoznačné, i když validní. V takových případech je doporučováno opakované testování pacienta, ideálně s novým vzorkem. Pokud je výsledek při opakovaném testování pořád nejednoznačný, je třeba použít jiné diagnostické testy a/nebo klinické informace ke stanovení autoimunitního stavu pacienta.
- Z různých důvodů a za určitých podmínek může dojít k nesprávnému výkonu soupravy (viz část 10.4 Řešení problémů). V takových případech výsledky nejsou validní a nelze je interpretovat. Doporučujeme zopakovat test. Pokud chyba přetrvává, kontaktujte svého distributora.
- Při používání prostředku ke konci doby jeho životnosti může dojít ke snížení intenzity výsledků. Výkonnost soupravy tím však není ovlivněna (detekce pozitivních a negativních výsledků), pokud jsou dodrženy normální podmínky použití a skladování.
- Sekvenční odběr vzorků (v různé dny) u pacienta s autoimunitním onemocněním může občas způsobit rozdíly ve výsledcích mezi jednotlivými vzorky. Tento rozdíl může mít několik příčin: léčba pacienta, rozvoj onemocnění nebo sérokonverze. Konkrétně v případě sérokonverze může být výsledek pozitivní na autoprotilátku při raném odběru vzorku pacientovi a při pozdějším odběru u stejného pacienta může být pozitivní na jinou autoprotilátku.

10.4 Řešení potíží

Problém	Možné příčiny + řešení
Diskrepance výsledků ve srovnání s referenční metodou	<p>-Použití</p> <ul style="list-style-type: none"> - nesprávné pipetování séra - aplikace nesprávného objemu - použití dvou různých vzorků téhož pacienta (viz část 10.3.6) nebo nesprávná manipulace se vzorkem / nesprávné skladování vzorku mezi testy - chybná vizuální interpretace - chybné čtení softwaru Dr Dot <p>→ zopakujte test</p> <p>-Materiál</p> <ul style="list-style-type: none"> - interferující látka ve vzorku - vzorek je poolovanou směsí různých lidských sér <p>→ zopakujte test a potvrďte jinými metodami</p> <p>-Metoda</p> <ul style="list-style-type: none"> - vnitřní výkon soupravy (viz část 11.2 <i>Analytická senzitivita a specifita</i>) - exspirovaná souprava - problém se stabilitou <p>S dalšími požadavky na technickou podporu kontaktujte svého distributora.</p>
Různé výsledky v rámci jedné šarže nebo mezi několika šaržemi	<p>-Použití</p> <ul style="list-style-type: none"> - nesprávné pipetování séra - aplikace nesprávného objemu - chybná vizuální interpretace nebo - chybné čtení softwaru Dr Dot <p>→ zopakujte test</p> <p>-Metoda</p> <ul style="list-style-type: none"> - vnitřní výkon soupravy (viz část 11.1 <i>Opakovatelnost a reprodukovatelnost</i>)
Kontaminace mezi sousedními proužky	<p>-Použití</p> <ul style="list-style-type: none"> - nesprávné pipetování séra <p>→ zopakujte test</p>

Chybějící nebo slabá RC	- Použití - sérum není vůbec napipetováno → zopakujte test - pacient s imunoglobulinovou deficiencí → potvrďte stav pacienta opakováním testu - poškozená činidla → zkontrolujte integritu činidel → v případě podezření na problém kontaktujte svého dodavatele - tečka není na proužku → spočítejte tečky na proužku; pokud počet není správný, kontaktujte svého dodavatele
Chybějící CO	- poškozená činidla → zkontrolujte integritu činidel; v případě podezření na problém kontaktujte svého distributora - tečka se nenachází na proužku → spočítejte tečky na proužku; v případě nesprávného počtu kontaktujte svého distributora
Nespecifická vazba / vysoké pozadí / vysoká hodnota CO	suspektní přítomnost kontaminace nebo interferující látky ve vzorku pacienta → zopakujte test a potvrďte jinou metodou S dalšími požadavky na technickou podporu kontaktujte svého distributora.
Proužky jsou nesprávně označeny	Výrobní problém → kontaktujte svého distributora
Obsah soupravy není správný	Výrobní problém → kontaktujte svého distributora
Pozitivní výsledky pro všechny biomarkery soupravy	Problém s činidly → kontaktujte svého distributora

POZNÁMKA:

Významná reziduální rizika soupravy dle analýzy rizik soupravy u konce návrhu (po mitigaci) jsou následná:

- 1) Riziko falešných výsledků v důsledku chyby pipetování (špatné sérum)
- 2) Riziko falešných výsledků v důsledku interferující látky obsažené ve vzorku

11. VÝKONY

11.1 Opakovatelnost a reprodukovatelnost

Referenční vzorky byly testovány na jednotlivé protilátky v postupných statisticky reprezentativních sériích, v rámci stejného testu, u různých testů a mezi různými šaržemi s cílem vypočítat variabilitu v rámci stanovení, mezi stanoveními a mezi šaržemi. Ve všech případech spadala variabilita intenzity barvy do následujících očekávaných limitů:

- CV ≤ 10 % pro zpracování v rámci analýzy
- CV ≤ 15 % pro zpracování mezi analýzami
- CV ≤ 20 % pro zpracování mezi šaržemi

11.2 Analytická senzitivita

Rozsah měření (semikvantitativní výsledky): Od 0 AU (negativní) do 100 AU (vysoce pozitivní).

Limit detekce: nejnižší naměřená hodnota testu je 5 AU (považovaná za neprůkaznou podle interpretačního algoritmu, viz bod 10.2)

Vzhledem k tomu, že pro autoprotilátky není k dispozici žádný mezinárodní standard, nelze u tohoto výrobku použít pravdivost měření ani linearitu.

11.3 Analytická specifita

1. U každého biomarkery této soupravy byly testovány hlavní známé interferující látky. Pro žádnou testovanou koncentraci interferující látky nepřekročil rozdíl mezi výsledkem vzorku bez interferující látky a výsledkem získaným v přítomnosti interferující látky 15 %.

Interferující látka	Maximální koncentrace	Střední koncentrace	Minimální koncentrace	Rozdíl < 15 %
Bilirubin	100 mg/dl	50 mg/dl	25 mg/dl	Ano
Hemoglobin	200 mg/dl	100 mg/dl	50 mg/dl	Ano
Cholesterol	224,3 mg/dl	112 mg/dl	56 mg/dl	Ano
Revmatoidní faktor IgM	přibl. 500 IU/ml	přibl. 300 IU/ml	přibl. 100 IU/ml	Ano

2. Poznámka: Nelze otestovat všechny možné interferující látky popsané v literatuře. Může dojít k jiným interferencím, mimo jiné interferencím indukovaným léky. Vysoká analytická specifita testu je zaručena kvalitou použitého antigenu. Tato souprava detekuje protilátky IgG proti Sm, Sm/RNP, SSA/Ro 60kD, SSB, Jo-1 a Scl-70. Nebyly zjištěny žádné zkřížené reakce s dalšími autoprotilátkami.

11.4 Klinická senzitivita a specifita

Senzitivita a specifita byly vypočteny z kombinovaných výsledků získaných na klinicky definovaných pozitivních a negativních kontrolách EQAS a z historických údajů (externí klinické hodnocení klinicky definovaných pozitivních a negativních pacientů). Tyto charakterizované vzorky (potvrzené pozitivní nebo negativní na specifické protilátky referenčními laboratořemi a/nebo metodologiemi) byly analyzovány dle pokynů testu. Na žádost je k dispozici podrobná klinická zpráva.

Senzitivita:			
Procentuální poměr je stanoven následujícím výpočtem: $\text{Senzitivita} = \frac{\text{Skutečně pozitivní výsledky}}{\text{Skutečně pozitivní výsledky} + \text{falešně negativní výsledky}}$			
Antigen	Skutečně pozitivní výsledky	Falešně negativní výsledky	Senzitivita (%)
Sm	23	0	> 99
Sm/RNP	38	1	97
SSA/Ro 60kD	86	0	> 99
SSB	44	2	96
Jo-1	57	0	> 99
Scl-70	13	0	> 99

Specifická:			
Procentuální poměr je stanoven následujícím výpočtem: $\text{Specifická} = \frac{\text{Skutečně negativní výsledky}}{\text{Skutečně negativní výsledky} + \text{falešně pozitivní výsledky}}$			
Antigen	Skutečně negativní výsledky	Falešně pozitivní výsledky	Specifická (%)
Sm	244	0	> 99
Sm/RNP	175	3	98
SSA/Ro 60kD	132	0	> 99
SSB	172	0	> 99
Jo-1	162	0	> 99
Scl-70	206	0	> 99

Poznámka: Hodnoty senzitivity a specifity na úrovni 100 % jsou striktně spojeny s kohortou vzorků použitých v klinických vyhodnoceních. Teoreticky by neměla být diagnostická souprava 100% senzitivní nebo specifická (přínejmenším > 99 %).

11.5 Diagnostické hodnoty autoprotilátek

Anti-Sm	Diagnostický marker (kritérium ACR a SLICC) pro systémový lupus erythematoses (SLE) Diagnostická specifická o hodnotě 99 % pro systémový lupus erythematoses (SLE) Diagnostická senzitivita na úrovni 5–40 % pro systémový lupus erythematoses (SLE)
Anti-Sm/RNP	Sm: Diagnostický marker (kritérium ACR a SLICC) pro systémový lupus erythematoses (SLE) Diagnostická specifická o hodnotě 99 % pro systémový lupus erythematoses (SLE) Diagnostická senzitivita na úrovni 5–40 % pro systémový lupus erythematoses (SLE) RNP 68kD/A/C : Diagnostické kritérium smíšené choroby pojiva (MCTD). Vysoce specifický a extrémně senzitivní (100 %) v nepřítomnosti protilátek Sm a dsDNA Detekován u 13–32 % pacientů se systémovým lupus erythematoses (SLE). Detekován u 10 % pacientů se systémovou sklerózou (SSc).
Anti-SSA/Ro 60kD	Diagnostický marker a klasifikační kritérium pro Sjögrenův syndrom (SjS) Dle EIA: Detekován u 96 % pacientů s primárním SjS Detekován u 80 % pacientů se sekundárním SjS Detekován u 25–60 % pacientů se systémovým lupus erythematoses (SLE), Detekován u 90–100 % pacientů se subakutním kožním lupus erythematoses (SCLE) Detekován u 90 % pacientů s neonatálním kožním lupus erythematoses (NLE) Detekován vzácněji (5–15 %) u pacientů s revmatoidní artritidou (RA) a Detekován u 9 % pacientů se systémovou sklerózou (SSc).
Anti-SSB	Diagnostický marker pro Sjögrenův syndrom (SjS) Dle EIA: Detekován u 70 % pacientů s primárním SjS Detekován u 50 % pacientů se sekundárním SjS Detekován u 25 % pacientů se systémovým lupus erythematoses (SLE), Detekován u 80 % pacientů se subakutním kožním lupus erythematoses (SCLE) Detekován u 70 % pacientů s neonatálním kožním lupus erythematoses (NLE)
Anti-Jo-1	Diagnostický marker pro idiopatickou (autoimunitní) myozitidu Diagnostická specifická na úrovni 100 %, diagnostická senzitivita na úrovni 24–30 % pro autoimunitní idiopatickou myozitidu.
Anti-Scl-70	Diagnostický marker pro systémovou sklerózu (SSc) Diagnostická specifická na úrovni 99 %, senzibilita 10 % pro limitovanou SSc a až 65 % pro difuzní SSc.

Odkazy na literaturu:

- 1: Orme ME, Andalucia C, Sjölander S, Bossuyt X. A comparison of a fluorescence enzyme immunoassay versus indirect immunofluorescence for initial screening of connective tissue diseases: Systematic literature review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2018 Aug;32(4):521-534. doi: 10.1016/j.berh.2019.03.005. Epub 2019 Apr 15. PMID: 31174821.
- 2: Jeong S, Hwang H, Roh J, Shim JE, Kim J, Kim GT, Tag HS, Kim HS. Evaluation of an Automated Screening Assay, Compared to Indirect Immunofluorescence, an Extractable Nuclear Antigen Assay, and a Line Immunoassay in a Large Cohort of Asian Patients with Antinuclear Antibody-Associated Rheumatoid Diseases: A Multicenter Retrospective Study. *J Immunol Res.* 2018 May 2;2018:9094217. doi: 10.1155/2018/9094217. PMID: 29854849; PMCID: PMC5954951.
- 3: Shovman O, Gilburd B, Chayat C, Amital H, Langevitz P, Watad A, Guy A, Perez D, Azoulay D, Blank M, Segal Y, Bentow C, Mahler M, Shoenfeld Y. Prevalence of anti-DFS70 antibodies in patients with and without systemic autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 2018 Jan-Feb;36(1):121-126. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28770702.
- 4: Zheng B, Wang Z, Mora RA, Liu A, Li C, Liu D, Zhai F, Liu H, Gong H, Zhou J, Liu J, Chen L, Wu L, Yuan L, Ying L, Jie L, He M, Hao M, Xu P, Lu Q, Han S, Chen S, Chen S, Zhu S, Sun W, Guo X, Chen Y, Wang Y, Qu Y, Li Z, Niu Z, Han Z, Chan EKL. Anti-DFS70 Antibodies Among Patient and Healthy Population Cohorts in China: Results From a Multicenter Training Program Showing Spontaneous Abortion and Pediatric Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases Are Common in Anti-DFS70 Positive Patients. *Front Immunol.* 2020 Oct 2;11:562138. doi: 10.3389/fimmu.2020.562138. PMID: 33133072; PMCID: PMC7566153.
- 5: Hayashi N, Uto K, Imanishi A, Sugiya D, Morinobu A, Saegusa J. Prevalence of anti-dense fine speckled 70 antibodies in healthy individuals and patients with antinuclear antibody-associated autoimmune rheumatic diseases in Japan. *Medicine (Baltimore).* 2021 Mar 5;100(9):e24556. doi: 10.1097/MD.00000000000024556. PMID: 33655922; PMCID: PMC7939200.

- 6: Aberle T, Bourn RL, Munroe ME, Chen H, Roberts VC, Guthridge JM, Bean K, Robertson JM, Sivils KL, Rasmussen A, Liles M, Merrill JT, Harley JB, Olsen NJ, Karp DR, James JA. *Clinical and Serologic Features in Patients With Incomplete Lupus Classification Versus Systemic Lupus Erythematosus Patients and Controls*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017 Dec;69(12):1780-1788. doi: 10.1002/acr.23201. Epub 2017 Nov 14. PMID: 28118528; PMCID: PMC5524597.
- 7: Zian Z, Maamar M, Aouni ME, Barakat A, Naima Ghailani Nourouti, El Aouad R, Arji N, Bennani Mechita M. *Immunological and Clinical Characteristics of Systemic Lupus Erythematosus: A Series from Morocco*. *Biomed Res Int*. 2018 Sep 30;2018:3139404. doi: 10.1155/2018/3139404. PMID: 30363993; PMCID: PMC6186365.
- 8: Wei Q, Jiang Y, Xiao M, Zhang X, Qi J, Xie J, Wu J, Wu Z, Gu J. *Comparison of chemiluminescence microparticle immunoassay, indirect immunofluorescence assay, linear immunoassay and multiple microbead immunoassay detecting autoantibodies in systemic lupus erythematosus*. *Scand J Immunol*. 2020 Mar;91(3):e12849. doi: 10.1111/sji.12849. Epub 2020 Jan 3. PMID: 31899559.
- 9: Au EY, Ip WK, Lau CS, Chan YT. *Evaluation of a multiplex flow immunoassay versus conventional assays in detecting autoantibodies in systemic lupus erythematosus*. *Hong Kong Med J*. 2018 Jun;24(3):261-269. doi: 10.12809/hkmj177007. Epub 2018 May 25. PMID: 29807953.
- 10: Betteridge ZE, Woodhead F, Lu H, Shaddick G, Bunn CC, Denton CP, Abraham DJ, du Bois RM, Lewis M, Wells AU, McHugh NJ. *Brief Report: Anti-Eukaryotic Initiation Factor 2B Autoantibodies Are Associated With Interstitial Lung Disease in Patients With Systemic Sclerosis*. *Arthritis Rheumatol*. 2016 Nov;68(11):2778-2783. doi: 10.1002/art.39755. PMID: 27273608.
- 11: René Louis Humbel, Groupe d'étude de l'auto-immunité (GEAI), l'info n°7, Mise au point anticorps anti Mi-2, Anticorps anti-DFS70/LEDGF/P75, p3, p6 mai 2015
- 12: Karsten Conrad, Werner Schössler, Falk Hiepe, Marvin J. Fritzler, Book "Autoantibodies in systemic Autoimmune Diseases", Volume 2, third edition – 2015

12. LIMITACE TESTU

1. Výsledky získané v tomto potvrzovacím testu jsou závislé na vnitřním výkonu soupravy a je nutné je považovat za pomůcku pro konečnou diagnózu v kontextu výsledků získaných referenční technikou a klinických údajů pacienta.
2. V případě hyperlipemických vzorků se doporučuje je před pipetováním 10 µl vzorku centrifugovat a pipetování provést v supernatantu.
3. Koncentrace autoprotilátek ve vzorku séra není ve vztahu k výsledkům poskytovaným přístrojem.
4. Neexistuje žádná souvislost mezi koncentrací různých autoprotilátek zjištěných přístrojem a závažností s tím spojených autoimunitních onemocnění.



We Apply Science



Návod k použití
ENAD-24/str. 10 z 12



We Apply Science



Návod k použití
ENAD-24/str. 11 z 12



We Apply Science



Návod k použití
ENAD-24/str. 12 z 12