

Lupus IgG

Kat.číslo: LUDIV-24
BlueDiver Protokol: 02

1. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

BlueDiver Dot Lupus IgG je Immunodot souprava určená pro detekci autoprotilátek IgG v lidském séru proti Nucleosome, Histones, Sm a Ribosome P0 antigenů.

Více informací ohledně zdroje/typu antigenů je dostupných přes vašeho distributora nebo na naší webové stránce www.d-tek.be.

2. PRINCIP TESTU

Tato souprava je určena pro přístroj *BlueDiver*. Test je založen na principu enzymatické imunoanalýzy. Testovací proužek je složený z membrány připevněné na specifickém plastovém držadle. Během automatizovaného testovacího procesu přístroj *BlueDiver* po sobě inkubuje proužky v otvorech reagenčních nádobek (reagencie jsou připraveny k použití). Zkráceně: proužky jsou nejprve inkubovány v naředěném séru pacienta. Pokud jsou přítomné lidské protilátky, navážou se na odpovídající antigeny umístěné na membráně. Nenavázané nebo přebytečné protilátky jsou vymyty. Po další inkubaci v AP-konjugovaných kozích protilátkách proti lidským IgG se enzymatický konjugát naváže na komplexy antigen-protilátky. Po odstranění přebývajících konjugátů promytím se proužky nakonec inkubují v roztoku substrátu. Pokud je přítomná enzymatická aktivita, pak se objeví purpurové tečky na membránové podložce. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství protilátek přítomných ve vzorku.

3. OBSAH SOUPRAVY

Zkratky v abecedním pořadí:

AP = Alkalická fosfatáza; BCIP = Bromo-Chloro-Indolyl-Fosfát; KCl = Chlorid draselný; MgCl₂ = Chlorid hořečnatý; MIT = MethylIsoThiazolon; NaCl = Chlorid sodný; NaN₃: Azid sodný; NBT = NitroBlue Tetrazolium; TBS = TBS pufr

Dot proužky	3 x 8 jednotek na plastovém držáku jednotlivě oddělitelné, zatavené v hliníkové fólii	PROUŽEK 	NÁDOBKÁ
	6 Dotů (teček) na každém: 1 pozitivní kontrola (C+) 4 antigenů 1 negativní kontrola (C-)		
Nádobka	24 jednotek každá má 7 oddílů; zatavené v hliníkové fólii:		
Diluční pufr	I. pozice, 1 x 1,4 ml (žlutý) <i>Obsahuje</i> H ₂ O • TBS • NaCl • Tween • Konzervans (MIT) • Barvivo • Protipěnicí emulze		
Promývací pufr	II., III., IV. a VI. pozice, 4 x 1,4 ml (bezbarvý) <i>Obsahuje</i> H ₂ O • TBS • NaCl • Tween • Konzervans (MIT) • Barvivo • Protipěnicí emulze		
Konjugát	V. pozice, 1 x 1,4 ml (červený) <i>Obsahuje</i> H ₂ O • TBS • NaCl • KCl • MgCl ₂ • AP-konjugované kozí anti-lidské IgG • Stabilizátor • Konzervans (MIT) • Barvivo • Protipěnicí emulze		
Substrát	VII. pozice, 1 x 1,4 ml (světle žlutý roztok) <i>Obsahuje</i> H ₂ O • NaN ₃ (0.05 %) • MgCl ₂ • TBS • NBT • BCIP • Stabilizátor • Protipěnicí emulze		
Další materiál	Absorbční papír (pro sušení špiček bod 9.1.16), zatavený spolu s Dot proužky v hliníkové fólii		
Dokumenty	IFU, Certifikát analýzy, seznam antigenů		

4. POVINNÝ MATERIÁL

BlueDiver přístroj

5. NEZBYTNÝ ALE NEDODÁVANÝ MATERIÁL

Mikropipety/rukavice

6. UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

Testovací souprava se musí uchovávat při teplotě mezi +2°C a +8°C. Nezamrazujte.

Po prvním otevření soupravy se nepoužité reagenční nádoby musí uchovávat při 2-8°C chráněné před slunečním světlem, nejlépe uvnitř originální krabice.

Nepoužité proužky se musí umístit zpět do obalu, uzavřít a uchovávat při 2-8°C nejlépe uvnitř originální krabice.

Při správném skladování zůstanou všechny komponenty soupravy stabilní až do data expirace.

7. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Všechny reagencie jsou pouze pro *in vitro* diagnostické a profesionální použití. Testovací souprava se může zpracovávat pouze školeným personálem. Souprava obsahuje potenciálně nebezpečné komponenty, proto se vyvarujte kontaktu s pokožkou, očima nebo se sliznicemi.

Se vzorky pacientů je třeba manipulovat opatrně, jako s potenciálně infekčním materiálem.

Likvidace odpadů: Se vzorky pacientů a inkubovanými testovacími proužky se musí zacházet jako s infekčním odpadem. Ostatní reagencie není třeba držet odděleně, není-li uvedeno jinak v místních předpisech.

D-tek s.a. a jeho autorizovaní distributoři nejsou odpovědní za poškození nepřímo nebo následně způsobená změnou nebo modifikací doporučeného postupu.

V jakémkoliv případě, je třeba při používání této soupravy praktikovat správnou laboratorní praxi se všemi všeobecnými a individuálními předpisy.

8. ODBĚR VZORKU, MANIPULACE A UCHOVÁVÁNÍ

Vzorky krve lze odebírat do suchých zkumavek nebo zkumavek obsahujících EDTA, heparin nebo citrát. Po oddělení séra nebo plazmy lze vzorky uchovávat při 2-8°C maximálně 3 dny. Delší uchování vyžaduje zamrazení na -20°C. Vyvarujte se opakovaného zamrazování a rozmrazování. Po zamrazení vždy před použitím vzorky promíchejte, abyste zajistili jejich homogenitu.

9. PRACOVNÍ POSTU

ZÁKLADNÍ INFORMACE, MANIPULACE A TIPY:

Princip TESTOVACÍ PROCEDURY:

Po ručním vložení proužků a reagenčních nádobek se automaticky spustí inkubační a promývací kroky pracovního postupu přístrojem BlueDiver, který zajistí účinnou cirkulaci tekutin přes proužky a to jejich kontinuálním třepáním směrem nahoru a dolů v otvorech ready-to-use reagenčních nádobek. Celý test probíhá za pokojové teploty.

Popis PROUŽKŮ:

Reaktivní (přední) strana proužků je potažena antigeny, který vypadají jako slabě namodralé tečky. Toto zbarvení zajistí, že všechny antigeny byly správně nanесeny na membránu. Zbarvení zmizí během testu. Tato přední strana také ukazuje číslo proužku a dvourozměrný čárový kód pro vysledování proužku po vyjmutí z přístroje BlueDiver na konci testu.

Nereaktivní (zadní) strana proužku zobrazuje jak alfanumerický tak čárový kód pro identifikaci typu proužku a číslo šarže v přístroji BlueDiver.



Proužky se musí před započítím automatizovaného procesu ručně vložit do speciální svorky (viz Příprava testu v bodě 9.1.4). Během této operace se vyvarujte dotyku prsty oblasti membrány na proužcích. Při manipulaci si vždy navlékejte laboratorní rukavice a používejte plastové části (držák proužku).

Popis REAGENČNÍCH NÁDOBEK: (viz obrázek na straně 1)

Reagenční nádobky se skládají ze 7 různých dílů naplněných ready-to-use reagenциemi. Tyto nádobky jsou zataveny (a reagenční sekce hermeticky odděleny) hliníkovou fólií, která se musí před začátkem testování odstranit. Jakmile jsou nádobky otevřené, zacházejte s nimi opatrně tak, aby nedošlo k vytlití reagenциí a vzájemné kontaminaci jednotlivých oddílů.

Zadní strana nádobek je označena alfanumerickým a čárovým kódem pro identifikaci typu nádobky a čísla šarže v přístroji BlueDiver.

Nádobky se musí před začátkem automatického procesu vkládat ručně do speciálního držáku na nádobky (viz Příprava testu v bodě 9.1.10). Přední a zadní strana nádobek má spodní trojúhelníkový a dva (spodní a horní) čtvercové plastové konce pro bezpečné uchycení a orientaci do držáku.

Propojení PROUŽKŮ/NÁDOBEK

Proužky a nádobky stejné soupravy mají stejné číslo šarže a jsou určeny pro propojení do šarže-specifických párů. Nepropojte proužek a nádobku s odlišným číslem šarže, protože to bude přístrojem BlueDiver detekováno jako neplatné nastavení a proces zpracování se zastaví.

Jakmile je pár proužek/nádobka platný, přístroj BlueDiver může zpracovávat spojení proužky/nádobky různých šarží; Nicméně pouze soupravy mající stejné číslo protokolu (stejná inkubační doba a posloupnost) lze zpracovávat společně v jednom běžícím testu (prosím podívejte se na číslo protokolu uvedené na první stránce návodu).

9.1 Příprava testu

- Nechejte před použitím všechny součásti soupravy vytemperovat na pokojovou teplotu (+18°C až +25°C).
- Pracovní seznam (buď vytvořený Dr Dot softwarem nebo externí) by vždy měl být připraven pro snadné vkládání a správné propojení proužků, nádobek a vzorků pacientů.
- Ujistěte se, že držák nádobek je upevněn na svém místě v přístroji BlueDiver.
- Ujistěte se, že přístroj BlueDiver je zapojen do sítě.

Následující kroky shrnují vložení a přípravu přístroje BlueDiver, testovacích proužků, reagenčních nádobek a vzorků pacientů před započítím testu. Pro detailní informaci nebo v případě jakýchkoliv problémů v některém z kroků, nahlédněte do Uživatelského manuálu pro přístroj BlueDiver.

1. Zapněte přístroj BlueDiver a počkejte několik sekund, dokud se na dotykové obrazovce neobjeví datum a čas.
2. Potvrďte správné datum a čas stlačením na dotykové obrazovce (v případě prvního použití nebo po resetování se podívejte do Uživatelského manuálu) → "Initialize?" se objeví na obrazovce.
3. Potvrďte inicializaci stlačením na dotykové obrazovce – horizontální rameno přístroje se automaticky přesune směrem k centrální (stand-by) pozici → "Load strips (24)" se objeví na obrazovce
4. (Nenastavujte ani nepotvrzujte v tomto kroku počet proužků). Vyndejte svorku z jejího umístění na rameni jemným tahem směrem nahoru a vložte testovací proužek: držte svorku očíslovanou stranou nahoru (otevřená pozice) a vložte proužky, také očíslovanou (reaktivní) stranou nahoru, vsunutím horní plastové části (jazyka) do speciálních děr ve svorce. Jemným tlakem zajistěte, aby plastový jazyček vklouzl až na dno otvoru.

Poznámky:

- Vždy začněte vkládání na pozici 1 svorky (levá strana) a nenechávejte prázdný prostor mezi proužky!



- Po dokončení vkládání zkontrolujte vizuálně vertikální, horizontální a boční zarovnání proužků. Jakékoliv viditelné nezarovnání se musí opravit vyndáním proužku(ů) ze svorky a jejich opětovným vložením.
5. Znovu vložte svorku na její místo v rameni jemným stlačením směrem dolů.
 6. Nastavte počet vložených proužků s použitím šipek nahoru a dolů na dotykové obrazovce.
 7. Potvrďte počet vložených proužků stlačením ✓ na dotykové obrazovce → horizontální rameno se automaticky přesune nazpět přes polohu děr držáku nádobek → **“Check alignment”** se zobrazí na obrazovce.
 8. Použijte funkci **“JOG”** na obrazovce pro ověření správného zarovnání proužků: jemně stlačte šipku „dolů“ na dotykové obrazovce dokud spodek proužků nedosáhne k poloze otvorů v držáku nádobek. Pokud jsou správně vyrovnány, proužky se nebudou dotýkat obrysů děr.
Poznámka: v případě nevyrovnání (kontakt proužků s držákem nádobek) prosím nahlédněte do Uživatelského manuálu pro přístroj BlueDiver).
 9. Potvrďte správné vyrovnání proužků stlačením ✓ na dotykové obrazovce → přístroj BlueDiver zcela vloží proužky do otvorů a přečte jejich čárové kódy → po dokončení odečtu čárových kódů, se na displeji objeví **“Load reagent”**.
Poznámka: v případě selhání odečtu jednoho nebo více čárových kódů na proužcích (blikající LED dioda na neodečtené pozici), prosím nahlédněte do Uživatelského manuálu pro přístroj BlueDiver.
 10. Otevřete reagenční nádobky a vložte je pod jejich odpovídající proužky do určených zářezů držáku nádobek.
 11. Potvrďte dokončení vkládání stlačením ✓ na dotykové obrazovce – přístroj BlueDiver odečte čárové kódy nádobek a zkontroluje jejich správné spojení s proužky → po dokončení odečtu čárových kódů se na obrazovce objeví počet proužků (ověřená propojení proužky/nádobky).
Poznámka: v případě selhání odečtu jednoho nebo více čárových kódů nádobek nebo v případě detekce špatného propojení proužek/nádobka (blikající LED dioda na odpovídající pozici), prosím nahlédněte do Uživatelského manuálu pro přístroj BlueDiver.
 12. Potvrďte počet proužků stlačením ✓ na dotykové obrazovce → číslo protokolu identifikované na čárovém kódu se objeví na obrazovce (**Protocol ID xx.**).
 13. Potvrďte číslo protokolu stlačením ✓ na dotykové obrazovce → **“Please close cover.”** se objeví na obrazovce.
 14. Zavřete víko přístroje BlueDiver a potvrďte uzavření stlačením ✓ na dotykové obrazovce → přístroj BlueDiver provede první promývací (předběžné ošetření) krok inkubační proužků v 2. otvoru nádobek (doba zpracování: 1 minuta) → na konci namáčecího kroku se na obrazovce objeví **“Please open cover.”**
 15. Otevřete víko BlueDiver přístroje a potvrďte jeho otevření stlačením ✓ na dotykové obrazovce → horizontální rameno se automaticky přesune směrem k přední části přístroje a přehodí proužky do šikmé pozice → **“Dry strips”** se objeví na obrazovce.
 16. Usušte jemně proužky pomocí absorbního papíru na bázi spodní malé dutiny (díra pro nanesení vzorku).
 17. Potvrďte usušení stlačením ✓ na dotykové obrazovce → **“Apply samples”** se objeví na obrazovce.
 18. Naneste vzorky napipetováním 10 µl séra/plazmy pacienta do spodního otvoru pro nanesení vzorku na proužku.
 19. Potvrďte nanesení vzorků stlačením ✓ na dotykové obrazovce → **“Please close cover”** se objeví na obrazovce.
 20. Zavřete víko přístroje BlueDiver a potvrďte uzavření stlačením ✓ na dotykové obrazovce → přístroj BlueDiver začne test automaticky provedením následné sekvence kroků (**Protokol 02**):

9.2 Provedení testu

Krok	Popis	Doba trvání
01.	Proužky jsou inkubovány v 1. otvoru nádobky (Ředící pufr), po kontaktu s tekutinou v otvoru a protřepání se nanesené vzorky (viz 9.1.18) uvolní z malé dutiny na dně proužku a naředí se pufr.	30 min
02.	Svorka se přesune vpřed a proužky jsou inkubovány v 2. otvoru nádobky (promývací pufr)	2 min
03.	Svorka se přesune vpřed a proužky jsou inkubovány ve 3. otvoru nádobky (promývací pufr)	2 min
04.	Svorka se přesune vpřed a proužky jsou inkubovány v 6. otvoru nádobky (promývací pufr)	2 min
05.	Svorka se přesune zpět a proužky jsou inkubovány v 5. otvoru nádobky (konjugát)	10 min
06.	Svorka se přesune zpět a proužky jsou inkubovány ve 4. otvoru nádobky (promývací pufr)	2 min
07.	Svorka se přesune zpět a proužky jsou inkubovány ve 3. otvoru nádobky (promývací pufr)	2 min
08.	Svorka se přesune zpět a proužky jsou inkubovány v 2. otvoru nádobky (promývací pufr)	2 min
09.	Svorka se přesune vpřed a proužky jsou inkubovány v 7. otvoru nádobky (substrát)	10 min
10.	Svorka se přesune zpět a proužky jsou inkubovány v 6. otvoru nádobky (promývací pufr)	2 min

Po dokončení procesu se svorka přesune do střední (stand-by) pozice přístroje, aby umožnila snadnou manipulaci se svorkou. Přístroj zapírá a na obrazovce se objeví **“Finished test”**.

Jemně přiložte absorbní papír na bázi proužků kvůli odstranění tekutiny ze spodní malé dutiny (otvor pro nanesení vzorku) a nechejte proužky před interpretací výsledků sušit po dobu 10 minut.

V případě použití BlueScan jako pomůcky pro interpretaci vzorků, nechejte prosím zpracované proužky ve svorce.

REGISTRACE TESTOVACÍCH ÚDAJŮ

Protokol testu lze nahrát stlačením symbolu USB a řízením příkazů, které se objeví na obrazovce (Vložit USB → Přepsat USB → Vyjmout USB). Tento krok není závazný, ale je velmi doporučován kvůli sledovatelnosti a regulačním záležitostem.

10. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Lze provést vizuální hodnocení výsledků, nicméně se doporučuje použít softwaru Dr. Dot a skenovacího systému pro přesnější a semi-kvantitativní interpretaci.

Více informací o Dr. DOT je dostupných přes vašeho distributora nebo na našich webových stránkách www.d-tek.be



10.1 Vizuální interpretace:

1. Vysuňte svorku z přístroje BlueDiver a vyndejte z ní proužky.
2. Umístěte proužky reaktivní stranou nahoru na vyznačená pole Interpretací šablony Diver dodávané se soupravou. Ta naznačí konkrétní pozice různých kontrol a antigenů na membráně.
3. První horní tečka (Dot) (Pozitivní kontrola) musí být pozitivní u všech pacientů.
Pouze jasně zbarvená pozitivní kontrola zajišťuje, že jsou vaše výsledky platné a zpracování bylo správné a/nebo komponenty soupravy nebyly znehodnoceny. Pokud první horní Dot není zbarvený, test selhal a nelze jej dále interpretovat.
4. Porovnejte specifické antigenní body s bodem negativní kontroly (což je vždy poslední spodní tečka).
Intenzita zbarvení antigenních dotů je přímo úměrná titru specifických protilátek ve vzorku pacienta.
Barevná intenzita negativní kontroly se může měnit v závislosti na charakteristice vzorku. Pokud je vzorek bez interferujících látek, je negativní kontrola vždy téměř bezbarvá. Naproti tomu hodně zbarvená negativní kontrola naznačuje vysokou míru nespecifických vazeb ve vzorku.

POZITIVNÍ VÝSLEDEK:

Vzorek je pozitivní na specifické protilátky pokud barevná intenzita odpovídajícího antigenního dotu je vyšší než intenzita negativní kontroly.

NEGATIVNÍ VÝSLEDEK:

Vzorek je negativní na specifické protilátky, pokud barevná intenzita odpovídajícího antigenního dotu je nižší nebo rovna intenzitě zbarvení negativní kontroly.

10.2 Použití softwaru DrDOT a skenovacího systému

1. Vyjměte svorku z přístroje BlueDiver. Nechejte zpracovat proužky připojené ke svorce.
2. Vložte svorku reaktivní stranou proužků směrem dolů do příslušného místa ve víku BlueScan skeneru.
3. Začněte skenování proužků s pomocí Dr Dot softwaru.
Pro detailní informace o BlueScan a Dr Dot softwaru prosím nahlédněte do Uživatelského manuálu vašeho Dr DOT softwaru

11. FUNKČNOST TESTU

11.1 Reprodukovatelnost

Referenční kontrolní vzorky byly testovány pro každou protilátku ve statisticky významném počtu opakování ve shodném testu nebo v několika testech kvůli výpočtu intra-assay a inter-assay variace, respective. V každé případě intenzita bodů byla v rámci specifikovaného rozpětí a standardní odchylky nižší než 10 %.

Detailní analytická data jsou dostupná na požádání

11.2 Citlivost a specifičnost

Nucleosome		Histones		Sm		Ribosome P0		
	+	-		+	-		+	-
+	true positive 36	false positive 1	+	true positive 31	false positive 0	+	true positive 15	false positive 0
-	false negative 18	true negative 49	-	false negative 0	true negative 132	-	false negative 0	true negative 24
	Sensitivity 67%			Sensitivity 100%			Sensitivity 100%	
	Specificity 98%			Specificity 100%			Specificity 100%	

Charakterizované vzorky (potvrzené pozitivní nebo negativní specifické protilátky pomocí referenční metody) byly analyzovány podle návodu k testu. Intenzity reakce byly hodnoceny pomocí Dr Dot software. Citlivost a specifičnost byly vypočteny z ROC analýzy s cut-off hodnotou automaticky naměřenou pomocí Dr Dot softwaru.

Poznámka: Vzhledem k tomu, že v současné době neexistuje žádná referenční metoda pro antigeny označené šedě, byly k posouzení klinické senzitivity/specifičnosti použity patientské vzorky, buď s potvrzenou diagnózou specifické choroby nebo vzorky kontrolní.

12. LIMITACE TESTU

Klinická diagnóza nemůže být stanovena pouze na základě *in vitro* diagnostické metody. Pro stanovení diagnózy je třeba vzít v potaz kompletní klinické zkoumání, stejně jako další laboratorní výsledky testů, protože žádná technika použitá pouze sama o sobě nemůže vyloučit možnost falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků. V tomto ohledu, zvláště nepřímý imunofluorescenční test, pokud je používán, by měl být proveden paralelně s určením autoprotilátek pomocí BlueDiver Dot, protože Immunofluorescence je často považována za zlatou referenční screeningovou techniku v autoimunitě.