

## ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51  
55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0  
Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58  
Internet: www.orgentec.com

Návod k použití  
2015-11



## ORG 711 Nucleo-9-Line

### KRÁTKÝ POPIS

Nucleo-9-Line imunoblot je membránový na bázi enzymů založený test pro semi-quantitativní měření třídy protilátek IgG proti dsDNA, nucleosomes, SS-A (52 a 60 kDa), SS-B, Sm, RNP/Sm, Scl-70, Jo-1, centromere B ve vzorcích lidského séra nebo plasmy. Tento výrobek je určen pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.

### POUŽÍVANÉ SYMBOLY

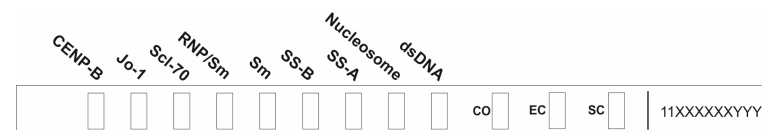
	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Výrobce
	Katalogové číslo
	16 Dostačuje pro
	Kód šarže
	Spotřebujte do
	Teplotní omezení
	Viz návod k použití
	Chraňte před slunečním světlem
	Pro jednorázové použití
	Datum výroby

	Vymaž pásy
	Vzorkový pufr
	Enzymový konjugát
	Promývací pufr
	BCIP substrátový roztok
	Připraven k použití

### PRINCIP TESTU

Na membránu z nitrocelulózy jsou naneseny v prouzcích vysoce purifikované antigeny dsDNA, nucleosomes, SS-A (52 a 60 kDa), SS-B, Sm, RNP/Sm, Scl-70, Jo-1 a centromere B stejně jako tři antigeny pro CO cut-off mezní kontrolní vzorek, EC kontrolní vzorek konjugátu a SC sérový kontrolní vzorek jsou vázány na nitrocelulózy prouzek.

Protilátky přítomné v séru nebo plazmě reagují s navázaným antigenem. Promytí stripů odstraňuje nenavázané protilátky a nespecifické komponenty vzorku. Alkalická fosfatáza konjugovaná s anti-lidským IgG detekuje protilátky navázané ze vzorku, které tvoří komplex konjugát / protilátka / antigen. Promytí stripů odstraní nenavázaný konjugát. Substrát BCIP / NBT je hydrolyzován navázaným enzymovým konjugátem a tvoří nerozpustný modro-fialový produkt. Promytí stripů odstraňuje nehydrolyzovaný substrát a ukončí reakci. Množství barvy je přímo úměrná koncentraci protilátek IgG přítomných v původním vzorku.



### VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ

- Všechna činidla této sady jsou navržena pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.
- Bílkovina hovězího séra (BSA) použitá v komponentách byla otestována na BSE a to negativně.
- Vyhnete se kontaktu se substrátem BCIP/NBT.
- Vzorkový roztok a mycí roztok obsahují 0.09% azidu sodného jako ochranný prostředek. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.
- Enzym konjugace obsahuje 0.05% ProClinu jako ochranného prostředku. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.
- Během manipulace se všemi činidly, kontrolami vzorky séra sledujte stávající nařízení pro laboratorní bezpečnost a správnou laboratorní práci:
- První pomoc: V případě kontaktu s pokožkou ihned důkladně opláchněte vodou a saponátem. Sundejte kontaminovaný oděv a boty a před dalším použitím je omyjte. Dojde-li ke kontaktu systémové kapaliny s kůží, opláchněte důkladně vodou. Po kontaktu se zrakem důkladně oplachujte otevřené oči tekoucí vodou po dobu alespoň 10 minut. Dle potřeby vyhledejte lékařskou pomoc.
- Osobní opatření, ochranné vybavení a postup v případě nouze:
  - Sledujte nařízení laboratorní bezpečnosti. Vyvarujte se kontaktu s pokožkou a očima. Nepožívejte. Nenasávejte ústy. Nejezte, nepijte, nekuřte nebo nenášejte make up v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo sadou činidel. Při vylití absorbujte inertním materiálem a políty materiál řádně zlikvidujte.
  - Limity vystavení / ochrana osob: Noste ochranné rukavice z nitrilové pryže nebo přirozeného latexu. Noste ochranné brýle. Při používání dle určeného použití nejsou známy nebezpečné reakce.
  - Při likvidaci laboratorního odpadu je třeba dodržovat místní a národní předpisy.
- Dodržujte směrnici pro provádění řízení kvality ve zdravotnických laboratořích analyzačními kontrolami séry.

### ODEBÍRÁNÍ VZORKŮ, JEJICH PŘÍPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ

- Krevní vzorky odebírat podle platných směrnic a metod.
- Krev nechat srazit a sérum získat odstředěním.
- Používání hemolytických, lipemických a ikterických sér je potřeba se vyhnout.
- Při teplotě 2 - 8 °C chlazené vzorky séra a plasmy mohou být skladovány až 5 dní. Je-li plánováno delší skladování, měly by být vzorky rozděleny na alikvotní části a při -20 °C hluboce zmrazeny.
- Vyhýbat se opakovanému rozmrazení a zmrazení! To může vést ke ztrátě aktivity autoprotilátek nebo protilátek.
- Používání tepelně inaktivovaných sér se nedoporučuje.

## OBSAH SOUPRAVY

▽ 8	ORG 711-08	Dostačuje pro 8 stanovení
▽ 16	ORG 710-16	Dostačuje pro 16 stanovení
<b>BLOT STRIPS</b>	1x/2x	8 kusů nitrocelulóзовých proužků s nakoutovanými antigeny. K okamžitému použití. 1 Předpřipravený nitrocelulóзовý kalibrační strip (označené CAL) pro semikvantitativní hodnocení. K okamžitému použití. Kód produktu na proužku: <b>11</b>
<b>DILUENT</b>	1x 20 ml	Vzorkový pufr PB, žlutá; obsahuje PBS, BSA, saponáty, ochranný prostředek azid sodný 0.09%. Připraven k použití.
<b>CONJUGATE</b>	1x 20 ml	Enzymový konjugát; světle červená; obsahuje protilidské protilátky IgG, označeno alkalické fosfatázy; PBS, BSA, detergent, ochranný prostředek PROCLIN 0.05%
<b>WASH</b>	1x 20 ml	Promývací pufr WB; obsahuje Tris, detergent, ochranný prostředek azid sodný 0,09%; 50x koncentrát.
<b>BCIP</b>	1x/2x 10 ml	Substrátový roztok (BCIP/NBT). Připraven k použití.
	1x/2x	Inkubační vanička
	1x/2x	Dokumentační list
<b>i</b>	1x	Návod k použití: Mini-DVD
<b>i</b>	1x	Certifikát analýzy

## POTŘEBNÉ VYBAVENÍ

- Mikropipety se špičkami na jedno použití na 10 µl, 1000 µl
- Destilovaná nebo deionizovaná voda
- Odměrný válec na 1000 ml
- Laboratorní časomíra
- Třepačka

## SKLADOVÁNÍ A STABILITA

- Skladujte testovací sadu při 2-8°C na tmavém místě.
- Během skladování a používání nevystavujte činidla horku, slunečnímu záření nebo silnému světlu.
- Udržujte proužky nitrocelulózy v dobře uzavřeném původním plastovém obalu s přidanými sušidly.
- Důležité: Kalibrační strip je velmi citlivý na světlo. Skladujte ve tmě!
- Uchovatelnost neotevřené testovací je 15 měsíců od data výroby. Neotevřená činidla jsou stabilní do konce expirace sady. Viz štítky pro individuální dávku.
- Rozředěný mycí roztok je stabilní minimálně 30 dní, je-li skladován při 2-8°C. Doporučujeme použít stejný den.

## POZNÁMKY K PRACOVNÍMU POSTUPU

- Složky soupravy nepoužívejte po uplynutí doby trvanlivosti.
- Nepoužívejte společně jednotlivé součásti z různých sad a produktů.
- Všechny složky musejí mít pokojovou teplotu (20 – 28 °C).
- Připravte si všechny složky a vzorky. Jakmile zkouška začne, je nutné provést ji bez přerušení.
- Provádějte jednotlivé kroky testu výhradně v určeném pořadí.
- Vždy používejte čerstvé naředěné vzorky.
- Aby nedocházelo ke kontaminaci, vyměňujte špičku mezi jednotlivými vzorky.
- Všechny kroky inkubace musejí být přesně časovány.
- S páskami nitrocelulózy zacházejte v rukavicích nebo pomocí pinzety.
- Kontrolní séra je nutné pravidelně analyzovat jako neznámá pro kontrolu účinnosti složek a testu.
- Je důležité se přesvědčit, že v průběhu inkubace stripu se netvoří vzduchové bubliny. Ty by mohly vést k nepravdělnému vybarvení proužků a ke špatným výsledkům.

## PŘÍPRAVA SLOŽEK

Naředte obsah Promývacího pufru koncentrátu (50x) s destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 1000ml (1l).

**DILUENT**

Připraven k použití

Příprava vzorku

Příprava vzorku: Ředění vzorku naleznete v testu. Efektivní ředění během zkoušky je 1:101.

## TESTU PRECEDURE

Pomocí pinzety opatrně vložte proužek do každé komůrky inkubační misky:

- Přidejte **1.0 ml vzorkového pufru**. Jemným houpáním nechte působit po dobu asi 5 minut
- Přidejte **10 µl séra pacienta** přímo do komůrky
- Za jemného houpání inkubujte po dobu **60 minut** při pokojové teplotě (20-28°C).
- Opatrně odstraňte z proužků veškeré rozředěné sérum.
- Přidejte 2.0 ml promývacího pufru, inkubujte po dobu 5 minut
- Opatrně odstraňte z proužků veškeré zbytky pufru. Tento postup opakujte dvakrát.

- Do každé komůrky přidejte **1.0 ml enzymového konjugátu**.
- Za jemného houpání inkubujte po dobu **30 minut** při pokojové teplotě.
- Z proužků odstraňte veškerý konjugát.
- Přidejte 2.0 ml promývacího pufru, inkubujte po dobu 5 minut
- Opatrně odstraňte z proužků zbytky veškerého pufru. Tento postup opakujte dvakrát.

- Do každé komůrky přidejte **1.0 ml substrátu**.
  - Za jemného houpání inkubujte po dobu 10 minut při pokojové teplotě.
  - Z proužků odstraňte veškerý substrát.
  - Přidejte 1.0 ml destilované vody, inkubujte po dobu 5 minut
  - Opatrně odstraňte z proužků veškerou vodou. Tento postup opakujte dvakrát.
- Proužky opatrně vysušte papírovou utěrkou. Před hodnocením ponechte proužky vyschnout na vzduchu.

## VALIDACE

Test je platný, pokud se všechny tři kontrolní proužky (CO mezní kontrolní vzorek, EC kontrolní vzorek konjugátu a SC sérový kontrolní vzorek) ukazují změnu substrátu z hlediska modro-fialové linky! Pokud tato kritéria nejsou splněna, jsou výsledky neplatné a test je nutné opakovat.

Poznámka: V případech cut off mezních hodnot pro vzorky se test opakuje nebo se provede jiným způsobem. Séra pacientů v případech mnoha autoimunitních onemocnění často obsahují několik specifických protilátek. Taková séra mohou vykazovat pozitivní reakci na více než jednu řadu antigenů.

## INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Intenzita modro-fialového proužku v místě, kde je nakoutován antigen je přímo úměrná koncentraci IgG protilátek přítomných v testovaném vzorku.

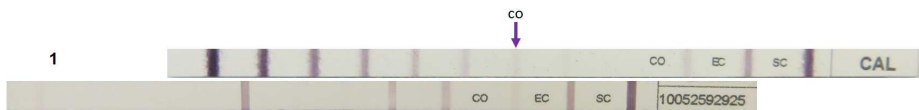
### Semi-kvantitativní hodnocení stripů vzorků:

negativní:	Intenzita vzorku pacientova proužku je slabší než intenzita proužku CO
mezní:	Intenzita proužku pacientova vzorku je ekvivalentní s intenzitou CO-proužku
slabě pozitivní:	Intenzita pacientova proužku je o 1 úroveň silnější než intenzita proužku CO
pozitivní:	Intenzita pacienta vzorku je až až 2 úrovně silnější než intenzita proužku CO
silně pozitivní:	Intenzita pacienta vzorku je ≥ o 3 úrovně silnější než intenzita proužku CO

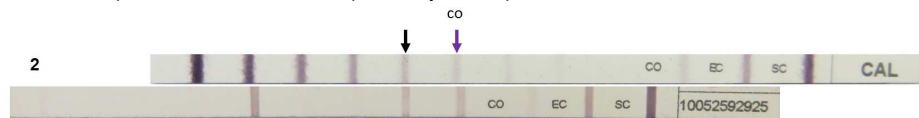
### Výklad intenzity modro-fialového proužku:

(1) Porovnejte intenzitu CO linií na patientském stripu s intenzitou linií na kalibračním stripu.

Příklad:



(2) Porovnejte intenzitu linií pacientova vzorku s intenzitou kalibračním stripu.  
Příklad: Interpretace intenzita linie vzorku pacienta je "slabě pozitivní".



## CHARAKTERISTIKY VÝKONNOSTI

### KALIBRACE

Test Systém je kalibrován proti mezinárodně uznávaného referenčního séra od CDC, Atlanta

### Rozsah měření

Hodnocení intenzity modré linie, jak je popsáno výše, umožňuje semikvantitativní stanovení protilátek tříd IgG testovaného vzorku do kvantifikace rozsahů:

negativní, hraniční, slabě pozitivní, pozitivní, silně pozitivní  
(negative, borderline, weak positive, positive, strong positive)

### Předpokládané hodnoty

V běžném rozsahu studie vzorků séra dárců zdravé krve byly stanoveny následující rozsahy pomoci kvantitativní analýzy. Cut off: hraniční

### INTERPRETACE VÝLEDKŮ

Normální: negativní

Zvýšené: slabě pozitivní, pozitivní, silně pozitivní

### Linearita

Vzorky pacientů obsahující vysoké hladiny specifických protilátek byly ředěny vzorku pufru. Účinnost každého ředění byla stanovena pomocí kalibračního proužku.

Linearita				
Vzorek	Ředění	Pozorovaná	Očekávaná	
1	1:100	strong positive	strong positive	PASS
	1:200	positive	positive	PASS
	1:400	weak positive	weak positive	PASS
	1:800	borderline	borderline	PASS
2	1:1600	negative	negative	PASS
	1:100	strong positive	strong positive	PASS
	1:200	positive	positive	PASS
	1:400	weak positive	weak positive	PASS
	1:800	borderline	borderline	PASS
	1:1600	negative	negative	PASS

### Límit detekce

Immunoblot je semi-quantitativní metoda. Každý reaktivita nižší než je hodnota hraniční je považována za negativní a nelze ji již kvantifikovat dále.

### Technické údaje

Intra-assay přesnost: Variační koeficient (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 24 stanovení v jednom cyklu. Výsledky pro přesnost analýzy jsou uvedeny v tabulce níže.

Intra-assay přesnost: Variační koeficient (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 6 stanovení v 5

různých cyklech. Výsledky přesnosti mezi cykly jsou uvedeny v tabulce níže.

Intra-Assay			Inter-Assay		
Vzorek	Průměr	Result	Vzorek	Průměr	Result
1	negative	PASS	1	negative	PASS
2	weak	PASS	2	weak	PASS
3	positive	PASS	3	positive	PASS

### Interference

Nebyla pozorována žádná interference se séry, která byla hemolytická (až do 1 000 mg/dl), lipemická (až do 3g/dl triglyceridů) nebo obsahovala bilirubin (až 40 mg/dl). Taktéž nebyly pozorovány žádné interference s použitím antikoagulancií (EDTA, heparin, citrát).

### Výsledky studie

Study population	n	n_pos	%
SLE	25	23	92.0
Sjogren's Syndrome	15	14	93.3
MCTD	10	9	90.0
Scleroderma	5	5	100.0
CREST	5	5	100.0
Disease controls (Rheumatoid arthritis)	20	1	5.0
Normal human sera	80	2	2.5

		Klinická diagnóza		
		pozitivní	negativní	
ORG 711	pozitivní	56	3	160
Nucleo-9-Line	negativní	4	97	
		60	100	
	senitivitát	93.3	%	
	specificita	97.0	%	
	diagnostická efektivita	95.6	%	

### HRANICE METODY

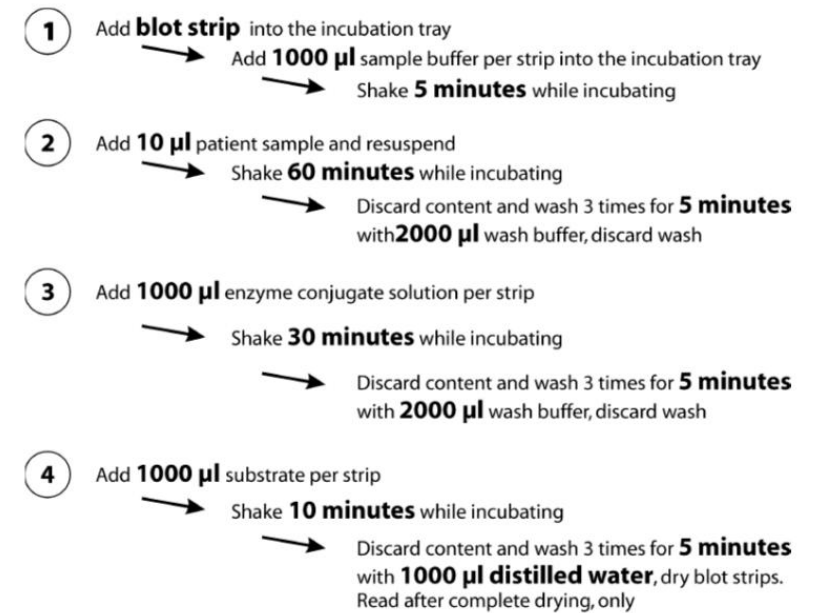
Tento test je diagnostická pomůcka. Definitivní klinická diagnóza by neměla být založena na výsledcích jediného testu, ale měla by být lékařem zhodnocena až po všech klinických a laboratorních vyšetřeních, které ukáží o celý klinický obrazem pacienta. Také každé rozhodnutí pro terapii by mělo být řešeno individuálně.

### REFERENCE

- Alba P, Bento L, Cuadrado MJ, Karim Y, Tungekar MF, Abbs I et al. Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(6):556-560.
- Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test. *Lupus* 2010; 19(8):906-912.
- Brouwer R, Hengstman GJ, Vree EW, Ehrfeld H, Bozic B, Ghirardello A et al. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(2):116-123.
- Castro C, Gourley M. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S238-S247.
- Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, Grosso S, Cereda A, Guercilena G et al. Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2011; 10(3):150-154.
- Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, Hallmans G, Wadell G, Rantapaa-Dahlqvist S. Autoantibodies predate the onset of Systemic Lupus Erythematosus in northern Sweden. *Arthritis Research & Therapy* 2011; 13(1):R30.
- Haugbro K, Nossent JC, Winkler T, Figenschau Y, Rekvig OP. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity. *Ann Rheum Dis JID* - 0372355 2004; 63(4):386-394.
- Ippolito A, Wallace DJ, Gladman D, Fortin PR, Urowitz M, Werth V et al. Autoantibodies in systemic lupus

erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity. *Lupus* 2011; 20(3):250-255.

9. Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46(7):1052-1056.
10. Kattah NH, Kattah MG, Utz PJ. The U1-snRNP complex: structural properties relating to autoimmune pathogenesis in rheumatic diseases. *Immunol Rev* 2010; 233(1):126-145.
11. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol* 2009; 4:1.
12. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1420-1422.
13. Petri M, Magder L. Classification criteria for systemic lupus erythematosus: a review. *Lupus* 2004; 13(11):829-837.
14. Poole BD, Schneider RI, Guthridge JM, Vette CA, Reichlin M, Harley JB et al. Early targets of nuclear RNP humoral autoimmunity in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; 60(3):848-859.
15. Putova I, Dostal C, Becvar R. Prevalence of antinucleosome antibodies by enzyme-linked immunosorbent assays in patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1109:275-286.
16. Reveille JD. Predictive value of autoantibodies for activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus JID* - 9204265 2004; 13(5):290-297.
17. Simon JA, Cabiedes J, Ortiz E, Alcocer-Varela J, Sanchez-Guerrero J. Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(2):220-224.
18. Sinclair D, Saas M, Williams D, Hart M, Goswami R. Can an ELISA replace immunofluorescence for the detection of anti-nuclear antibodies?--The routine use of anti-nuclear antibody screening ELISAs. *Clin Lab* 2007; 53(3-4):183-191.
19. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002; 117(2):316-324.
20. Maidhof W., Hilius O. Lupus: an overview of the disease and management options. *P T* 2012; 37(4):240-9.
21. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012; 64(6):797-808.



Change Control

Former version: *ORG 711\_IFU\_CS\_QM115748\_2014-04-24\_2*

Reason for revision: *New batchcoding system, code on strip revised.*