

## 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 740 Gastro-5-Line

### KRÁTKÝ POPIS

Gastro-5-Line imunoblot je membránový na bázi enzymů založený test pro semi-kvantitativní měření třídy protilátek IgG a IgA proti intrinsic factor, parietal cell H+/K+-ATPase, tissue transglutaminase, Mannan from *Saccharomyces cerevisiae*, gliadin ve vzorcích lidského séra nebo plasmu. Tento výrobek je určen pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.

### POUŽÍVANÉ SYMBOLY

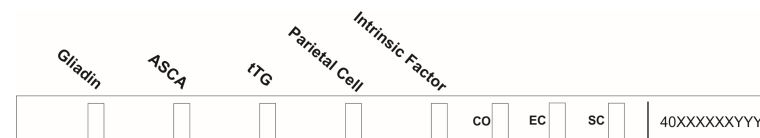
	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Výrobce
	Katalogové číslo
	16 Dostačuje pro
	Kód šarže
	Spotřebujte do
	Teplotní omezení
	Viz návod k použití
	Chraňte před slunečním světlem
	Pro jednorázové použití
	Datum výroby

	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 intrinsic factor, parietal cell H+/K+-ATPase, tissue transglutaminase, Mannan from *Saccharomyces cerevisiae* a gliadin stejně jako tři antigeny pro CO cut-off mezní kontrolní vzorek, EC kontrolní vzorek konjugátu a SC sérový kontrolní vzorek jsou vázány na nitricelulózový proužek.

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.
- Vyhněte 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 plazmy 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.
- Vyhnout se opakovanému rozmrazení a zmrazení! To může vést ke ztrátě aktivity autoprotilátek nebo protilátek.
- Používání tepelně inaktivovaných sér se nedoporučuje.

## OBSAH SOUPRAVY

▽ 8	ORG 740-08	Dostačuje pro 8 stanovení
▽ 16	ORG 740-16	Dostačuje pro 16 stanovení
<b>BLOT STRIPS</b>	1x/2x	8 kusů nitrocelulózových proužků s nakoutovanými antigeny. K okamžitému použití. 1 Předpřipravený nitrocelulózový kalibrační strip (označené CAL) pro semikvantitativní hodnocení. K okamžitému použití. Kód produktu na proužku: <b>40</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+IgA, 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 vzuchové 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 (1!).

**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+IgA protilátek přítomných v testovaném vzorku.

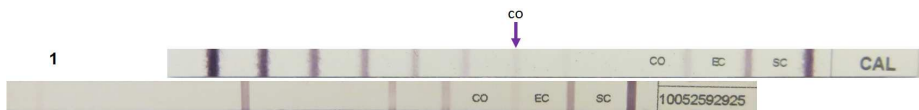
### Semi-kvantitativní hodnocení stripů vzorků:

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

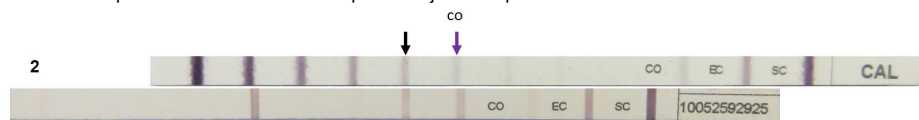
### Výklad intenzity modro-fialového proužku:

(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

Citlivost, specifita a odezva na dávku Gastro-5-Line imunoblotu byla hodnocena pomocí klinicky definovaných domácích kontrolních séra obsahující různé relativní množství sér se známou specifitostí.

### Rozsah měření

Hodnocení intenzity modré linie, jak je popsáno výše, umožňuje semikvantitativní stanovení protilátek tříd IgG+IgA 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 pomocí kvantitativní analýzy. Cut off: hraniční

### INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

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
	1:1600	negative	negative	PASS
2	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

Imunoblot je semi-kvantitativní 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 antikoagulantů (EDTA, heparin, citrát).

### Výsledky studie

Study population	n	n_pos	%
Coeliac disease	100	98	98.0
Pernicious anaemia	85	74	87.1
Normal human sera	150	6	4.0

		Klinická diagnóza		
		pozitivní	negativní	
ORG 740	pozitivní	172	6	335
Gastro-5-Line	negativní	13	144	
		185	150	

senitivitát	93.0	%
specifická	96.0	%
diagnostická efektivita	94.3	%

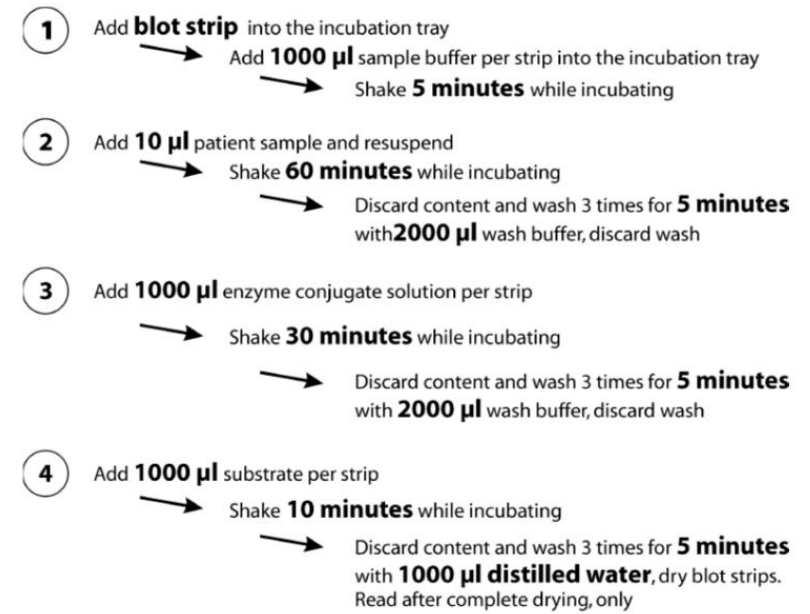
### HRANICE METODY

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

- Carmel, R. Reassessment of the relative prevalence of antibodies to gastric parietal cell and to intrinsic factor in patients with pernicious anaemia: influence of patient age and race. Clin. Exp. Immunol., 1992, 89:74-77.
- Schade, S.G., P.L. Feick, M.H. Imrie, and R.F. Schilling. In vitro studies on antibodies to intrinsic factor. Clin. Exp. Immunol. 1967, 2:399-413.
- Uibo, R., Krohn, K., Villako, K., Tammur, T., Tamm, A. The relationship of parietal cell, gastrin cell and thyroid autoantibodies to the state of the gastric mucosa in a population sample. Scand. J.Gastroenterol. 1984, No. 19, pp. 1075-1080.
- Rabon, E. C. and Reuben M. A. The mechanism and structure of the gastric H/K-ATPase. Ann. Rev. Physiol. 1990, No. 52, pp. 321-344.
- Fesus, L., and M. Piacentini. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Trends Biochem. Sci., 2002, 27:534-539.
- Dieterich, W. et al. Autoantibodies to tissue Transglutaminase as predictors of celiac disease. Gastroenterol., 1998, 115:1317-1321.
- Dieterich, W. Et al., Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nature Med., 1997, 3:797-801.
- Sendid, B., J.F. Colombel, P.M. Jacquinet, C. Faille, J. Fruit, A. Cortot, D. Lucidarme, D. Camus, and D. Poulain. Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's Disease. Clin.Diag. Lab. Immunol., 1996, 3(2):219-226.
- Main, J., H. McKenzie, G.R. Yeaman, M.A. Kjerr, D. Robson, and C.R. Pennington. Antibody to Saccharomyces cerevisiae (baker's yeast) in Crohn's disease. Brit. J. Med., 1988, 297:1105-1106.
- McKenzie, H., J. Main, C.R. Pennington, and D. Parrat. Antibody to selected strains of Saccharomyces

cerevisiae (baker's and brewer's yeast) and Candida albicans in Crohn's disease. Gut, 1990, 31:536-538.  
11. Sollid, L.M. Celiac disease: Dissecting a complex inflammatory disorder. Nature Rev., 2002, 2:647-655.  
12. Dieterich, W. et al. Serum antibodies in Celiac Disease. Clin. Lab., 2000, 46:361-364.



Change Control

Former version: *ORG 740\_IFU\_CS\_QM115751\_2014-04-24\_2*

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