

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 722 Liver-9-Line 2nd Generation

KRÁTKÝ POPIS

Liver-9-Line 2nd Generation imunoblot je membránový na bázi enzymů založený test pro semi-kvantitativní měření třídy protilátek IgG proti AMA-M2, Sp100, gp210, SLA/LP, LKM-1, LC1, F-Actin, Actinin, Tropomyosin ve vzorcích lidského séra nebo plasmu. Tento výrobek je určen pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.

POUŽÍVANÉ SYMBOLY

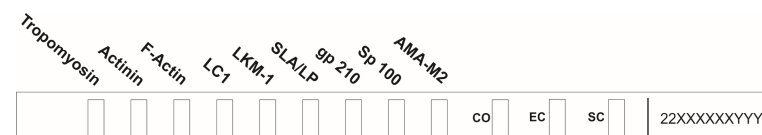
	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Výrobce
	Katalogové číslo
	Dostačuje pro
	Kód šarže
	Spotřebuje do
	Teplotní omezení
	Viz návod k použití
	Chraňte před slunečním světlem
	Pro jednorázové použití
	Datum výroby

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

PRINCIP TESTU

Na membránu z nitrocelulózy jsou naneseny v proučích vysoce purifikované antigeny AMA-M2, Sp100, gp210, SLA/LP, LKM-1, LC1, F-Actin, Actinin a Tropomyosin stejně jako tři antigeny pro CO cut-off mezní kontrolní vzorek, EC kontrolní vzorek konjugátu a SC sérový kontrolní vzorek jsou vázány na nitrocelulóзовый prouček.

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.
 - Vyhňte 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, opláchnete 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 politý 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.
- Vyhýbat se opakovanému rozmrazení a zmrazení! To může vést ke ztrátě aktivity autoprotiátek nebo protilátek.
- Používání tepelně inaktivovaných sér se nedoporučuje.

OBSAH SOUPRAVY

▽ 8	ORG 722-08	Dostačuje pro 8 stanovení
▽ 16	ORG 722-16	Dostačuje pro 16 stanovení
BLOT STRIPS	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: 22
DILUENT	1x 20 ml	Vzorkový pufr PB, žlutá; obsahuje PBS, BSA, saponáty, ochranný prostředek azid sodný 0.09%. Připraven k použití.
CONJUGATE	1x 20 ml	Enzymový konjugát; světle červená; obsahuje protilidské protilátky IgG, označeno alkalické fosfatázy; PBS, BSA, detergent, ochranný prostředek PROCLIN 0.05%
WASH	1x 20 ml	Promývací pufr WB; obsahuje Tris, detergent, ochranný prostředek azid sodný 0,09%; 50x koncentrát.
BCIP	1x/2x 10 ml	Substrátový roztok (BCIP/NBT). Připraven k použití.
	1x/2x	Inkubační vanička
	1x/2x	Dokumentační list
i	1x	Návod k použití: Mini-DVD
i	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.

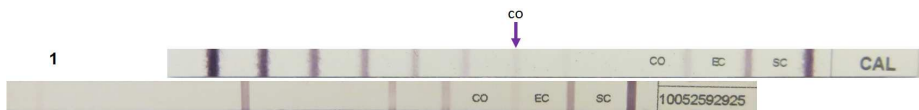
Semi-kvantitativní hodnocení stripů vzorků:

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

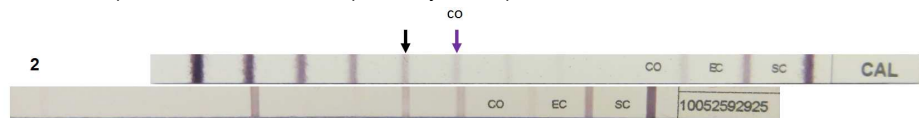
Výklad intenzity modro-fialového proužku:

(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

Citlivost, specifita a odezva na dávku Liver-9-Line 2nd Generation imunoblotu byla hodnocena pomocí klinicky definovaných domácích kontrolních séra obsahující různé relativní množství sér se známou specifícností.

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 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

Immunoblot 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	%
Autoimmune hepatitis AIH	59	51	86.4
Primary biliary cirrhosis PBC	21	21	100.0
PBC overlap syndrome	9	9	100.0
Rheumatoid Arthritis RA	25	2	8.0
SLE	19	0	0.0
Thrombosis	16	1	6.3
Normal human sera	69	0	0.0

		Klinická diagnóza		
		pozitivní	negativní	
Liver-9-Line 2nd Generation	ORG 722 pozitivní	81	3	218
	negativní	8	126	
		89	129	
	senitivitát	91.0	%	
	specifická	97.7	%	
	diagnostická efektivita	95.0	%	

HRANICE METODY

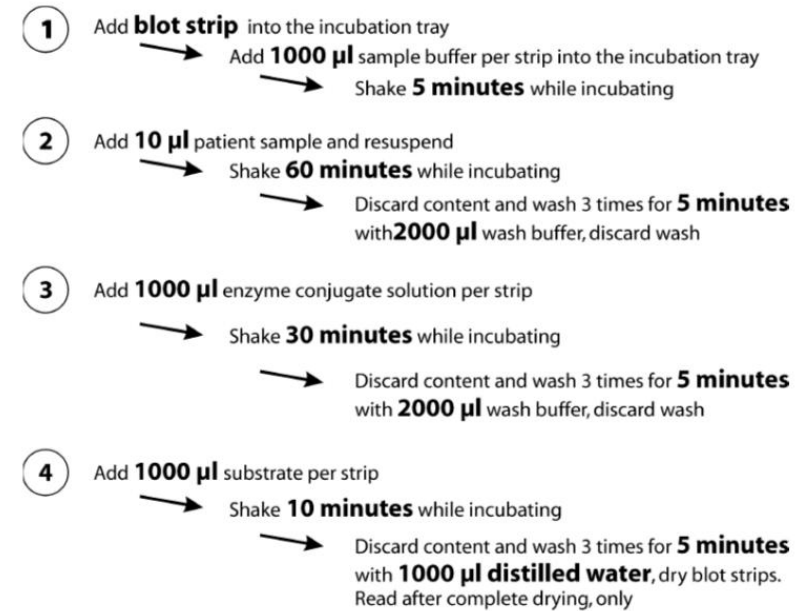
Tento test je diagnostická pomůcka. Definitivní klinická diagnóza by neměla být založena na výsledcích jediného testu, ale měla by být lékařem zhodnocena až po všech klinických a laboratorních vyšetřeních, které ukáží o celý klinický obrazem pacienta. Také každé rozhodnutí pro terapii by mělo být řešeno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

REFERENCE

- F. Alvarez et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 31; 929-938, 1999.
- D. P. Bogdanos et al. Anti-gp210 antibody mirrors disease severity in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 45; 1583-1584, 2007.
- D. P. Bogdanos et al. Autoantibodies and their antigens in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 29; 241-253, 2009.
- A. J. Czaja et al. Antibodies to soluble liver antigen, P450IID6, and mitochondrial complexes in chronic hepatitis. *Gastroenterology* 105; 1522-1528, 1993
- A. J. Czaja and H. A. Homburger. Autoantibodies in liver disease. *Gastroenterology* 120, 239-249, 2001.
- G. Dighiero et al. Sera with high levels of anti-smooth muscle and anti-mitochondrial antibodies frequently bind to cytoskeleton proteins. *Clin.Exp.Immunol.* 82; 52-56, 1990.
- M. Gueguen et al. Anti-liver kidney microsome antibody recognizes a cytochrome P450 from the IID subfamily. *J Exp Med* 168; 801-806, 1988.
- Gueguen, P et al. Double reactivity against actin and alpha-actinin defines a severe form of autoimmune hepatitis type 1. *J Clin.Immunol.* 26; 495-505, 2006.
- A. Granito et al. Antibodies to filamentous actin (F-actin) in type 1 autoimmune hepatitis. *J Clin.Pathol.* 59; 280

-284, 2006.

10. C. J. Hu et al. Primary biliary cirrhosis: what do autoantibodies tell us? *World J Gastroenterol.* 16; 3616-3629, 2010.
11. N. Kerkar et al. Cytochrome P4502D6 (193-212): A new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type I-positive liver disease. *J Immunol.* 2003, 170, 1481-1489.
12. E. L. Krawitt. Autoimmune hepatitis. *N.Engl.J Med.* 354; 54-66, 2006.
13. M. Lenzi, P. et al. Liver cytosolic 1 antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Gut* 36; 749-754, 1995.
14. G. Maggiore et al. Autoimmune diseases of the liver and biliary tract and overlap syndromes in childhood. *Minerva Gastroenterol.Dietol.* 55; 53-70, 2009.
15. M. P. Manns and A. Vogel. Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. *Hepatology* 43; S132-S144, 2006.
16. L. Muratori et al. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* 42; 721-726, 1998.
17. L. Muratori et al. Antimitochondrial antibodies and other antibodies in primary biliary cirrhosis: diagnostic and prognostic value. *Clin Liver Dis* 12; 261-276, 2008.
18. P. Muratori et al. The serological profile of the autoimmune hepatitis/primary biliary cirrhosis overlap syndrome. *Am J Gastroenterol.* 104; 1420-1425, 2009.
19. E. I. Rigopoulo et al. Autoimmune hepatitis-specific antibodies against soluble liver antigen and liver cytosol type 1 in patients with chronic viral hepatitis. *J Autoimmune. Dis* 4; 2, 2007.
20. D. Vergani et al. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group *J Hepatol.* 41; 677-683, 2004.
21. I. Wies et al. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 355; 1510-1515, 2000.
22. K. Zachou et al. Anti-alpha actinin antibodies as new predictors of response to treatment in autoimmune hepatitis type 1. *Aliment.Pharmacol Ther* 35; 116-125, 2012.
23. A. Zamanou et al. Anti-smooth muscle antibodies (ASMAs) and anti-cytoskeleton antibodies (ACTAs) in liver diseases: a comparison of classical indirect immunofluorescence with ELISA. *J. Clin. Lab Anal.* 16; 194-201 2002.



Change Control

Former version: *ORG 722_IFU CS_QM140482_2014-04-24_2*

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