



### 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

M2/nPDC	E1, E2, E3 podjednotky komplexu pyruvátdehydrogenázy (purifikované z bovinního srdce)
gp210	Glykoprotein komplexu jaderných pórů (sekvence 36 aminokyselin odpovídající C-koncovému cytoplazmatickému ocasu gp210, lidský, rekombinantní, exprimovaný v E. coli)
sp100	Protein 100 kD jaderného tělíska (rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem)
LKM1	Cytochromoxidáza P450 2D6 (antigen mikrozomu jater a ledvin typu I), v úplné délce (rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem)
LC1	Formiminotransferáza cyklodeamináza (antigen jaterního cytosolu typu I) (rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem)
SLA	Solubilní jaterní antigen (rekombinantní, lidský, exprimovaný v bakteriálních buňkách E.coli)
F-aktin	In vitro polymerizovaná aktinová filamenta (připravená z purifikovaného G-aktinu (králíčí kosterní sval))

### 3.3 Reaktivní složky

Látka	Původ	Zamýšlený účel souprav LIVER	Koncentrace v soupravách LIVER	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.
Antigen M2/nPDC	Purifikováno z bovinního srdce	Biomarker (antigen) potažený na prouzcích	< 0,5 mg/ml Jedna skvrna M2/nPDC = 0,5 µl na každém proužku	> 80 %
Antigen gp210	Rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách E.coli	Biomarker (antigen) potažený na prouzcích	< 0,5 mg/ml Jedna skvrna gp210 = 0,5 µl na každém proužku	> 80 %
Antigen sp100	Rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem	Biomarker (antigen) potažený na prouzcích	< 0,5 mg/ml Jedna skvrna sp100 = 0,5 µl na každém proužku	> 80 %
Antigen LKM1	Rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem	Biomarker (antigen) potažený na prouzcích	< 0,5 mg/ml Jedna skvrna LKM1 = 0,5 µl na každém proužku	> 80 %
Antigen LC1	Rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách Sf9 infikovaných bakulovirem	Biomarker (antigen) potažený na prouzcích	< 0,5 mg/ml Jedna skvrna LC1 = 0,5 µl na každém proužku	> 80 %
Antigen SLA	Rekombinantní, lidský, exprimovaný v buňkách E.coli	Biomarker (antigen) potažený na prouzcích	< 0,5 mg/ml Jedna skvrna SLA = 0,5 µl na každém proužku	> 80 %
Antigen F-actin	Připraveno z purifikovaného G-aktinu (králíčí kosterní sval)	Biomarker (antigen) potažený na prouzcích	< 0,5 mg/ml Jedna skvrna F-aktin = 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-vět
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-vět
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-vět
NaN <sub>3</sub>	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-vět
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 částičky 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 zabarvené 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:

**Pozitivní 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**.

*Přípravte 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 3x 3 minuty 1,5 ml naředěného promývacího roztoku** na jamku (protřepávejte).  
*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 3x 3 minuty 1,5 ml naředěného promývacího roztoku** (protřepajte)  
*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 1x 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:

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

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 začnete 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

1. 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).
2. Intenzita výsledku nemusí být nutně spojena se stupněm intenzity onemocnění, ale spíše s detekovanou hladinou protilátek.
3. 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.
4. 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 přetrvá, kontaktujte svého distributora.
5. 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.
6. 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	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Použití <ul style="list-style-type: none"> <li>- nesprávné pipetování séra</li> <li>- aplikace nesprávného objemu</li> <li>- použití dvou různých vzorků téhož pacienta (viz část 10.3.6) nebo nesprávná manipulace se vzorkem / nesprávné skladování vzorku mezi testy</li> <li>- chybná vizuální interpretace</li> <li>- chybné čtení softwaru Dr Dot</li> <li>→ zopakujte test</li> </ul> </li> <li>- Materiál <ul style="list-style-type: none"> <li>- interferující látka ve vzorku</li> <li>- vzorek je poolovanou směsí různých lidských sér</li> <li>→ zopakujte test a potvrďte jinými metodami</li> </ul> </li> <li>- Metoda <ul style="list-style-type: none"> <li>- vnitřní výkon soupravy (viz část 11.2 <i>Analytická senzitivita a specifita</i>)</li> <li>- exspirovaná souprava</li> <li>- problém se stabilitou</li> </ul> </li> </ul> <p><b>S dalšími požadavky na technickou podporu kontaktujte svého distributora.</b></p>
Různé výsledky v rámci jedné šarže nebo mezi několika šaržemi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Použití <ul style="list-style-type: none"> <li>- nesprávné pipetování séra</li> <li>- aplikace nesprávného objemu</li> <li>- chybná vizuální interpretace nebo</li> <li>- chybné čtení softwaru Dr Dot</li> <li>→ zopakujte test</li> </ul> </li> <li>- Metoda <ul style="list-style-type: none"> <li>- vnitřní výkon soupravy (viz část 11.1 <i>Opakovatelnost a reprodukovatelnost</i>)</li> </ul> </li> </ul>
Kontaminace mezi sousedními proužky	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Použití <ul style="list-style-type: none"> <li>- nesprávné pipetování séra</li> <li>→ zopakujte test</li> </ul> </li> </ul>
Chybějící nebo slabá RC	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Použití <ul style="list-style-type: none"> <li>- sérum není vůbec napipetováno</li> <li>→ zopakujte test</li> <li>- pacient s imunoglobulinovou deficiencí</li> <li>→ potvrďte stav pacienta opakovaním testu</li> <li>- poškozená činidla</li> <li>→ zkontrolujte integritu činidel</li> <li>→ v případě podezření na problém kontaktujte svého dodavatele</li> <li>- tečka není na proužku</li> <li>→ spočítejte tečky na proužku; pokud počet není správný, kontaktujte svého dodavatele</li> </ul> </li> </ul>
Chybějící CO	<ul style="list-style-type: none"> <li>- poškozená činidla</li> <li>→ zkontrolujte integritu činidel; v případě podezření na problém kontaktujte svého distributora</li> <li>- tečka se nenachází na proužku</li> <li>→ spočítejte tečky na proužku; v případě nesprávného počtu kontaktujte svého distributora</li> </ul>
Nespecifická vazba / vysoké pozadí / vysoká hodnota CO	<ul style="list-style-type: none"> <li>- suspektní přítomnost kontaminace nebo interferující látky ve vzorku pacienta</li> <li>→ zopakujte test a potvrďte jinou metodou</li> </ul> <p><b>S dalšími požadavky na technickou podporu kontaktujte svého distributora.</b></p>

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 specifická**

- 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
Rheumatoidní faktor IgM	přibl. 500 IU/ml	přibl. 300 IU/ml	přibl. 100 IU/ml	Ano

- Poznámka: Nelze otestovat všechny možné interferující látky popsané v literatuře. Může dojít k jiným interferencím, mimo jiné interferencím indukovaným léky. Vysoká analytická specifická testu je zaručena kvalitou použitého antigenu. Tato souprava detekuje protilátky IgG proti M2/nPDC, gp210, sp100, LKM1, LC1, SLA a F-aktinu. Nebyly zjištěny žádné zkřížené reakce s dalšími autoprotilátkami.

**11.4 Klinická senzitivita a specifická**

Senzitivita a specifická 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.

<b>Senzitivita:</b> 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 (%)
M2/nPDC	211	32	87
gp210	23	0	> 99
sp100	22	0	> 99
LKM1	44	6	88
LC1	18	0	> 99
SLA	41	2	95
F-aktin	49	9	84

<b>Specifická:</b> 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 (%)
M2/nPDC	241	2	99
gp210	36	0	> 99
sp100	37	0	> 99
LKM1	275	1	99
LC1	202	2	99
SLA	177	2	99
F-aktin	247	7	97

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

### 11.5 Diagnostické hodnoty autoprotilátek

Anti-M2/nPDC	<p>Anti-M2/nPDC jsou markerové protilátky primární biliární cholangitidy (PBC) a jsou detekovatelné téměř v 95 % případů. Jsou zahrnuty do tří diagnostických kritérií pro PBC.</p> <p>Ačkoli jsou vysoce specifické pro PBC, lze Anti-M2/nPDC detekovat také u pacientů s chronickými zánětlivými revmatickými onemocněními. Předpokládá se, že u těchto pacientů je kromě základního onemocnění zvýšené riziko vzniku PBC. Riziko rozvoje PBC je zvýšené zejména u Anti-M2/nPDC pozitivní varianty CREST systémové sklerózy (Fregeau et al., 1988; Zurgil et al., 1992). U pacientů se SLE je přítomnost Anti-M2/nPDC významně spojena se zvýšenou hladinou aminotransferáz (Li et al., 2006).</p> <p>Anti-M2/nPDC jsou detekovatelné u 3–6 % pacientů s autoimunitní hepatitidou (AIH) typu 1. Nejčastěji se jedná o překryvný syndrom AIH/PBC. O překryvu AIH/PBC by se mělo uvažovat, pokud je poměr ALP a aminotransferáz menší než 1,5, IgG je zvýšený a SMA jsou přítomny v titru vyšším než 1 : 80 (Bowlus &amp; Gershwin, 2014).</p> <p>Anti-M2/nPDC mohou být prediktivní. Mohou se objevit řadu let před projevem PBC. Osoby s trvale vysokou hladinou protilátek Anti-M2/nPDC mají vyšší riziko vzniku PBC. Prospektivní studie ukázaly, že u 76 % asymptomatických Anti-M2/nPDC pozitivních pacientů je po dobu sledování od 11 do 24 let diagnostikována PBC (Metcalf et al., 1996). Prevalence Anti-M2/nPDC u příbuzných prvního stupně pacientů s PBC je vysoká (13,1 %) (Nakamura et al., 2014).</p> <p>Titry Anti-M2/nPDC se v průběhu času nemění a nejsou spojeny se závažností ani progresí onemocnění (Benson et al., 2004). Na druhou stranu některé skupiny prokázaly, že při léčbě UDCA dochází k poklesu titru Anti-M2/nPDC (Nakamura et al., 2014).</p> <p>Anti-M2/nPDC přetrvávají po transplantaci jater</p>
Anti-gp210	<p>Protilátky anti-gp210 jsou vysoce specifické pro primární biliární cholangitidu (PBC) a jsou detekovatelné enzymovou imunoanalýzou u 10–45 % pacientů s PBC se specificitou 99,5 %.</p> <p>Vzácně nebo velmi vzácně se vyskytují u autoimunitní hepatitidy, chronické hepatitidy B (12,6 %), revmatoidní artritidy, polymyozitidy nebo Sjögrenova syndromu. Jejich případná prediktivní hodnota není v současné době známa.</p> <p>Titry protilátek anti-gp210 závisí na aktivitě onemocnění nebo na pokročilosti onemocnění.</p> <p>Protilátky anti-gp210 jsou spojeny s mimojaterními projevy, jako je artritida. Jsou také považovány za prognostické markery špatného výsledku a korelují s vyšším rizikem jaterního selhání.</p> <p>Protilátky anti-gp210 přetrvávají po transplantaci jater, a jsou proto nevhodným markerem pro možnou recidivu onemocnění.</p>
Anti-sp100	<p>Protilátky anti-sp100 jsou specifické (97 %) pro primární biliární cholangitidu (PBC) s diagnostickou senzitivitou 20–40 %. Tyto autoprotilátky se vyskytují relativně často (48 %) ve skupině AMA negativních pacientů s klinicky a histologicky prokázanou PBC.</p> <p>Zdá se, že protilátky anti-sp100 jsou spojené s infekcemi močových cest. 74 % pacientů s PBC trpících infekcemi močových cest je pozitivních na protilátky anti-sp100 (Bogdanos et al., 2003).</p> <p>V nízké frekvenci byly protilátky anti-sp100 zjištěny u revmatoidního onemocnění (3 % u revmatoidní artritidy, až 10 % u systémového lupusu erythematoses, ~5 % u systémové sklerózy, 2 % u Sjögrenova syndromu).</p> <p>Protilátky anti-sp100 přetrvávají po transplantaci jater, a jsou proto nevhodným markerem pro možnou recidivu onemocnění.</p>
Anti-LKM1	<p>Protilátky LKM1 jsou markerové protilátky autoimunitní hepatitidy (AIH) typu 2 a jsou zahrnuty do diagnostických kritérií AIH Mezinárodní skupiny pro autoimunitní hepatitidu se senzitivitou 90–95 % u (převážně) mladých pacientů. Jsou také součástí zjednodušených kritérií AIH. Pacienti s AIH typu 2 bývají typicky negativní na ANA a SMA. U primární biliární cholangitidy (PBC) a primární sklerozující cholangitidy (PSC) bývají protilátky LKM1 jen zřídka detekovány. Protilátky proti LKM1 se vyskytují v ~ 50–60 % případů společně s protilátkami LC1, lze je však detekovat i izolovaně.</p>
Anti-LC1	<p>Protilátky LC1 jsou detekovatelné u 30–59 % pacientů s autoimunitní hepatitidou (AIH) typu 2 a jsou diagnostickým kritériem Mezinárodní skupiny pro autoimunitní hepatitidu. Vyskytují se převážně u dětí a mladších pacientů a jsou často spojeny s protilátkami LKM1. U 50–60 % pacientů s pozitivními protilátkami LKM1 jsou protilátky LC1 detekovány také jako druhá markerová protilátka AIH typu 2. U ~ 10 % pacientů s AIH typu 2 jsou však protilátky LC1 jedinými markerovými protilátkami. U AIH typu 2 u dětí se protilátky proti LC1 vyskytují častěji (59 %) než u dospělých (28,6 %).</p>
Anti-SLA	<p>Protilátky SLA/LP jsou vysoce specifické pro autoimunitní hepatitidu (AIH) typu 3. Přestože definice AIH typu 3 je sporná, jelikož se klinicky ani terapeuticky neliší od AIH typu 1, zjevně se jedná o samostatnou entitu vzhledem k protilátkám SLA/LP. Uvádí se, že diagnostická senzitivita je 19–33 %. Jejich pozitivní prediktivní hodnota je téměř 100 %.</p>
Anti-F-aktin	<p>Vysoké titry anti-F-aktinu jsou markerové protilátky a jsou tedy diagnostickým kritériem Mezinárodní skupiny pro autoimunitní hepatitidu (International Autoimmune Hepatitis Group; tři body ve skórovacím systému za titr &gt; 1 : 80, dva body za 1:80 a jeden bod za 1:40) pro autoimunitní hepatitidu (AIH) typu 1. Jsou také součástí zjednodušených kritérií AIH. Velmi často jsou spojeny s antijadernými protilátkami (ANA), které však mohou být izolovaně pozitivní u ~35 % pacientů s AIH typu 1. Diagnostická senzitivita AIH typu 1 je ~ 80 % a specificita 96 %. Negativní výsledek anti-F-aktinu proto nemůže zcela vyloučit AIH. Titr má omezenou korelaci s aktivitou onemocnění. S aktivitou onemocnění jsou spojeny pouze vysoké titry &gt; 1 : 80. Titr protilátek při diagnóze ani chování protilátek v průběhu onemocnění nejsou prognostickými markery. Poznámka: U dětí může být diagnosticky relevantní titr 1:20.</p> <p>Většina nízkých titrů anti-F-aktinu se vyskytuje u virových infekcí, jako je infekční mononukleóza, chronická hepatitida C (8–10 %), ale také u revmatických onemocnění, primární biliární cholangitidy (PBC) (22 %), u pacientů s alkoholickým onemocněním jater (3–16 %) a u nádorových onemocnění. Jejich prevalence u zdravých jedinců je ~ 5 %.</p>

Odkazy na literaturu:

- 1: Chen BH, Wang QQ, Zhang W, Zhao LY, Wang GQ. Screening of anti-mitochondrial antibody subtype M2 in residents at least 18 years of age in an urban district of Shanghai, China. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016 May;20(10):2052-60. PMID: 27249604.
- 2: Pang SY, Dai YM, Zhang RZ, Chen YH, Peng XF, Fu J, Chen ZR, Liu YF, Yang LY, Wen Z, Yu JK, Liu HY. Autoimmune liver disease-related autoantibodies in patients with biliary atresia. *World J Gastroenterol.* 2018 Jan 21;24(3):387-396. doi: 10.3748/wjg.v24.i3.387. PMID: 29391761; PMCID: PMC5776400.
- 3: Zandanell S, Strasser M, Feldman A, Tevini J, Strebinger G, Niederseer D, Pohla-Gubo G, Huber-Schönauer U, Ruhaltinger S, Paulweber B, Datz C, Felder TK, Aigner E. Low rate of new-onset primary biliary cholangitis in a cohort of anti-mitochondrial antibody-positive subjects over six years of follow-up. *J Intern Med.* 2020 Apr;287(4):395-404. doi: 10.1111/joim.13005. Epub 2019 Dec 4. PMID:31802567; PMCID: PMC7154539.
- 4: Calise SJ, Zheng B, Hasegawa T, Satoh M, Isailovic N, Ceribelli A, Andrade LEC, Boylan K, Cavazzana I, Fritzler MJ, de la Torre IG, Hiepe F, Kohl K, Selmi C, Shoenfeld Y, Tincani A, Chan EKL; IUIS Autoantibody Standardization Committee. Reference standards for the detection of anti-mitochondrial and anti-rods/rings autoantibodies. *Clin Chem Lab Med.* 2018 Sep 25;56(10):1789-1798. doi: 10.1515/cclm-2017-1152. PMID: 29478040; PMCID: PMC8128709.
- 5: Amin K, Rasool AH, Hattem A, Al-Karboly TA, Taher TE, Bystrom J. Autoantibody profiles in autoimmune hepatitis and chronic hepatitis C identifies similarities in patients with severe disease. *World J Gastroenterol.* 2017 Feb 28;23(8):1345-1352. doi: 10.3748/wjg.v23.i8.1345. PMID: 28293081; PMCID: PMC5330819.
- 6: Deng CW, Wang L, Fei YY, Hu CJ, Yang YJ, Peng LY, Zeng XF, Zhang FC, Li YZ. Exploring pathogenesis of primary biliary cholangitis by proteomics: A pilot study. *World J Gastroenterol.* 2017 Dec 28;23(48):8489-8499. doi: 10.3748/wjg.v23.i48.8489. PMID: 29358857; PMCID: PMC5752709.
- 7: Yannick Chantrana, Christophe Corpechotb, David Haddouk, et al., Groupe d'étude de l'auto-immunité (GEAI), 8eme Colloque, Anticorps anti-gp210 et anticorps anti-Sp100 dans la cirrhose biliaire primitive: une association de très mauvais pronostic, n°464 bis, juillet/août 2014
- 8: Karsten Conrad, Werner Schössler, Falk Hiepe, Marvin J. Fritzler, Book "Autoantibodies in organ Autoimmune Diseases", Volume 8, second edition - 2017
- 9: Vanderlocht J, van der Cruys M, Stals F, Bakker-Jonges L, Damoiseaux J. Multiplex autoantibody detection for autoimmune liver diseases and autoimmune gastritis. *J Immunol Methods.* 2017 Sep;448:21-25. doi: 10.1016/j.jim.2017.05.003. Epub 2017 May 16. PMID: 28522403.

**12. LIMITACE TESTU**

1. Výsledky získané v tomto potvrzovacím testu jsou nezávislé 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. Diagnóza autoimunitní hepatitidy (AIH) je založena na přítomnosti hypergamaglobulinemie, cytolyzy, cholestázy, autoprotilátek charakteristických pro AIH nebo PBC (primární biliární cholangitidu) a zánětlivých a nekrotických histologických lézí.
4. Koncentrace autoprotilátek ve vzorku séra není ve vztahu k výsledkům poskytovaným přístrojem.
5. Neexistuje žádná souvislost mezi koncentrací různých autoprotilátek zjištěných přístrojem a závažností s tím spojených autoimunitních onemocnění.



We Apply Science



Návod k použití  
LI7D-24/str. 10 z 12



We Apply Science



Návod k použití

LI7D-24/str. 11 z 12



We Apply Science



Návod k použití

LI7D-24/str. 12 z 12