



We Apply Science



**BlueDot**

**Polymyositis/Scleroderma<sup>12</sup> IgG**

Cat. No. PMS12D-24



D-tek s.a.

rue René Descartes 19

BE-7000 Mons BELGIUM

Tel. +32 65 84 18 88

Fax. +32 65 84 26 63

Email: [info@d-tek.be](mailto:info@d-tek.be)

Domovská stránka [www.d-tek.be](http://www.d-tek.be)

R.C. Mons 132.050 • T.V.A. BE 454.291.184 • BNP PARIBAS FORTIS IBAN BE21 0015 0659  
4603 BIC GEBABEBB ING IBAN BE58 3701 0463 3179 BIC BBRUBEBB

**OBSAH**

<b>1</b>	<b>Princip testu .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Složení soupravy .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Další potřebné vybavení k provedení testu .....</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Skladování a expirace .....</b>	<b>5</b>
<b>5</b>	<b>Bezpečnost práce .....</b>	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>Vzorky a jejich skladování .....</b>	<b>6</b>
<b>7</b>	<b>Pracovní postup .....</b>	<b>6</b>
<b>8</b>	<b>Interpretace výsledků.....</b>	<b>8</b>
<b>9</b>	<b>Charakteristiky soupravy.....</b>	<b>10</b>
<b>10</b>	<b>Omezení testu .....</b>	<b>10</b>
<b>11</b>	<b>Řešení nastalých problémů .....</b>	<b>13</b>
<b>12</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>13</b>
<b>13</b>	<b>Vysvětlení symbolů .....</b>	<b>16</b>

---

## **Immunodot souprava k detekci specifických protilátek třídy IgG proti nukleárním antigenům: Jo1, PL-7, PL-12, EJ, SRP, Mi-2, MDA-5, TIF1-γ, Ku PM-Scl 100 a Scl-70 a Ro52 v lidském séru nebo plazmě**

---

Více informací o typu a zdroji antigenů je k dispozici na naší domovské stránce [www.d-tek.be](http://www.d-tek.be), nebo u našich distributorů.

### **1 Princip testu**

Test je založen na principu enzymové imunoanalýzy. Antigeny jsou naneseny na membránu upevněnou na plastové podložce. V průběhu testu jsou jednotlivé stripy inkubovány s vyšetřovaným vzorkem, přičemž dochází k vazbě specifických protilátek přítomných ve vzorku na příslušné antigeny na stripu. Po promytí jsou stripy dále inkubovány s konjugátem (kozí protilátky namířené proti lidským IgG, konjugované s alkalickou fosfatázou). Vizualizace je provedena inkubací se substrátovým roztokem. Pokud je přítomna enzymatická aktivita, dojde ke vzniku fialových dotů v místě nanesení jednotlivých antigenů na membránu. Zbarvení je přímo úměrné koncentraci specifických IgG protilátek přítomných ve vzorku.

## 2 Složení soupravy

<b>BL stripy</b>	24 ks
<u>14 dotů na každém stripu:</u>	
1 Pozitivní kontrola (C+)	
12 antigenů	
1 Negativní kontrola (C-)	
<b>Ředící roztok vzorků</b>	1 × 40 ml
Žlutě zbarvený roztok určený k ředění vzorků (TBS, BSA, Tween), konzervován MIT, roztok v pracovním ředění	
<b>Konjugát</b>	1 × 40 ml
Červeně zbarvený roztok obsahující kozí imunoglobulin značený alkalickou fosfatázou namířený proti lidským IgG konzervován MIT, roztok v pracovním ředění	
<b>Substrát</b>	1 × 40 ml
Nažloutlý roztok (NBT/BCIP a), obsahuje 0,05% NaN <sub>3</sub> , roztok uchovávejte v originální tmavé láhce, roztok v pracovním ředění	
<b>Promývací roztok</b>	1 × 40 ml
10× koncentrovaný roztok, bezbarvý, s obsahem TBS, Tween, konzervovaný MIT, roztok určený k promytí stripů.	
<b>Inkubační vaničky</b>	3 × 8 ks

### Vysvětlivky ke zkratkám

**BSA** – albumin bovinního séra

**BCIP** - bromo-chloro-indolyl fostát

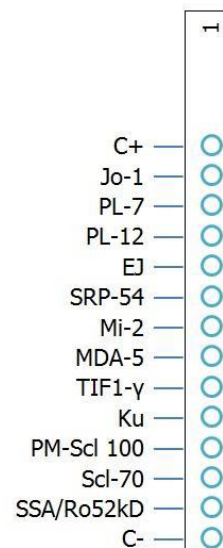
**MIT** – methylisothiazolinon

**NaN<sub>3</sub>** – azid sodný

**NBT** – nitrotetrazoliová modř

**TBS** – Tris pufr

### Ilustrační schéma stripu



### 3 Další potřebné vybavení k provedení testu

Mikropipety pro přesný objem

Špičky pro jednorázové použití

Jednorázové rukavice

Kývačka nebo třepačka

Budík

Odměrný válec

Pinzeta

Absorpční nebo filtrační papír

Destilovaná nebo deionizovaná voda

Nádoby na potenciálně infekční materiál

### 4 Skladování a expirace

Soupravu skladujte při teplotě +2 °C až +8 °C. Souprava nesmí zmrznout! Po otevření skladujte roztoky při +2 °C až +8 °C, preferujte originální obal soupravy. Substrát chraňte před slunečním zářením. Nepoužité stripy vraťte zpět do tuby se sušidlem, neprodyšně uzavřete a uchovávejte při +2 °C až +8 °C. Naředěný Promývací roztok skladujte při teplotě +2 °C až +8 °C. Při dodržení skladovacích podmínek platí expirace uvedená na obalech roztoků a stripů.

### 5 Bezpečnost práce

Souprava je určena pouze pro diagnostické účely in vitro. Souprava by měla být zpracována pouze kvalifikovaným personálem.

Při práci se vzorky sér je nutné dodržovat všechny místní předpisy týkající se bezpečnosti práce. Některé reagentie obsahují toxickou složku azid sodný. Vyvarujte se kontaktu s kůží.

Se vzorky sér je třeba zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem a likvidovat je v souladu s platnou legislativou. Komponenty soupravy a další pomůcky použité k provedení testu je nutné považovat vzhledem ke kontaktu s biologickým materiálem za potenciálně infekční. Proto je likvidujte společně s biologickým odpadem.

D-tek s.a. ani jeho autorizovaní distributoři **nesou zodpovědnost za případné škody, vzniklé v důsledku změny nebo nedodržení pracovního postupu.** Souprava musí být zpracována v souladu se všemi obecnými a individuálními podmínkami vyplývajícími ze správné laboratorní praxe.

## 6 Vzorky a jejich skladování

Vzorky krve odeberte do suchých sterilních zkumavek, popř. zkumavek obsahujících EDTA, heparin nebo citrát. Vyšetřované vzorky séra nebo plazmy je možno uchovávat při +2 °C až +8 °C maximálně tři dny. Při delším skladování vzorky zmrazte na -20 °C. Vyvarujete se opakovanému zamrazování/rozmrazování vzorků. Po rozmrazení vzorky důkladně promíchejte. Nařaděné vzorky je nutno vyšetřit co nejdříve.

## 7 Pracovní postup

### ZÁKLADNÍ INFORMACE, MANIPULACE A TIPY

Před použitím všechny komponenty temperujte při laboratorní teplotě (+18 °C až +25 °C). Celý test proveďte při laboratorní teplotě.

V průběhu testu je nezbytné promíchávání roztoků v inkubační vaničce, aby byla zajištěna efektivní cirkulace kapalin na membráně stripu. Přístrojem volby je kývačka (třepačka). Ujistěte se, že jste nastavili pohyb kývačky tak, aby nedošlo k rozlití roztoků nebo křížové kontaminaci mezi jamkami inkubační vaničky.

Po každém naplnění jamek roztokem, s inkubační vaničkou jemně zatřeste, dokud nebudou testované stripy zcela ponořeny. Odstraníte tak vzduchové bubliny, které se mohou zachytit pod stripy. Rovněž je možné ponořit stripy do roztoku tlakem (pinzetou nebo špičkou pipety) na horní straně stripu (plastová zóna).

Nedotýkejte se reaktivní zóny stripu prsty, pinzetou ani špičkou pipety. Pro manipulaci vždy používejte plastovou zónu. Celý postup je nutné provádět při pokojové teplotě.

### STRIPY (popis)

Na reaktivní (přední) straně stripů jsou naneseny antigeny viditelné jako světle modré body. Toto zbarvení prokazuje, že všechny antigeny byly správně naneseny na membránu. Světle modré zbarvení zmizí během první fáze inkubace. Po kontaktu s Promývacím roztokem se objevuje světle růžové zbarvení pozadí, které po vysušení stripů vymizí.

#### 7.1 Pracovní roztoky

Promývací roztok (koncentrovaný) ředte 10× destilovanou vodou.

Na jeden strip je potřeba 15 ml promývacího roztoku v pracovním ředění. Smíchejte 1,5 ml koncentrovaného Promývacího roztoku a 13,5 ml destilované vody.

## 7.2 Průběh testu

1. Rozmístěte požadovaný počet stripů do inkubační vaničky. Stripy umístěte reaktivní stranou (strana se světle modrými doty) směrem nahoru
2. Dávkujte 2 ml Promývacího roztoku v pracovním ředění do každé jamky inkubační vaničky. Smáčejte 10 min na třepače.

### Poznámka

Při správné inkubaci modré zbarvení dotů zcela vymizí. Pokud se tak nestane, prodlužte dobu smáčení stripů do doby vymizení zbarvení.

3. Odsajte roztok z jamek inkubační vaničky.

### Poznámka

Odstraňte roztok pomalým obrácením inkubační vaničky. Stripy se zachytí na dně jamek. Osušte okraj vaničky absorpčním papírem.

4. Pipetujte 1,5 ml Ředícího roztoku vzorků do jamky inkubační vaničky.
5. Pipetujte 10 µl vzorku do jamky inkubační vaničky. Inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě, vaničku umístěte na třepačku.

### Poznámka

Nedotýkejte se membrány špičkou pipety. Pipetujte vzorek přes horní plastovou část stripu. (Alternativně lze naředit vzorek v ředícím roztoku vzorků předem v kádince nebo zkumavce a poté přímo aplikovat do jamky inkubační vaničky).

6. Odsajte roztok z jamek inkubační vaničky.

### Poznámka

Odstraňte roztok pomalým obrácením inkubační vaničky. Stripy se zachytí na dně jamek. Osušte okraj vaničky absorpčním papírem.

7. Promyjte stripy v inkubační vaničce 3 × 3 minuty po 1,5 ml promývacího roztoku na jeden strip, vaničku umístěte na třepačku. Po každém promyti odstraňte roztok pomalým obrácením inkubační vaničky. Stripy se zachytí na dně jamek. Osušte okraj vaničky absorpčním papírem.
8. Pipetujte 1,5 ml Konjugátu do jamky inkubační vaničky. Inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě, vaničku umístěte na třepačku
9. Odsajte roztok z jamek inkubační vaničky.

### Poznámka

Odstraňte roztok pomalým obrácením inkubační vaničky. Stripy se zachytí na dně jamek. Osušte okraj vaničky absorpčním papírem.

10. Promyjte stripy v inkubační vaničce 3 × 3 minuty po 1,5 ml promývacího roztoku na jeden strip, vaničku umístěte na třepačku. Po každém promyti odstraňte roztok pomalým obrácením inkubační vaničky. Stripy se zachytí na dně jamek. Osušte okraj vaničky absorpčním papírem.
11. Pipetujte 1,5 ml Substrátu. Inkubujte 10 minut při laboratorní teplotě, vaničku umístěte na třepačku.
12. Odsajte roztok z jamek inkubační vaničky.

### **Poznámka**

Odstraňte roztok pomalým obrácením inkubační vaničky. Stripy se zachytí na dně jamek. Osušte okraj vaničky absorpčním papírem.

13. Promyjte stripy v inkubační vaničce 1 × 3 minuty po 1,5 ml promývacího roztoku na jeden strip, vaničku umístěte na třepačku. Po každém promyti odstraňte roztok pomalým obrácením inkubační vaničky. Stripy se zachytí na dně jamek. Osušte okraj vaničky absorpčním papírem.
14. Vyjměte stripy z jamek a ponechejte je uschnout po dobu 30 minut na absorpčním papíře. Výsledky musí být vyhodnoceny maximálně do 24 hodin od provedení testu.

## **8 Interpretace výsledků**

1. Odlepte ochrannou vrstvu lepicí pásky na zadní straně každého stripu a nalepte stripy na vyznačená pole vyhodnocovacího protokolu. Zde jsou zobrazeny konkrétní pozice různých kontrol a antigenů na membráně.
2. První horní dot (pozitivní kontrola) musí být pozitivní u všech pacientů. Pouze jasně zbarvená pozitivní kontrola zajistí, že jsou vaše výsledky validní a zpracování bylo správné a/nebo komponenty soupravy nebyly degradovány. Pokud první horní dot není zbarvený, test selhal a nelze jej dále interpretovat.
3. Porovnejte specifické antigenní doty s dotem negativní kontroly (což je vždy poslední spodní terčík). Intenzita zbarvení antigenních dotů je přímo úměrná titru specifických protilátek ve vzorku pacienta.
4. 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 vzorku.

### **Pozitivní výsledek**

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



## Negativní výsledek

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

### Poznámka:

Slabé zbarvení dotu antigenu, podobající se barevné intenzitě negativní kontroly může být vizuálně obtížné interpretovatelné. V takových případech se doporučuje používat software Dr DOT a skenovací systém umožňující přesnější interpretaci.

## 8.1 Vyhodnocení testu

Vyhodnocení testu je založeno na přítomnosti specifických antigenních dotů a jejich intenzity (AU), hodnocení se provede pomocí tabulky (Tabulka 1).

**Tabulka 1 Vyhodnocení testu**

Intenzita linií (AU)	Interpretace
< 5	negativní
5 – 10	hraniční
> 10	pozitivní

Hraniční výsledek může poukazovat na výskyt nízkého titru auto protilátek u zdravých pacientů.

V případě hraničního výsledku zopakujte test. Pokud zůstává test nadále hraniční, je vhodné opakovat z nového odběru, který bude proveden s určitým časovým odstupem.

Sérologický nálezn je možno interpretovat pouze v kontextu s výsledky ostatních laboratorních testů a s klinickým obrazem pacienta.

## 9 Charakteristiky soupravy

### 9.1 Reprodukovatelnost

Referenční kontrolní vzorky byly testovány ve statisticky významných replikacích, a to buď v jedné, nebo v několika analýzách. Získaná data byla použita pro Intra- a Inter-assay stanovení. Dosažené výsledky potvrdily, že intenzity linií byly ve stanoveném rozsahu a standardní odchylky byly menší než 10 %

### 9.2 Citlivost a specifita

Referenční vzorky (referenční laboratoří a/nebo jinou metodou potvrzené pozitivní nebo negativní vzorky) byly analyzovány přesně podle pracovního postupu. Citlivost a specifita uvedená v tabulce (Tabulka 2) byla stanovena z výsledků získaných pomocí softwaru Dr.DOT.

**Tabulka 2 Citlivost a specifita soupravy BlueDot Polymyositis/Scleroderma<sup>12</sup> IgG**

Jo-1			
	pozitivní	negativní	
pozitivní	22	0	<b>Citlivost 100 %</b>
negativní	0	119	<b>Specifita 100 %</b>

PL-7			
	pozitivní	negativní	
pozitivní	3	0	<b>Citlivost 100 %</b>
negativní	0	50	<b>Specifita 100 %</b>

PL-12			
	pozitivní	negativní	
pozitivní	3	0	<b>Citlivost 99 %</b>
negativní	0	50	<b>Specifita 100 %</b>

<b>EJ</b>		
	pozitivní	negativní
pozitivní	6	0
negativní	0	261

**Citlivost 99 %**  
**Specifita 100 %**

<b>SRP</b>		
	pozitivní	negativní
pozitivní	18	0
negativní	0	20

**Citlivost 100 %**  
**Specifita 100 %**

<b>Mi-2</b>		
	pozitivní	negativní
pozitivní	20	0
negativní	0	50

**Citlivost 100 %**  
**Specifita 100 %**

<b>MDA-5</b>		
	pozitivní	negativní
pozitivní	7	0
negativní	0	263

**Citlivost 100 %**  
**Specifita 100 %**

<b>TIF1-y</b>		
	pozitivní	negativní
pozitivní	3	0
negativní	0	261

**Citlivost 100 %**  
**Specifita 100 %**

<b>Ku</b>		
	pozitivní	negativní
pozitivní	22	0
negativní	0	50

**Citlivost 100 %**  
**Specifita 100 %**

PM-Scl 100		
	pozitivní	negativní
pozitivní	10	0
negativní	0	24

Citlivost 100 %  
Specifita 100 %

Scl-70		
	pozitivní	negativní
pozitivní	13	0
negativní	0	91

Citlivost 100 %  
Specifita 100 %

## 10 Omezení testu

1. Soupravu nechte vždy vytemperovat na laboratorní teplotu.
2. Nenahrazujte roztoky ani stripy s odlišnými čísly šarže, mohly by tak být ovlivněny výsledky testu.
3. Nedotýkejte se stripů prsty. Používejte pinzety nebo laboratorní rukavice.
4. Při manipulaci se Substrátem (NBT/BCIP) dbejte opatrnosti, aby nedošlo k jeho kontaminaci alkalickou fosfatázou.
5. Dodržujte předepsaný pracovní postup.
6. Klinická diagnóza by neměla být stanovena pouze na základě jediné diagnostické metody in vitro.
7. Podkladem pro stanovení správné diagnózy by mělo být kompletní klinické vyšetření včetně výsledků dalších laboratorních testů. Žádná diagnostická metoda použita samostatně nemůže vyloučit možnost výskytu falešně pozitivních nebo negativních výsledků.
8. **D-tek s.a.** ani jeho autorizovaní distributoři nenesou zodpovědnost za případné škody, vzniklé v důsledku změny nebo nedodržení pracovního postupu. Souprava by měla být zpracována pouze kvalifikovaným personálem.
9. V každém případě je odpovědnost D-tek omezena pouze na výměnu soupravy.

## 11 Řešení nastalých problémů

V tabulce (Tabulka 3) uvádíme přehled nejčastějších chyb, které mohou nastat v provedení testu.

**Tabulka 3 Přehled nejčastějších problémů v provedení testu**

<b>Problém</b>	<b>Možná příčina</b>
<b>Zcela negativní výsledek testu</b>	použití koncentrovaného promývacího roztoku místo promývacího roztoku v pracovním ředění
	vzorek nebyl správně naředěn
	Konjugát byl naředěn (je v pracovním ředění) neaktivní Konjugát nedostačující kvalita vzorku (bakteriálně kontaminovaný, s obsahem interferujících látek, starý vzorek)
<b>Příliš vysoké pozadí testu</b>	nedostatečné smáčení stripů, nebo vynechání tohoto kroku
	nedostatečné promytí stripů
	Nedodržení inkubační doby testu
	Příliš vysoká laboratorní teplota
	vzorek nebyl správně naředěn kontaminovaný Substrát

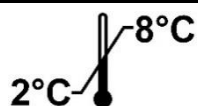
## 12 Literatura

Aktuální literatura je k dispozici na požádání. Žádosti prosím zasílejte na adresu [info@d-tek.be](mailto:info@d-tek.be)

**Poznámky**

**Poznámky**

### 13 Vysvětlení symbolů



Skladovací teplota



Udržovat v suchu



Chránit před slunečním zářením



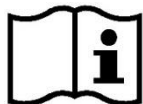
Použít do data



Číslo šarže



Výrobce



Čtěte návod k použití



Katalogové číslo



Počet testů



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro

#### D-tek s.a.

rue René Descartes 19  
BE-7000 Mons BELGIUM  
Tel. +32 65 84 18 88  
Fax. +32 65 84 26 63  
Email: [info@d-tek.be](mailto:info@d-tek.be)  
[www.d-tek.be](http://www.d-tek.be)

Souprava je distribuována společností  
**TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.**

Křížíkova 68  
612 00 Brno, CZ  
Tel: +420 541 248 311  
Email: [info@testlinecd.cz](mailto:info@testlinecd.cz)  
[www.testlinecd.com](http://www.testlinecd.com)