LABORATORY · DIAGNOSTICS

ANA plus ViraChip® IgG testovací souprava

Návod k použití

CE

Multiplexní detekce autoprotilátek ve formátu microarray pro kvalitativní detekci autoprotilátek **IgG** proti specifickým **jaderným** a **cytoplazmatickým** antigenům v lidském séru v rámci diagnostiky autoimunitních onemocnění.

ANA plus ViraChip® IgG Test Kit je mikroarray založený na enzymovém imunoanalýze, při kterém se používají následující purifikované specifické antigeny: **dsDNA, nukleosom, PCNA, P0, SS-A 52, SS-A 60** (Ro)**, histony, Sm, Sm/RNP, Ku, SS-B** (La)**, CENP B, Scl-70, PM/Scl, Jo-1, Mi-2** a **DFS70**. Navíc je aplikována **kontrola specificity DNA** pro hodnocení specifické reaktivity dsDNA spotdublettu.

Testovací souprava ANA plus ViraChip®IgG je vyrobena v souladu se směrnicí **98/79/ES**.

Princip testu

Na dně každé jamky standardní 96jamkové mikrotitrační destičky (MTP) se nachází nitrocelulózová membrána, na které jsou fixovány antigeny jako analytické skvrny (mikroarray). Během inkubace séra se nukleární a cytoplazmatické autoprotilátky v séru pacienta vážou na fixované antigeny na mikroarray. Během inkubace konjugátu se konjugát váže na komplex antigen-protilátka. Po přidání chromogenu/substrátu alkalická fosfatáza vázaná na konjugátovou protilátku přemění chromogen/substrát a zbarví komplex antigen-protilátka na mikročipu do fialova až černa. Po inkubaci séra, inkubaci konjugátu a inkubaci chromogenu/substrátu následuje vždy promývací krok k odstranění nevázaných protilátek a reagencií.

Každý mikroarray obsahuje kromě analytických bodů také následující kontrolní body: **sérové kontroly**, **konjugátové kontroly, kalibrační kontroly** a **negativní kontrolu**. Analytické body slouží k detekci protilátek proti jaderným a cytoplazmatickým antigenům **dsDNA, nukleosom, PCNA, P0, SS-A 52, SS-A 60** (Ro)**, histonů, Sm, Sm/RNP, Ku, SS-B** (La)**, CENP B, Scl-70, PM/Scl, Jo-1, Mi-2** a **DFS70.** . Navíc je nanesena **kontrola specifity DNA** pro hodnocení specifické reaktivity dvojice skvrn dsDNA.

Pro jednoznačné označení jsou jamky barevně kódovány: ANA plus ViraChip® IgG je označen **oranžovým plným kruhem** na okraji jamky.

Objednací číslo:	**V-APCGOK**	Objednací číslo:	**V-APCGDK (Deca Kit)**
Velikost balení:	**1 MTP s 96 jednotlivě oddělitelnými dutinami**	Velikost balení:	**10 MTP po 96 samostatně odlamovatelných jamkách**
Vzorek:	**10 µl séra**	Vzorek:	**10 µl séra**
Doba trvání testu:	**cca 130 minut**	Doba trvání testu:	**cca 130 minut**

Obsah soupravy

1x nebo 10 MTP po 96 jamkách (číslo výrobku: V-APCGAC)	**ANA plus ViraChip® IgG antigenem potažené jamky** Jednotlivě oddělitelné jamky s ViraChip® mikročipy, připravené k použití	
1x nebo 10x 12 ml (Objednací číslo: V-UVCGKI)	**ViraChip® AP-Anti-Human IgG Conjugate** Anti-human IgG konjugátová roztok pro ViraChip® testy, z kozy, s bovinní alkalickou fosfatázou, připravený k použití	
1x nebo 10x 100 ml	**ViraChip® / ViraStripe® / ViraBlot® Diluent / Wash Buffer** Koncentrát promývacího pufru pro testy ViraChip® , s detergenty a solemi k zabránění nespecifických vazeb, 10násobný	(Objedn. č.: V-UVNUWP)
1x nebo 10x 12 ml	**ViraChip® Chromogen / Substrate Solution** Chromogen / substrátový roztok pro testy ViraChip®, s BCIP / NBT, připravený k použití	(Objedn. č.: V-UVCUCS)
1x nebo 10x 50 ml	**ViraChip® vzorkový pufr** Vzorkový pufr pro testy ViraChip® s mlékem v prášku, detergenty a solemi k zabránění nespecifických vazeb, připravený k použití	(Objedn. č.: V-UVCUPP)

Volitelně k dispozici

1 MTP lišta s 8 dutinami (Objednací číslo: V-APCGRT)	**ANA plus ViraChip® IgG antigenem potažené jamky (8)** Jednotlivě oddělitelné jamky s ViraChip® mikročipy, připravené k použití	
330 µl (Objednací číslo: V-ANCGPK)	**ANA plus ViraChip® IgG pozitivní kontrola** IgG pozitivní kontrolní sérum, lidské, připravené k použití	
330 µl	**ANA plus ViraChip® IgG negativní kontrola** IgG negativní kontrolní sérum, lidské, připravené k použití	(Objedn. č.: V-ANCGNK)

Další požadované vybavení

1. **Software ViraChip®**	pro přípravu, provedení a vyhodnocení testu, od verze v1.3.0-1960	(Objedn. č.: V-VCNUPR)
2. **2D čtečka čárových kódů**	pro čtení kódů DataMatrix	
3. **Mikrotitrační destička** (objednací číslo: V-UVNMTP) s 96 prázdnými jamkami	pro doplnění započatých lišt mikrotitrační destičky v držáku	
4. **Orbitální třepačka (750 ot./min)** nebo **lineární třepačka (20 Hz)**	pro míchání vzorků a reagencií během zpracování	
5. **ViraChip® skener** (objednací číslo: V-UVCSCA) nebo **ViraChip® Reader**	pro digitalizaci / měření vyvinutých testů ViraChip®, od ViraChip® skeneru v1.0 nebo čtečky ViraChip® Rev.01	(objednací číslo: V-UVCCAM)
6. Volitelně: **ventilátor/ventilátor**	pro rychlejší vysušení vyvolaných mikrotitračních destiček	

Příprava reagencií a vzorků pacientů

Všechny reagencie a zabalené mikrotitrační destičky před použitím přiveďte na pokojovou teplotu (RT: 20–23 °C). Všechny reagencie před použitím dobře promíchejte.

© Copyright VIRAMED Biotech AG leden 2024 0122/0950

VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • 82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
viramed@viramed.de • www.viramed.de

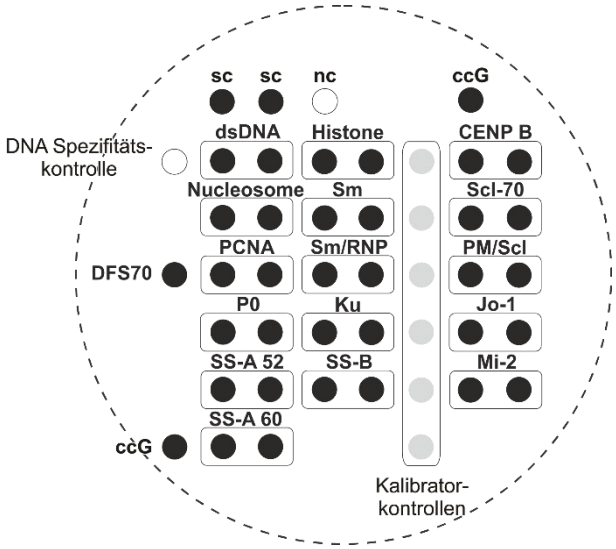
Koncentrát mycího prostředku 100 ml **použití:**	**Koncentrát čisticího pufru** zřeďte v poměru **1:10** destilovanou nebo deionizovanou vodou (H_2 O), např.: koncentrát pracího pufru + 900 ml H_2 O
Vzorkový pufr:	Připravený k použití
Konjugátový roztok:	Připraveno k použití
Chromogen / substrátový roztok:	Připraven k použití
MTP jamky:	Mikrotitrační destičku (MTP) opatrně vyjměte z obalu a vložte potřebný počet jamek do prázdného rámečku pro mikrotitrační destičky (příprava a provedení testu, bod 3). Po vyjmutí z obalu jamky okamžitě použijte. Nepotřebné jamky okamžitě vraťte do původního obalu, pevně uzavřete a skladujte při teplotě 2–8 °C.
Vzorky pacientů:	Vzorky pacientů se používají v ředění **1:76**, např. **10 µl vzorku pacienta** + **750 µl vzorkového pufru**. Při zpracování je zapotřebí 100 µl zředěného vzorku.
Kontroly:	V případě potřeby se pozitivní a negativní kontrolní sérum použije v ředění **1:16**, např. **10 µl kontrolního séra** + **150 µl vzorkového pufru**. Z naředěné kontroly se při zpracování použije 100 µl.

Složení ANA plus ViraChip® IgG Microarrays

Antigeny:
Následující antigeny jsou naneseny dvakrát v identické koncentraci jako dvojice spotů: **dsDNA, nukleosom, PCNA, P0, SS-A 52, SS-A 60** (Ro)**, histony, Sm, Sm/RNP, Ku, SS-B** (La)**, CENP B, Scl-70, PM/Scl, Jo-1, Mi-2.** Navíc je antigen **DFS70** nanesen jako samostatný spot.

Kontroly:

Každá dutina ViraChip®obsahuje následující integrované kontroly:
Dvě sérové kontroly (sc), jedna negativní kontrola (nc), dvě kontroly IgG konjugátu (ccG) a šest kalibračních kontrol (cal). Navíc je nanesena **kontrola specifity DNA** pro hodnocení specifické reaktivity dvojice skvrn dsDNA.



Obrázek 1: Obrázek dutiny z mikrotitrační destičky s ANA plus ViraChip® IgG Microarray (zvětšený). Uspořádání dvojic skvrn pro antigeny a skvrn pro integrované kontroly.

Nomenklatura jaderných a cytoplazmatických antigenů

Antigen:	**Poznámky:**
dsDNA	Dvouřetězcová DNA
Nukleozom	Proteinový komplex
PCNA	Proliferující buněčný jaderný antigen
P0	Ribozomální fosfoprotein
SS-A 52	Sjögrenův syndrom antigen A, 52 kDa
SS-A 60	Sjögrenův syndrom antigen A, 60 kDa
Histony	bazický protein
Sm	Smithův antigen
Sm/RNP	Smithův antigen/ ribonukleoprotein
Ku	DNA-vázající nukleární heterodimer (p70/p80)
SS-B	Sjögrenův syndrom antigen B
CENP B	Centromerový antigen B
Scl-70	Topoisomeráza I
PM/Scl	Exoribonukleáza
Jo-1	Histidyl-t-RNA syntetáza

© Copyright VIRAMED Biotech AG leden 2024 0122/0950

VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • 82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
viramed@viramed.de • www.viramed.de

Mi-2	nukleární helikáza, 235–240 kDa
DFS70	Dense Fine Speckled 70 antigen, 70 kDa

© Copyright VIRAMED Biotech AG Ieden 2024 0122/0950

VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • 82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
viramed@viramed.de • www.viramed.de

Příprava a provedení testu

Při automatizovaném zpracování se mohou inkubační doby, objemy a pořadí jednotlivých pracovních kroků lišit od níže uvedených pracovních pokynů. Podrobný návod krok za krokem pro použitou automatizační řešení a návod k použití softwaru ViraChip® bude poskytnut při instalaci zařízení a školení společností Viramed Biotech AG. Viz také část „Poznámky k zařízením a softwaru“.

1. **Zadání**
   Výběr testů a zadání údajů o vzorcích do plánu obsazení softwaru ViraChip®.

2. **Osazení**
   Skenování 2D čárových kódů na štítcích testovací soupravy a mikrotitrační destičky za účelem přenosu čísel šarží a faktorů specifických pro danou šarži (lot specific factors).

3. **Zpracování**
   Proveďte všechny kroky zpracování v RT.

   3.1 Příprava
   - Vložte do držáku počet jamek odpovídající obsazení.
   - Prázdné pozice příčky mikrotitrační destičky v držáku vyplňte prázdnými dutinami. Příčky jsou na mikrotitrační destičce označeny čísly 1–12.

   Dbejte na to, aby při lámání lišt do jamek nespadly žádné plastové částice.

   3.2 Předběžná inkubace
   - Do každé jamky přidejte 300 µl pracovní roztoku promývacího pufru.
   - Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě na třepačce.
   - Odsajte tekutinu.

   3.3 Inkubace séra
   - Podle plánu obsazení přidejte 100 µl zředěného vzorku pacienta nebo 100 µl zředěného kontrolního séra do příslušné jamky.
   - Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě na třepačce.
   - Odsajte tekutinu .

   3.4 3x promýt
   - Do každé dutiny přidejte 300 µl pracovního roztoku promývacího pufru .
   - Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě na třepačce.
   - Odsát tekutinu.

   Nastavte odsávací jehly nebo použijte pipety tak, aby nedošlo k poškození dna jamek.

   3.5 Inkubace konjugátu
   - Do každé jamky přidejte 100 µl konjugátu .
   - Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě na třepačce.
   - Odsát tekutinu.

   Dna dutin musí být během inkubačních kroků zcela pokryta kapalinou.

   3.6 3 x promýt
   - Do každé jamky přidejte 300 µl pracovní roztoku promývacího pufru.
   - Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě na třepačce.
   - Odsát tekutinu.

   3.7 1 x promýt
   - Do každé jamky přidejte 300 µl destilované nebo deionizované vody.
   - Inkubujte 1 minutu při pokojové teplotě.
   - Odsát kapalinu.

   3.8 Inkubace substrátu
   - Do každé jamky přidejte 100 µl chromogenu / roztoku substrátu.
   - Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě na třepačce.
   - Zastavit: odsát tekutinu.

   3.9 3 x promýt
   - Do každé jamky přidejte 300 µl destilované nebo deionizované vody.
   - Žádná mezikultivace.
   - Odsát kapalinu.

   Během inkubačních a promývacích kroků použijte orbitální třepačku nastavitelnou na frekvenci přibližně 750 ot/min nebo lineární třepačku nastavitelnou na frekvenci přibližně 20 Hz.

   3.10 Vysušte jamky
   Nechte 20 minut schnout při maximální vlhkosti vzduchu 60 % za nepřetržitého proudění vzduchu.

   Při vyšší vlhkosti vzduchu se doba sušení může prodloužit. Alternativně nechte 12 hodin schnout při pokojové teplotě chráněné před světlem.

4. **Skenování**
   ViraChip® mikročipy měřte pomocí skeneru ViraChip® nebo čtečky ViraChip®.

   Měření ViraChip® mikroarrayů je třeba provést do 24 hodin po zpracování (mikrotitrační destičku uchovávejte chráněnou před světlem). Přesný postup naleznete v příručce k přístroji.

5. **Analýza**

© Copyright VIRAMED Biotech AG leden 2024 0122/0950

VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • 82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
viramed@viramed.de • www.viramed.de

5.1 Zkontrolujte přiřazení dvojic antigenových spotů a kontrolních spotů (technická validace)

Každý spot je na základě své polohy softwarem ViraChip®automaticky přiřazen k odpovídajícímu dvojici antigenových spotů nebo odpovídajícímu kontrolnímu spotu.
Automatické přiřazení musí být vizuálně zkontrolováno podle vzoru na obr. 1. Přiřazení, která neodpovídají zobrazenému vzoru, označte v poli „QC“ jako „neplatná“. Příslušný vzorek musí být opakován.

5.2 Kontrola platnosti

Kontrola platnosti je prováděna automaticky softwarem ViraChip®.

ViraChip® microarray je platný, pokud následující kontrolní spoty splňují kritéria uložená v softwaru ViraChip®:
- **Sérové kontroly** (sc) nad mezní hodnotou
- **Konjugátové kontroly IgG** (ccG) nad mezní hodnotou
  Konjugátové kontroly IgG musí reagovat silněji než kontroly ostatních tříd konjugátů.
- **Kalibrační kontroly** (cal) nad mezní hodnotou
- **Negativní kontrola** (nc) pod mezní hodnotou

Pokud není splněno jedno z uvedených kritérií, je ViraChip® Microarray klasifikován jako „neplatný“. Neplatné ViraChip® Microarrays nesmějí být vyhodnoceny a musí být opakovány.

5.3 Vyhodnocení ViraChip® mikroarray

Vyhodnocení vzorků pacientů provádí software ViraChip® automaticky podle následujících vyhodnocovacích kritérií:

Jednotky ViraChip® každého dvojice spotů jsou vypočítány softwarem ViraChip® s přihlédnutím k faktorům specifickým pro danou šarži ve vztahu ke kalibračním kontrolám.

Kritéria vyhodnocení

Jednotky ViraChip® dvojic spotů	Výsledek	Hodnocení
Minimálně jeden dvojitý spot ≥ **100 jednotek ViraChip®** z: Nukleozom, PCNA, P0, SS-A 52, SS-A 60, histony, Sm, Sm/RNP, Ku, SS-B, CENP B, Scl-70, PM/Scl, Jo-1, Mi-2.	**Pozitivní**	**Specifické autoprotilátky** proti příslušnému antigenu detekovatelné: **nukleosom, PCNA, P0, SS-A 52, SS-A 60, histony, Sm, Sm/RNP, Ku, SS-B, CENP B, Scl-70, PM/Scl, Jo-1, Mi-2.** Náznak autoimunitního onemocnění, které je spojeno s příslušnými detekovatelnými nukleárními nebo cytoplazmatickými autoprotilátkami.
Žádný dvojitý spot ≥ **100 jednotek ViraChip® -** z: Nukleosom, PCNA, P0, SS-A 52, SS-A 60, Histon, Sm, Sm/RNP, Ku, SS-B, CENP B, Scl-70, PM/Scl, Jo-1, Mi-2.	**Negativní**	**Žádné** nebo pouze malé množství specifických autoprotilátek.
dsDNA spotový duplet **≥ 100 ViraChip® - jednotek** pokud dsDNA spotdublett > kontrola specificity DNA	**Pozitivní**	**Specifické autoprotilátky** jsou detekovatelné proti **dsDNA**. Narážka na systémový lupus erythematodes.
dsDNA spotový duplet **≥ 50 a < 100 jednotek ViraChip®** pokud dsDNA spotdublett > kontrola specificity DNA	**Hraniční**	Přítomny **nízké** množství specifických autoprotilátek proti **dsDNA**.
dsDNA spotový duplet ≥ 50 jednotek ViraChip® **pokud dsDNA spotový duplet < kontrola specificity DNA**	**dsDNA spotový duplet nelze interpretovat**	Reakce s kontrolou specificity DNA může naznačovat nespecifické reakce dsDNA spotového duplikátu. dsDNA spotový duplikát není interpretovatelný.
dsDNA-Spotdublett **< 50 jednotek ViraChip®**	**Negativní**	Nejsou detekovatelné **žádné** specifické autoprotilátky proti **dsDNA**.
DFS70 skvrna **≥ 100 jednotek ViraChip®**	**Pozitivní**	Byly zjištěny **specifické autoprotilátky** proti **DFS70**.
DFS70 Spot **< 100 ViraChip® - jednotek**	**Negativní**	**Žádné** nebo pouze malé množství specifických autoprotilátek proti **DFS70**.

Diagnostický význam nukleárních a cytoplazmatických autoprotilátek

1. dsDNA (dvouřetězcová DNA): Autoantibodies proti dsDNA (dvouřetězcová DNA, resp. nativní DNA) mají velmi vysoký diagnostický a prognostický význam a slouží jako markery aktivity. Vyskytují se u přibližně 90 % pacientů se SLE. Detekce autoprotilátek proti nativní nebo dsDNA je považována za jedno z jedenácti kritérií Americké revmatologické společnosti (kritéria ACR z roku 1982, revidovaná v roce 1997). Autoprotilátky proti dsDNA jsou nejčastěji detekovatelnými autoprotilátkami typickými pro SLE.

© Copyright VIRAMED Biotech AG leden 2024 0122/0950

VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • 82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
viramed@viramed.de • www.viramed.de

Frekvence detekce se však liší v závislosti na aktivitě a orgánovém projevu: aktivní SLE s postižením ledvin > 95 %, aktivní SLE bez postižení ledvin > 50–70 %, neaktivní SLE < 40 %. Absence dsDNA však nevylučuje aktivní vzplanutí SLE (11,13,7,2,12).

2. Sm (Smithův antigen): Autoantibodies proti Sm jsou vysoce specifické a vyskytují se u přibližně 10–15 % pacientů se SLE. Pozitivní asociace s těžkými orgánovými projevy, jako jsou např. CNS, ledviny nebo kůže. Jsou považovány za prognostický marker a jejich detekce patří mezi jedenáct kritérií ACR. Sm pozitivní séra často reagují také se Sm/RNP-Spottriplett, který kromě hlavního antigenu RNP obsahuje také epitopy Sm (11,7,2,12,4,6).

3. Sm/RNP (Smithův antigen/ribonukleoprotein): Autoantibodies proti Sm/RNP se vyskytují u přibližně 30–40 % pacientů se SLE, u přibližně 95 % pacientů s MCTD a u 10–15 % pacientů se sklerodermií. Při absenci autoprotilátek proti Sm a dsDNA mají autoprotilátky proti RNP velmi vysokou senzitivitu téměř 100 % pro MCTD. Absence autoprotilátek proti RNP proto vylučuje MCTD (11,13,7,2,4,6).

4. PCNA (proliferující buněčný jaderný antigen): Autoantibodies proti PCNA (identické s autoantibodies proti cyklinu) se vyskytují u přibližně 3–7 % pacientů se SLE. Pacienti s PCNA pozitivním SLE často vykazují postižení ledvin nebo CNS a trombocytopenii (11,13,7,2).

5. P0 (ribozomální fosfoprotein): P0 je ribozomální fosfoprotein a hlavní složka 60S podjednotky ribozomálního komplexu. Autoantibodies proti P0 se vyskytují u přibližně 6–46 % pacientů se SLE, i když dsDNA a Sm autoantibodies nejsou detekovatelné. Autoantibodies proti P0 jsou vysoce specifické a jsou spojovány především s pacienty se SLE v aktivní fázi s postižením ledvin (7,2,4,9).

6. SS-A 52 (Sjögrenův syndrom antigen A): Autoantibodies proti SS-A 52 se často vyskytují u pacientů s myozitidou a mají význam v patogenezi kongenitálního srdečního bloku a kožních projevů lupusu. Autoantibodies proti SS-A 52 jsou méně specifické pro Sjögrenův syndrom (SjS) a systémový lupus erythematodes (SLE) než autoantibodies proti SS-A 60. Současný výskyt autoprotilátek SS-A 52, SS-A 60 a SS-B je spojen s vrozeným srdečním blokem (7,2,4,6,1,3).

7. SS-A 60 (Sjögrenův syndrom antigen A): Autoantibodies proti SS-A se vyskytují u přibližně 96 % pacientů s primárním SjS, přibližně u 80 % pacientů se sekundárním SjS, přibližně u 24–60 % pacientů s LE, přibližně u 70–100 % pacientů se subakutním kožním lupus erythematodes (SCLE) přibližně 85 % pacientů s neonatálním lupus erythematodes (NLE) a přibližně 5–8 % pacientů s RA. Současný výskyt autoprotilátek SS-A 52, SS-A 60 a SS-B je spojen s vrozenou srdeční blokádou (11,7,2,4,6,1,3).

8. SS-B (Sjögrenův syndrom antigen B): Autoantibodies proti SS-B se vyskytují u přibližně 70 % pacientů s primárním SjS, přibližně u 50 % pacientů se sekundárním SjS, přibližně u 20 % pacientů s LE, přibližně u 50 % pacientů se subakutním kutánním lupus erythematodes (SCLE) a přibližně u 60 % pacientů s neonatálním lupus erythematodes (NLE). Pokud se autoantibodies SS-B vyskytují současně s autoantibodies SS-A 52 a SS-A 60 u těhotných žen, existuje zvýšené riziko 1–2 % vrozeného srdečního bloku u novorozenců (11,7,2,4,1,3).

9. Scl-70 (topoizomeráza I): Autoantibodies proti Scl-70 se vyskytují u přibližně 40 % pacientů se SSc. Pacienti pozitivní na Scl-70 mají obvykle těžší průběh onemocnění s nepříznivější prognózou než pacienti pozitivní na centromerové autoprotilátky. Existuje souvislost s difúzním postižením kůže a výskytem vnitřních projevů, např. na plicích, srdci a ledvinách (11,13,7,2,10).

10. CENP B (centromerový antigen B): Autoantibodies proti CENP B se vyskytují u přibližně 64–95 % pacientů s CREST syndromem a u přibližně 20–35 % pacientů s difúzní sklerodermií. S více než 95 % je CENP B nejčastějším cílovým antigenem u pacientů se sklerodermií. Pacienti s primární biliární cirhózou (PBC) také vykazují autoprotilátky proti centromeru v přibližně 30 % případů. Četnost intersticiální plicní fibrózy a postižení ledvin je u pacientů se sklerodermií pozitivních na centromery velmi nízká, zatímco orgánové projevy, jako je plicní hypertenze a gastrointestinální komplikace, se vyskytují častěji (7,2,4,10).

11. Jo-1 (histidyl-t-RNA syntetáza): Autoantibodies proti Jo-1 se vyskytují u přibližně 60 % pacientů s PM, přibližně 13 % pacientů s DM a přibližně 43 % pacientů s PM/DM překrývajícím se syndromem. Diagnostická specificita je téměř 100 %. Existuje souvislost s autoprotilátkami SS-A 52. Pacienti s myozitidou pozitivní na Jo-1 mají těžký průběh, časté relapsy a špatnou prognózu. Ve více než 70 % případů dochází k intersticiálnímu postižení plic. Většina pacientů s myozitidou s autoantikrémy Jo-1 má příznaky anti-syntetázového syndromu. Při úspěšné léčbě nebo v remisi autoantikrémy Jo-1 mizí (11,13,7,2,5).

12. PM/Scl (exoribonukleáza): Autoantibodies proti PM/Scl exoribonukleázám se vyskytují u přibližně 24–55 % pacientů s polymyozitidou/sklerodermickým překrývajícím se syndromem, u přibližně 8–12 % pacientů s PM/DM a u přibližně 1–16 % pacientů se sklerodermie. Kromě myozitidy je PM/Scl prognostickým markerem pro artritidu v přibližně 89 % případů, Raynaudův syndrom v přibližně 79 % případů, intersticiální plicní projevy v přibližně 44 % případů a skleromyozitidu v dětském věku. Autoantibodies PM/Scl se většinou vyskytují pouze izolovaně a ne v kombinaci s jinými markery idiopatické myozitidy nebo sklerodermie (13,7,2,10,8).

13. DFS70 (Dense Fine Speckled 70): Autoantibodies proti DFS70 mohou korelovat s hustým jemně skvrnitým jaderným vzorem v HEp2-IFT. Detekce autoprotilátek DFS70 může tedy pomoci pochopit pozorované vzory v HEp2-IFT, zejména pokud nejsou detekovatelné žádné jiné autoprotilátky. (15,16,17,18).

Údaje o výkonu

Shoda reaktivit ANA plus ViraChip® IgG s ANA ViraChip® IgG.

V následujících tabulkách (tabulka 1 – 13) je uvedena shoda mezi reaktivitami ANA plus ViraChip® IgG a reaktivitami srovnávací metody ANA ViraChip® IgG. Celkem bylo použito 242 sér, která vykazují pozitivní výsledek v HEp-2 IFT.

dsDNA	**ANA** ViraChip®	
ANA plus ViraChip®	Pozitivní	Negativní
Pozitivní	**23**	**1**
Negativní	**4**	**214**
	Korelace: 98 %	

Tabulka 1: Shoda reaktivity dsDNA spotdupletu na ANA plus ViraChip® IgG s dsDNA spottripletem na ANA ViraChip® IgG.

SS-B	**ANA** ViraChip®	
ANA plus ViraChip®	Pozitivní	Negativní
Pozitivní	**39**	**1**
Negativní	**1**	**201**
	Korelace: 99 %	

Tabulka 8: Shoda reaktivity SS-B spotového dupletu na ANA plus ViraChip® IgG se SS-B spotovým tripletem na ANA ViraChip® IgG.

PCNA	**ANA** ViraChip®

CENP B	**ANA** ViraChip®

© Copyright VIRAMED Biotech AG leden 2024 0122/0950

VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • 82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
viramed@viramed.de • www.viramed.de

ANA plus ViraChip®	Pozitivní	Negativní
Pozitivní	**0**	**0**
Negativní	**0**	**242**
	Korelace: 100 %	

Tabulka 2: Shoda reaktivity PCNA spotového dupletu na ANA plus ViraChip® IgG s PCNA spotovým tripletem na ANA ViraChip® IgG.

P0	**ANA** ViraChip®	
ANA plus ViraChip®	Pozitivní	Negativní
Pozitivní	**14**	**1**
Negativní	**2**	**225**
	Korelace: 99 %	

Tabulka 3: Shoda reaktivity dvojice skvrn P0 na ANA plus ViraChip® IgG s trojicí skvrn P0 na ANA ViraChip® IgG.

SS-A 52	**ANA** ViraChip®	
ANA plus ViraChip®	Pozitivní	Negativní
Pozitivní	**83**	**1**
Negativní	**8**	**150**
	Korelace: 96 %	

Tabulka 4: Shoda reaktivity SS-A 52 spotdublett na ANA plus ViraChip® IgG s SS-A 52 spotriplett na ANA ViraChip® IgG.

SS-A 60	**ANA** ViraChip®	
ANA plus ViraChip®	Pozitivní	Negativní
Pozitivní	**105**	**1**
Negativní	**9**	**127**
	Korelace: 96 %	

Tabulka 5: Shoda reaktivity SS-A 60 spotdublettu na ANA plus ViraChip® IgG se SS-A 60 spotriplettem na ANA ViraChip® IgG.

Sm	**ANA** ViraChip®	
ANA plus ViraChip®	Pozitivní	Negativní
Pozitivní	**30**	**8**
Negativní	**1**	**203**

ANA plus ViraChip®	Pozitivní	Negativní
Pozitivní	**14**	**0**
Negativní	**0**	**228**
	Korelace: 100 %	

Tabulka 9: Shoda reaktivity CENP B spotdupletu na ANA plus ViraChip® IgG s CENP B spottripletem na ANA ViraChip® IgG.

Scl-70	**ANA** ViraChip®	
ANA plus ViraChip®	Pozitivní	Negativní
Pozitivní	**16**	**2**
Negativní	**0**	**224**
	Korelace: 99 %	

Tabulka 10: Shoda reaktivity dvojice skvrn Scl-70 na ANA plus ViraChip® IgG s trojicí skvrn Scl-70 na ANA ViraChip® IgG.

PM/Scl	**ANA** ViraChip®	
ANA plus ViraChip®	Pozitivní	Negativní
Pozitivní	**1**	**2**
Negativní	**0**	**239**
	Korelace: 99 %	

Tabulka 11: Shoda reaktivity PM/Scl spotdublettu na ANA plus ViraChip® IgG s PM/Scl spotripletem na ANA ViraChip® IgG.

Jo-1	**ANA** ViraChip®	
ANA plus ViraChip®	Pozitivní	Negativní
Pozitivní	**7**	**0**
Negativní	**0**	**235**
	Korelace: 100 %	

Tabulka 12: Shoda reaktivity dvojice Jo-1 na ANA plus ViraChip® IgG s trojicí Jo-1 na ANA ViraChip® IgG.

DFS70*	**ANA** ViraChip®	
ANA plus ViraChip®	Pozitivní	Negativní
Pozitivní	**2**	**0**
Negativní	**0**	**25**

© Copyright VIRAMED Biotech AG leden 2024 0122/0950

VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • 82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
viramed@viramed.de • www.viramed.de

Korelace: 96 %

Korelace: 100 %

Tabulka 6: Shoda reaktivity Sm spotdublettu na ANA plus ViraChip® IgG se Sm spottripletem na ANA ViraChip® IgG.

Sm/RNP	**ANA ViraChip®**	
ANA plus ViraChip®	Pozitivní	Negativní
Pozitivní	**39**	**1**
Negativní	**0**	**202**
	Korelace: 100 %	

Tabulka 7: Shoda reaktivity dvojice skvrn Sm/RNP na ANA plus ViraChip® IgG se trojicí skvrn Sm/RNP na ANA ViraChip® IgG.

Tabulka 13: Shoda reaktivity DFS70 spotdupletu na ANA plus ViraChip® IgG s DFS70 spottripletem na ANA ViraChip® IgG.

*K určení reaktivity bylo použito 27 sér.

V následující tabulce je uvedena specificita jednotlivých antigenů nukleozomů a histonů.

	IFT negativní	
ANA plus ViraChip®	**Nukleozom**	**Histony**
Pozitivní	**1***	**3***
Negativní	**139**	**137**
	Korelace: 99 %	**Korelace: 98 %**

Tabulka 14: Specifičnost jednotlivých antigenů nukleozomů a histonů s ANA plus ViraChip® IgG.
*Další údaje týkající se citlivosti pro Mi-2, Ku, nukleosomy a histony jsou k dispozici na vyžádání.

ANA antigeny	**Séra dárců krve n = 141**	
	ANA plus ViraChip® IgG pozitivní	**Specifičnost**
dsDNA	**0**	**100**
Sm	**1**	**99**
Sm/RNP	**0**	**100**
PCNA	**1**	**99**
P0	**1**	**99**
SS-A 52	**0**	**100**
SS-A 60	**0**	**100**
SS-B	**0**	**100**
Scl-70	**1**	**99**
CENP B	**0**	**100**
Jo-1	**1**	**99**

© Copyright VIRAMED Biotech AG leden 2024 0122/0950

VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • 82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
viramed@viramed.de • www.viramed.de

PM/Scl	**1**	**99**
DFS70	**2**	**99**
Nukleozom	**0**	**100**
Histony	**2**	**99**
Ku	**1**	**99**
Mi-2	**0**	**100**

Tabulka 15: Specifičnost autoprotilátek s ANA plus ViraChip® IgG u evropských dárců krve.

Požadavky na uživatele

1. Tento test smí provádět pouze specializovaná laboratoř, která disponuje odpovídajícím laboratorním vybavením (např. podle „Good Laboratory Practice“, GLP) a případně potřebnými úředními povoleními pro manipulaci s testovanými vzorky.

2. Aby bylo možné získat přesný výsledek testu, je nutné dodržovat návod k použití a GLP.

3. Tento test smí provádět pouze odborný personál, který byl proškolen v testovací proceduře.

Skladování a trvanlivost reagencií

1. ViraChip® Microarrays: Uzavřené v originálním obalu při teplotě 2–8 °C skladovatelné do data expirace.

2. Koncentrát promývacího pufru, 10násobný: Skladujte při teplotě 2–8 °C do data exspirace.

3. Prací pufr v ředění pro použití: Skladovat při teplotě 2–8 °C po dobu cca 2 týdnů. Při delším skladování lze ředění pro použití rozdělit na alikvotní části a zmrazit při teplotě -20 °C.

4. Vzorkový pufr: Skladovat při teplotě 2–8 °C do data expirace.

5. Konjugátový roztok: Skladovat při teplotě 2–8 °C do data exspirace.

6. Chromogen/substrátový roztok: Skladovat při teplotě 2–8 °C do data exspirace. Chránit před světlem!

7. Po prvním otevření reagencií a komponentů soupravy se při správném použití („správná laboratorní praxe“) a dodržení skladovacích podmínek uvedených na štítku v originálním obalu obvykle zachová trvanlivost do data exspirace.

Bezpečnostní opatření

1. Všechny složky lidského séra byly testovány na protilátky HCV, HIV1,2 a antigen HBs a byly shledány negativními. Přesto by všechny složky soupravy lidského původu, stejně jako vzorky pacientů, měly být považovány za potenciálně infekční a měly by být používány s příslušnými bezpečnostními opatřeními. Při práci s potenciálně nebezpečnými nebo infekčními materiály je třeba dodržovat příslušné národní / mezinárodní zákony, nařízení a předpisy. To platí také pro skladování a likvidaci použitých chemikálií a reagencií.

2. Při práci s nebezpečnými a biologickými látkami je třeba dodržovat ochranná opatření podle aktuálně platných směrnic pro laboratoře platných v dané zemi. Mezi tato opatření patří mimo jiné:

- Nepipetujte ústy.
- Nosit jednorázové rukavice a ochranné brýle / obličejový štít.
- Na pracovišti nejíst, nepít ani nekouřit.

3. Zamezte kontaktu kůže a sliznic s chromogenem / substrátovým roztokem. V případě kontaktu s kůží a očima okamžitě opláchněte velkým množstvím vody.

4. Vzorky a všechny potenciálně kontaminované materiály, jakož i tekuté infekční odpady, je třeba dekontaminovat podle obecně uznávaných laboratorních pokynů, např. autoklávováním po dobu nejméně 20 minut při teplotě 121 °C. K likvidaci tekutého odpadu lze tento smíchat např. s chlornanem sodným v objemovém poměru tak, aby konečná směs obsahovala 1 % chlornanu sodného. Pro úplnou dezinfekci nechte působit 30 minut.

5. Údaje o možných nebezpečích, opatřeních první pomoci, opatřeních při neúmyslném uvolnění větších množství, manipulaci a skladování, osobních ochranných prostředcích, pokynech k likvidaci a toxikologických údajích jsou uvedeny v bezpečnostních listech.

6. Je třeba zabránit vniknutí prachu a jiných nečistot do dutin MTP, protože by to mohlo vést k neplatným výsledkům.

Odběr, manipulace a skladování vzorku pacienta

1. Testovací souprava ANA plus ViraChip®IgG se provádí s lidským sérem jako vzorkovým materiálem.

2. Odběr vzorků by měl provádět zdravotnický personál podle platných standardů z plné krve (14).

3. Vzorky, které byly předem ošetřeny teplem, jsou hemolytické, ikterické nebo lipemické, mohou vést k neplatným výsledkům.

4. Vzorky nesmí být mikrobiálně kontaminovány.

5. Nerozředěné vzorky lze obvykle skladovat až 5 dní při teplotě 2–8 °C. Pro skladování po dobu až 24 měsíců je nutné vzorky zmrazit v alikvótních částech při teplotě minimálně -20 °C.

6. Před zahájením testu by měly být vzorky uvedeny na pokojovou teplotu. Po rozmrazení vzorky opatrně promíchejte a v případě potřeby odstraňte viditelné částice odstředěním.

7. Je třeba se vyvarovat opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorků.

Omezení testovacího postupu

1. Pozitivní výsledek testu příslušného vzorku pacienta je třeba považovat za symptom. Interpretaci a hodnocení výsledků testů smí provádět pouze zdravotnický personál po zhodnocení všech relevantních údajů (13).

2. Negativní výsledek testu nevylučuje kontakt s patogenem nebo infekci.

3. Detekce specifických protilátek může při vyšetřeních s různými testy nebo od různých výrobců vést k odlišným výsledkům z důvodu rozdílné citlivosti, specificity a testovacích metod.

4. V případě imunosuprese je posuzovatelnost omezená (13).

5. Léky a podávání imunoglobulinů mohou vyvolat nespecifické protilátkové reakce (13).

6. *In* vitro diagnostika nesmí být používána po uplynutí uvedeného data expirace, protože poté již nelze zaručit spolehlivé výsledky.

7. Přesné dodržování pracovních pokynů je nezbytné pro získání přesných výsledků testů. Nedostatečné provedení kroků promývání může způsobit nesprávné výsledky.

8. Použití smíšených vzorků, při kterém se společně vyšetřuje více sér, není přípustné, protože u takových vzorků může být snížena citlivost a specificita testu.

© Copyright VIRAMED Biotech AG leden 2024 0122/0950

VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • 82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
viramed@viramed.de • www.viramed.de

Poznámky k přístrojům a softwaru

1. Při automatizovaném provádění musí být naprogramovány a použity pracovní kroky validované společností Viramed Biotech AG pro příslušný typ procesoru.
2. Při použití spotřebního materiálu specifického pro daný procesor musí být příslušné konfigurace schváleny společností Viramed Biotech AG podle pokynů výrobce.
3. Konfigurace zařízení a softwaru poskytnutá společností Viramed Biotech AG nesmí být měněna. Jakákoli změna může způsobit nesprávné výsledky.
4. Je nutné používat výhradně software specifický pro dané zařízení. Změny v konfiguračních souborech smí provádět pouze společnost Viramed Biotech AG.
5. Jako měřicí přístroje smí být používány pouze systémy schválené společností Viramed Biotech AG.
6. Vyhodnocení mikročipů ViraChip® se provádí výhradně pomocí softwaru ViraChip®. Ruční/vizuální vyhodnocení není možné.

Literatura

1. BRUCATO, A et al.: Riziko vrozeného úplného srdečního bloku u novorozenců matek s protilátkami anti-Ro/SSA detekovanými pomocí protileptické elektroforézy: prospektivní studie 100 žen, Arthritis Rheum, 2001
2. CONRAD, K et al.: Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen, Pabst Science Publishers, 3. vydání, 2006
3. GORDON, P et al.: Anti-52 kDa Ro; anti-60 kDa Ro and anti-La antibody profiles in neonatal lupus, J Rheumatol, 2004
4. HOFFMANN, MH et al.: Autoantigeny asociované s nukleovými kyselinami: patogenní zapojení a terapeutický potenciál, J Autoimmun, 2010
5. KAO, AH et al.: Anti-Signal recognition particle autoantibody in patients with and patients without idiopathic inflammatory myopathy, Journal of experimental Medicine, 2005
6. MIGLIORINI, P et al.: Anti-Sm a anti-RNP protilátky, Autoimmunity, 2005
7. VON MÜHLEN, CA & TAN, EM: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases, Seminars in Arthritis and Rheumatism, 1995
8. REICHLIN, M et al.: Protilátky proti jadernému/nukleolárnímu antigenu u pacientů s polymyozitidou a překrývajícími se syndromy, Journal of Clinical Immunology, 1984
9. REICHLIN, M: Sérologické korelace s nefritidou u systémového lupus erythematodes, Clin Immunol, 2005
10. STEEN, VD: Autoantibodies in systemic sclerosis, Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2005
11. TAN, EM: Antinukleární protilátky: Diagnostické markery autoimunitních onemocnění a sondy pro buněčnou biologii, Adv Immunol, 1989
12. HOCHBERG MC: Aktualizace revidovaných kritérií Americké revmatologické společnosti pro klasifikaci systémového lupus erythematodes, Arthritis Rheum, 1997
13. THOMAS, L: Laboratoř a diagnostika, Med Verlagsgesellschaft Marburg, 2012
14. TUCK, MK et al.: Standardní operační postupy pro odběr séra a plazmy, J Proteome Res, 2009
15. HEROLD, M et al.: ICAP – pokus o jednotný popis fluorescenčních vzorců anticycelulárních protilátek na HEp-2 buňkách, J Lab Med, 2017
16. BENTOW, C et al.: Rozpoznání hustého jemně skvrnitého vzorce (DFS) zůstává náročné: výsledky mezinárodního internetového průzkumu, Auto Immun Highlights, 2016
17. CARTER, JB et al.: Rozpoznání a relevance autoprotilátek anti-DFS70 v rutinním testování antinukleárních autoprotilátek v komunitní nemocnici, Frontiers in Medicine, 2018
18. CONRAD, K et al.: Klinický význam autoprotilátek anti-DFS70, Clinic Rev Allerg Immunol, 2017

Vysvětlení symbolů

	Výrobce		Objednací číslo
	Dodržujte návod k použití		Použitelné do / datum minimální trvanlivosti
	*In vitro* diagnostikum		Teplotní omezení (skladování)
	Číslo šarže		Pozitivní kontrolní sérum
	Dostatečné pro 96 dávek		Negativní kontrolní sérum

© Copyright VIRAMED Biotech AG leden 2024 0122/0950

VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • 82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
viramed@viramed.de • www.viramed.de