

ENA Dot

Bestelcode: AD ENAD

1. BEOOGD GEBRUIK

ENA Dot is een immunodot-kit voor de detectie van IgG-auto-antilichamen tegen de antigenen Sm, Sm/RNP, SSA/Ro 60kD, SSB, Jo-1 en Scl-70, enkel in humaan serum.

Deze kit is bedoeld om de resultaten van antinucleaire patronen verkregen door immunofluorescentie, de screening- en referentiemethode in auto-immuniteit, te bevestigen; de kit is bedoeld als hulpmiddel bij de diagnose van de volgende auto-immuunziekten (zie 11.5 *Diagnostische waarden van auto-antilichamen* voor meer informatie).

De test is bedoeld voor een grote, routinematige populatie. Deze kit is strikt voorbehouden voor professioneel gebruik in klinische analyselaboratoria. Training voorafgaand aan ingebruikname wordt sterk aanbevolen (neem contact op met uw distributeur).

Deze kit kan alleen handmatig worden gebruikt op een schudplaat of in een open geautomatiseerd immunodot-verwerkingssysteem, geprogrammeerd volgens het pipetteerschema beschreven in punt 9.2.

2. PRINCIPE VAN DE TEST

Deze kit en alle onderdelen ervan zijn uitsluitend bedoeld voor handmatige uitvoering.


De test is gebaseerd op het principe van een enzymimmunoassay (EIA). De teststrip bestaat uit een membraan op een kunststof onderlaag. Tijdens de testprocedure worden de teststrips met verdund patiëntserum geïncubeerd. Humane antilichamen, indien aanwezig, binden aan de overeenkomstige specifieke antigenen op het membraan. Overtollige of ongebonden antilichamen worden tijdens de wasfase verwijderd. De strips worden geïncubeerd met alkalische fosfatase (AP) geconjugeerde geit-antilichamen tegen humaan IgG. Dit enzymconjugaat bindt het antigeen-antilichaam-complex. Tijdens de tweede wasstap wordt het overtollige conjugaat verwijderd, waarna de strips in een substraatoplossing worden geïncubeerd. Als er sprake is van enzymactiviteit zijn er paarse spots op het membraan te zien. De intensiteit van de kleuring is recht evenredig met het aantal antilichamen in het monster.

De kit bestaat uit 24 tests voor eenmalig gebruik.

3. INHOUD VAN DE KIT

Controleer voor het gebruik van de kit dat alle genoemde artikelen aanwezig zijn. Controleer ook of de eigenschappen van het product overeenkomen met de hieronder beschreven eigenschappen. Als een van de artikelen ontbreekt of beschadigd is, dan mag de kit niet gebruikt worden. Neem contact op met de distributeur.

3.1 BESTANDDELEN







TE VERDUNNEN:	(10 x) Wasbuffer	1 x 40 ml - 10x geconcentreerd (kleurloos) Bevat: H ₂ O • TBS • NaCl • Tween • conserveringsmiddelen	
GEBRUIKSKLAAR:	Dot-strips	24 stuks 8 spots waarvan: 1 negatieve controle (CO) 6 antigenen 1 positieve controle (RC)	
	Verdunningsbuffer	1 x 40 ml (geel) Bevat: H ₂ O • TBS • NaCl • Tween • BSA • conserveringsmiddelen • kleurstof	
	Conjugaat	1 x 40 ml (rood) Bevat: H ₂ O • TBS • NaCl • KCl • MgCl ₂ • AP-geconjugeerde geit-antilichamen tegen humaan IgG • conserveringsmiddelen • kleurstof	
	Substraat	1 x 40 ml (bruine fles, lichtgele oplossing) Bevat: H ₂ O • conserveringsmiddelen • MgCl ₂ • TBS • NBT • BCIP • NBT-stabilisator	
	Incubatieplaat	3 stuks met 8 incubatie-welletjes	

Afkortingen in alfabetische volgorde:

AP = Alkalische fosfatase; BCIP = Broom-chloor-indolyl-fosfaat; BSA = Runderserumalbumine; KCl = Kaliumchloride; MgCl₂ = Magnesiumchloride; NaCl = Natriumchloride; NBT = Nitroblauwtetrazolium; TBS = Tris-gebufferde zoutoplossing

Voor meer informatie over de samenstelling en de concentratie van de gebruikte werkzame stoffen verwijzen wij naar het MSDS dat op aanvraag beschikbaar is of naar www.alphadia.be.

Gebruikte symbolen op kitetiketten

	Attention : consult instructions for use Attenzione : consulti le istruzioni per uso Achtung : Gebrauchsanwendung beachten Attention : consulter le mode d'emploi Atención : consultar las instrucciones Atenção : consultar instruções para uso Προσοχή : Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης		For ... uses Per ... dosaggi Für ... Anwendungen Pour ... utilisations Para ... usos Para ... utilização για ... χρήσεις
IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositivo medico diagnostico in vitro Zur medizinischen diagnostischen Anwendung in vitro Dispositif médical de diagnostic in vitro Dispositivo médico para uso diagnostico in vitro Dispositivo médico para uso diagnostico in vitro Ιατρικό υλικό για διάγνωση In Vitro	REF	Code Codice Artikelnummer Référence Código Código Κωδικός
	To be stored from 2°C to 8°C Conservazione da 2 - 8°C bei 2°C bis 8°C lagern A conserver de 2°C à 8°C Almacenar a 2 - 8°C Armazenar a 2 - 8°C Αποθηκεύστε στους 2 έως 8°C		Manufactured by Fabbricato da Hergestellt von Fabriqué par Fabricado por Fabricado por Κατασκευάζεται από την
LOT	Batch Number Lotto numero Chargennummer Désignation du lot Denominación de lote Número do lote Κωδικός		Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Verwendbar bis (letzter Tag des Monats) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Estable hasta (usar antes de ultimo dia del mes) Data limite para utilização (ultimo dia do mês) Χρήση έως (τελευταία ημέρα του μήνα)
CE	CE Mark Marcatura CE CE-Kennzeichnung Marquage CE Marca CE Marcação CE μονογράφιση CE		To be protected from direct sunlight Proteggere dalla luce Vor Licht schützen Protéger de la lumière Proteja de la luz Proteger da exposição à luz Προστατεύετε τον αντιδραστήριο
TRAY	Incubation tray Vaschetta d'incubazione Inkubationsschale Plaque d'incubation Bandejas de incubación Bandejas de incubação Δίσκοι επώσης	STRIP	Coated strip Strips rivestita Streifen Bandelette Tira Tira Στιγμάτων
DIL	Diluent Diluente campione Verdünnungspuffer Diluant Tampón diluyente Tampão de diluição Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	WASH ...X	(... x concentrated) wash buffer Tampone di lavaggio (concentrato... x) (... x konzentrierte) Spülpufferlösung tampon de lavage (... x concentré) (... x concentrado) tampones de lavado (... x concentrado) tampão de lavagem (... x συγκέντρωση) Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
CONJ ...	Conjugate ... Coniugato ... Konjugat ... Conjugué ... Conjugado ... Conjugado ... Συζυγές ...	SUB	Substrate Substrato Substrat Substrat Substrato Substrato Υπόστρωμα

3.2 Gebuikte antigenen

Sm	Kerneiwitten van snRNP-deeltjes. Bevat voornamelijk D-eiwit. E, F, G-subeenheden zijn detecteerbaar. BB'-eiwitten zijn niet detecteerbaar (gezuiverd van runderthymus)
Sm/RNP	snRNP-deeltjes. Bevat hoofdzakelijk 68kD-, A-, BB'-, C- en D-eiwitten. Een significante hoeveelheid snRNA is detecteerbaar (gezuiverd van runderthymus)
SSA/Ro 60kD	Ro 60 kD-eiwit (recombinant, humaan, tot expressie gebracht in Baculovirus-geïnfecteerde Sf9-cellen)
SSB	La 50 kD-eiwit (recombinant, humaan, tot expressie gebracht in Baculovirus-geïnfecteerde Sf9-cellen)
Jo-1	Histidyl-tRNA I-synthetase (recombinant, humaan, tot expressie gebracht in Baculovirus-geïnfecteerde Sf9-cellen)
Scl-70	DNA-topoisomerase I (recombinant, humaan, tot expressie gebracht in Baculovirus-geïnfecteerde Sf9-cellen)

4. VEREIST, MAAR NIET VOORZIEN MATERIAAL

Schudplaat / Micropipetten / Timer / Maatcilinder / Gedistilleerd of gedemineraliseerd water / pincet / absorberend en/of filtreerpapier.

5. OPSLAG

De gereconstitueerde wasbuffer is stabiel gedurende minstens één maand bij 2 - 8 °C. Reagentia en strips kunnen worden opgeslagen bij 2 - 8 °C tot de aangegeven vervaldatum op ieder flesje of buis.

Ongebruikte strips moeten worden teruggeplaatst in de bijgeleverde buis, de buis moet gesloten worden bewaard bij 2 - 8 °C.

Het chromogeen/substraat (NBT/BCIP) moet bij 2 - 8 °C (beschermd tegen licht) worden bewaard.
Bij correcte opslag zijn alle onderdelen van de kit stabiel tot de aangegeven vervaldatum.

6. VOORZORGSMAATREGELEN

1. Alle reagentia zijn uitsluitend bestemd voor in-vitrodiagnostiek en professioneel gebruik. De kit mag alleen door opgeleid technisch personeel worden verwerkt.
2. De reagentia in de kit worden als niet gevaarlijk beschouwd, aangezien de concentraties van potentieel gevaarlijke chemische stoffen onder de door de Europese regelgeving voorgeschreven drempelwaarden liggen (zie MSDS). Desondanks bevat het product conserveringsmiddelen die (in hun gegeven concentratie) licht vervuilende eigenschappen kunnen hebben of overgevoeligheidsreacties van de huid kunnen veroorzaken. Daarom moet contact met de huid, ogen of slijmvliezen worden vermeden. Zoals bij elke chemische stof die specifieke gevaren bevat, mag het product/de componenten van het product alleen door gekwalificeerd personeel en met de nodige voorzorgsmaatregelen worden gehanteerd.
3. De monsters van patiënten moeten worden behandeld alsof ze besmettelijke ziekten kunnen overdragen; ze vereisen dus een geschikte bescherming (handschoenen, laboratoriumjas, veiligheidsbril). In ieder geval moeten de GLP-regels worden toegepast met alle geldende algemene of individuele veiligheidsregels.
4. Afvalverwijdering: Patiëntmonsters, geïncubeerde teststrips en gebruikte reagentiabuisjes moeten als besmettelijk afval worden behandeld. De dozen hoeven niet afzonderlijk te worden ingezameld, tenzij anders vermeld in de officiële voorschriften.

7. AANBEVELINGEN

1. Alphadia en zijn erkende distributeurs kunnen niet aansprakelijk worden gesteld voor schade die indirect of als gevolg van een verandering of wijziging in de aangegeven procedure, een oneigenlijk gebruik van de kit en/of het gebruik van een onvolledige of beschadigde kit ontstaat. Het gebruik van deze kit is voorbehouden aan gekwalificeerd technisch personeel.
2. De aansprakelijkheid van Alphadia blijft in alle gevallen beperkt tot het vervangen van de kit.
3. In het geval van een ernstig incident (letsel, verslechtering van de gezondheid of overlijden) met deze IVD-kit, dient u dit onmiddellijk te melden (zie adres hieronder) en aan de bevoegde instantie in uw land.

8. AFNAME, HANTERING EN OPSLAG VAN MONSTERS

De test mag alleen worden gebruikt op recent verzamelde serummonsters! Onzuivere sera moeten op lage snelheid worden gecentrifugeerd. Bloedmonsters worden verzameld in droge buizen. Vermijd het gebruik van een pool met verschillende sera, aangezien dit tot inconsistente resultaten kan leiden (zie punt 10.4). Na centrifugatie moeten de serummonsters direct worden gebruikt, of in kleinere hoeveelheden worden verdeeld worden en bij 2 - 8 °C bewaard (voor opslag van een paar dagen). Voor langere perioden moeten ze ingevroren worden bij minstens -20 °C. Vermijd het herhaaldelijk invriezen en ontdooien van de monsters.

9. TESTPROCEDURE

BASISINFORMATIE, HANTERING EN TIPS:

De antigeenspots op de strips zijn blauw voorgekleurd zodat zichtbaar is dat alle antigenen correct op het membraan zijn aangebracht. Deze blauwe kleur verdwijnt tijdens de eerste stap van de incubatie. Tijdens incubatie met de wasbuffer is een lichtroze achtergrondkleuring op het membraan zichtbaar; deze verdwijnt na het drogen aan het einde van de test.

Tijdens de procedure is het constant bewegen van de incubatieplaat nodig om een efficiënte circulatie van de buffers over het oppervlakte van het membraan te verzekeren. Een schudplaat is daarbij de beste keuze. Zorg ervoor dat de schudplaat juist is ingesteld zodat geen vloeistof overloopt (ter vermindering van kruisbesmetting).

Beweeg na elke stap de incubatieplaat handmatig tot de strips volledig zijn ondergedompeld; dit brengt de luchtballen die zich onder de strip bevinden naar boven. Anderzijds kunnen drijvende strips naar beneden worden geduwd in de oplossing (duw met een pincet of pipetpunt op de bovenzijde (plasticlabel-zone) van de strip).

Raak het membraan van de strip **nooit aan** met de vingers, pincetten of pipetpunten. Alleen de plasticlabel-zone mag worden aangeraakt. Voer de hele procedure uit bij **kamertemperatuur (18 - 25 °C)**.

Beschrijving van de CONTROLES:

De **positieve controle of RC (reactiecontrole)** bestaat uit een eiwit dat alle immunoglobulinen in het monster fixeert. Als de test correct is uitgevoerd, zal deze controle aan het einde van de test een kleuring vertonen (met een intensiteit die afhankelijk is van de effectieve concentratie van de immunoglobulinen in het monster).

Het ontbreken van een kleuring van deze spot aan het einde van de test kan erop wijzen dat het monster niet op de strip is gepipetteerd (zie 10.4 *Problemen oplossen*).

De **negatieve controle of CO (afkapcontrole)** bestaat uit een eiwit dat reageert met het enzymatische substraat en met bepaalde bestanddelen van het geteste monster. Als de test correct is uitgevoerd, toont deze controle aan het einde van de test een kleuring, met een signaal dat afhankelijk is van de kinetiek van het substraat en de kenmerken van het monster. De intensiteit van deze controle dient als drempelwaarde voor de uiteindelijke interpretatie van de resultaten (zie 10 *DE RESULTATEN INTERPRETEREN*).

9.1 Voorbereiding van reagentia

1. Vóór gebruik, alle componenten op kamertemperatuur (**18 - 25 °C**) laten komen.
2. **Verdun** de geconcentreerde **wasbuffer 10x** met **gedestilleerd water**.
Bereid 15 ml verdunde wasbuffer per teststrip
Bijvoorbeeld: 1,5 ml geconcentreerde wasbuffer + 13,5 ml gedestilleerd water per strip.
Reagentia en strips mogen nooit worden vervangen door producten met verschillende batchnummers; dit kan leiden tot variaties in de resultaten.

9.2 Pipetteerschema

1. **Plaats één strip** per patiënt in de plaat, met de blauwe spots naar **boven**.
2. Voeg **2 ml verdunde wasbuffer** per welletje toe. **Incubeer** (beweeg) **gedurende 10 min.**
Bij juiste incubatie verdwijnt de blauwe kleur van de spots volledig.
Is dit niet het geval? Ga dan door met de procedure totdat de blauwe kleur geheel is verdwenen.
3. **Verwijder** de buffer bij iedere strip.
Keer de plaat langzaam om en laat de buffer eruit lopen. De strips kleven aan de bodem van de welletjes. Droog de rand van de plaat met absorberend papier.
4. Voeg **1,5 ml verdunningsmiddel** per welletje toe.
5. Voeg **10 µl patiëntmonster** per welletje toe. **Incubeer** (beweeg) **gedurende 30 min.**
Raak de membraan niet met de pipetpunt aan. Voeg bij voorkeur het monster aan de oplossing toe boven het bovenste gedeelte van de strip (plasticlabel-zone).
NB: De stappen 4 en 5 kunnen worden gecombineerd door vooraf het monster te verdunnen in een glazen of kunststof buis (1,5 ml verdunningsmiddel + 10 µl patiëntmonster). Meng en pipetteer in het welletje.
6. **Verwijder** de buffer bij iedere strip.
Keer de plaat langzaam om en laat de buffer eruit lopen. De strips kleven aan de bodem van de welletjes. Droog de rand van de plaat met absorberend papier.
7. **Was 3 x 3 minuten** met **1,5 ml verdunde wasbuffer** per welletje (beweeg).
Keer na elke wasbeurt de plaat langzaam om en laat de buffer eruit lopen. De strips kleven aan de bodem van de welletjes. Droog de rand van de plaat met absorberend papier.
8. Voeg **1,5 ml conjugaat** per welletje toe. **Incubeer** (beweeg) **gedurende 30 min.**
9. **Verwijder** de buffer bij iedere strip.
Keer de plaat langzaam om en laat de buffer eruit lopen. De strips kleven aan de bodem van de welletjes. Droog de rand van de plaat met absorberend papier.
10. **Was 3 x 3 minuten** met **1,5 ml verdunde wasbuffer** (beweeg).
Keer na elke wasbeurt de plaat langzaam om en laat de buffer eruit lopen. De strips kleven aan de bodem van de welletjes. Droog de rand van de plaat met absorberend papier.
11. Voeg **1,5 ml substraat** per welletje toe. **Incubeer** (beweeg) **gedurende 10 min.**
12. **Verwijder** de buffer bij iedere strip.
Keer de plaat langzaam om en laat de buffer eruit lopen. De strips kleven aan de bodem van de welletjes. Droog de rand van de plaat met absorberend papier.
13. **Was 1 x 3 min.** met **1,5 ml verdunde wasbuffer** per welletje om de reactie te stoppen.
14. **Verzamel** de strips uit de welletjes en laat ze 30 minuten op absorberend papier drogen. Interpretatie moet binnen 24 uur na het doorlopen van de test plaatsvinden.

10. INTERPRETATIE VAN RESULTATEN

Een visuele (kwalitatieve) interpretatie van de resultaten is mogelijk, maar het gebruik van de BlueDiver Scanner en de Dr Dot-software wordt over het algemeen aanbevolen voor meer precisie en voor een semi-kwantitatieve interpretatie.

BELANGRIJK: De positiviteit van alle parameters in deze kit is NIET mogelijk en in zo'n geval is de test NIET geldig. Er moet een extra test worden uitgevoerd om de diagnose te bevestigen.

10.1. Kwalitatieve interpretatie

1. Verwijder de beschermfolie van de achterkant van elke strip. Bevestig alle strips met de spots naar boven op de gemarkeerde velden van het interpretatiesjabloon dat bij elke kit is meegeleverd. Het sjabloon geeft de respectievelijke posities van antigenen en controles op het membraan.
2. De bovenste spot (**positieve controle**) moet positief zijn voor alle patiënten. Alleen een duidelijk gekleurde positieve controle garandeert dat de uitslagen geldig zijn en dat de test correct is verlopen en/of dat alle kitcomponenten functioneel waren. Als de positieve controle niet is gekleurd, is de test mislukt en kan het interpreteren van de uitslagen niet verder worden uitgevoerd.
3. Vergelijk de **antigeenspots** met de **negatieve controle**. De negatieve controle is altijd de onderste spot op de strip. De kleurintensiteit van de antigeenspots is recht evenredig met de titer van het specifieke antilichaam in het patiëntmonster. *De kleurintensiteit van de negatieve controle kan variëren (afhankelijk van de eigenschappen van het monster).* *Als het monster vrij van is van storende stoffen, kan de kleur van de negatieve controle zelfs dicht bij de achtergrondkleuring liggen. Daarentegen toont een sterk gekleurde negatieve controle een hoge mate van niet-specifieke binding in het monster aan.*

POSITIEF RESULTAAT:

Een monster is positief voor een specifiek antilichaam als de kleurintensiteit van de corresponderende antigeenspot hoger is dan de intensiteit van de negatieve controle.

NEGATIEF RESULTAAT:

Een monster is negatief voor een specifiek antilichaam als de kleurintensiteit van de corresponderende antigeenspot lager of gelijk is aan van de negatieve controle.

Let op: Een zwakke kleuring van een antigeenspot kan, wanneer deze dicht bij de kleurintensiteit van het negatieve controle ligt, moeilijk te onderscheiden zijn door alleen visuele inspectie. In dergelijke gevallen wordt aanbevolen om Dr Dot-software en het scansysteem te gebruiken (zie 10.2) en de bijbehorende instructies te raadplegen voor een nauwkeuriger interpretatie.

10.2 Semi-kwantificering van de resultaten: gebruik van Dr Dot-software en scansysteem (benodigd materiaal: BlueDiver-klem, lege striphouders)

De BlueDiver Scanner is een speciaal ontworpen systeem voor het uitlezen van Alphadia-immunodotstrips. Het speciale deksel maakt een eenvoudige plaatsing van de BlueDiver-klem mogelijk.

Met de Dr Dot-software is een semi-kwantificering van de resultaten mogelijk. Op basis van het gescande beeld wordt elk resultaat gekwantificeerd in grijswaarden en vergeleken met de in de BlueDiver Scanner-deksel geïntegreerde referentieschaal.

Deze grijswaarden worden getransformeerd en weergegeven in willekeurige eenheden (AU, van 0 tot 100) op basis van de intensiteiten van de controles (RC en CO, zie punt 9) die op de strip aanwezig zijn, volgens de volgende conversieformule:

$$\text{Resultaat van antigeen X (AU)} = \frac{\text{Grijswaardenintensiteit van antigeen X} - \text{grijswaardenintensiteit van CO}}{\text{Grijswaardenintensiteit van RC} - \text{grijswaardenintensiteit van CO}} * 100$$

1. Bereid een BlueDiver-klem voor en vul deze met evenveel lege striphouders als er te analyseren strips zijn. Steek voorzichtig een strip in elke striphouder, met de RC naar boven.
2. Plaats de BlueDiver-klem, met de reactieve zijde van de strips naar beneden, in de daarvoor bestemde plaats in het deksel van de BlueDiver Scanner.
3. Start het scannen van de strips met behulp van de Dr Dot-software.
4. De software semi-kwantificeert de resultaten, en de interpretatie van de waarden is als volgt:

Dr Dot willekeurige eenheden (Arbitrary Units - AU)	Interpretatie
< 5	negatief
5 - 10	zwak positief (minder betrouwbaar(*))
>10	positief

Voor gedetailleerde informatie over de BlueDiver Scanner en Dr Dot-software, raadpleegt u de handleiding van uw Dr Dot-software.

10.3 Belangrijke aanbevelingen voor de interpretatie van de resultaten

1. De kits van Alphasia vormen een diagnostisch hulpmiddel. Bijgevolg kan geen enkele diagnose worden gesteld uitsluitend op basis van deze kits. De resultaten moeten altijd worden geïnterpreteerd door rekening te houden met het klinisch onderzoek, de voorgeschiedenis van de patiënt en de resultaten die met andere methoden zijn verkregen. Geen enkele techniek kan de mogelijkheid van fout-positieve of fout-negatieve resultaten uitsluiten. Met dit in het achterhoofd moet, voor zover mogelijk, een indirecte immunofluorescentietest worden uitgevoerd vóór het gebruik van deze kit (immunofluorescentie wordt erkend als een referentiemethode in de auto-immuniteit).
2. De intensiteit van een resultaat is niet noodzakelijkerwijs gerelateerd aan de mate van intensiteit van de ziekte, maar eerder aan het niveau van de gedetecteerde antilichamen.
3. Lage titers van auto-antilichamen kunnen voorkomen bij gezonde patiënten. Om deze reden moeten lage positieve resultaten (dicht bij de CO, tussen 5 en 10 Dr Dot-AU), hoewel geldig, als dubbelzinnig (minder betrouwbaar) worden beschouwd. In dergelijke gevallen wordt aanbevolen de patiënt opnieuw te testen, bij voorkeur met een nieuw monster. Als het resultaat bij het tweede testen onduidelijk blijft, moeten andere diagnostische tests en/of klinische informatie worden gebruikt om de auto-immune status van de patiënt te helpen bepalen.
4. Om verschillende redenen en onder bepaalde omstandigheden kan de kit een defect in de prestaties vertonen (zie 10.4 Problemen oplossen). In dergelijke gevallen zijn de resultaten niet geldig en kunnen ze niet worden geïnterpreteerd. Het wordt aanbevolen om de test te herhalen. Als de fout blijft bestaan, neemt u contact op met uw distributeur.
5. De intensiteit van de resultaten kan afnemen als het apparaat aan het einde van zijn levensduur wordt gebruikt. De prestaties van de kit worden echter niet beïnvloed (detectie van positieven en negatieven) onder normale gebruiksen opslagomstandigheden.
6. Opeenvolgende bemonstering (op verschillende data) van een auto-immuunpatiënt kan soms leiden tot verschillende resultaten van monster tot monster. Dit verschil kan verschillende oorzaken hebben: de behandeling van de patiënt, de evolutie van de ziekte of een seroconversie. In het specifieke geval van seroconversie kan het resultaat positief zijn voor een auto-antilichaam in een vroege bemonstering van de patiënt, en positief worden voor een ander auto-antilichaam in een latere bemonstering van dezelfde patiënt.

10.4 Problemen oplossen

Probleem	Mogelijke oorzaken + actie
Verskil in resultaten ten opzichte van een referentiemethode	<ul style="list-style-type: none"> -Gebruik <ul style="list-style-type: none"> - verkeerd pipetteren van serum - verkeerd uitgegeven volume - gebruik van twee verschillende monsters van dezelfde patiënt (zie punt 10.3.6) of verkeerde behandeling/opslag van monsters tussen tests - verkeerde visuele interpretatie - foutieve Dr Dot-lezing → de test herhalen -Materiaal <ul style="list-style-type: none"> - Storende stof in het monster - Monster is een pool van verschillende menselijke sera → de test herhalen en het resultaat door andere methoden bevestigen -Methode <ul style="list-style-type: none"> - intrinsieke prestaties van de kit (zie 11.2: <i>Analytische sensitiviteit en specificiteit</i>) - vervallen kit - stabiliteitsprobleem <p>Neem contact op met uw distributeur voor verdere technische ondersteuning</p>

Verschillende resultaten in dezelfde batch of tussen meerdere batches -	<ul style="list-style-type: none"> - Gebruik <ul style="list-style-type: none"> - verkeerd pipetteren van serum - verkeerd uitgegeven volume - foutieve visuele interpretatie of - foutief lezen door Dr Dot-software → de test herhalen - Methode <ul style="list-style-type: none"> - intrinsieke prestaties van de kit (zie 11.1: <i>Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid</i>)
Vervuiling tussen aangrenzende strips	<ul style="list-style-type: none"> - Gebruik <ul style="list-style-type: none"> - verkeerd pipetteren van serum → de test herhalen
RC afwezig of zwak	<ul style="list-style-type: none"> - Gebruik <ul style="list-style-type: none"> - Serum helemaal niet gepipetteerd → de test herhalen - Patiënt met immunoglobulinetekort → de test herhalen om de status van de patiënt te bevestigen - Beschadigde reagentia → de integriteit van de reagentia controleren → neem contact op met uw distributeur als u een probleem vermoedt - Spot niet op de strip → het aantal spots op de strip tellen; indien dit niet correct is, neem contact op met uw distributeur.
CO afwezig	<ul style="list-style-type: none"> - beschadigde reagentia → de integriteit van de reagentia controleren; neem contact op met uw distributeur als u een probleem vermoedt - Spot niet op de strip → het aantal spots op de strip tellen; indien dit niet correct is, neem contact op met uw distributeur.
Niet-specifieke bindingen / hoge achtergrond / hoge CO-waarde	<p>Vermoedelijke aanwezigheid van een verontreiniging of een storende stof in het patiëntmonster</p> <p>→ de test herhalen en met een andere methode bevestigen</p> <p>Neem contact op met uw distributeur voor verdere technische ondersteuning</p>
Strips niet correct gelabeld	Productieprobleem → neem contact op met uw distributeur
Verkeerde inhoud van de kit	Productieprobleem → neem contact op met uw distributeur
Een positief resultaat voor ieder biomarker in de kit	Probleem met reagentia → neem contact op met uw distributeur

NB: De belangrijkste restrisico's van de kit, zoals vermeld in de risicoanalyse van de kit aan het einde van het ontwerp (na mitigatie), zijn de volgende:

- 1) Risico op valse resultaten als gevolg van een pipetfout (slecht serum)
- 2) Risico op valse resultaten als gevolg van een storende stof in het monster

11. EIGENSCHAPPEN VAN DE TEST

11.1 Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid

Voor elk antilichaam werden referentiemonsters in opeenvolgende statistische representatieve reeksen getest, zowel in dezelfde tests als in verschillende tests en tussen verschillende lotnummers, om respectievelijk de intra-assay, inter-assay en inter-lot variaties te berekenen.

In alle gevallen lagen de variaties in kleurintensiteit binnen de volgende verwachte grenzen:

- CV ≤ 10% voor intra-assayreeksen
- CV ≤ 15% voor inter-assayreeksen
- CV ≤ 20% voor inter-lotreeksen

11.2 Analytische gevoeligheid

Meetbereik (semi-kwantitatieve resultaten): Van 0 AU (negatief) t/m 100 AU (hoog positief).

Aantoonbaarheidsgrens: de laagst gemeten waarde van de test is 5 AU (beschouwd als 'zwak positief' volgens het interpretatiealgoritme, zie punt 10.2).

Aangezien er geen internationale norm beschikbaar is voor de auto-antilichamen, zijn juistheid van meting en lineariteit niet van toepassing op dit product.

11.3 Analytische specificiteit

- De belangrijkste bekende storende stoffen werden getest op elke biomarker van deze kit. Voor elke geteste concentratie van de storende stof bedroeg het verschil tussen het resultaat van het monster zonder de storende stof en het resultaat verkregen in de aanwezigheid van de storende stof niet meer dan 15%.

Storende stof	Maximale concentratie	Tussentijdse concentratie	Minimale concentratie	Verskil <15%
Bilirubine	100 mg/dL	50 mg/dL	25 mg/dL	Ja
Hemoglobine	200 mg/dL	100 mg/dL	50 mg/dL	Ja

Cholesterol	224,3 mg/dL	112 mg/dL	56 mg/dL	Ja
Reumatoïde factor IgM	~500 IE/ml	~300 IE/ml	~100 IE/ml	Ja

NB: Het is onmogelijk om alle mogelijke storende stoffen die in de literatuur worden beschreven, te testen. Andere interferenties, onder andere door geneesmiddel veroorzaakte interferenties, zijn mogelijk.

- De hoge analytische specificiteit van de test wordt gegarandeerd door de kwaliteit van het gebruikte antigeen. Deze kit detecteert IgG-antilichamen tegen Sm, Sm/RNP, SSA/Ro 60kD, SSB, Jo-1 en Scl-70. Er zijn geen kruisreacties met andere auto-antilichamen gevonden.

11.4 Klinische sensitiviteit en specificiteit

Gekarakteriseerde monsters (door referentielaboratoria en/of -methodologieën als bevestigd positieve of bevestigd negatieve monsters voor specifieke antilichamen) werden getest volgens de testinstructies. De sensitiviteit en specificiteit werden berekend op basis van de resultaten van externe prestatiebeoordelingen en externe kwaliteitsborgingsprogramma's (EQAS). Een gedetailleerd klinisch rapport is op aanvraag beschikbaar.

<p>Sm</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>echt-positief 23</td> <td>fout-positief 0</td> </tr> <tr> <td>fout-negatief 0</td> <td>echt-negatief 244</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitiviteit $\frac{23}{23} = > 99\%$</p> <p>Specificiteit $\frac{244}{244} = > 99\%$</p>	+	-	echt-positief 23	fout-positief 0	fout-negatief 0	echt-negatief 244	<p>Sm/RNP</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>echt-positief 38</td> <td>fout-positief 3</td> </tr> <tr> <td>fout-negatief 1</td> <td>echt-negatief 175</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitiviteit $\frac{38}{39} = 97\%$</p> <p>Specificiteit $\frac{175}{178} = 98\%$</p>	+	-	echt-positief 38	fout-positief 3	fout-negatief 1	echt-negatief 175	<p>SSA/Ro 60kD</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>echt-positief 86</td> <td>fout-positief 0</td> </tr> <tr> <td>fout-negatief 0</td> <td>echt-negatief 132</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitiviteit $\frac{86}{86} = > 99\%$</p> <p>Specificiteit $\frac{132}{132} = > 99\%$</p>	+	-	echt-positief 86	fout-positief 0	fout-negatief 0	echt-negatief 132	<p>SSB</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>echt-positief 44</td> <td>fout-positief 0</td> </tr> <tr> <td>fout-negatief 2</td> <td>echt-negatief 172</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitiviteit $\frac{44}{46} = 96\%$</p> <p>Specificiteit $\frac{172}{172} = > 99\%$</p>	+	-	echt-positief 44	fout-positief 0	fout-negatief 2	echt-negatief 172
+	-																										
echt-positief 23	fout-positief 0																										
fout-negatief 0	echt-negatief 244																										
+	-																										
echt-positief 38	fout-positief 3																										
fout-negatief 1	echt-negatief 175																										
+	-																										
echt-positief 86	fout-positief 0																										
fout-negatief 0	echt-negatief 132																										
+	-																										
echt-positief 44	fout-positief 0																										
fout-negatief 2	echt-negatief 172																										
<p>Jo-1</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>echt-positief 57</td> <td>fout-positief 0</td> </tr> <tr> <td>fout-negatief 0</td> <td>echt-negatief 162</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitiviteit $\frac{57}{57} = > 99\%$</p> <p>Specificiteit $\frac{162}{162} = > 99\%$</p>	+	-	echt-positief 57	fout-positief 0	fout-negatief 0	echt-negatief 162	<p>Scl-70</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>+</th> <th>-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>echt-positief 13</td> <td>fout-positief 0</td> </tr> <tr> <td>fout-negatief 0</td> <td>echt-negatief 206</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitiviteit $\frac{13}{13} = > 99\%$</p> <p>Specificiteit $\frac{206}{206} = > 99\%$</p>	+	-	echt-positief 13	fout-positief 0	fout-negatief 0	echt-negatief 206	<p>NB: Sensitiviteits- en specificiteitswaarden van 100% zijn strikt gerelateerd aan monstercohorten die in klinische evaluaties worden gebruikt. In theorie zou een diagnostische kit nooit als 100% sensitief of specifiek mogen worden beschouwd (minstens >99%).</p>													
+	-																										
echt-positief 57	fout-positief 0																										
fout-negatief 0	echt-negatief 162																										
+	-																										
echt-positief 13	fout-positief 0																										
fout-negatief 0	echt-negatief 206																										

11.5 Diagnostische waarden van auto-antilichamen

Anti-Sm	Diagnostische marker (ACR- en SLICC-criterium) voor systemische lupus erythematoses (SLE). Diagnostische specificiteit van 99% voor systemische lupus erythematoses (SLE). Diagnostische sensitiviteit van 5-40% voor systemische lupus erythematoses (SLE).
Anti-Sm/RNP	Sm: Diagnostische marker (ACR- en SLICC-criterium) voor systemische lupus erythematoses (SLE) Diagnostische specificiteit van 99% voor systemische lupus erythematoses (SLE) Diagnostische sensitiviteit van 5-40% voor systemische lupus erythematoses (SLE) RNP 68kD/A/C: Diagnostisch criterium van gemengde bindweefselziekte (mixed connective-tissue disease, MCTD). Zeer specifiek en uiterst sensitief (100%) bij afwezigheid van Sm- en dsDNA-antilichamen. Gevonden bij 13 - 32 % van de patiënten met systemische lupus erythematoses (SLE). Gevonden bij 10% van de patiënten met systemische sclerose (SSc).
Anti-SSA/Ro 60kD	Diagnostische marker en classificatiecriterium voor syndroom van Sjögren (SjS). Door EIA: Gevonden bij 96% van de patiënten met primaire SjS. Gevonden bij 80% van de patiënten met secundaire SjS. Gevonden bij 25 - 60 % van de patiënten met systemische lupus erythematoses (SLE). Gevonden bij 90 - 100 % van de patiënten met subacute cutane lupus erythematoses (SCLE). Gevonden bij 90% van de patiënten met neonatale cutane lupus erythematoses (NLE). Vaker (5 - 15%) gevonden bij patiënten met reumatoïde artritis (RA). Gevonden bij 9% van de patiënten met systemische sclerose (SSc).
Anti-SSB	Diagnostische marker voor syndroom van Sjögren (SjS). Door EIA:

	Gevonden bij 70% van de patiënten met primaire SjS. Gevonden bij 50% van de patiënten met secundaire SjS. Gevonden bij 25% van de patiënten met systemische lupus erythematoses (SLE). Gevonden bij 80 % van de patiënten met subacute cutane lupus erythematoses (SCLE). Gevonden bij 70% van de patiënten met neonatale cutane lupus erythematoses (NLE).
Anti-Jo-1	Diagnostische marker voor idiopathische (auto-immuun) myositis. Diagnostische specificiteit van 100%, diagnostische sensitiviteit van 24-30% voor auto-immuun idiopathische myositis.
Anti-Scl-70	Diagnostische marker voor systemische sclerose (SSc). Diagnostische specificiteit van 99%, sensibilliteit van 10% voor gelimiteerde SSc en tot 65% voor diffuse SSc.

Publicatieverwijzingen:

- Orme ME, Andalucia C, Sjölander S, Bossuyt X. A comparison of a fluorescence enzyme immunoassay versus indirect immunofluorescence for initial screening of connective tissue diseases: Systematic literature review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2018 Aug;32(4):521-534. doi: 10.1016/j.berh.2019.03.005. Epub 2019 Apr 15. PMID: 31174821.
- Jeong S, Hwang H, Roh J, Shim JE, Kim J, Kim GT, Tag HS, Kim HS. Evaluation of an Automated Screening Assay, Compared to Indirect Immunofluorescence, an Extractable Nuclear Antigen Assay, and a Line Immunoassay in a Large Cohort of Asian Patients with Antinuclear Antibody-Associated Rheumatoid Diseases: A Multicenter Retrospective Study. *J Immunol Res.* 2018 May 2;2018:9094217. doi: 10.1155/2018/9094217. PMID: 29854849; PMCID: PMC5954951.
- Showman O, Gilburd B, Chayat C, Amital H, Langevitz P, Watad A, Guy A, Perez D, Azoulay D, Blank M, Segal Y, Bentow C, Mahler M, Shoenfeld Y. Prevalence of anti-DFS70 antibodies in patients with and without systemic autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 2018 Jan-Feb;36(1):121-126. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28770702.
- Zheng B, Wang Z, Mora RA, Liu A, Li C, Liu D, Zhai F, Liu H, Gong H, Zhou J, Liu J, Chen L, Wu L, Yuan L, Ying L, Jie L, He M, Hao M, Xu P, Lu Q, Han S, Chen S, Chen S, Zhu S, Sun W, Guo X, Chen Y, Wang Y, Qu Y, Li Z, Niu Z, Han Z, Chan EKL. Anti-DFS70 Antibodies Among Patient and Healthy Population Cohorts in China: Results From a Multicenter Training Program Showing Spontaneous Abortion and Pediatric Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases Are Common in Anti-DFS70 Positive Patients. *Front Immunol.* 2020 Oct 2;11:562138. doi: 10.3389/fimmu.2020.562138. PMID: 33133072; PMCID: PMC7566153.
- Hayashi N, Uto K, Imanishi A, Sugiyama D, Morinobu A, Saegusa J. Prevalence of anti-dense fine speckled 70 antibodies in healthy individuals and patients with antinuclear antibody-associated autoimmune rheumatic diseases in Japan. *Medicine (Baltimore).* 2021 Mar 5;100(9):e24556. doi: 10.1097/MD.00000000000024556. PMID: 33655922; PMCID: PMC7939200.
- Aberle T, Bourn RL, Munroe ME, Chen H, Roberts VC, Guthridge JM, Bean K, Robertson JM, Sivils KL, Rasmussen A, Liles M, Merrill JT, Harley JB, Olsen NJ, Karp DR, James JA. Clinical and Serologic Features in Patients With Incomplete Lupus Classification Versus Systemic Lupus Erythematosus Patients and Controls. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2017 Dec;69(12):1780-1788. doi: 10.1002/acr.23201. Epub 2017 Nov 14. PMID: 28118528; PMCID: PMC5524597.
- Zian Z, Maamar M, Aouni ME, Barakat A, Naima Ghailani Nourouti, El Aouad R, Arji N, Bennani Mechita M. Immunological and Clinical Characteristics of Systemic Lupus Erythematosus: A Series from Morocco. *Biomed Res Int.* 2018 Sep 30;2018:3139404. doi: 10.1155/2018/3139404. PMID: 30363993; PMCID: PMC6186365.
- Wei Q, Jiang Y, Xiao M, Zhang X, Qi J, Xie J, Wu J, Wu Z, Gu J. Comparison of chemiluminescence microparticle immunoassay, indirect immunofluorescence assay, linear immunoassay and multiple microbead immunoassay detecting autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol.* 2020 Mar;91(3):e12849. doi: 10.1111/sji.12849. Epub 2020 Jan 3. PMID: 31899559.
- Au EY, Ip WK, Lau CS, Chan YT. Evaluation of a multiplex flow immunoassay versus conventional assays in detecting autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Hong Kong Med J.* 2018 Jun;24(3):261-269. doi: 10.12809/hkmj177007. Epub 2018 May 25. PMID: 29807953.
- Betteridge ZE, Woodhead F, Lu H, Shaddick G, Bunn CC, Denton CP, Abraham DJ, du Bois RM, Lewis M, Wells AU, McHugh NJ. Brief Report: Anti-Eukaryotic Initiation Factor 2B Autoantibodies Are Associated With Interstitial Lung Disease in Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Nov;68(11):2778-2783. doi: 10.1002/art.39755. PMID: 27273608.
- René Louis Humbel, Groupe d'étude de l'auto-immunité (GEAI), l'info n°7, Mise au point anticorps anti Mi-2, Anticorps anti-DFS70/LEDGF/P75, p3, p6 mai 2015
- Karsten Conrad, Werner Schössler, Falk Hiepe, Marvin J. Fritzler, Book "Autoantibodies in systemic Autoimmune Diseases", Volume 2, third edition - 2015.

12. TESTBEPERKINGEN

- De met deze bevestigingstest verkregen resultaten zijn afhankelijk van de intrinsieke prestaties van de kit en moeten worden beschouwd als een hulpmiddel bij de uiteindelijke diagnose, waarbij rekening wordt gehouden met de resultaten verkregen via referentietechniek en de klinische gegevens van de patiënt.
- In het geval van hyperlipemische monsters wordt aanbevolen om het monster te centrifugereren voordat de 10 µl van het monster in de bovenstaande vloeistof wordt gepipetteerd.

