AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKULISA®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKULISA® Protein S

Ref 3902

CE | Σ 96 | 2°C – 8°C | IVD | eIFU WWW.AESKU.COM

Οδηγίες χρήσης

Περιεχόμενα

1 Ενδεδειγμένη χρήση 1
2 Κλινική εφαρμογή και αρχές της μεθόδου 1
3 Συστατικά στοιχεία που περιέχονται στο σετ 2
4 Φύλαξη και χρόνος διατήρησης 2
5 Υποδείξεις και προφυλάξεις 3
6 Λήψη δείγματος, προετοιμασία και φύλαξη 4
7 Διαδικασία της μεθόδου 4
8 Ποσοτική και ποιοτική ερμηνεία 8
9 Τεχνικά στοιχεία 9
10 Στοιχεία Απόδοσης 9
11 Βιβλιογραφία 12
12 Ρυθμιστικά σύμβολα 13

Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim
Germany
Tel: +49 6734 9622-0
Fax: +49 6734 9622-2222
Website: www.aesku.com
Mail: info@aesku.com

1 Ενδεδειγμένη χρήση

AESKULISA® **Protein S** είναι μια ενζυμοανοσολογική μέθοδος στερεής φάσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της Ολικής και Ελεύθερης πρωτεΐνης S σε ανθρώπινο πλάσμα στο οποίο έχουν προστεθεί κιτρικά.

2 Κλινική εφαρμογή και αρχές της μεθόδου

Η πρωτεΐνη S είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 70 kDa που εξαρτάται από τη βιταμίνη K της οποίας η σύνθεση γίνεται κυρίως από τα ηπατοκύτταρα, αλλά και από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα Leydig στους όρχεις, και τα μεγακαρυοκύτταρα. Σε ανθρώπινο πλάσμα εντοπίζεται με συγκέντρωση 25 μg/ml και έχει ημιζωή δυο κατά προσέγγιση ημερών. Περίπου το 40 % της πρωτεΐνης S κυκλοφορεί σε μια λειτουργικά ενεργή ελεύθερη μορφή, δεδομένου ότι το 60% συμπλέκεται με C4b-σταθεροποιητική πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη S διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στο αντιπηκτικό σύστημα της πρωτεΐνης C όπου η ελεύθερη πρωτεΐνη S λειτουργεί ως συμπαράγοντας ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (aPC). Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που εξαρτώνται από τη βιταμίνη K η πρωτεΐνη S έχει τη μεγαλύτερη συνάφεια αναφορικά με αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια και γι' αυτό αυξάνει τη συνάφεια ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C με μεμβράνες σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα. Το γεγονός είναι σημαντικό από άποψη φυσιολογίας καθώς η aPC αδρανοποιεί επιλεκτικά τους παράγοντες πηκτικότητας Va και VIIIa που δεσμεύονται στη μεμβράνη. Η ανεπάρκεια πρωτεΐνης S μπορεί να είναι κληρονομική ή επίκτητη και αυξάνει τον κίνδυνο θρομβωτικών επεισοδίων όπως βαθιά φλεβική θρόμβωση, πνευμονική εμβολή, ή θρομβοφλεβίτιδα. Ο επιπολασμός της ανεπάρκειας πρωτεΐνης S στο γενικό πληθυσμό έχει εκτιμηθεί σε ένα περιστατικό στα 300. Σχεδόν 50 % των ατόμων με κληρονομική ανεπάρκεια πρωτεΐνης S θα αντιμετωπίσουν θρομβωτικό επεισόδιο πριν από την ηλικία των 45 ετών. Η επίκτητη ανεπάρκεια πρωτεΐνης S είναι πιο συνηθισμένη από την κληρονομική μορφή της. Μεταξύ άλλων μπορεί να παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια πόσιμης αντιπηκτικής θεραπείας, λήψης χαπιών, εγκυμοσύνης, ηπατικών ασθενειών, σακχαρώδους διαβήτη, χημειοθεραπείας και διαφόρων φλεγμονωδών συνδρόμων. Η ανεπάρκεια πρωτεΐνης S ταξινομείται σε τρία στάδια. Η ανεπάρκεια τύπου I είναι μια μείωση στο επίπεδο και της Ελεύθερης και της Ολικής πρωτεΐνης S. Η ανεπάρκεια τύπου II χαρακτηρίζεται από μειωμένη δραστηριότητα πρωτεΐνης S, με φυσιολογικό επίπεδο αντιγόνου. Η ανεπάρκεια τύπου III αντιστοιχεί σε μειωμένο επίπεδο αντιγόνου και δραστηριότητα Ελεύθερης πρωτεΐνης S μόνο. Για να προσδιοριστεί ο τύπος της ανεπάρκειας, η εργαστηριακή διάγνωση της πρωτεΐνης S ενδεχομένως να απαιτεί τόσο τον προσδιορισμό των επιπέδων αντιγόνου και της Ελεύθερης και της Ολικής πρωτεΐνης S όσο και λειτουργικό προσδιορισμό της.

Αρχές της δοκιμασίας

Η πρωτεΐνη S AESKULISA είναι μια ELISA τύπου σάντουιτς που χρησιμοποιεί μικροπλάκες επικαλυμμένες με ένα αντίσωμα καθήλωσης ειδικό για την ανθρώπινη πρωτεΐνη S. Αραιωμένο πλάσμα ασθενούς σε αναλογία 1:51 επωάζεται στα βυθίσματα ώστε η πρωτεΐνη S να υπάρχει στο πλάσμα για τη δέσμευση του αντισώματος. Το μη δεσμευμένο κλάσμα απομακρύνεται με πλύση. Στη συνέχεια, αντιανθρώπινο αντίσωμα εντοπισμού πρωτεΐνης S συνδεδεμένο με horseradish περοξειδάση (σύζευγμα) επωάζεται και αντιδρά με το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος στην επιφάνεια μικροτιτλοδότησης. Κατόπιν της επώασης, το μη δεσμευμένο σύζευγμα απομακρύνεται με πλύση. Η προσθήκη υποστρώματος TMB παράγει μια ενζυμική χρωματομετρική (μπλε) αντίδραση, η οποία διακόπτεται με την προσθήκη αραιωμένου οξέως (το χρώμα γίνεται κίτρινο). Το ποσοστό σχηματισμού χρώματος από το χρωμογόνο μετρείται σε μονάδες οπτικής πυκνότητας με ένα φασματοφωτόμετρο στα 450 nm. Χρησιμοποιώντας μια καμπύλη που προετοιμάζεται από το πρότυπο πλάσματος που παρέχεται με το κιτ, μπορεί να προσδιοριστεί το σχετικό ποσοστό συγκέντρωσης αντιγόνου πρωτεΐνης S στο πλάσμα του ασθενούς.

3 Συστατικά στοιχεία που περιέχονται στο σετ

ΔΙΑΛΥΟΝΤΑΙ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ				
Στοιχείο	Ποσότητα	Χρώμα καπακιού	Χρώμα διαλύματος	Περιγραφή / Περιεχόμενο
Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων (5x)	1 x 20ml	Λευκό	Κίτρινο	5πλάσια συγκέντρωση Tris, χλωριούχο νάτριο (NaCl), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)
Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (50x)	1 X 20ml	Λευκό	Πράσινο	50πλάσια συγκέντρωση Tris, NaCl, Tween 20, οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)
πλάσμα αναφοράς	3 x 0,4ml	Λευκό	-	Συστατικά στοιχεία: Ανθρώπινο πλάσμα
έλεγχος „N“	3 x 0,2ml	Λευκό	-	Συστατικά στοιχεία: Ανθρώπινο πλάσμα
έλεγχος „D“	3 x 0,2ml	Λευκό	-	Συστατικά στοιχεία: Ανθρώπινο πλάσμα
ΕΤΟΙΜΑ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ				
Στοιχείο	Ποσότητα	Χρώμα καπακιού	Χρώμα διαλύματος	Περιγραφή / Περιεχόμενο
Διάλυμα PEG	2 x 2ml	Κόκκινο	Πράσινο	πολυαιθυλενογλυκόλη, Οξείδιο του νατρίου < 0,1 %(Συντηρητικό)
Σύζευγμα IgG	1 x 15ml	Μπλε	Μπλε	Αντι – ανθρώπινη Protein S σημαδεμένη με υπεροξειδάση από ραφανίδα
Υπόστρωμα TMB	1 x 15ml	Μαύρο	Διαυγές	Σταθεροποιημένη τετραμεθυλβενζιδίνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου (TMB/H_2O_2)
Διάλυμα διακοπής αντίδρασης	1 x 15ml	Λευκό	Διαυγές	1M Υδροχλωρικό οξύ
Πλάκα μικροτιτλοποίησης	12 x 8 ταινίες	Δεν είναι διαθέσιμο	Δεν είναι διαθέσιμο	Με αποσπώμενους υποδοχείς. Ανατρέξτε στην παράγραφο 1 για πληροφορίες σχετικά με την επικάλυψη.
* Η ένταση του χρώματος αυξάνεται με τη συγκέντρωση				

Απαιτούμενα υλικά:

Ο αναγνώστης πλακών μικροτιτλοποίησης 450 nm αναγιγνώσκει φίλτρα ανάγνωσης και προαιρετικό 620 nm φίλτρα αναφοράς (600-690 nm). Γυάλινα εξαρτήματα (κύλινδρος 100-1000ml), δοκιμαστικοί σωλήνες για διαλύματα. Δονητής ανάμιξης, προχοϊδες ακρίβειας (10, 100, 200, 500, 1000 µl) ή προσαρμοζόμενη πολυπροχοϊδα (100-1000µl). Συσκευή πλύσης μικροπλάκας (300µl επαναλαμβανόμενη προχοϊδα, ή προχοϊδα πολλαπλών καναλιών ή αυτοματοποιημένο σύστημα), απορροφητικό χαρτί. Οι δοκιμασίες μας έχουν ως σχεδιαστεί για να χρησιμοποιηθούν με καθαρό ύδωρ σύμφωνα με τους ορισμούς της Φαρμακοποιίας Ηνωμένων Πολιτειών (USP 26 - NF 21) και της Ευρωπαϊκής φαρμακοποιίας (Eur.Ph. 4th ed.).

4 Φύλαξη και χρόνος διατήρησης

Τα αντιδραστήρια του συνόλου αντιδραστηρίων και η μικροπλάκα πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8 °C/35,6-46,4 °F μέσα στους αυθεντικούς περιέκτες. Οι αραιωμένες λύσεις είναι ανθεκτικές - με την εξαίρεση του πλάσματος και των ελέγχων αναφοράς - με 2-8 °C/35,6-46,4 °F ένας μήνας. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στη συσκευασία και στις ετικέτες του κάθε συστατικού. Τα κοντρόλ παραμένουν σταθερά για 8 ώρες όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8 °C/35,6-46,4 °F.

Μη χρησιμοποιείται ληγμένα συστατικά στοιχεία του συνόλου αντιδραστηρίων! Πρέπει να αποφεύγεται η έντονη επίδραση φωτός στο διάλυμα υποστρώματος TMB. Οι μικοπλάκες να φυλάσσονται πάντοτε με ξηραντικό υλικό καλά κλεισμένες μέσα στη μεμβράνη της συσκευασίας.

5 Υποδείξεις και προφυλάξεις

5.1 Επικινδυνότητα για την υγεία

ΑΑΥΤΟ ΤΟ ΠΡΟΪΟΝ ΕΠΙΤΡΕΠΕΤΑΙ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΧΡΗΣΗ (IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ).

Πρέπει να χρησιμοποιείται από προσωπικό, το οποίο έχει κατατοπιστεί και εκπαιδευτεί ειδικά στη χρησιμοποίηση in vitro διαγνωστικών υλικών. Αν και αυτό το προϊόν δεν θεωρείται ιδιαίτερα τοξικό ή επικίνδυνο υπό συνθήκες ενδεδειγμένης χρήσης, συμβουλευτείτε τις παρακάτω πληροφορίες για τη διαφύλαξη της μέγιστης ασφάλειας:

Συστάσεις και μέτρα προφύλαξης

Μεμονωμένα συστατικά του συνόλου αντιδραστηρίων περιέχουν δυνητικά επικίνδυνα αντιδραστήρια, τα οποία είναι δυνατό να προκαλέσουν ερεθισμό των οφθαλμών και του δέρματος. ΠΡΟΣΟΧΗ! Διακριβωτές, έλεγχοι και ρυθμιστικά διαλύματα περιέχουν αζίδιο του νατρίου (NaN_3) ως συντηρητικό. Το NaN_3 μπορεί να είναι τοξικό εάν προληφθεί ή απορροφηθεί από το δέρμα ή τα μάτια. Το NaN_3 μπορεί να αντιδράσει με την εγκατάσταση μολύβδου και χαλκού σχηματίζοντας ιδιαίτερα εκρηκτικά μεταλλικά αζίδια. Κατά την απόρριψη, ξεπλύνετε με μεγάλο όγκο ύδατος για να αποτρέψετε τη δημιουργία αζιδίων. Παρακαλώ ανατρέξετε στις διαδικασίες απολύμανσης όπως περιγράφονται από τη CDC ή άλλες τοπικές/ εθνικές οδηγίες.

Κατά τη διάρκεια της εργασίας με το σετ, απαγορεύεται το φαγητό, το ποτό και το κάπνισμα.Μη χρησιμοποιείτε την προχοΐδα (πιπέττα) δια μέσω του στόματος, φοράτε γάντια μίας χρήσης.

Το Πλάσμα αναφοράς και τα Κοντρόλ που περιλαμβάνονται σε αυτό το κιτ έχουν ελεγχθεί μέσω εγκεκριμένων μεθόδων και έχουν βρεθεί αρνητικά για HbsAg, Ηπατίτιδα C και HIV 1. Ωστόσο, κανένας έλεγχος δεν εγγυάται την πλήρη απουσία ιογενών παραγόντων σε τέτοιο υλικό. Επομένως, χειρίζεστε το Πλάσμα αναφοράς, τα Κοντρόλ και τα δείγματα των ασθενών ως ικανά να μεταδώσουν μολυσματικές νόσους και ακολουθείτε τους εθνικούς κανονισμούς.

5.2 Γενικές υποδείξεις

Στην περίπτωση κατά την οποία οι πληροφορίες του προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων των ετικετών, είναι ελλιπείς ή εσφαλμένες, επικοινωνήστε με τον κατασκευαστή ή τον προμηθευτή του κιτ δοκιμής.

Μην μπλέκετε η αντικαθιστάτε Μάρτυρες, Βαθμονομητές, Ενζυμα Σύζευξης η μικροπλάκες από διαφορετικές παρτίδες. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αποκλίσεις στα αποτελέσματα.
Αφήστε όλα τα συστατικά του σετ να λάβουν θερμοκρασία δωματίου πριν από την έναρξη της δοκιμασίας (20-26 °C/68-78,8 °F) και αναμείξτε καλά. Πρέπει οπωσδήποτε να τηρείται το καθορισμένο πρωτόκολλο για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας.
Επώαση: Συνιστούμε απόδοση δοκιμής στους 23 °C/73,4 °F για αυτοματοποιημένα συστήματα.
Μην εκθέτετε ποτέ τα συστατικά του συνόλου αντιδραστηρίων σε θερμοκρασίες άνω των 37 °C/98,6 °F Χρησιμοποιείτε για τη λήψη του διαλύματος του υποστρώματος πάντοτε καινούρια – συσκευασμένα ρύγχη για την πιπέτα, για να αποφεύγετε μολύνσεις. Αποφεύγετε την επαφή του διαλύματος υποστρώματος με έντονο φως. Μη χρησιμοποιείτε για το διάλυμα συζεύγματος ποτέ τα ίδια ρύγχη πιπέτας που έχουν έρθει σε επαφή με άλλα αντιδραστήρια.
Η τελική κλινική διάγνωση δεν πρέπει να τίθεται μόνο με βάση τα αποτελέσματα της διεξαγμένης δοκιμασίας, αλλά από τον ιατρό λαμβάνοντας υπόψη όλα τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Η διάγνωση πρέπει να επιβεβαιώνεται χρησιμοποιώντας διαφορετικές διαγνωστικές μεθόδους.

6 Λήψη δείγματος, προετοιμασία και φύλαξη

Συνιστάται η χρήση φρέσκων δειγμάτων ορού. Η λήψη του αίματος πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τα εθνικά νομικά αξιώματα.Να μη χρησιμοποιούνται: ικτερικά, λιπαιμικά, αιμολυμένα ή μολυσμένα από βακτήρια δείγματα ορού. Δείγματα ορών που περιέχουν σωματίδια, να τοποθετούνται με χαμηλή ταχύτητα στη συσκευή φυγοκέντρησης (<1000 x g). Συλλέγετε τα δείγματα αίματος σε καθαρά, στεγνά και κενά φιαλίδια.

Κατόπιν διαχωρισμού τα δείγματα πλάσματος πρέπει να χρησιμοποιηθούν εντός των πρώτων 8 ωρών, διαφορετικά πρέπει να φυλάσσονται κλεισμένα αεροστεγώς στους 2-8 °C/35,6-46,4 °F για 48 ώρες το μέγιστο. Σε περίπτωση που προβλέπεται μεγαλύτερη διάρκεια φύλαξης, τα δείγματα πρέπει να ψύχονται στους -20 °C/-4 °F.

7 Διαδικασία της μεθόδου

7.1 Προετοιμασία

Προετοιμασία πριν την εισαγωγή σε πιπέτα Αραίωση συμπυκνωμένων αντιδραστηρίων:

Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων: αραιώνετε 1:5 με αποσταγμένο νερό (π.χ. 20 ml συν 80 ml).

Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης: αραιώνετε 1:50 με αποσταγμένο νερό (π.χ. 20 ml συν 980 ml).

Πρότυπο πλάσματος:

Κάντε ανασύσταση του πρότυπου πλάσματος με την προσθήκη 0,4 ml αποσταγμένου νερού και ανακινήστε απαλά. Αφήστε το ανασυσταμένο πλάσμα να ηρεμήσει για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Το πρότυπο πλάσματος παραμένει σταθερό για 8 ώρες όταν αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 2-8 °C/35,6-46,4 °F.

Κοντρόλ:

Κάντε ανασύσταση των κοντρόλ N και D με την προσθήκη 0,2 ml αποσταγμένου νερού και ανακινήστε απαλά. Αφήστε τα ανασυσταμένα κοντρόλ να ηρεμήσουν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Τα κοντρόλ παραμένουν σταθερά για 8 ώρες όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8 °C/35,6-46,4 °F.

Προετοιμασία με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) για καθορισμό ελεύθερης πρωτεΐνης S:

Μην αραιώνετε δείγματα πλάσματος πριν από την προετοιμασία PEG. Προσθέστε 15 µl διαλύματος PEG σε 85 µl πλάσματος ασθενή ή κοντρόλ. Για να προετοιμάσετε την πρότυπη καμπύλη προσθέστε 45 µl διαλύματος PEG σε 255 µl ανασυσταμένου πρότυπου πλάσματος. Περιδινήστε τα δείγματα και τοποθετήστε τα σε πάγο για 30 λεπτά. Μετά την επώαση φυγοκεντρήστε τα δείγματα για 10 λεπτά σε 3000 x g. Προετοιμάστε την πρότυπη καμπύλη, την αραίωση του κοντρόλ και την αραίωση του δείγματος χρησιμοποιώντας το υπερκείμενο υγρό όπως περιγράφεται παρακάτω.

Προαραίωση του πρότυπου πλάσματος για καθορισμό ολικής και ελεύθερης πρωτεΐνης S:

Για ολική πρωτεΐνη S η προαραίωση προετοιμάζεται με τη χρήση του ανασυσταμένου πρότυπου πλάσματος. Για ελεύθερη πρωτεΐνη S η προαραίωση προετοιμάζεται με τη χρήση του υπερκείμενου υγρού του πρότυπου πλάσματος με επεξεργασία PEG. Ετοιμάστε μία αραίωση 1:2 του ανασυσταμένου πλάσματος αναφοράς στο προαραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων (1x) και αναμείξτε καλά, π.χ. 100µl ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων+100µl πλάσμα.

Προετοιμασία για την πρότυπη καμπύλη:
Το σετ αραίωσης προετοιμάζεται με τη χρήση του προαραιωμένου πρότυπου πλάσματος.

Όγκος πρότυπου πλάσματος	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος	Επίπεδο αναφοράς
60 µl	1000 µl	150 %
40 µl	1000 µl	100 %
30 µl	1000 µl	75 %
20 µl	1000 µl	50 %
10 µl	1000 µl	25 %
10 µl	2000 µl	12.5 %

Αραίωση των δειγμάτων και των κοντρόλ:

Προσθέστε 20 µl πλάσματος σε 1000 µl ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος (1x) και αναμείξτε καλά.

Για ελεύθερη πρωτεΐνη S: Προσθέστε 20 µl υπερκείμενου υγρού του πλάσματος με επεξεργασία PEG σε 1000 µl διαλύματος δείγματος (1x) και αναμείξτε καλά.

Πλύση:

Απαιτούνται 20 ml αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (1x) ανά 8 βυθίσματα ή 200 ml ανά 96 βυθίσματα (π.χ. 4 ml συμπύκνωμα συν 196 ml αποσταγμένο νερό).

Αυτοματοποιημένη πλύση:

Για τη λειτουργία του εργαλείου και το νεκρό όγκο της αυτόματης πιπέτας πρέπει να ληφθούν υπόψη πρόσθετες ποσότητες.

Χειροκίνητη πλύση:

Απομακρύνετε το υγρό χτυπώντας την πλάκα επάνω σε ένα απορροφητικό χαρτί. Βάζετε 300 µl αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης σε κάθε βύθισμα χρησιμοποιώντας την πιπέτα, περιμένετε 20 δευτερόλεπτα. Επαναλάβετε τη διαδικασία ακόμη δύο φορές.

Μικροπλάκες:

Απομακρύνετε τα βυθίσματα που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί και φυλάσσετέ τα με ξηραντικό υλικό καλά κλεισμένα μέσα στη μεμβράνη της συσκευασίας σε δροσερό μέρος (2-8 °C/35,6-46,4 °F).

7.2 Σχήμα διανομής αντιδραστηρίων

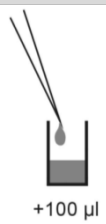
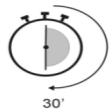
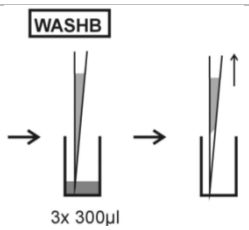
Προτείνουμε τη χρήση της πιπέτας για αντιδραστήρια βαθμονόμησης, ορούς ελέγχου και δείγματα ως εξής:

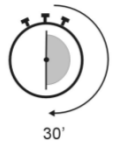
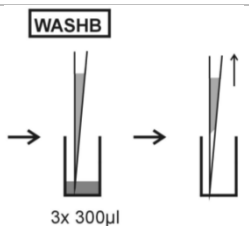
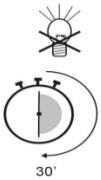
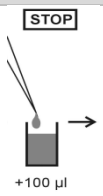
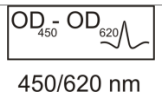
Για **ποσοτική ερμηνεία**, χρησιμοποιήστε τις αραιώσεις εργασίας του πρότυπου πλάσματος για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης.

	1	2	3	4...	
A	150	25	P1		
B	150	25	P1		
C	100	12.5	P2		
D	100	12.5	P2		
E	75	CD	P3		
F	75	CD	P3		
G	50	CN	...		
H	50	CN	...		

150: Reference Level 150 %
100: Reference Level 100 %
75: Reference Level 75 %
50: Reference Level 50 %
25: Reference Level 25 %
12.5: Reference Level 12.5 %
CD: control ‚deficient plasma
CN: control ‚normal plasma‘
P1: patient 1
P2: patient 2
P3: patient 3

7.3 Βήματα εργασίας

Βήμα	*Περιγραφή*
1.	Πριν από το πιπετάρισμα βεβαιωθείτε ότι έχετε εκτελέσει τη διαδικασία προετοιμασίας από το βήμα 7.1 παραπάνω.
2.	Ακολουθήστε τα παρακάτω βήματα ανάλογα με τα επιθυμητά αποτελέσματα ποιοτικής/ποσοτικής ερμηνείας:
	ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΔΕΙΓΜΑΤΑ
3.	 Βάζετε 100 µl αραιωμένου πλάσματος από κάθε ασθενή στις προβλεπόμενες μικροτιτλοδοτήσεις χρησιμοποιώντας την πιπέτα. Βάζετε 100 µl αραιωμένου πλάσματος από κάθε ασθενή στις προβλεπόμενες μικροτιτλοδοτήσεις χρησιμοποιώντας την πιπέτα.
4.	 Επωάζετε για 30 λεπτά σε 20-26 °C/68-78,8 °F.
5.	 Πλένετε 3 φορές, κάθε φορά με 300 µl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (αραιωμένο 1:50).

	ΣΥΖΕΥΓΜΑ	
6.		Βάζετε 100 µl διαλύματος συζεύγματος σε κάθε υποδοχέα χρησιμοποιώντας πιπέτα.
7.		Επωάζετε για 30 λεπτά σε 20-26 °C/68-78,8 °F.
8.		Πλένετε 3 φορές, κάθε φορά με 300 µl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (αραιωμένο 1:50).
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	
9.		Βάζετε 100 µl διαλύματος υποστρώματος TMB σε κάθε υποδοχέα χρησιμοποιώντας την πιπέτα.
10.		Επωάζετε για 30 λεπτά σε 20-26 °C/68-78,8 °F. Προστατεύστε από το έντονο φως.
	ΔΙΑΛΥΜΑ ΔΙΑΚΟΠΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	
11.		Βάζετε 100 µl διαλύματος διακοπής αντίδρασης σε κάθε βύθισμα με τη σειρά που τοποθετήθηκε το υπόστρωμα χρησιμοποιώντας την πιπέτα.
12.		Επωάζετε για 5 λεπτά τουλάχιστον.
13.		Ανακινείτε προσεκτικά την πλάκα για 5 δευτερόλεπτα.
14.		Μετρήστε την απορρόφηση στα 450 nm εντός 30 λεπτών (συνιστάται προαιρετικά και στα 450/620 nm).

8 Ποσοτική και ποιοτική ερμηνεία

Ο ποσοτικός προσδιορισμός επιτυγχάνεται βάσει μιας πρότυπης καμπύλης, στην οποία μεταφέρεται η οπτική πυκνότητα κάθε αραίωσης του πρότυπου πλάσματος (άξονας y) έναντι της αντίστοιχης τιμής του πρότυπου επιπέδου σε % (άξονας x). Πρέπει να προετοιμαστούν διαφορετικές καμπύλες για ολική και ελεύθερη πρωτεΐνη S. Για τον καλύτερο προσδιορισμό συνιστάται η μεταφορά log/lin και ένα Fit 4 παραμέτρων. Από την οπτική πυκνότητα κάθε δείγματος, εξακριβώνεται η σχετική τιμή ασθενούς για ολική και ελεύθερη πρωτεΐνη εκφρασμένη S (σε %) από την αντίστοιχη πρότυπη καμπύλη. Πολλαπλασιάστε τη σχετική τιμή ασθενούς που λαμβάνεται με τον αντίστοιχο παράγοντα που θα βρείτε στο φυλλάδιο του ποιοτικού ελέγχου για να υπολογίσετε το επίπεδο αντιγόνου ολικής και ελεύθερης πρωτεΐνης S ως ποσοστό του φυσιολογικού.

Παράδειγμα προσδιορισμού

Ο σχεδιασμός της καμπύλης συνιστάται για κάθε νέα δοκιμασία.

Πρότυπο επίπεδο	OD 450/620 nm	Αποτελέσματα (%)	CV % (Διακύμανση)
12.5 %	0,618	11,68	1,07
25 %	0,896	26,58	0,94
50 %	1,212	48,72	1,03
75 %	1,521	77,35	0,97
100 %	1,708	99,16	1,01
150 %	2,034	148,71	1,01

Ασθενής	Επανάληψη (OD)	Μέσος όρος (OD)	Σχετική τιμή ασθενούς (%)	Παράγοντας	Πρωτεΐνη S ασθενούς (%)
P 01	1,008/1,020	1,014	39,9	1,03	41,09
P 02	1,651/1,649	1,650	94,6	1,03	97,43

Τα δείγματα με τιμές μεγαλύτερες από το μέγιστο εύρος τιμών των αντιδραστηρίων βαθμονόμησης πρέπει να αναφέρονται ως" >Μέγ." Πρέπει να αραιώνονται κατάλληλα και να δοκιμάζονται ξανά. Τα δείγματα με τιμές μικρότερες από το εύρος τιμών των αντιδραστηρίων βαθμονόμησης πρέπει να αναφέρονται ως "<Ελάχ."

Ειδικά στοιχεία της παρτίδας, αναγράφονται στο συναπτόμενο πιστοποιητικό ελέγχου. Ιατρικά εργαστήρια μπορούν να διεξάγουν ελέγχους ποιότητος στο χώρο τους με δικούς τους ελέγχους και/ ή ορούς από την τράπεζα αίματος σύμφωνα με της ρυθμίσεις της Ε.Ε..

Συνιστάται σε κάθε εργαστήριο να δημιουργήσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές, βασισμένες στη δική του τεχνική, ελέγχους, εξοπλισμό και πληθυσμούς ασθενών.

Στην περίπτωση κατά την οποία οι τιμές των ορών ελέγχου δεν συμφωνούν με τα κριτήρια, η δοκιμή είναι άκυρη και θα πρέπει να επαναληφθεί.

Θα πρέπει να ελεγχθούν τα παρακάτω τεχνικά ζητήματα: Ημερομηνίες λήξης των αντιδραστηρίων (που προετοιμάστηκαν), συνθήκες αποθήκευσης, πιπέτες, συσκευές, φωτόμετρο, συνθήκες επώασης και μέθοδος πλύσης.

Εάν τα στοιχεία τα οποία υποβλήθηκαν σε δοκιμή παρουσιάζουν απόκλιση ή άλλου είδους διαφοροποίηση από τις αναμενόμενες τιμές ή εάν δεν πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας χωρίς εύλογη αιτία, επικοινωνήστε με τον κατασκευαστή ή τον προμηθευτή του κιτ δοκιμής.

Αναμενόμενες τιμές

Οι τιμές για την ελεύθερη και ολική πρωτεΐνη S δίνονται σε σχετικό ποσοστό (%) σε σύγκριση με τη συγκέντρωση φυσιολογικού πλάσματος. Για την ολική πρωτεΐνη S η τιμή κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 60 % και 150 %, το φυσιολογικό εύρος για ελεύθερη πρωτεΐνη S είναι 50-130 %. Τα δείγματα με τιμές άνω της περιοχής της πρότυπης καμπύλης μπορούν να δοκιμαστούν ξανά σε υψηλότερες αραιώσεις για ακριβή αποτελέσματα. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καθορίσει τη δική του περιοχή φυσιολογικών τιμών με βάση τις τεχνικές, τους ελέγχους, τον εξοπλισμό που χρησιμοποιεί και τον πληθυσμό ασθενών, σύμφωνα με τις εδραιωμένες διαδικασίες του.

9 Τεχνικά στοιχεία

Υλικό δειγμάτων:	πλάσμα
Όγκος δειγμάτων:	20 µl πλάσμα 1:51 με 1x ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
Ολικός χρόνος επώασης:	90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου 20-26 °C/68-78,8 °F
Περιοχή μέτρησης:	12.5-150 %
Αναλυτική Ευαισθησία:	1,0 %
Φύλαξη:	σε 2-8 °C/35,6-46,4 °F στις αυθεντικές φιάλες
Αριθμός των προσδιορισμών:	96 δοκιμασίες

10 Στοιχεία Απόδοσης

10.1 Αναλυτική Ευαισθησία

Δοκιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος 30 φορές σε ***AESKULISA®* Protein S** δίνει αναλυτική ευαισθησία 1,0 %.

10.2 Κλινική απόδοση

Οι πλάκες μικροτιτλοποίησης είναι επικαλυμμένες με ένα αντίσωμα καθήλωσης ειδικό για την ανθρώπινη πρωτεΐνη S. Η ελεύθερη πρωτεΐνη S απομονώνεται από την συμπλοκοποιημένη πρωτεΐνη S μέσω καθίζησης με πολυαιθυλενογλυκόλη. Σε συμφωνία με τις συστάσεις των διαγνωστικών εργαστηρίων, ένα δείγμα θεωρήθηκε ελλιπές στον αναλύτη εάν η μέτρηση ήταν κάτω από το 70 % της κανονικής τιμής (Labor und Diagnose, εκδόσεις L. Thomas, 8η έκδοση 2012, Φρανκφούρτη/Μάιν, Γερμανία).

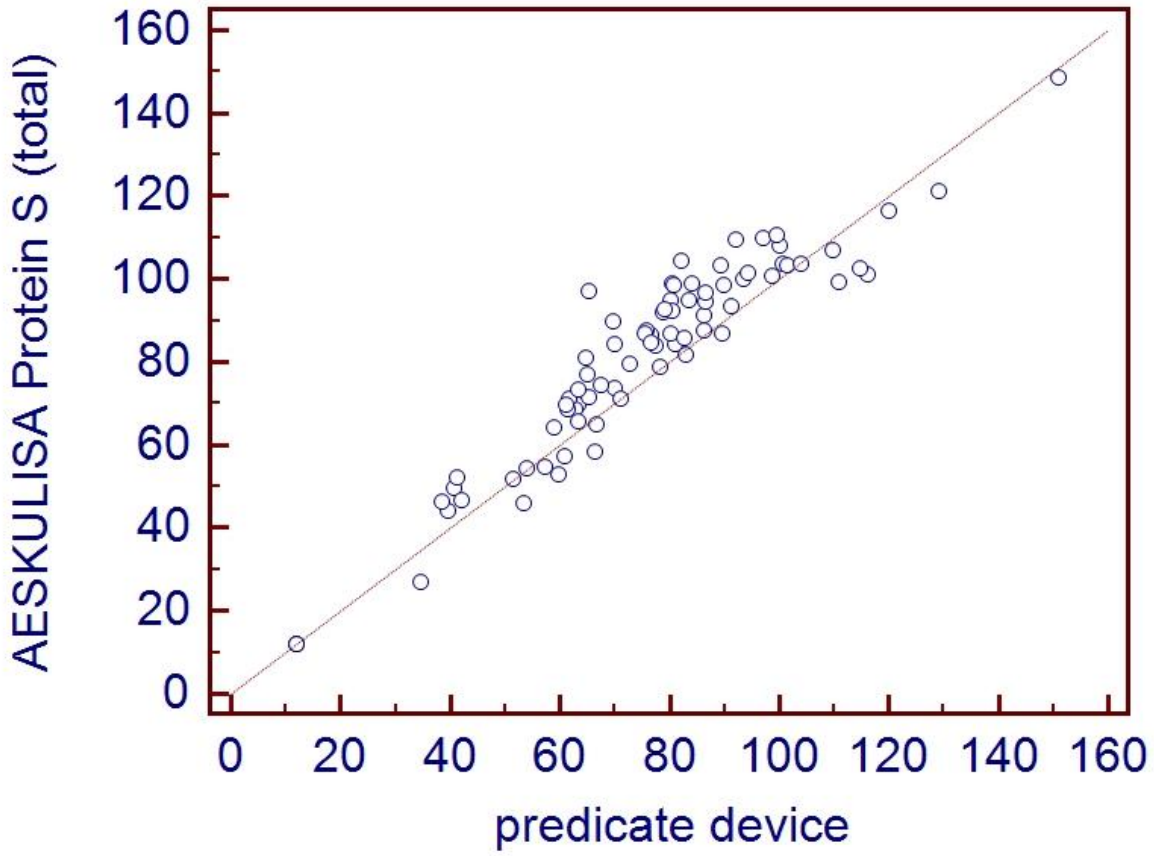
Συνολική πρωτεΐνη S

79 δείγματα πλάσματος ελέγχθηκαν με τη μέθοδο ***AESKULISA®* Protein S** για συνολική πρωτεΐνη S και μια συσκευή ανάλυσης επιβεβαίωσης.

	Συσκευή ανάλυσης επιβεβαίωσης			
***AESKULISA®* total Protein S**		ΘΕΤ.	ΑΡΝ.	Σύνολο
	ΘΕΤ.	23	0	23
	ΑΡΝ.	10	46	56
	Σύνολο	33	46	79

Συνολικό ποσοστό συμφωνίας αποτελεσμάτων	87,3%	78,2% έως 93,0%
Ποσοστό συμφωνίας θετικών αποτελεσμάτων	69,7%	52,7% έως 82,6%
Ποσοστό συμφωνίας αρνητικών αποτελεσμάτων	100%	92,3% έως 100%

Ο συσχετισμός μεταξύ της μεθόδου ***AESKULISA®* Protein S** και της συσκευής ανάλυσης επιβεβαίωσης για τη συνολική πρωτεΐνη S είχε ως αποτέλεσμα έναν συντελεστή συσχέτισης r=0,945.



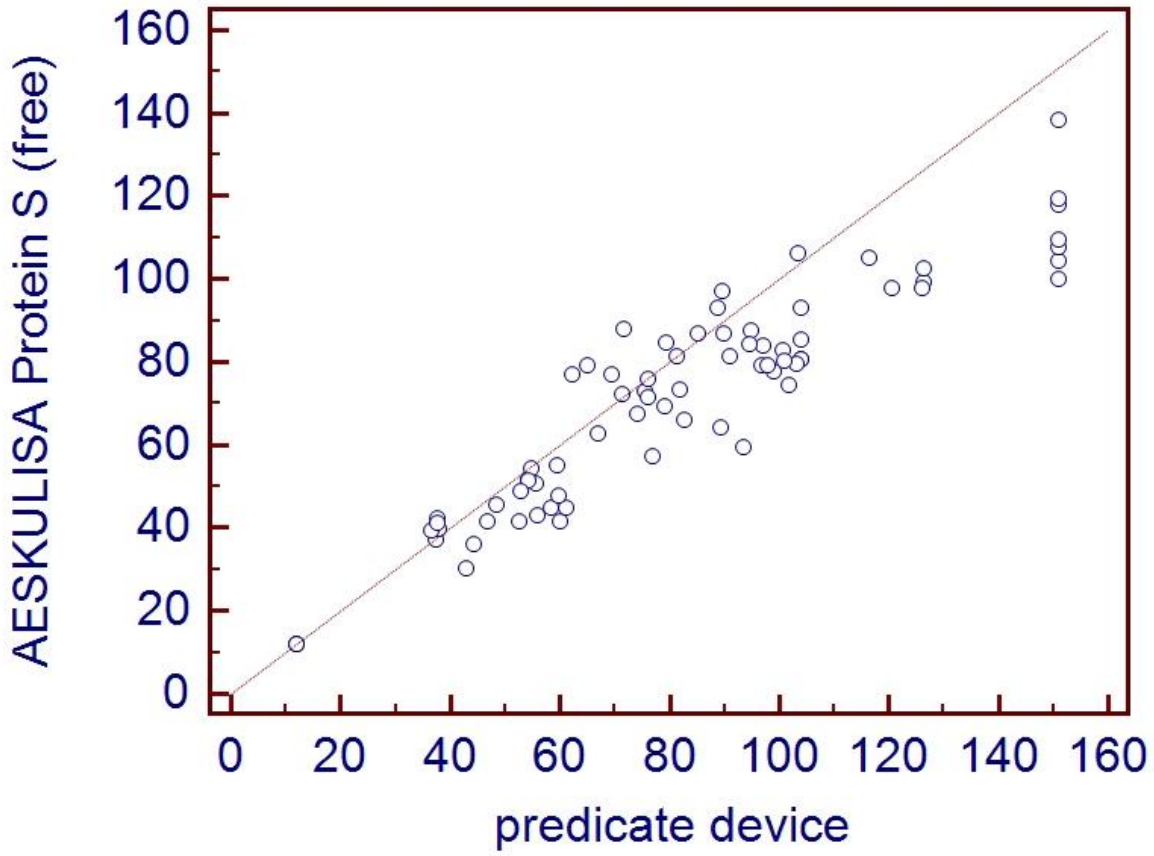
Ελεύθερη πρωτεΐνη S

74 δείγματα πλάσματος ελέγχθηκαν με τη μέθοδο ***AESKULISA®*** **Protein S** για ελεύθερη πρωτεΐνη S και μια συσκευή ανάλυσης επιβεβαίωσης.

	Συσκευή ανάλυσης επιβεβαίωσης			
AESKULISA® **free Protein S**		ΘΕΤ.	ΑΡΝ.	Σύνολο
	ΘΕΤ.	25	6	31
	ΑΡΝ.	3	40	43
	Σύνολο	28	46	74

Συνολικό ποσοστό συμφωνίας αποτελεσμάτων	87,8%	78,5% έως 93,5%
Ποσοστό συμφωνίας θετικών αποτελεσμάτων	89,3%	72,8% έως 96,3%
Ποσοστό συμφωνίας αρνητικών αποτελεσμάτων	86,7%	74,3% έως 93,9%

Ο συσχετισμός μεταξύ της μεθόδου ***AESKULISA®*** **Protein S** και της συσκευής ανάλυσης επιβεβαίωσης για την ελεύθερη πρωτεΐνη S είχε ως αποτέλεσμα έναν συντελεστή συσχέτισης r=0,926.



10.3 Γραμμικότητα

Τα επιλεγμένα δείγματα πλάσματος έχουν δοκιμαστεί με αυτό το κιτ και βρέθηκε η γραμμική συμπεριφορά της αραίωσης.

Αριθμ. Δείγματος	Αραίωση	μετρημένη συγκέντρωση (%)	αναμενόμενη συγκέντρωση (%)	Ανάκτηση (%)
1	1 / 50	115,17	120	95,98
	1 / 100	61,96	60	103,27
	1 / 200	29,54	30	98,47
	1 / 400	14,91	15	99,40
2	1 / 50	43,33	40	108,33
	1 / 100	20,41	20	102,05
	1 / 200	9,58	10	95,80
	1 / 400	4,69	5	93,80

10.4 Ακρίβεια

Για έλεγχο της ακρίβειας της μεθόδου, αξιολογήθηκε η διακύμανση (στην ίδια μέθοδο) με εξέταση της αναπαραγωγισιμότητας σε τρία δείγματα πλάσματος που επιλέχθηκαν ώστε να αντιπροσωπεύουν μια περιοχή άνω της πρότυπης καμπύλης.

Εσωτερική μέθοδος		
Αριθμ. δείγματος	**Μέσος όρος (%)**	**CV (%)**
1	115,0	2,9
2	92,0	1,1
3	44,0	1,4

Ενδιάμεση μέθοδος		
Αριθμ. δείγματος	**Μέσος όρος (%)**	**CV (%)**
1	120,6	4,7
2	44,5	4,9
3	9,2	9,8

10.5 Διακρίβωση

Η ποσοτική μέθοδος βαθμονομείται έναντι του διεθνούς προτύπου του WHO για την πρωτεΐνη S. Οι τιμές δίνονται σε σχετικό ποσοστό (%) σε σύγκριση με τη συγκέντρωση φυσιολογικού πλάσματος.

11 Βιβλιογραφία

Murdock PJ, Brooks S, Mellars G, Cheung G, Jacob D, Owens DL, Parmar M, Riddell A (1997). A simple monoclonal antibody based ELISA for free protein S. Comparison with PEG precipitation. Clinical and Laboratory Haematology 19: 111-114.

Deutz-Terlouw PP, Ballering L, van Wijngaarden A, Bertina RM (1989). Two ELISA‘s for measurement of protein S, and their use in the laboratory diagnosis of Protein S deficiency. Clinica Chimica Acta 186: 321-334.

Persson KEM, Hillarp A, Dahlbäck B (2001). Analytical considerations for free protein S assays in protein S deficiency. Thrombosis and Haemostasis 86: 1144-1147.

Walker FJ (1984). Protein S and the regulation of activated protein C. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 10: 131-138.

Preissner KT (1990). Biological relevance of the Protein C system and laboratory diagnosis of Protein C and S deficiencies. Clinical Science 17: 351-364.

12 Ρυθμιστικά σύμβολα

IVD	- Diagnosi in vitro	- For in vitro diagnostic use
	- Pour diagnostic in vitro	- Para uso diagnóstico in vitro
	- In Vitro Diagnostikum	- In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	- Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	- Numero d'ordine	- Cataloge number
	- Référence Catalogue	- Numéro de catálogo
	- Bestellnummer	- Αριθμός παραγγελίας
	- Número de catálogo	
LOT	- Descrizione lotto	- Lot
	- Lot	- Lote
	- Chargen Bezeichnung	- Χαρακτηρισμός παρτίδας
	- Lote	
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo	- Unique Device Identifier
	- Identifiant unique de l'appareil	- Identificador único del dispositivo
	- eindeutige Produktidentifizierung	- Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	- Identificador único do dispositivo	
CE	- Conformità europea	- EC Declaration of Conformity
	- Déclaration CE de Conformité	- Declaración CE de Conformidad
	- Europäische Konformität	- Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- Déclaracão CE de Conformidade	
Σ 96	- 96 determinazioni	- 96 tests
	- 96 tests	- 96 pruebas
	- 96 Bestimmungen	- 96 προσδιορισμοί
	- 96 Testes	
eIFU WWW.AESKU.COM	- Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso	- See electronical instructions for use
	- Voir les instructions d'utilisation électronique	- Siga las instrucciones electrónicas de uso
	- Elektronische Gebrauchsanweisung beachten	- Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Seguir as instruções electrónicas de utilização	
	¨ Da utilizzarsi entro	¨ Use by
	¨ Utilise avant le	¨ Utilizar antes de
	¨ Verwendbar bis	¨ Χρήση μέχρι
	¨ Utilizar antes de	
+2°C +8°C	¨ Conservare a 2-8°C	¨ Store at 2-8°C (35.6-46.4°F)
	¨ Conserver à 2-8°C	¨ Conservar a 2-8°C
	¨ Lagerung bei 2-8°C	¨ Φυλάσσεται στους 2-8°C
	¨ Conservar entre 2-8°C	
	¨ Prodotto da	¨ Manufactured by
	¨ Fabriqué par	¨ Fabricado por
	¨ Hergestellt von	¨ Κατασκευάζεται από
	¨ Fabricado por	
REF. PLASMA	¨ Plasma di riferimento	¨ Reference Plasma
	¨ Plasma de référence	¨ Plasma de Referencia
	¨ Referenzplasma	¨ πλάσμα αναφοράς
	¨ Plasma de referência	
CON D	¨ Controllo „D“	¨ Control “D”
	¨ Contrôle „D“	¨ Control „D“
	¨ Kontrolle „D“	¨ έλεγχος „D“
	¨ Controlo „D“	
CON N	¨ Controllo „N“	¨ Control “N”
	¨ Contrôle „N“	¨ Control „N“
	¨ Kontrolle „N“	¨ έλεγχος „N“
	¨ Controlo „N“	
PEG	¨ Soluzione di PEG	¨ PEG solution
	¨ Solution PEG	¨ Solución PEG
	¨ PEG Lösung	¨ Διάλυμα PEG
	¨ Solução PEG	
CONJ	¨ Coniugato	¨ Conjugate
	¨ Conjugé	¨ Conjugado
	¨ Konjugat	¨ Σύζευγμα
	¨ Conjugado	
MP	¨ Micropiastra rivestita	¨ Coated microtiter plate
	¨ Microplaque sensibilisée	¨ Microplaca sensibilizada
	¨ Beschichtete Mikrotiterplatte	¨ Επικαλυμμένη μικροπλάκα
	¨ Microplaca revestida	
WASHB 50x	¨ Tampone di lavaggio	¨ Wash buffer
	¨ Tampon de Lavage	¨ Solución de lavado
	¨ Waschpuffer	¨ Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	¨ Solucão de lavagem	
SUB	¨ Tampone substrato	¨ Substrate buffer
	¨ Substrat	¨ Tampón sustrato
	¨ Substratpuffer	¨ Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	¨ Substrato	
STOP	¨ Reagente bloccante	¨ Stop solution
	¨ Solution d'Arrêt	¨ Solución de parada
	¨ Stopreagenz	¨ Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης
	¨ Solucão de paragem	
SB 5x	¨ Tampone campione	¨ Sample buffer
	¨ Tampon Echantillons	¨ Tampón Muestras
	¨ Probenpuffer	¨ Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	¨ Diluente de amostra	