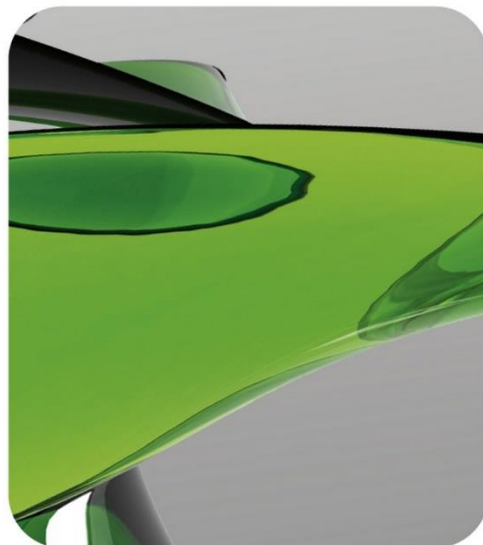




AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKULISA®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKULISA® Free Protein S

Ref 3903



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 ερμηνεία	8
9	Τεχνικά στοιχεία.....	9
10	Στοιχεία Απόδοσης	9
11	Βιβλιογραφία.....	10
12	Ρυθμιστικά σύμβολα	11



1 Ενδεικτική χρήση

AESKULISA® Free Protein S είναι Ενζυμοανοσολογική μέθοδος στερεής φάσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό ελεύθερης πρωτεΐνης S στο ανθρώπινο πλάσμα με κιτρικό. Ο προσδιορισμός ελεύθερης πρωτεΐνης S εξυπηρετεί στην εκτίμηση του κινδύνου θρόμβωσης.

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 συμπαραγοντας 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 πήκτικότητας 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 kit, 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
Σύζευγμα IgG	1 x 15ml	Μπλε	Μπλε	Συστατικό στοιχείο: Αντι – ανθρώπινη Free Protein S σημαδεμένη με υπεροξειδάση από ραφανίδα
Υπόστρωμα TMB	1 x 15ml	Μαύρο	Διαυγές	Σταθεροποιημένη τετραμεθυλβενζιδίνη και υπεροξειδίο του υδρογόνου (TMB/H ₂ O ₂)
Διάλυμα διακοπής αντίδρασης	1 x 15ml	Λευκό	Διαυγές	1M Υδροχλωρικό οξύ
Πλάκα μικροπιλοποίησης	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 μικροπιλοποίησης 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, προχοίδες ακρίβειας (10, 100, 200, 500, 1000 μl) ή προσαρμοζόμενη πολυπροχοίδα (100-1000μl). Συσκευή πλύσης μικροπλάκας (300μl επαναλαμβανόμενη προχοίδα, ή προχοίδα 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 μικροπλάκες 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 ανατρέξτε 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 (πιπέτα) δια μέσω του στόματος, φοράτε γάντια μίας χρήσης.

Το Πλάσμα αναφοράς και τα Κοντρόλ που περιλαμβάνονται σε αυτό το kit 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 kit δοκιμής.

Μην μπλέκετε η αντικαθιστάτε Μάρτυρες, Βαθμονομητές, Ενζυμα Σύζευξης ή 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 - 32 °C / 68 - 89,6 °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

Χρησιμοποιήστε επιλεκτικά φρέσκα δείγματα πλάσματος με προσθήκη κιτρικού νατρίου 3,2% ή 3,8% ως αντιπηκτικό. Η λήψη του αίματος πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τα εθνικά νομικά αξιώματα. Να μην χρησιμοποιούνται: ικτερικά, λιπαιμικά, αιμολυμένα ή μολυσμένα από βακτήρια δείγματα. Συλλέγετε τα δείγματα αίματος σε καθαρά, στεγνά και κενά φιαλίδια. Κατόπιν φυγοκέντρωσης, τα δείγματα πλάσματος πρέπει να χρησιμοποιηθούν αμέσως, διαφορετικά πρέπει να φυλάσσονται στους 2 - 8 °C / 35,6 - 46,4 °F για οκτώ 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.

Προαραίωση του πρότυπου πλάσματος:

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 κοντρώλ:

Προσθέστε 20 μl πλάσματος σε 1000 μl ρυθμιστικού 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 φυλάσσετε τα με ξηραντικό υλικό καλά κλεισμένα μέσα στη μεμβράνη της συσκευασίας σε δροσερό μέρος (2 - 8 °C / 35,6 - 46,4 °F).

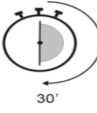
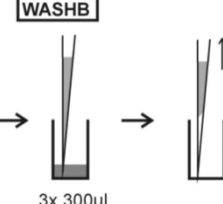
7.2 Σχήμα διανομής αντιδραστηρίων

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

	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 %	50: Reference Level 50 %	CD: control ,deficient plasma	P1: patient 1
100: Reference Level 100 %	25: Reference Level 25 %	CN: control ,normal plasma	P2: patient 2
75: Reference Level 75 %	12.5: Reference Level 12.5 %		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 - 32 °C / 68 - 89,6 °F.
5.	 Πλένετε 3 φορές, κάθε φορά με 300 µl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (αραιωμένο 1:50).

ΣΥΖΕΥΓΜΑ

6.



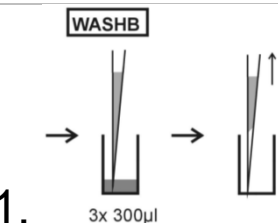
Βάζετε 100 μl διαλύματος συζεύγματος σε κάθε υποδοχέα χρησιμοποιώντας πιπέτα.

7.



Επωάζετε για 30 λεπτά σε 20 - 32 °C / 68 - 89,6 °F.

8.



Πλένετε 3 φορές, κάθε φορά με 300 μl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (αραιωμένο 1:50).

1.

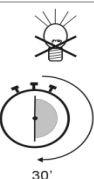
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

9.



Βάζετε 100 μl διαλύματος υποστρώματος TMB σε κάθε υποδοχέα χρησιμοποιώντας την πιπέτα.

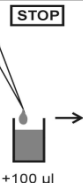
10.



Επωάζετε για 30 λεπτά σε 20 - 32 °C / 68 - 89,6 °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.

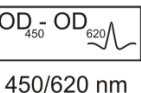


Επωάζετε για 5 λεπτά τουλάχιστον.

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 ερμηνεία

Η ποσοτική ανάλυση επιτυγχάνεται με βάση την καμπύλη αναφοράς, στην οποία μεταφέρονται η οπτική πυκνότητα των μεμονωμένων αραιώσεων εργασίας του πλάσματος αναφοράς (άξονας ψ) σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση του πλάσματος αναφοράς σε % (άξονας χ). Για την ανάλυση συνιστάται μία μεταφορά log/lin και ένα Fit 4 παραμέτρων. Με βάση την καμπύλη γίνεται ανάγνωση της σχετικής τιμής του ασθενή σε % από την οπτική πυκνότητα του δείγματος. Η σχετική τιμή ασθενή πρέπει να πολλαπλασιαστεί με τον παράγοντα που αναφέρεται στο συνημμένο πιστοποιητικό ελέγχου, για να υπολογιστεί η συγκέντρωση της ελεύθερης πρωτεΐνης S του δείγματος ασθενή (σε %) σε σχέση με τη φυσιολογική τιμή.

Παράδειγμα προσδιορισμού

Ο σχεδιασμός της καμπύλης συνιστάται για κάθε νέα δοκιμασία.

Πρότυπο επίπεδο	OD 450/620 nm	Αποτελέσματα (%)	CV (Διακύμανση) %
12.5 %	0,433	11,98	4,16
25 %	0,754	23,45	6,20
50 %	1,275	53,63	7,26
75 %	1,581	76,53	2,04
100 %	1,881	99,71	0,29
150 %	2,371	146,52	2,32

Ασθενής	Επανάληψη (OD)	Μέσος όρος (OD)	Σχετική τιμή ασθενούς (%)	Παράγοντας	Πρωτεΐνη C ασθενούς (%)
P 01	0,933/0,927	0,930	29,5	0,96	28,32
P 02	1,860/1,866	1,863	123,5	0,96	118,56

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 ποιότητας 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 kit δοκιμής.

Αναμενόμενες τιμές

Η συγκέντρωση ελεύθερης πρωτεΐνης S αναφέρεται σε ποσοστά (%) σχετικά με μία συλλογή φυσιολογικού πλάσματος. Οι φυσιολογικές τιμές της ελεύθερης πρωτεΐνης S βρίσκονται μεταξύ 60 % και 130 %. Δείγματα με τιμές πάνω από τις τιμές αναφοράς θα πρέπει να ξαναελέγχονται σε μεγαλύτερη αραιώση. Συνιστάται κάθε εργαστήριο να εδραιώνει τις δικές του τιμές αναφοράς, βασισμένες σε δική του τεχνική, μάρτυρες, εξοπλισμό και πληθυσμό ασθενών.



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 - 32 °C / 68 - 89,6 °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® Free Protein S** δίνει αναλυτική ευαισθησία 1,0 %.

10.2 Ειδικότητα και Ευαισθησία

Η μικροτιτλοδότηση είναι επικαλυμμένη με αντίσωμα συγκεκριμένο για την ανθρώπινη πρωτεΐνη S.

10.3 Γραμμικότητα

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

Αριθμ. Δείγματος	Αραίωση	μετρημένη συγκέντρωση (%)	αναμενόμενη συγκέντρωση (%)	Ανάκτηση (%)
1	1 / 50	97,66	100	97,66
	1 / 100	49,51	50	99,02
	1 / 200	25,66	25	102,64
	1 / 400	13,36	12,5	106,88
2	1 / 50	42,97	40	107,43
	1 / 100	18,78	20	93,90
	1 / 200	9,78	10	97,80
	1 / 400	4,85	5	97,0

10.4 Ακρίβεια

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

Εσωτερική μέθοδος		
Αριθμ. δείγματος	Μέσος όρος (%)	CV (%)
1	110	2,3
2	78	5,6
3	26	4,2

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 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 Free Protein S, and their use in the laboratory diagnosis of Free Protein S deficiency. Clinica Chimica Acta 186: 321-334.

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

Walker FJ (1984). Free 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 - Pour diagnostic in vitro - In Vitro Diagnostikum - Para uso Diagnóstico in vitro	- For in vitro diagnostic use - Para uso diagnóstico in vitro - In Vitro Διαγνωστικό μέσο
REF	- Numero d'ordine - Référence Catalogue - Bestellnummer - Número de catálogo	- Catalogue number - Numéro de catálogo - Αριθμός παραγγελίας
LOT	- Descrizione lotto - Lot - Chargen Bezeichnung - Lote	- Lot - Lote - Χαρακτηρισμός παρτίδας
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo - Identifiant unique de l'appareil - eindeutige Produktidentifizierung - Identificador único do dispositivo	- Unique Device Identifier - Identificador único del dispositivo - Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
CE	- Conformità europea - Déclaration CE de Conformité - Europäische Konformität - Declaração CE de Conformidade	- EC Declaration of Conformity - Declaración CE de Conformidad - Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- 96 determinazioni - 96 tests - 96 Bestimmungen - 96 Testes	- 96 tests - 96 pruebas - 96 προσδιορισμοί
	- Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso - Voir les instructions d'utilisation électronique - Elektronische Gebrauchsanweisung beachten - Seguir as instruções electrónicas de utilização	- See electronic instructions for use - Sigla las instrucciones electrónicas de uso - Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Da utilizzarsi entro - Utiliser avant le - Verwendbar bis - Utilizar antes de	- Use by - Utilizar antes de - Χρήση μέχρι
	- Conservare a 2-8°C - Conserver à 2-8°C - Lagerung bei 2-8°C - Conservar entre 2-8°C	- Store at 2-8°C (35.6-46.4°F) - Conservar a 2-8°C - Φυλάσσεται στους 2-8°C
	- Prodotto da - Fabriqué par - Hergestellt von - Fabricado por	- Manufactured by - Fabricado por - Κατασκευάζεται από
REF. PLASMA	- Plasma di riferimento - Plasma de référence - Referenzplasma - Plasma de referência	- Reference Plasma - Plasma de Referencia - πλάσμα αναφοράς
CON D	- Controllo „D“ - Contrôle „D“ - Kontrolle „D“ - Controllo „D“	- Control „D“ - Control „D“ - έλεγχος „D“
CON N	- Controllo „N“ - Contrôle „N“ - Kontrolle „N“ - Controllo „N“	- Control „N“ - Control „N“ - έλεγχος „N“
PEG	- Soluzione di PEG - Solution PEG - PEG Lösung - Solução PEG	- PEG solution - Solución PEG - Διάλυμα PEG
CONJ	- Coniugato - Conjugé - Konjugat - Conjugado	- Conjugate - Conjugado - Σύζευγμα
MP	- Micropietra rivestita - Microplaque sensibilisée - Beschichtete Mikrotiterplatte - Microplaca revestida	- Coated microtiter plate - Microplaca sensibilizada - Επικαλυμμένη μικροπλάκα
WASHB 50x	- Tampone di lavaggio - Tampon de Lavage - Waschpuffer - Solução de lavagem	- Wash buffer - Solución de lavado - Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
SUB	- Tampone substrato - Substrat - Substratpuffer - Substrato	- Substrate buffer - Tampón sustrato - Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP	- Reagente bloccante - Solution d'Arrêt - Stopreagenz - Solução de paragem	- Stop solution - Solución de parada - Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης
SB 5x	- Tampone campione - Tampon Echantillons - Probenpuffer - Diluente de amostra	- Sample buffer - Tampón Muestras - Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων