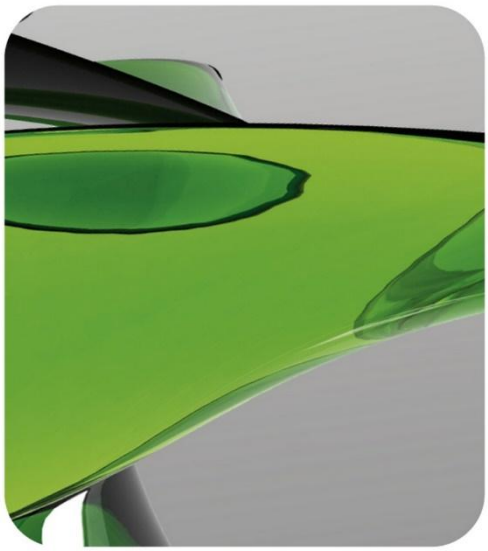
AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKULISA®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKULISA® SpA detect

Ref 3190

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 ερμηνεία 7
9 Τεχνικά στοιχεία 8
10 Στοιχεία Απόδοσης 8
11 Βιβλιογραφία 11
12 Ρυθμιστικά σύμβολα 12

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

1 Ενδεδειγμένη χρήση

***AESKULISA®* SpA detect** είναι μία Ενζυμοανοσολογική μέθοδος στερεής φάσης που περιέχει ανασυνδυασμένη ανθρώπινη α- φοδρίνη για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων IgA έναντι της ανθρώπινο CD74 σε ανθρώπινο ορό.

Το τεστ συμβάλλει στη διάγνωση της σπονδυλοαρθρίτιδας (ΣπΑ) και, επομένως, στον προσδιορισμό του φλεγμονώδους πόνου στην πλάτη. Δεν υπάρχει παράμετρος διαλογής για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και τον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ).

2 Κλινική εφαρμογή και αρχές της μεθόδου

Οι σπονδυλοαρθρίτιδες (ΣπΑ) είναι μια ομάδα συναφών φλεγμονωδών ρευματικών παθήσεων, οι οποίες χωρίζονται στις ακόλουθες υποομάδες: αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (ΑΣ), ψωριασική αρθρίτιδα, αντιδραστική ΣπΑ (μετά από προηγούμενες λοιμώξεις), ΣπΑ που σχετίζονται με χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου και μια μορφή νεανικής ιδιοπαθούς αρθρίτιδας. Οι διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν φλεγμονές στη σπονδυλική στήλη (αξονική ΣπΑ), οι οποίες εκδηλώνονται με κύρια συμπτώματα τον πόνο στην πλάτη και την ιερολαγονίτιδα, αλλά και περαιτέρω εκδηλώσεις όπως είναι η περιφερειακή αρθρίτιδα, οι ενθεσοπάθειες, η ραγοειδίτιδα, η ψωρίαση και οι φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου. Οι σπονδυλοαρθρίτιδες εμφανίζονται με συχνότητα 0,5-2% του γενικού πληθυσμού. Οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται σε ηλικία 20-45 ετών, με τους άνδρες να προσβάλλονται συχνότερα από τις γυναίκες (αναλογία 3:1) και συχνά να έχουν πιο σοβαρή εξέλιξη. Για τη βελτίωση της μακροπρόθεσμης πρόγνωσης στους ασθενείς με ΣπΑ, χρησιμοποιούνται ΜΣΑΦ (μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα) και φυσιοθεραπείες. Σε σοβαρές περιπτώσεις, μια θεραπεία αντι-TNFα μπορεί να επηρεάσει θετικά τη δραστηριότητα της ασθένειας και να επιβραδύνει την εξέλιξη των φλεγμονωδών διεργασιών στο σκελετό. Η παθογένεια της ΣπΑ είναι σε μεγάλο βαθμό ασαφής, ωστόσο υπάρχει μια ισχυρή γενετική συσχέτιση: Το 95% των ασθενών με ΣπΑ έχει θετικό HLA B27. Η παρουσία του HLA B27 αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης ΣπΑ κατά 10 φορές, γι' αυτόν το λόγο η ανίχνευση του HLA B27 συμπεριλήφθηκε στα κριτήρια ASAS για τη διάγνωση της ΣπΑ. Η ανίχνευση της ιερολαγονίτιδας μέσω ακτινών X ή/και MRI είναι ένα ακόμη βασικό κριτήριο για τη διάγνωση της ΣπΑ. Η διάγνωση της ΣπΑ συχνά καθυστερεί αρκετά χρόνια, διότι στην αρχή της ασθένειας τα συμπτώματα μπορεί να είναι πολύ ασαφή και μέχρι τώρα δεν υπήρχε κάποιος ειδικός ορολογικός δείκτης. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα αντισώματα CD74 σχετίζονται με την ύπαρξη ΣπΑ, ιδιαίτερα με την αξονική ΣπΑ (Baerlecken et al. 2014; Baraliakos et al. 2014). Τα αντισώματα CD74 αποτελούν, επομένως, έναν νέο ορολογικό δείκτη για την ύπαρξη ΣπΑ. Τα αντισώματα CD74 μπορούν να ανιχνευθούν σε ασθενείς τόσο με θετικό όσο και με αρνητικό HLA B27. Ομοίως, τα αντισώματα CD74 είναι ανιχνεύσιμα ήδη από τα πρώτα στάδια της ασθένειας αποτελώντας έτσι ένα σημαντικό εργαλείο ειδικά για την έγκαιρη διάγνωση της σπονδυλοαρθρίτιδας.

Αρχές τεστ

Τα δείγματα ορού που αραιώθηκαν σε αναλογία 1:101 επωάζονται σε κοιλότητες, οι οποίες είναι επενδυμένες με το ειδικό αντιγόνο. Κατά τη διαδικασία αυτή τα ειδικά αντισώματα από τον ορό του ασθενούς, εάν διατίθεται, ενώνονται με το αντιγόνο στην πλάκα. Μη ενωμένα στοιχεία ορού εκπλένονται στο επόμενο βήμα πλύσης. Στη συνέχεια, προστίθεται μια αντιανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη, η οποία είναι σημαδεμένη με υπεροξειδάση αγριοραπανιού (σύζευγμα). Κατά την επώαση, αυτή ενώνεται με το προηγουμένως σχηματισμένο σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος και οι μη ενωμένες ανοσοσφαιρίνες απομακρύνεται στο επόμενο βήμα πλύσης. Η απόδειξη των ενωμένων αντισωμάτων πραγματοποιείται με μια ενζυμική χρωστική αντίδραση (μπλε) του υποστρώματος, η οποία διακόπτεται με αραιωμένο οξύ (αλλαγή χρώματος σε κίτρινο). Η ένταση της χρωστικής αντίδρασης του χρωμογόνου εξαρτάται από την ποσότητα συζεύγματος που ενώθηκε με το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος και έχει συνεπώς άμεση αναλογία με τη συγκέντρωση αντισωμάτων στον ορό.

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)
ΕΤΟΙΜΑ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ				
Στοιχείο	Ποσότητα	Χρώμα καπακιού	Χρώμα διαλύματος	Περιγραφή / Περιεχόμενο
Αρνητικός ορός ελέγχου	1 x 1,5ml	Πράσινο	Διαυγές	υλικό ελέγχου (διαλυμένος), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)
Θετικός ορός ελέγχου	1 x 1,5ml	Κόκκινο	Κίτρινο	υλικό ελέγχου (διαλυμένος), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)
Αντιδραστήρια βαθμονόμησης	6 x 1,5ml	Λευκό	Κίτρινο*	Συγκέντρωση κάθε αντιδραστηρίου βαθμονόμησης: 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml. υλικού βαθμονόμησης (διαλυμένος), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)
Συζεύγματα, IgA	1 x 15ml	Κόκκινο	Κόκκινο	Συστατικό στοιχείο: ανοσοσφαιρίνη σημαδεμένη με υπεροξειδάση από ραφανίδα (BSA)
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. Αραιωμένα διαλύματα, φυλάσσονται στους 2 – 8 °C / 35,6 - 46,4 °F για ένα μήνα. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στη συσκευασία και στις ετικέτες του κάθε συστατικού.

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.

Τα αντιδραστήρια βιολογικός προέλευσης που περιέχονται σε αυτό το προϊόν αποδείχτηκαν κατά τον έλεγχο για ηπατίτιδα Β αντιγόνο επιφάνειας (HbsAg), ηπατίτιδα C και HIV 1 και 2 ως αρνητικά. Όμως, σε προϊόντα βιολογικός προέλευσης δε μπορεί ποτέ να αποκλειστεί πλήρως η πιθανότητα μόλυνσης με τους αναφερόμενους ή και με άλλους ακόμη άγνωστους παθογόνους οργανισμούς. Για τον λόγο αυτό, οι οροί ελέγχου, τα αντιδραστήρια βαθμονόμησης όπως επίσης και οι οροί των ασθενών χαρακτηρίζονται ως δυνητικά μολυσματικοί και πρέπει να χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τα εθνικά νομικά αξιώματα.

Επειδή το κιτ περιέχει υλικό ζωικής προέλευσης, όπως αναφέρεται στον πίνακα περιεχομένων, πρέπει να το χρησιμοποιείτε σύμφωνα με τις απαιτήσεις της εθνικής νομοθεσίας.

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 – 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 30°C / 86°F για αυτοματοπιημένα 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. (Thomas: Labor und Diagnose; CLSI Guideline GP44-A4)

7 Διαδικασία της μεθόδου

7.1 Προετοιμασία

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).

Για την αποφυγή τυχόν λαθών, συνιστάται η σήμανση των καπακιών των διάφορων αντιδραστηρίων βαθμονόμησης.

Αραίωση των δειγμάτων των ασθενών:

Δείγματα ορού: αραιώνετε και αναμειγνύετε 1:101 με αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων, π.χ. (1x) 1000 µl ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων + 10 µl ορός.

Πλύση:

Απαιτούνται 20 ml αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα 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 πρέπει να ληφθούν υπόψη πρόσθετες ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης

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

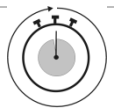
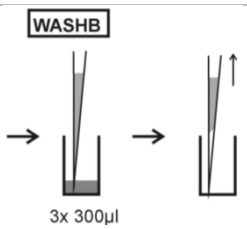
Προτείνουμε τη χρήση της πιπέτας για αντιδραστήρια βαθμονόμησης, ορούς ελέγχου και δείγματα ως εξής:

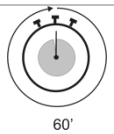
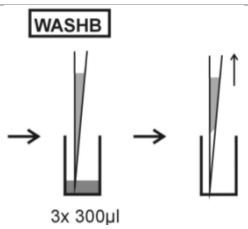
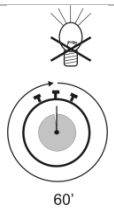
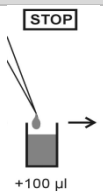
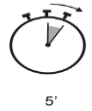
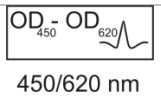
Για ημι-ΠΟΣΟΤΙΚΗ ερμηνεία

	1	2	3	4..
A	Cal A	Cal E	P1	
B	Cal A	Cal E	P1	
C	Cal B	Cal F	P2	
D	Cal B	Cal F	P2	
E	Cal C	PC	P3	
F	Cal C	PC	P3	
G	Cal D	NC	…	
H	Cal D	NC	…	

CalA: calibrator A	CalD: calibrator D	PC: positive control	P1: patient 1
CalB: calibrator B	CalE: calibrator E	NC: negative control	P2: patient 2
CalC: calibrator C	CalF: calibrator F		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 στα προβλεπόμενα βυθίσματα 100 µl από ένα από τα παρακάτω υλικά χρησιμοποιώντας την πιπέτα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.2 παραπάνω: a. Αντιδραστήρια βαθμονόμησης (CAL.A έως CAL.F) για *ημι-ΠΟΣΟΤΙΚΗ* ερμηνεία ή b. Αντιδραστήριο βαθμονόμησης οριακής τιμής (CC) για *ΠΟΙΟΤΙΚΗ* ερμηνεία Επίσης, βάζετε από 100 µl από καθένα από τα παρακάτω: • Αρνητικός ορός ελέγχου (NC) και θετικός ορός ελέγχου (PC) καθώς και • Διαλυμένο ορό ασθενών (P1, P2...)
4.	 Επωάζετε για 60 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 60 λεπτά σε 20 – 32 °C / 68 - 89,6 °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 60 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

Ο ημι-**ποσοτικός προσδιορισμός** επιτυγχάνεται βάσει μίας πρότυπης καμπύλης, στην οποία μεταφέρεται η οπτική πυκνότητα των αντιδραστηρίων βαθμονόμησης (άξονας ψ) έναντι της συγκέντρωσης σε U/ml (άξονας x). Για τον καλύτερο προσδιορισμό συνιστάται η μεταφορά log/lin και ένα Fit 4 παραμέτρων. Με βάση την καμπύλη εξακριβώνεται από την οπτική πυκνότητα του δείγματος η συγκέντρωση των αντισωμάτων σε U/ml.

Περιοχή φυσιολογικών τιμών	Θετικά αποτελέσματα
≤ 20 U/ml	> 20 U/ml

Παράδειγμα προσδιορισμού

Αυτό το παράδειγμα δεν επιτρέπεται να χρησιμοποιηθεί για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των ασθενών.

Αντιδραστήρια βαθμονόμησης IgA	OD 450/620 nm	CV % (Διακύμανση)
0 U/ml	0,08	2,9
3 U/ml	0,166	3,0
10 U/ml	0,297	1,9
30 U/ml	0,619	2,6
100 U/ml	1,358	2,2
300 U/ml	2,250	0,2

Παράδειγμα υπολογισμού

Ασθενής	Επανάληψη (OD)	Μέσος όρος (OD)	Αποτέλεσμα (U/ml)
P 01	0,968/1,016	0,993	62,1
P 02	0,634/0,654	0,642	31,8

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.

9 Τεχνικά στοιχεία

Υλικό δειγμάτων:	Ορός
Όγκος δειγμάτων:	10 μl ορός για αραίωση 1:101 με 1x ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
Ολικός χρόνος επώασης:	180 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου 20 – 32 °C / 68 - 89,6 °F
Περιοχή μέτρησης:	3-300 U/ml
Αναλυτική Ευαισθησία:	2,7 U/ml
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

Το όριο μάρτυρα των 1,26 U/ml προσδιορίστηκε με 80 δοκιμασίες των ρυθμιστικών διαλυμάτων δείγματος με το ***AESKULISA®* SpA detect**, ενώ το όριο ανίχνευσης των 2,7 U/ml με 8 δοκιμασίες 10 ασθενώς αρνητικών δειγμάτων.

10.2 Ειδικότητα και Ευαισθησία

Οι μικροπλάκες είναι επενδυμένες με ανασυνδυασμένο ανθρώπινο αντιγόνο ιστοσυμβατότητας HLA τάξης II, αλυσίδα γάμμα (Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 74, CD74).

Η διαγνωστική ευαισθησία ύψους 91% και η διαγνωστική ειδικότητα ύψους 95% υπολογίστηκαν με 320 δείγματα: Για αυτόν το σκοπό, εξετάστηκαν 120 δείγματα ορού σπονδυλοαρθρίτιδας με καθορισμένη αξονική ΣπΑ, 80 δείγματα από άλλες αυτοάνοσες παθήσεις (κοιλιοκάκη, αγγειοπάθεια, εκφυλιστική νόσος του κολλαγόνου, σκληροδερμία, πολυμυοσίτιδα, μικτή νόσος του συνδετικού ιστού), καθώς και 120 υγιή δείγματα ελέγχου (βλ. παρακάτω πίνακα). Ενδέχεται να παρουσιαστεί διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (PA) και τον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ) (*βλ. παρακάτω πίνακα). Τα αποτελέσματα των ορών PA δεν συμπεριλήφθηκαν στον υπολογισμό για την ειδικότητα.

Σημαντική σημείωση: Το τεστ συμβάλλει στη διάγνωση του χρόνιου πόνου της πλάτης και δεν χρησιμοποιείται ως ανάλυση διαλογής ή/και για τη διαφορική διάγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (PA) και του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου (ΣΕΛ).

ομάδα νόσο	**θετικώς (>18)**	**άθροισμα**
άλλες αυτοάνοσες νόσους	6 (7,5 %)	80
*ρευματοειδής αρθρίτιδα	24 (25%)	96
υγιείς μάρτυρες	5 (4,2 %)	120
σπονδυλοαρθρίτιδες	109 (90,8 %)	120
άθροισμα	**121 (37,8 %)**	**320**

CD74	διάγνωση		
δοκιμή	**θετικώς**	**αρνητικά**	**άθροισμα**
θετικώς>18	109	11	120
αρνητικά ≤18	11	189	200
άθροισμα	120	200	320

διαγνωστική ευαισθησία*	95 % Konfidenzintervall (CI)	
90,8 % (109/120)	84,3 %	94,8 %
διαγνωστική εξειδίκευση*		
94,5 % (189/200)	99,4 %	96,9%

* Τα οριακά αποτελέσματα θεωρήθηκαν αρνητικά

10.3 Γραμμικότητα

Για επιλεγμένους ορούς επετεύχθη με αυτό το τεστ ο προσδιορισμός γραμμικού συσχετισμού για την αραίωση με αρνητικό ορό σύμφωνα με τις απαιτήσεις EP06-A του CLSI (Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων). Λόγω της ετερογένειας των ανθρώπινων αυτοαντισωμάτων δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι μεμονωμένα δείγματα μπορεί να έχουν άλλη συμπεριφορά.

σύνθεση		υψηλά			μεσαίο			χαμηλός		
θετικό δείγμα	αρνητικό δείγμα	σημαίνω [U/ml]	αναμένεται [U/ml]	και πάλι καθιστώντας [%]	σημαίνω [U/ml]	αναμένεται [U/ml]	και πάλι καθιστώντας [%]	σημαίνω [U/ml]	αναμένεται [U/ml]	και πάλι καθιστώντας [%]
100,0%	0,0%	270,3	270	100%	41,79	42	101%	13,50	14	104%
87,5%	12,5%	203,65	236,51	116%	37,24	36,56	98%	11,78	11,82	100%
75,0%	25,0%	183,57	152,73	83%	33,11	27,93	84%	9,64	8,84	92%
67,5%	32,5%	147,54	123,91	84%	22,09	22,34	101%	7,26	6,51	90%
50,0%	50,0%	104,19	73,77	71%	15,78	11,04	70%	3,74	3,63	97%
37,5%	62,5%	75,63	39,07	52%	17,98	5,92	33%	1,91	1,40	73%
25,0%	75,0%	46,07	18,91	41%	7,25	4,50	62%	0,87	0,485	55%
12,5%	87,5%	11,21	5,76	51%	4,25	0,91	21%	0,09	0,11	123%

Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το ***AESKULISA®* SpA detect** παρουσιάζει γραμμικότητα για το εύρος από 2,7 U/ml έως 300 U/ml.

10.4 Ακρίβεια

Για τον έλεγχο της ακρίβειας της δοκιμής προσδιορίστηκε με πέντε ορούς σε διάφορα σημεία της καμπύλης στάνταρ η διασπορά (εσωτερική διασπορά και διασπορά μεταξύ των δοκιμών καθώς και η διασπορά lot to lot), εξετάζοντας την αναπαραγωγιμότητα σε 5 διαδικασίες εργασίας με 8 επαναλήψεις κάθε φορά. Η διασπορά lot to lot εξετάστηκε με την εξέταση πέντε ορών σε 3 διαφορετικές παρτίδες με 8 επαναλήψεις.

Interassay- διακύμανση			**Intraassay-** διακύμανση			**Lot-to-Lot-** διακύμανση		
Δείγμα όχι.	**σημαίνω [U/ml]**	**CV% (διακύμανση)**	**Δείγμα όχι.**	**σημαίνω [U/ml]**	**CV% (διακύμανση)**	**Δείγμα όχι.**	**σημαίνω [U/ml]**	**CV% (διακύμανση)**
1	13,09	8,3%	1	13,09	6,5%	1	13,52	5,3%
2	22,96	4,2%	2	22,96	3,6%	2	23,28	3,5%
3	39,65	4,2%	3	39,65	4,3%	3	39,82	4,1%
4	106,08	3,4%	4	106,08	3,0%	4	105,51	2,2%
5	248,68	2,1%	5	248,68	1,6%	5	250,52	2,1%

Τα κριτήρια αποδοχής για τα θετικά δείγματα σε θερμοκρασία ≤ 10%, για οριακά δείγματα σε θερμοκρασία ≤ 15 και για αρνητικούς ορούς σε ≤ 25%.

10.5 Διακρίβωση

Το ποσοτικό σύστημα μέτρησης βαθμονομήθηκε λόγω της απουσίας διεθνών προτύπων αναφοράς σε προσωρινές μονάδες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε U/ml.

11 Βιβλιογραφία

Baerlecken NT, et al.: Autoantibodies against CD74 in spondyloarthritis. Ann Rheum Dis. 2014 Jun;73(6):1211-4.

Haglund E, et al.: Prevalence of spondyloarthritis and its subtypes in southern Sweden. Ann Rheum Dis 2011;70:943‑8.

Braun J, et al.: Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors.. Arthritis Rheum 1998;41:58‑67.

Trontzas P, et al.: Seronegative spondyloarthropathies in Greece: a population-based study of prevalence, clinical pattern, and management. The ESORDIG study. Clin Rheumatol 2005;24:583‑9.

De Angelis R, et al.: Prevalence of spondyloarthropathies in an Italian population sample: a regional community-based study. Scand J Rheumatol 2007;36:14‑21.

Rudwaleit M, et al.: The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. Ann Rheum Dis 2009;68:777‑83.

Braun J, et al.: Ankylosing spondylitis.. LANCET 2007;369:1379‑90.

Dincer U, et al.: Diagnosis delay in patients with ankylosing spondylitis: possible reasons and proposals for new diagnostic criteria.. Clin Rheumatol 2008;27:457‑62.

Bennett AN, et al.: The fatty Romanus lesion: a non-inflammatory spinal MRI lesion specific for axial spondyloarthropathy.. Ann Rheum Dis 2010;69:891‑4.

Lothar Thomas: Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik., 8. Auflage, TH Books

CLSI Guideline GP44-A4: Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests

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 (35.6-46.4°F)	- Store at 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conserver à 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Conservar a 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Lagerung bei 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Φυλάσσεται στους 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conservar entre 2-8°C (35.6-46.4°F)	
	- Prodotto da	- Manufactured by
	- Fabriqué par	- Fabricado por
	- Hergestellt von	- Κατασκευάζεται από
	- Fabricado por	
CO-CAL	- Calibratore cut-off	- Cut off Calibrator
	- Etalon Seuil	- Calibrador de cut-off
	- Grenzwert Kalibrator	- Οριακός ορός Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
	- Calibrador de cut-off	
CON +	- Controllo positivo	- Positive Control
	- Contrôle Positif	- Control Positivo
	- Positiv Kontrolle	- Θετικός ορός ελέγχου
	- Controlo positivo	
CON –	- Controllo negativo	- Negative Control
	- Contrôle Négatif	- Control Negativo
	- Negativ Kontrolle	- Αρνητικός ορός ελέγχου
	- Controlo negativo	
CAL	- Calibratore	- Calibrator
	- Etalon	- Calibrador
	- Kalibrator	- Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
	- Calibrador	
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	