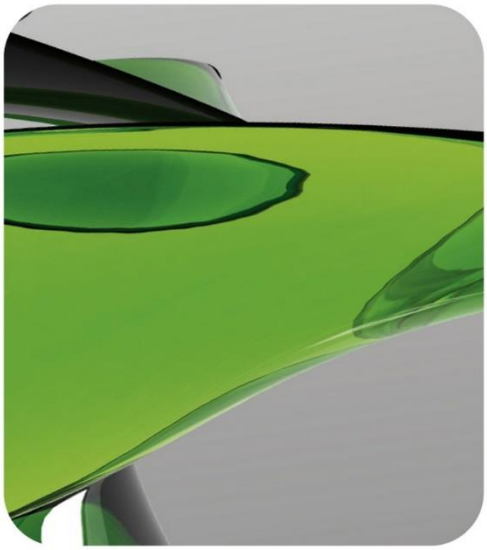
AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



# AESKULISA®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

# INSTRUCTION MANUAL

**AESKULISA® ASCA-A**

*Ref 3507*

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 ..... 7
9 Τεχνικά στοιχεία ..... 8
10 Στοιχεία Απόδοσης ..... 8
11 Διάθεση ..... 9
12 Βιβλιογραφία ..... 9
13 Ρυθμιστικά σύμβολα ..... 11



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®* ASCA-A** είναι μία Ενζυμοανοσολογική μέθοδος στερεής φάσης (ELISA) που περιέχει υψηλής καθαρότητας μαννάνη για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων έναντι του μύκητα Saccharomyces cerevisiae (ASCA) στον ανθρώπινο ορό. Τα ASCA αναγνωρίζουν ειδικά τη μαννάνη, η οποία είναι συστατικό στοιχείο του εξωτερικού κυτταρικού τοιχώματος των ζυμομυκήτων.
Η δοκιμασία έχει υψηλή ειδικότητα και είναι ευαίσθητη για τη νόσο του Crohn.

# 2 Κλινική εφαρμογή και αρχές της μεθόδου

Η νόσος του Crohn και η ελκώδης κολίτιδα αποτελούν τις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντερικές νόσους (ΙΦΕΝ), χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους του λεπτού και/ ή του παχέος εντέρου, οι οποίες εκδηλώνουν φλεγμονές ή έλκη. Η αιτιολογία των ΙΦΕΝ μέχρι σήμερα, είναι ακόμη άγνωστη, συζητιέται ωστόσο η συμμετοχή γενετικών παραγόντων και λοιμώξεων.
Στη νόσο του Crohn προσβάλλονται όσο το λεπτό, τόσο και το παχύ έντερο από τη φλεγμονή, ενώ στην ελκώδη κολίτιδα η φλεγμονή παραμένει περιορισμένη στο παχύ έντερο. Εφόσον μέχρι τώρα δεν υπήρχαν διαθέσιμοι δείκτες ορού, η διαφοροδιάγνωση γινόταν μέσω ενδοσκόπησης και/ ή ακτινολογικών εξετάσεων του λεπτού και του παχέος εντέρου. Αν και οι δύο ασθένειες παρουσιάζουν κοινά συμπτώματα, υπάρχουν βασικές διαφορές όσον αφορά την εξέλιξη της νόσου, τις επιπλοκές και τη θεραπεία τους, ιδιαιτέρως όταν τίθεται θέμα απόφασης διεξαγωγής χειρουργικής επέμβασης. Συνεπώς, η σίγουρη διαφοροδιάγνωση των δύο ασθενειών είναι πολύ σημαντική για τη θεραπεία. Τη σίγουρη διαφοροδιάγνωση επιβαρύνει το γεγονός ότι με τις έως τώρα χρησιμοποιούμενες μεθόδους, περίπου το 5-10% των ασθενών δεν μπορεί να καταχωρηθεί με βεβαιότητα σε μία από τις δύο ασθένειες, οι περιπτώσεις αυτές χαρακτηρίζονται ως «ενδιάμεση κολίτιδα» (Colitis indeterminata).
Τα ASCA περιγράφηκαν ως ειδικοί δείκτες για τη νόσο του Crohn και διαπιστώθηκαν με μία συχνότητα 68% σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο. Η αναγνώριση της μανάννης ως αντιγόνο – στόχο καθιστά δυνατή την διαπίστωση των ASCA μέσω του ELISA. Η μανάννη είναι ένας υδατάνθρακας πλούσιος σε μανόζη, που βρίσκεται στο εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα των ζυμομυκήτων.
Το ASCA, ως πρώτος διαθέσιμος δείκτης ορού, παριστάνει μία υψηλής ειδικότητας και συνεπώς σημαντική παράμετρο στη διάγνωση των χρόνιων – φλεγμονωδών εντερικών παθήσεων. Επιπλέον, τα αντισώματα έναντι του S. cerevisiae λόγω της «προφητικής» τους αξίας είναι μία εξαιρετικώς κατάλληλη παράμετρο για την ανίχνευση και παρακολούθηση της ασθένειας σε ομάδες υψηλού κινδύνου.

**Αρχές της δοκιμασίας**
Τα διαλυμένα 1:101 δείγματα ορού επωάζονται στις μικροπλάκες, οι οποίες είναι επικαλυμμένες με το ειδικό αντιγόνο. Κατά τη διάρκεια της επώασης συνδέονται τα ειδικά αντισώματα από τον ορό των ασθενών, εάν αυτά υπάρχουν, με το αντιγόνο που βρίσκεται στην πλάκα, τα μη συνδεμένα στοιχεία του ορού απομακρύνονται στο επόμενο βήμα πλύσης. Έπειτα προσθέτονται αντι-ανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες, οι οποίες είναι συζευγμένες με υπεροξειδάση από ραφανίδα (σύζευγμα). Κατά τη διάρκεια μίας επώασης, το σύζευγμα (συζευγμένες ανοσοσφαιρίνες) συνδέεται με το σύμπλοκο αντιγόνου – αντισώματος που σχηματίστηκε πριν, οι μη συζευγμένες ανοσοσφαιρίνες απομακρύνονται στο επόμενο βήμα πλύσης. Η διαπίστωση των συνδεμένων αντισωμάτων πραγματοποιείται με ενζυματική χρωστική αντίδραση (μπλε) του υποστρώματος, η οποία αναστέλλεται με διαλυμένο οξύ (αλλαγή χρώσης σε κίτρινο). Ο βαθμός σχηματισμού χρώματος από το χρωμογόνο εξαρτάται από την ποσότητα συζεύγματος που βρίσκεται συνδεδεμένη με το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος και έτσι είναι ανάλογος προς την αρχική συγκέντρωση των αντίστοιχων αντισωμάτων στο δείγμα 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<br>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<br>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) |
| Αντιδραστήριο βαθμονόμησης οριακής τιμής | 1 x 1,5ml | Μπλε | Κίτρινο | υλικού βαθμονόμησης (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 ΠΟΣΟΤΙΚΉ ερμηνεία

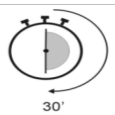
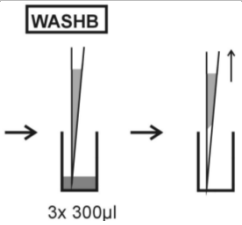
| | 1 | 2 | 3 | 4.. |
|---|---|---|---|---|
| **A** | Cal A | Cal E | P1 | |
| **B** | Cal A | Cal E | P1 | |
| **C** | Cal B | Cal F | P2 | |
| **D** | Cal B | Cal F | P2 | |
| **E** | Cal C | PC | P3 | |
| **F** | Cal C | PC | P3 | |
| **G** | Cal D | NC | … | |
| **H** | Cal D | NC | … | |

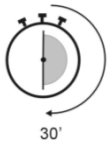
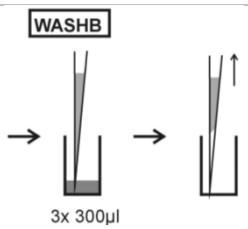
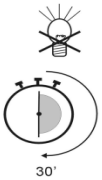
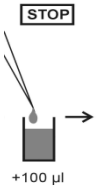
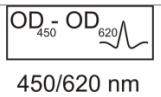
Για ΠΟΙΟΤΙΚΉ ερμηνεία

| | 1 | 2 | 3 | 4... |
|---|---|---|---|---|
| **A** | NC | P2 | | |
| **B** | NC | P2 | | |
| **C** | CC | P3 | | |
| **D** | CC | P3 | | |
| **E** | PC | … | | |
| **F** | PC | … | | |
| **G** | P1 | … | | |
| **H** | P1 | … | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 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 | CC: cut-off calibrator | 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:<br>a. Αντιδραστήρια βαθμονόμησης (CAL.A έως CAL.F) για *ΠΟΣΟΤΙΚΗ* ερμηνεία ή<br>b. Αντιδραστήριο βαθμονόμησης οριακής τιμής (CC) για *ΠΟΙΟΤΙΚΗ* ερμηνεία<br>Επίσης, βάζετε από 100 µl από καθένα από τα παρακάτω:<br>• Αρνητικός ορός ελέγχου (NC) και θετικός ορός ελέγχου (PC) καθώς και<br>• Διαλυμένο ορό ασθενών (P1, P2...) |
| 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). |
| | 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 και ποιοτική ερμηνεία

Ο **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 | Απροσδιόριστα | Θετικά αποτελέσματα |
|---|---|---|
| < 12 U/ml | 12 - 18 U/ml | >18 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 | 0.032 | 2,8 |
| 3 U/ml | 0.152 | 2,6 |
| 10 U/ml | 0.281 | 1,2 |
| 30 U/ml | 0.646 | 2,4 |
| 100 U/ml | 1.214 | 1,7 |
| 300 U/ml | 2.104 | 1,6 |

***Παράδειγμα υπολογισμού***

| Ασθενής | Επανάληψη (OD) | Μέσος όρος (OD) | Αποτέλεσμα (U/ml) |
|---|---|---|---|
| P 01 | 0,904/0,937 | 0.921 | 58,3 |
| P 02 | 0,564/0,551 | 0.558 | 25,9 |

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.

Για **ποιοτική αξιολόγηση** διαβάστε την οπτική πυκνότητα του μάρτυρα αποκοπής (cut-off calibrator) και την αντίστοιχη των δειγμάτων ασθενών. Συγκρίνετε την οπτική πυκνότητα των δειγμάτων με αυτή του μάρτυρα. Για την ποιοτική αξιολόγηση προτείνεται να θεωρούνται τα δείγματα 20% γύρω από την τιμή του μάρτυρα σαν απροσδιόριστα. Ολα τα δείγματα με υψηλότερες τιμές θεωρούνται θετικά, δείγματα με χαμηλότερες τιμές αρνητικά.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Αρνητικό:** | | **$OD_{ασθενή}$** | **<** | **$0.8 \times OD_{cut\text{-}off}$** | | |
| **Απροσδιόριστα:** | **$0.8 \times$** | **$OD_{cut\text{-}off}$** | **≤** | **$OD_{ασθενή}$** | **≤** | **$1.2 \times OD_{cut\text{-}off}$** |
| **Θετικό:** | | **$OD_{ασθενή}$** | **>** | **$1.2 \times OD_{cut\text{-}off}$** | | |

# 9 Τεχνικά στοιχεία

| | |
|---|---|
| Υλικό δειγμάτων: | Ορός |
| Όγκος δειγμάτων: | 10 µl ορός για αραίωση 1:101 με 1x ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων |
| Ολικός χρόνος επώασης: | 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου 20-32 °C/68-89,6 °F |
| Περιοχή μέτρησης: | 0-300 U/ml |
| Αναλυτική Ευαισθησία: | 2,3 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 Εύρος φυσιολογικών τιμών

Οροί αίματος υγιών δοτών υποβλήθηκαν στην ανοσολογική δοκιμασία ***AESKULISA®* ASCA-A** και από τα αποτελέσματα προέκυψε η ακόλουθη κατανομή:

| Αριθμός δειγμάτων | αρνητικά | οριακά | θετικά |
|---|---|---|---|
| 298 | 195 (65,4 %) | 24 (8,1 %) | 69 (23,2 %) |

Συνιστούμε, επίσης, κάθε εργαστήριο να καθορίσει το δικό του εύρος φυσιολογικών τιμών.

## 10.2 Ακρίβεια

Η ακρίβεια των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ανοσολογική δοκιμασία ***AESKULISA®* ASCA-A**, REF 3507 αξιολογήθηκε με βάση τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας καθώς και της διακύμανσης στις αναλύσεις πολλών δειγμάτων διαφορετικών δραστηριοτήτων αντισωμάτων.

| Ταυτότητα δείγματος | Επαναληψιμότητα | | Παραγωγιμότητα | | Ακρίβεια | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Μέσος όρος (U/ml) | CV | Μέσος όρος (U/ml) | CV | Μέσος όρος (U/ml) | CV |
| Δείγμα 1 | 11,0 | 17,4 % | 9,7 | 15,0 % | 9,7 | 6,6 % |
| Δείγμα 2 | 36,8 | 8,9 % | 35,0 | 11,8 % | 35,0 | 5,7 % |
| Δείγμα 3 | 57,7 | 5,0 % | 57,4 | 9,9 % | 57,4 | 4,2 % |
| Δείγμα 4 | 93,3 | 9,3 % | 92,1 | 9,1 % | 92,1 | 5,1 % |
| Δείγμα 5 | 168,8 | 9,7 % | 168,4 | 9,6 % | 168,4 | 4,1 % |
| Δείγμα 6 | 180,6 | 9,2 % | 179,3 | 9,6 % | 179,3 | 4,0 % |

## 10.3 Ευαισθησία και εξειδίκευση
## Αναλυτική ευαισθησία

Η αναλυτική ευαισθησία έχει αξιολογηθεί με βάση πολλαπλές αναλύσεις δειγμάτων με ρυθμιστικό διάλυμα και χαμηλών θετικών δειγμάτων και με υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης.
Για τη δοκιμασία ***AESKULISA®* ASCA-A**, REF 3507 έχει καθοριστεί ένα **όριο ανίχνευσης 2,3 U/ml** .

## 10.4 Γραμμικότητα

Τρεις οροί αίματος που καλύπτουν το συνολικό εύρος της δοκιμασίας αραιώθηκαν σε σειρά με ένα αρνητικό δείγμα ορού αίματος. Οι τιμές των ξεχωριστών διαλυμάτων που προέκυψαν από τη μέτρηση και οι αναμενόμενες τιμές χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό μιας γραμμικής παλινδρόμησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ελέγχου γραμμικότητας προσδιορίστηκε ένα εύρος 3 - 300 U/ml για τη δοκιμασία ***AESKULISA®* ASCA-A**.

## 10.5 Βαθμονόμηση

Λόγω της έλλειψης διεθνούς αναφοράς βαθμονόμησης, αυτή η μέθοδος βαθμονομείται σε αυθαίρετες μονάδες (U/ml).

# 11 Διάθεση

Παρακολουθήστε τις σχετικές κανονιστικές απαιτήσεις!

# 12 Βιβλιογραφία

**1. Seibold F, Stich O, Hufnagel R, Kamil S, Scheurlen M (2001).**
*Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in inflammatory bowel disease: a family study.*
Scand J Gastroenterol 36: 196-201.

**2. Sendid B, Colombel JF, Jacquinot PM et al. (1996).**
*Specific antibody response to pligomannosidic epitopes in Crohn`s disease.*
Clin Diagn Lab Immunol 3: 219-226.

**3. Giaffer MH, Clark A, Holdsworth CD (1992).**
*Antibodies to Saccharomyces cerevisiae in patients with Crohn`s disease and their possible pathogenic importance.*
Gut 33: 1071-1075.

**4. Bernstein CN, Blanchard JC, Rawsthorne P and Wadja A (1999).**
*Epidemiology of Crohn‘s disease in a central canadian province: a population-based study.*
Am. J. Epidemiol. 149(10): 916-924.

**5. Glas J, Torok HP, Vilsmaier F, Herbinger KH, Hoelscher M, Folwaczny C (2002)**
*Anti-saccharomyces cerevisiae antibodies in patients with inflammatory bowel disease and their first-degree relatives: potential clinical value.*
Digestion. 66(3):173-177.

**6. Peters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P (2001)**
*Diagnostic value of Anti-Saccharomyces Cervisiae and antineutrophil cytoplasmatic autoanti bodies in inflamatory bowel disease.*
Am. J. Gastroenterol. 96: 730-734

**7. Sandborn WJ. (2004)**
*Serologic markers in inflammatory bowel disease: state of the art.*
Rev. Gastroenterol. Disord. 4(4):167-74

**8. Rutgeerts P and Vermeire S (1998)**
*Clinical value of the detection of antibodies in the serum for diagnosis and treatment of inflamm- atory bowel disease.*
Gastroenterol. 115: 1006-1022

**9. Klebl FH, Bataille F, Hofstädter F, Herfarth H, Schölmerich J, Rogler G (2004)**
*Optimising the diagnostic value of Anti-Saccharomyces Cerevisiae-antibodies (ASCA) in Crohn's disease.*
Int. J. Colorectal Dis. 19: 319-24

**10. Lawrance IC, Murray K, Hall A, Sung JJ, Leong R. (2004)**
*A prospective comparative study of ASCA and pANCA in Chinese and Caucasian IBD patients.*
Am. J. Gastroenterol. 99: 2186-94

**11. Damoiseaux JG, Bouten B, Linders AM, Austen J, Roozendaal C, Russel MG, Forget PP,Tervaert JW. (2002)**
*Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies for inflammatory bowel disease: high prevalence in patients with celiac disease.*
J. Clin. Immunol. 22: 281-87

**12. Muratori P, Muratori L, Guidi M, Maccariello S, Pappas G, Ferrari R, Gionchetti P, Campieri M, Bianchi FB. (2003)**
*Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) and autoimmune liver diseases.*
Clin.Exp.Immunol. 132: 473 – 476

**13. Sutton CL, Yang H, Li Z, Rotter JI, Targan SR, and Braun J. (2003)**
*Familial expression of anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in affected and un-affected relatives of patients with Crohn's disease.*
Gut 46: 58 - 63.

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

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

# 13 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 | |